

ISSN 0206-5657

**ВІСНИК**  
ЛЬВІВСЬКОГО  
УНІВЕРСИТЕТУ

СЕРІЯ БІОЛОГІЧНА

Випуск 82

2020

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

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

**Issue 82** | **Випуск 82**

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

2020

Друкується за ухвалою Вченої ради  
Львівського національного університету  
імені Івана Франка  
Протокол №88/9 від 30 вересня 2020 р.

Свідоцтво про державну реєстрацію серія  
КВ №14810-3581Р від 28 жовтня 2008 р.,  
перереєстровано як фахове видання України  
(наказ МОН №528 від 12.05.2015 р.). Видання  
включене до Thomson 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 *А. Бабський*; чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук *[М. Козловський]* (Інститут екології Карпат НАН України); канд. біол. наук, доц. *З. Мамчур*; д-р біол. наук, проф. *Н. Сибірна*; д-р біол. наук, проф. *Д. Санагурський*; канд. біол. наук, проф. *С. Гнатуш*; д-р біол. наук, проф. *Л. Тасенкевич*; д-р біол. наук, проф. *О. Терек*; д-р біол. наук, проф. *Й. Царик*; д-р біол. наук, проф. *Ю. Чорнобай* (Державний природознавчий музей НАН України); д-р біол. наук, проф. *Г. Антоняк*; д-р біол. наук *Б. Осташ*, канд. біол. наук, доц. *В. Гончаренко*; канд. біол. наук *М. Ватаманюк*; канд. біол. наук *О. Ватаманюк*; д-р біол. наук, проф. *М. Долба*; д-р біол. наук *А. Лужецький*; канд. біол. наук, проф. *І. Медина*.

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, Hrushevskyi St.  
Lviv 79005, Ukraine  
tel. (032) 239-47-86

E-mail: [biovisnyk@lnu.edu.ua](mailto:biovisnyk@lnu.edu.ua)

<http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/index>

<https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.82>

Редактор: Л. СІДЛОВИЧ

Комп'ютерна верстка: В. ДЕМЧУК

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

Формат 70x100/<sub>16</sub>  
Ум. друк. арк. 15,3  
Тираж 100 прим. Зам.

© Львівський національний університет  
імені Івана Франка, 2020

ОГЛЯДИ

УДК: 577.2: 633.34

<https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.82.01>

**МОЛЕКУЛЯРНА БУДОВА *E*-ГЕНІВ СОЇ ТА ЇХНІ  
ФУНКЦІОНАЛЬНІ МУТАЦІЇ**

**О. Охримович\*, С. Чеботар, Г. Чеботар, Д. Жарікова**

*Одеський національний університет імені І. І. Мечникова  
Шампанський провулок, 2, Одеса 65058, Україна  
e-mail: okhrymovych.o.v@ukr.net*

Розглянуто особливості молекулярної структури відомих *E*-локусів (early maturity) та їхньої участі в передачі сигналів до зацвітання рослин, залежно від чутливості генотипів сої до фотоперіоду. Ці локуси сприяють адаптації рослин до широкого діапазону природних умов за рахунок мутацій у генах і QTL, що контролюють час цвітіння. На молекулярному рівні *E*-гени суттєво різняться за структурними особливостями, походженням і функціями. Розміри ідентифікованих генів коливаються від одного екзону 525 п.н., кодуючого транскрипційний фактор (*E1*), до 14 екзонів і близько 20 т.п.н. для гена *GmG1a* (*E2*). Серед функціональних мутацій, які в більшості призводять до часткової або повної втрати функції, наявні одонуклеотидні заміни або делеції, вставки послідовностей, схожих на транспозони, які, у свою чергу, можуть призводити до заміни амінокислот у білку, до зсуву рамки зчитування, до появи передчасного стоп-кодона. Продукти *E*-генів є рецепторами сигналів, що надходять із навколишнього середовища, та беруть участь у сигнальних шляхах, які контролюють фотоперіод.

Загальний вплив і взаємодії між *E*-генами наразі у повному обсязі не вивчено, молекулярну будову досліджено лише для *E1-E4*, для них запропоновано генетичну мережу взаємодій, водночас п'ять локусів (*E6-E9* та *E11*) є лише картованими на хромосомах сої, а наявність окремого локусу *E5* досі не доведено. У восьми з 11 *E*-локусів домінуючий алель спричиняє пізні зацвітання. Відомо про плеiotропний вплив алелів *E*-генів на урожайність, висоту рослини, стресостійкість, реакцію на знижені температури. Знання алельного стану лише окремих із 11 генів є недостатнім. Необхідне комплексне розуміння функціонування генетичної мережі фотоперіодичної відповіді, тому що *E*-гени є генетичними детермінантами, на які можна орієнтуватися під час селекції та створення нових сортів із запрограмованими темпами розвитку.

*Ключові слова:* соя, *E*-гени, фотоперіодична чутливість, строки стиглості

Час цвітіння та час стиглості є важливими кількісними ознаками [1], що свідчать про географічну адаптацію, якість насіння й урожайність короткоденних рослин сої [9]. Рослини *Glycine max* L. можуть зростати в широкому діапазоні широт – щонайменше, від 50° північної до 35° південної широти [6]. Така широка адаптаційна здатність досягається за рахунок мутацій у генах і QTL, що контролюють час цвітіння [3].

У сої локуси, які відповідають за фотоперіодичну чутливість, позначаються як *E*-локуси (early maturity), вони детермінують строки стиглості цієї важливої сільськогосподарської культури. Наразі було охарактеризовано локуси *E1 – E11*. У всіх локусів, окрім *E6*, *E9* та *E11*, домінуючий алель відповідає за пізні зацвітання. Локуси *E1*, *E3* та *E4* беруть участь у відповіді на зміну фотоперіоду [28]. Локус *E1* контролює експресію генів *GmFT*, що контролюють час зацвітання (Flowering time) у *Glycine max* L. Зокрема, визначають

*GmFT2a* та *GmFT5a*, що є частиною сигнального шляху фітохром А. За умов довгого дня експресія *E1* активується, що, у свою чергу, викликає супресію генів *GmFT* та пізнє зацвітання. Альтернативні варіанти генів *E3* та *E4*, що призводять до втрати генами функції, впливають на *E1*, знижуючи його експресію. Це, відповідно, призводить до більшої експресії генів *GmFT* і, як результат, до більш раннього цвітіння рослини незалежно від довжини дня (рис. 1) [28]. Проте запропонована [28] модель генної мережі жодним чином не відображає впливу інших *E*-генів (*E2*, *E6-11*) на час зацвітання сої.

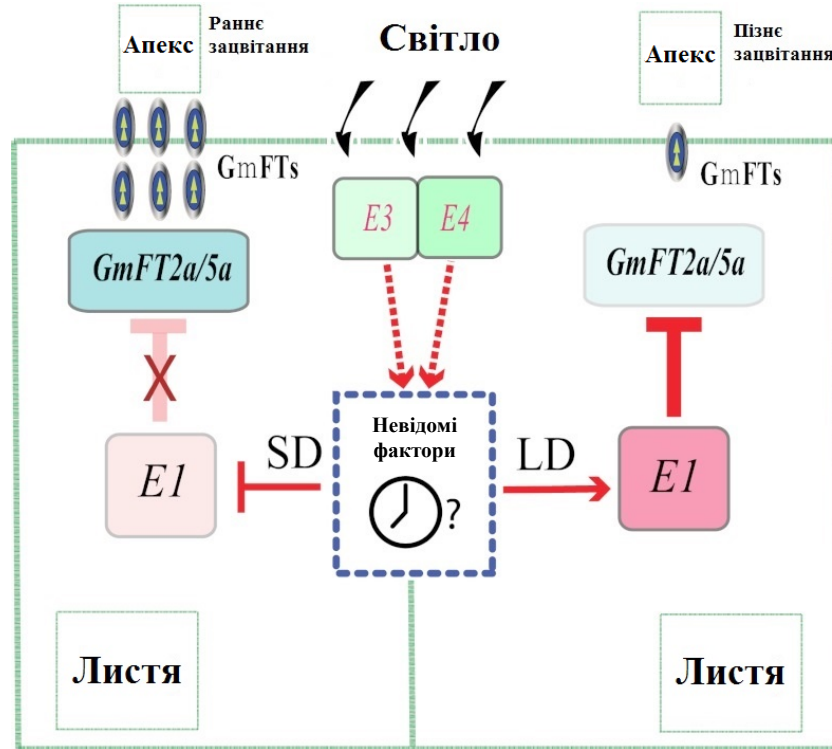


Рис. 1. Генна мережа регуляції часу цвітіння у сої [28]. Стрілками показано стимуляцію експресії генів; Т-подібні символи вказують на зниження експресії генів; Х показує відміну гальмування / стимуляції; SD – коротка тривалість дня, LD – довга тривалість дня

Наша робота присвячена аналізу даних сучасної літератури щодо молекулярної структури генів *E* та їхньої участі в передачі сигналів до зацвітання рослин, залежно від чутливості генотипів сої до фотоперіоду, тому що *E*-гени є активними компонентами сигнальної системи чутливості до фотоперіоду, а білки – продукти зазначених генів – є рецепторами сигналів, що надходять із навколишнього середовища.

#### Молекулярна будова *E*-генів і функціональні мутації

Локус *E1* ідентифіковано за допомогою методу позиційного клонування [28] та визначено у регіоні розміром 17,4 т.п.н. на хромосомі 6 сої в перицентромерній області [21]. Цей регіон є багатим на повтори та містить мало функціональних генів [28]. Ген *E1* розміром 525 п.н. складається з одного екзону та не містить інтронів (рис. 2) [28]. *E1* кодує транскрипційний фактор, з альтернативними варіантами *el-as*, *el-fs*, *el-nl*, *el-re* та *el-p*. Для алеля *el-as* характерна наявність місенс-мутації у 44 положенні, що призводить до заміни аргініну

на треонін (*el-as*) (рис. 2). Делеція аденіну в положенні 49 алеля *el-fs* призводить до зсуву рамки зчитування й утворення передчасного стоп-кодона в положенні 124-го нуклеотиду (рис. 2). У рослин із нуль-алелем (*el-nl*) видалено ділянку 130 т.п.н., у якій міститься ген (рис. 2) [28].

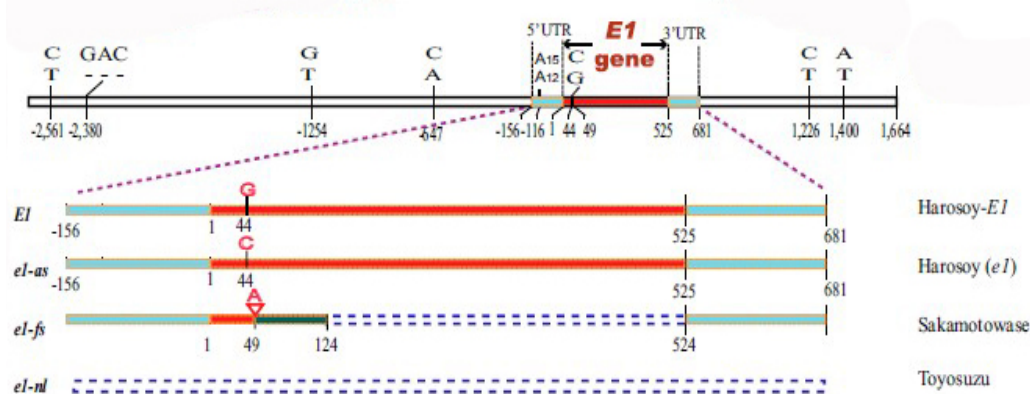


Рис. 2. Розташування та схематична будова гена *E1* згідно з результатами позиційного клонування [28]. Синій і червоний кольори позначають відповідно НТР та області кодування *E1*. Показано відмінності в молекулярній структурі алелів *E1* (клонованого з лінії Harosoy-*E1*), *el-as* (Harosoy-*el*), *el-fs* (сорту Sakamotowase), *el-nl* (сорту Toyosuzu)

В умовах Японії (Мацуда, 35°78' північної широти, 139°90' східної довготи) рослини сої з мутаціями *el-as*, *el-fs*, *el-nl* зацвітали раніше, ніж рослини дикого типу. Так, рослини-носії *el-as* зацвітали на 50-ту добу, а рослини з *el-fs* та *el-nl* на 30-ту добу після проростання, в той час як рослини з алелем дикого типу зацвітали на 70-ту добу. Якщо домінуючий алель *E1* вважається повністю функціональним алелем, алель *el-as* є частково функціональним, а алелі *el-fs* та *el-nl* є, ймовірно, нефункціональними [28]. Нещодавно було описано алелі *el-re* та *el-p*, які мають поліморфні зміни за межами генної області, що безпосередньо не впливають на структуру білка. Алель *el-re* має довгий диспергований повтор (LINE – long interspersed nuclear element) – це вставка транспозону в промоторну область *E1*, тоді як *el-p* має змінену область перед 5'-кінцем [24].

Ген *E1* кодує білок (транскрипційний фактор), який містить імовірний двосторонній сигнал ядерної локалізації та регіон, що віддалено пов'язаний зі специфічним для рослин доменом В3. Надродина В3 охоплює багато добре охарактеризованих родин з різноманітними функціями, пов'язаними з ростом і розвитком рослин [22]. Наприклад, ARF (фактори відповіді на ауксин), ABI3 (фактор нечутливості до абсцизової кислоти) у арабідопсису. Домен В3 відповідає за фактори транскрипції у більш ніж 40 видів рослин. Він складається зі 100–120 залишків, включає сім бета-ланцюгів і дві альфа-спіралі, які утворюють ДНК-зв'язуючу білкову частину [29]. Білок, що кодується *E1* геном, лише на 21–27 % ідентичний до В3 домену, знайденого в багатьох транскрипційних факторах різних видів рослин [16]. Він вважається супресором експресії генів *GmPhyA3* та *GmPhyA2*, які є ортологами локусу арабідопсису під назвою *FLOWERING TIME (FT)* [11]. Гени *GmPhyA3* та *GmPhyA2* регулюються локусами *E3* та *E4* [28]. С-кінцевий регіон амінокислотної послідовності (55–174) білка, що кодується геном *E1*, несе мінімальний В3 домен, необхідний для контакту з ДНК [22, 29]. Характеристики, виявлені за допомогою досліджень *in silico*, вказують на те, що білок, який кодується геном *E1*, може функціонувати у зв'язуванні ДНК або як фактор

транскрипції та містить два основних домени (KKRK і RRR), що розділені 12 амінокислотними залишками [28].

Було показано, що експресія гена *E1* є найбільшою у листках рослин сої, які повністю розпустилися [28]. Протягом дня експресія *E1* змінюється поступово, вночі вона зменшується і досягає мінімуму перед світанком [28].

Вважається, що гени часу цвітіння, як правило, мають плейотропну дію на такі важливі ознаки, як урожайність, висота рослини та стресостійкість. Як було відмічено вище, QTL, асоційовані з генетичними локусами, що детермінують підвищену урожайність і реакцію на знижені температури (менше 17 °C), тісно пов'язані з локусом *E1*. Однак, на думку Funatsuki et al. [8], подальші дослідження дають змогу виявити, чи є це впливом самого *E1* гена, чи ж незалежних сусідніх генів.

У локусі сої *E2* за допомогою позиційного клонування на хромосомі 10 виявлено ген *GmGla* (*Glyma10g36600*) – ортолог гена арабідопсису *GIGANTEA* [27]. *GmGla* кодує білок *GIGANTEA* (GI), що відіграє важливу роль у цвітінні завдяки контролю рівня експресії м-РНК [12, 18].

Кодуюча ділянка гена розміром 20 т.п.н. містить 14 екзонів (рис. 3,А) [27]. До алельних варіацій локусу *E2* належить нонсенс-мутація (*e2-ns* або *ft2*) – зміна А на Т в положенні 1561, яка вводить передчасний стоп-кодон (рис. 3, Б). До цього локусу розроблено алель-специфічний маркер [27]. У мутантній лінії *E2-mut* делеція нуклеотидів у 10-му екзоні призводила до трансляції усіченого білка GI. Такі рослини характеризувалися більш ранніми строками цвітіння у природних умовах [27].

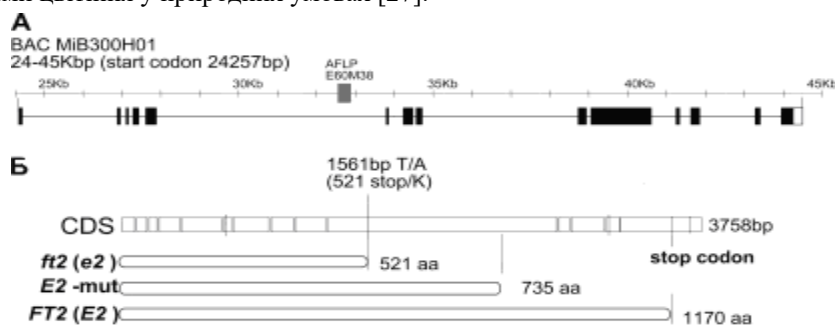


Рис. 3. Структура гена *GmGla* та положення мутацій: А – схематична структура гена *GmGla* [27]. Екзони позначені прямокутниками. Б – відмінності в молекулярній структурі алелів *ft2*, *E2-mut*, *FT2* (*E2*)

У дослідженнях [27], проведених у Японії, різниця між близько ізогенними лініями у часі цвітіння була достовірною ( $P < 0,001$ ) з  $57,5 \pm 1,72$  добу ( $n=168$ ) для рецесивного алеля та  $67,6 \pm 1,56$  ( $n=210$ ) доби для домінантного алеля. Тобто генотип *e2/e2* спричиняв раннє цвітіння, викликаючи експресію *GmFT2a*, що є гомологом флоригену в сої. Ці результати вказують на те, що функції *GI* у цвітінні зберігаються в сої, а мутації з втратою функцій гена *GI* можуть бути корисними ресурсами для адаптації рослин зі складними геномами, такими як соя, до широкого кола географічних регіонів [27].

У локусі *E3*, який локалізовано на хромосомі 19 геному сої, методом позиційного клонування, було визначено наявність гена фітохром А сої – *GmPhyA3* [26], який містить 4 екзони. Добре відомо, що мутації гена фітохром А впливають на чутливість рослин до

фотоперіоду [26]. Білок, що кодується геном *GmPhyA3*, є фоторецептором шляху цвітіння, який затримує цвітіння в умовах довгого дня з високою інтенсивністю червоного (R, довжина хвилі 625–740 нм) / далеко-червоного світла (FR, довжина хвилі 700-780 нм) [15, 26].

У дослідженнях [26], проведених у Японії, різниця за часом цвітіння була істотною ( $P < 0,001$ ) між близько-ізогенними лініями, що різнилися алелями *e3* та *E3*. Лінії з рецесивним алелем *e3* зацвітали на  $58,2 \pm 1,55$  (n=47) добу, а лінії з домінантним алелем *E3* – на  $69,1 \pm 1,21$  добу (n=70).

Одна з алельних форм (*GmPhyA3-Mo*) локуса *E3* містить однунулеотидну несинонімічну амінокислотну заміну (гліцин на аргінін) у третьому екзоні та велику інсерцію у четвертому інтроні. Послідовність інсерції має довжину 2,5 т.п.н., а її частина дуже схожа на довгу кінцеву послідовність ретротранспозону, що кодує зворотну транскриптазу. Однак функціональне значення цієї вставки залишається незрозумілим [26]. У іншій алельній формі (*GmPhyA3-E3*) міститься велика інсерція, що теж схожа на послідовність ретротранспозонів. Рослини з цим алелем зацвітали на 15 днів раніше, порівняно з рослинами з алелем дикого типу (в експерименті рослини вирощували під штучним освітленням ртутною лампою). У третього алельного варіанта (*GmPhyA3-e3*) було детектовано велику делецію (13,33 т.п.н.) після третього екзона. Можливо, це призводить до експресії нефункціонального фітохрому, оскільки в нього було видалено гістидинкіназний домен, що відіграє важливу роль у передачі сигналу [26]. Структура гена *GmPhyA3* відображена на рис. 4.

У рису подвійні мутанти *phyA-phyB* та *phyA-phyC*, вирощені в природних умовах, проявили фенотип більш раннього зацвітання, а ефект *phyA* маскувався за наявності інших функціональних фоторецепторів. Ця епістатична взаємодія, що спостерігається у рису, може бути порівнянна з епістазом між локусами *FT1 (E1)* та *FT3 (E3)* у сої [26]. Більш того, ймовірно, що *GmPhyA3* ген набув здатності сприймати червоне світло в результаті субфункціоналізації після подвоєння геному в сої. Однак доказів цього немає, і для перевірки гіпотези необхідно більше експериментів [26].

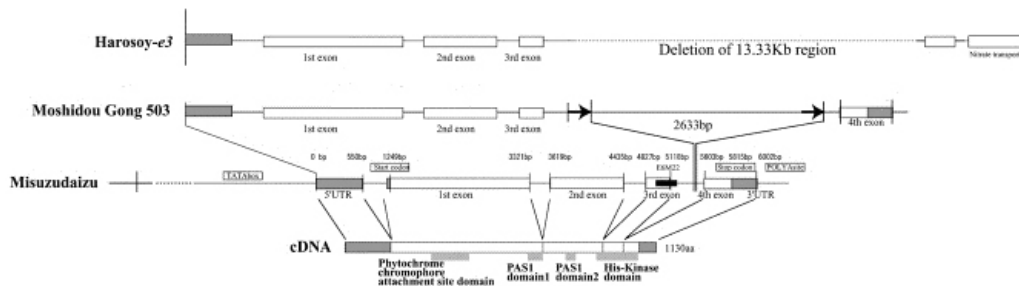


Рис. 4. Структура гена *GmPhyA3* згідно з [26]. Білі прямокутники, сірі прямокутники та горизонтальні лінії позначають відповідно екзони, НТР та інтрони; вказно позиції ТАТА-подібної послідовності, ініціаторного кодона та стоп-кодона. Видалену область, виявлену в *Harosoy-e3*, позначено пунктирною лінією. Цифри над алелем сорту *Misuzudaizu* вказують на нуклеотидну позицію від початкової точки транскрипції. Положення великої інсерції, що спостерігається в генотипі *Moshidou Gong 503*, позначене жирними стрілками, що вказують праворуч

У даний час інформація про фізіологічну активність білків фітохрому А сої та їхній взаємозв'язок з іншими продуктами генетичного годинника, а також про взаємодію з іншими білками сої, обмежена. Певною мірою високий рівень подібності між повторюваними



генами може перешкоджати аналізу функцій окремих генів *GmPhyA3*. Для з'ясування контролю за цвітінням сої необхідно виділити різні гени для асоційованих локусів і проаналізувати їхні функції та взаємодії [26].

У локусі *E4*, який міститься на 20-й хромосомі геному сої, наявний інший ген фітохрому А (*GmFT5a*), що містить 5 екзонів [15]. Він має 1 функціональний і 5 нефункціональних алелів [13], до яких розроблені алель-специфічні праймери [15]. У рецесивному алелі (*e4-SORE-1*) наявна інсерція 6238 п.н. – ця ділянка схожа на ретротранспозон (*Ty1/copia*) [22, 23] (рис. 5). Її наявність вносить передчасний стоп-кодон, який вкорочує 1123 амінокислотний протеїн до 237 амінокислот. Це порушує функцію *GmFT5a* гена щодо забезпечення нечутливості до довгих світлових днів із низьким співвідношенням R: FR [15]. Інших чотири дисфункціональних алелі – *e4-oto*, *e4-tsu*, *e4-kam* і *e4-kes* – мають по одному видаленому нуклеотиду в гено-кодуєчій області, що створює зміщення рамки зчитування та експресію усічених білків з 456 амінокислот, 759 амінокислот, 894 амінокислот і 979 амінокислот відповідно [15].

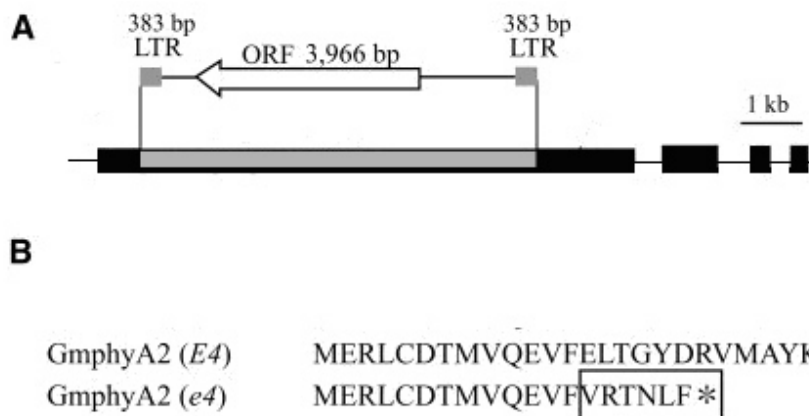


Рис. 5. Структура *GmphyA2* [15]: А – Суцільні чорні та сіре поля вказують на екзони і ретротранспозон *Ty1/copia*, відповідно. Біла стрілка вказує положення та напрямок відкритої рамки зчитування (ORF) в ретротранспозоні. В – Зміни у вирівняній послідовності амінокислот, які були викликані введенням ретротранспозону в *GmphyA2* для алеля *e4* порівняно з *E4*. Послідовність амінокислот ретротранспозона позначена квадратом. Зірочка вказує стоп-кодон [15]

Зв'язок між локусами *E3* та *E4* у сої може бути еквівалентним взаємодії *phyA* та *phyB* або *phyC* у рису [15]. Разом з алелем *e3* алель *e4*, швидше за все, обумовлює нечутливість до фотоперіоду в сої [15]. Скоріш за все, *GmFT2a* та *GmFT5a* – це гомеологи, що виникли внаслідок давніх хромосомних дублювань і перебудов у геномі сої [15].

**Локус *E5*** – на сьогодні немає чітко визначеної думки щодо підтвердженого його існування. Дослідники [17] припускали, що *E5* міститься на 10-й хромосомі геному сої у безпосередній близькості від гена *E2*, або ж *E5* є алелем локусу *E2*. *E5* показав часткове домінування, аналогічне повідомленому для алелів *E1* і *E2* [7], а також відрізнявся за своїм впливом від *E2* та *E1* на час цвітіння та стиглості [7].

У той же час [17] після дослідження близько-ізогенних ліній, створених на основі сортів Harosoy, Clark, а також японської лінії PI 80837, зробили висновок, що унікального гена *E5* немає, хоча існування нового локусу, який впливає на строки стиглості сої, не може бути виключеним.

**Локус E6.** Повідомлялося, що є ген, який відіграє важливу роль у подовженні ювенільної фази (Long juvenile) та затримує цвітіння в умовах короткого дня. Ознаку було виявлено у тропічних сортах сої, а подальше її введення в інші сорти зробило вирощування сої можливим навіть у регіонах із широтами нижче 15° південної широти [2].

Уперше дослідження нового локусу сої E6 було проведено в експериментах Cober, Voldeng [5], але остаточних доказів його існування та наявності алельних форм не зроблено. Комітет із генетики сої переглянув представлену інформацію та призначив символ E6 локусу, що визначає раннє цвітіння та стиглість, характерну для сорту Paraná, а e6 – гена, який визначає пізнє цвітіння і стиглість у сорту Paranagoiana та лінії SS-1 [2].

У подальших дослідженнях [2] доведено, що цей ген міститься на хромосомі 4 поряд із маркером HRM101. Також було показано, що гени E6 та E1 мають епістатичну взаємодію, причому E6 є супресором гена E1.

**Локус E7** визначає чутливість сої до фотоперіоду і є тісно зчепленим з E1. E7 міститься на хромосомі 6 геному сої, на відстані 6,0 сМ від локусу E1 [5]. Генотип E7/E7 призводить до більш пізнього цвітіння та стиглості, чутливості до тривалих фотоперіодів, тоді як e7/e7 призводить до раннього цвітіння та стиглості, меншої чутливості до довгого фотоперіоду [5]. Локус E7 містить діагностичний маркер Satt319 та займає ділянку 22,2 сМ між маркерами Satt100 і Satt469 [19]. На сьогодні даних щодо секвенування нуклеотидної послідовності цього гена та визначення його молекулярної структури немає, як і відомостей про будову та функціонування продукту цього гена, тому поки що неможливо визначити місце цього гена в генній мережі регуляції чутливості рослин сої до фотоперіоду.

**Локус E8** міститься в прецентромній області хромосоми 4 геному сої. Він специфічно відображається у групі зчеплення C1 між маркерами Sat 404 та Satt136. Генотип E8/E8 призводить до більш пізньої стиглості, тоді як e8/e8 – до дострокової стиглості [4]. Рослини сої з генотипами e8/e8 дозрівали на 9 і 6 днів раніше, що показано для сортів Maple Presto та Harosoy відповідно, за вирощування в умовах Оттави (Канада) [4]. На обох генетичних фонах лінії з рецесивним алелем e8 характеризувалися меншою кількістю насіння, давали близько 60 % врожаю та мали висоту рослин на рівні 80 % висоти ліній із домінантним алелем [4]. Подальші дослідження зі секвенування цільової ділянки та пошуку гена E8 і визначення його молекулярної будови дадуть змогу більш повно зрозуміти його роль у розвитку рослин сої.

**Локус E9** міститься на хромосомі 16 геному сої в регіоні довжиною ~245 т.п.н. Є два гени-претенденти, що можуть міститися в цьому локусі: GmFT2a та GmFT2b. Для точного визначення, який із цих генів є у локусі E9, необхідні подальші дослідження [10]. Дослідники [10], використовуючи лінії Hidaka 4, Tokei 780 та ранньоквітучі рекомбінантні інбредні лінії (RIL) TH85 та TH03, вирощені в умовах Китаю (Харбін, 45° 43' Північної широти, 126° 45' Східної довготи), визначили, що домінантний алель E9/E9 обумовлює раннє цвітіння та стиглість за умов довгого дня (LD).

**Локус E10** кодує T-подібний білок 8. Аналіз простих повторюваних послідовностей (SSR) та однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) визначив область на хромосомі 8 (група зчеплення A2), що корелює з цим новим локусом стиглості. Використовуючи функціональну геноміку сої (за допомогою аналізу PIPE) з подальшим застосуванням методів молекулярної біології, які включали секвенування, аналіз SNP та 2D дослідження РНК, було визначено, що FT4 є геном-кандидатом для локусу скоростиглості E10 [20]. Генотип E10/E10 призводить до пізньої, а e10/e10 – до ранньої стиглості. Скоріш за все, заміщення треоніну ізолейцином у 4-му екзоні призводить до зміни функції білка рослин із мутантним алелем [20].

**Локус *E11*** на хромосомі 7 також відіграє важливу роль у регуляції часу цвітіння та дозрівання у сої (рис. 6).

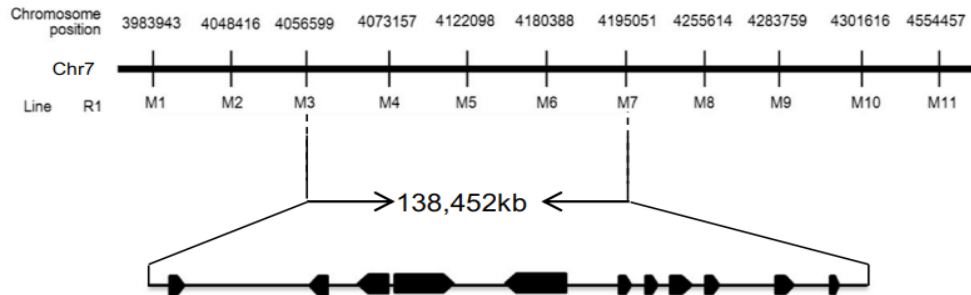


Рис. 6. Приблизне положення гена *E11* на хромосомі 7 у області довжиною близько 138 т.п.н. між маркерами M3 та M7. Жирними чорними стрілками вказано відкриті рамки читування в цільовому регіоні [25]

Дослідники [25] вважають, що цей локус може міститися між індел-маркерами (indel markers) *ID7079* та *ID7088* у області довжиною 138 т.п.н., в якій запропоновано гені-кандидати *Glyma.07 g4850*, *Glyma.07 g049000* чи *Glyma.07 g049100* [25].

Локус *E11* має подібну до локусу *E9* дію, його домінуючий алель викликає раннє зацвітання в умовах довгого дня [25].

#### Узагальнення

Таким чином, у роботі розглянуто й узагальнено особливості молекулярної структури відомих *E*-генів сої. Функціональні особливості зазначених генів впливають на час цвітіння рослин сої, що свідчить на користь їхньої участі у фотоперіод-сигнальних шляхах рослин. *E*-гени є генетичними детермінантами, на які можна орієнтуватися під час селекції та створення нових сортів із запрограмованими темпами розвитку. Водночас стає зрозумілим, що знання аельного стану лише окремих з 11 генів недостатньо. Необхідне комплексне розуміння функціонування генетичної мережі фотоперіодичної відповіді. Нещодавно опубліковані факти дають змогу створити часткову модель взаємодії досліджуваних генів, як, наприклад, у роботі Xia et al. [28]. За потрапляння світла на листову пластинку сигнал передається завдяки продуктам генів фітохромів *E3* та *E4*, проте в умовах короткого дня не відбувається активації експресії *E1*, що знімає репресію генів *GmFT*, які контролюють час зацвітання (Flowering time) у *Glycine max* L., та призводить до більш раннього цвітіння [28]. Продукти мутантних генів *E3* та *E4* через втрату функціональності призводять до змін на шляху передачі світлового сигналу, в результаті знижується рівень експресії транскрипційних факторів (*E1*) – супресорів *GmFT*, що призводить до більшої експресії генів *GmFT* і, як результат, до більш раннього цвітіння рослини незалежно від довжини світлового дня.

За вирощування рослин сої в Україні важливим для селекціонерів є створення саме ранньостиглих сортів, що дає змогу більш інтенсивно використовувати сою як проміжну та повторну культуру.

Залишаються незрозумілими вплив інших *E*-генів та їхня участь у формуванні чутливості до фотоперіоду і скорочення часу до цвітіння. Гени *E6-E9* та *E11* на сьогодні тільки картовані на хромосомах сої, тоді як існування *E5* досі викликає сумніви. Беззаперечно складність кодування часу і тривалості цвітіння й довжини вегетаційного періоду потребує від дослідників подальших робіт зі секвенування генів і визначення їхньої молекулярної структури та формування на основі отриманих даних прототипів генних мереж взаємодії *E*-генів один з одним або з іншими генами.

Залишається багато невирішених питань. Так, на сьогодні є інформація про молекулярну будову лише генів *E1-E4*. Для *E7*, наприклад, відома приблизна локалізація на хромосомі, проте наявність мутацій або білкова структура залишаються невідомими, така ж ситуація спостерігається і для *E8*.

У той же час в дослідженнях українських зразків сої [30, 30] за допомогою маркерів до мікросателітних локусів, зчеплених з *E7*, простежується тенденція до більш частого трапляння саме домінантних алелів гена *E7* в українському генофонді, а не інших *E*-генів.

Отже, на сьогодні ще залишається багато питань, які стосуються вдосконалення наших уявлень про генетичні мережі, що контролюють час цвітіння у сої.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bernard R. L. Two major genes for time of flowering and maturity in soybeans // *Crop Science*. 1971. Vol. 11. P. 242–247.
2. Bonato E. R., Vello N. A. *E6*, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans // *Genet. Mol. Biol.* 1999. Vol. 22. P. 229–232.
3. Cao D., Takeshima R., Zhao C. et al. Molecular mechanisms of flowering under long days and stem growth habit in soybean // *J. Exp. Bot.* 2017. Vol. 68. N 8. P. 1873–1884
4. Cober E. R., Molnar S. J., Charette M., Voldeng H. D. A new locus for early maturity in soybean // *Crop Sci.* 2010. Vol. 50. P. 524–527.
5. Cober E. R., Voldeng H. D. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to *E1*, and *T* // *Crop Sci.* 2001. Vol. 41. N 3. P. 698–701.
6. Destro D., Carpentieri-Pipolo V., Kiihl R. A. S., Almeida L. A. Photoperiodism and genetic control of the long juvenile period in soybean: A review // *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2001. Vol. 1. P. 72–92.
7. Dissanayaka A., Rodriguez T. O., Di S. Quantitative trait locus mapping of soybean maturity gene *E5* // *Breed Sci.* 2016. Vol. 66. N 3. P. 407–415.
8. Funatsuki H., Kawaguchi K., Matsuba S., Sato Y., Ishimoto M. Mapping of QTL associated with chilling tolerance during reproductive growth in soybean // *Theor. Appl. Genet.* 2005. Vol. 111. P. 851–861.
9. Garner W. W., Allard H. A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants // *J. Agric. Res.* 1920. Vol. 18. P. 553–606.
10. Kong F., Nan H., Cao D. et al. New Dominant gene *E9* conditions early flowering and maturity in soybean // *Crop Science*. 2014. Vol. 54. P. 2529–2535.
11. Kong F.J., Liu B., Xia Z. Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 154. P. 1220–1231.
12. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Blankestijn-de Vries H. et al. Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis* // *Genetics*. 1998. Vol. 148. N 2. P. 885–892.
13. Langewisch T., Zhang H., Vincent R. et al. Major soybean maturity gene haplotypes revealed by SNPviz analysis of 72 sequenced soybean genomes // *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9. N 4. P. e94150.
14. Li X., Fang C., Xu M. et al. Quantitative trait locus mapping of soybean maturity gene *E6* // *Crop Science*. 2017. Vol. 57. N 5. P. 1–8.
15. Liu B., Kanazawa A., Matsumura H. et al. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of phytochrome *A* gene // *Genetics*. 2008. Vol. 180. P. 995–1007.

16. Lukashin A.V., Borodovsky M. GeneMark, new solutions for gene finding // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. N 4. P. 1107–1115.
17. McBlain B. A., Bernard R. L. Anewgene affecting the time of flowering maturity in soybeans // *J. Hered.* 1987. Vol. 178. P. 68–70.
18. Mizoguchi T., Wright L., Fujiwara S. et al. Distinct roles of *GIGANTEA* in promoting flowering and regulating circadian rhythms in Arabidopsis // *Plant Cell.* 2005. Vol. 17. N 8. P. 2255–2270.
19. Molnar S. J., Rai S., Charette M., Cober E. R. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to *E1*, *E3*, *E4*, and *E7* maturity genes in soybean // *Genome.* 2003. Vol. 46. P. 1010–1024.
20. Samanfar B., Molnar S. J., Charette M. et al. Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, *E10*, in soybean // *Theor. Appl. Genet.* 2017. Vol. 130. N 2. P. 377–390.
21. Schmutz J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean // *Nature.* 2010. Vol. 463. P. 178–183.
22. Swaminathan K., Peterson K., Jack T. The plant B3 superfamily // *Trends Plant Sci.* 2008. Vol. 13. N 12. P. 647–55.
23. Tsubokura Y., Matsumura H., Xu M. et al. Genetic variation in soybean at maturity locus *E4* is involved in adaptation to long days at high latitudes // *Agronomy.* 2013. Vol. 3. P. 117–134.
24. Tsubokura Y., Watanabe S., Xia Z. et al. Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean // *Ann. Bot.* 2014. Vol. 113. N 3. P. 429–441.
25. Wang F., Nan H., Chen L. et al. A new dominant locus, *E11*, controls early flowering time and maturity in soybean // *Mol. Breeding.* 2019. Vol. 39. P. 70.
26. Watanabe S., Hideshima R., Xia Z. Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3* // *Genetics.* 2009. Vol. 182. P. 1251–1262.
27. Watanabe S., Xia Z., Hideshima R. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering // *Genetics.* 2011. Vol. 188. P. 395–407.
28. Xia Z., Watanabe S., Yamada T. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering // *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 2012. Vol. 109. P. E2155–E2164.
29. Yamasaki K., Kigawa T., Inoue M. et al. Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1 // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16. N 12. P. 3448–3459.
30. Zharikova D. O., Chebotar G. O., Aksonova O. A., Chebotar S. V. Vyznachennia alelnoho stanu heniv *E1*, *E2*, *E3*, *E4* ta *E7* za dopomohoiu zcheplenykh z nymy mikrosatelitnykh lokusiv u sortiv soi suchasnoi selektsii // *Ekoloho-henetychni aspekty v selektsii polovykh kultur v umovakh zmin klimatu: Materialy mizhnarodnoi naukovy-praktychnoi konferentsii, prysviachenoi 90-richchiu z dnia narodzhennia henetyka, selektsionera, profesora M.M. Chekalina (18–19 kvitnia 2019 r.) / Poltavska derzhavna ahrarna akademiia. Poltava, 2019. P. 29.*
31. Zharikova D., Chebotar G., Aksonova E. et al. Polymorphism in SSR-loci associated with *E* genes in soybean mutant lines perspective for breeding // *Agricultural science and practice.* 2019. Vol. 6 (3). P. 45–55.

Стаття надійшла до редакції 09.01.20

прийнята до друку 18.02.20

---

**MOLECULAR STRUCTURE OF SOYBEAN *E*-GENES AND THEIR  
FUNCTIONAL MUTATIONS**

**O. Okhrymovych, S. Chebotar, G. Chebotar, D. Zharikova**

*Odesa National I. I. Mechnikov University  
Shampansky Lane, 2, Odesa 65058, Ukraine  
e-mail: okhrymovych.o.v@ukr.net*

In this review, we discuss features of the molecular structure of known *E*-loci (early maturity) and their involvement in signaling to plant flowering, depending on the sensitivity of soybean genotypes to the photoperiod. These loci contribute to the adaptation of plants to a wide range of natural conditions due to mutations in genes and QTL that control flowering time. At the molecular level, *E*-genes are significantly different in structural features, origin and function. The length of the identified genes range from one exon to 525 bp encoding the transcription factor (*E1*), up to 14 exons and about 20 kb for the *GmGla* gene (*E2*). Among the functional mutations that in most cases lead to partial or complete loss of function, there are single-nucleotide substitutions or deletions, insertions of transposon-like sequences that can lead to amino acid substitutions in the protein, shift of the reading frame, appearance of the premature stop-codon. *E*-gene products are receptors of signals coming from the environment and they participate in signaling pathways that control the photoperiod.

The overall impact and interactions between *E*-genes have not been fully studied yet, the molecular structure was investigated only for *E1-E4*, for which a genetic network of interactions was proposed, while at the same time five loci (*E6-E9* and *E11*) were only mapped on soybean chromosomes, and the existence of a separate *E5* locus has not yet been established. In eight of the 11 *E*-loci, the dominant allele causes late flowering. Also there is a pleiotropic effect of *E*-gene alleles on yield, plant height, stress resistance, and response to low temperatures. Knowledge of the allelic state of only some of the 11 genes is not sufficient. A comprehensive understanding of the functioning of the photoperiodic genetic response network is needed. *E*-genes are genetic determinants that can be used during selection and creation of new varieties with programmed rates of development.

*Keywords:* soybean, *E*-genes, photoperiodic sensitivity, maturity

## КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ ЕРИТРОДІЕРЕЗУ

Т. Король

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: tetiana.korol10@gmail.com*

У нормі еритродієрез перебуває в динамічній рівновазі з процесом еритропоєзу, а отже, є одним із чинників, який забезпечує відносно постійну кількість еритроцитів у кров'яному руслі. Руйнування зазнають фізіологічно старі, пошкоджені та нежиттєздатні еритроцити, а також еритроцити, які утворилися під час стресового еритропоєзу. Кліренс еритроцитів є селективним процесом. Із кровотоку насамперед вилучаються ті клітини, які втратили здатність до деформації. Здатність еритроцитів деформуватися залежить від форми клітин, в'язкості цитоплазми та механічних властивостей мембрани. Старі та змінені еритроцити є досить ригідними, а тому затримуються у вузьких капілярах і венозних синусах печінки й селезінки. Окрім того, макрофаги печінки та селезінки фагоцитують еритроцити, які на своїй поверхні експонують сигнальні молекули «з'їж мене». Експозиція фосфатидилсерину на зовнішній поверхні еритроцитів призводить до їхнього вилучення з кровотоку клітинами Купфера й іншими мононуклеарними фагоцитами. Під час ініціації еритрофагоцитозу фосфатидилсерин зовнішнього ліпідного шару плазматичної мембрани еритроцитів безпосередньо взаємодіє з рецепторами Stabilin-2, Tim-1, Tim-4 або CD300 макрофагів. Інтегрини макрофагів  $\alpha v \beta 3$  та  $\alpha v \beta 5$ , а також рецептор Mer тирозинкінази опосередковано взаємодіють з фосфатидилсерином поверхні еритроцитів за допомогою розчинних протеїнів MFG-E8, Gas 6 і протеїну S. Кластеризація протеїну смуги 3 мембрани еритроцитів спричиняє зв'язування природних антитіл, а опсонізація еритроцитів за допомогою C3b підсилює цей процес і сприяє розпізнаванню таких клітин макрофагами червоної пульпи селезінки. У старіючих еритроцитах пригнічується утворення комплексу CD47-SIRP $\alpha$  (сигнал «не їж мене»), який гальмує їхній фагоцитоз, а відтак – з'являється додатковий стимул для захоплення еритроцитів макрофагами селезінки та печінки.

Мета огляду – описати механізми еритрофагоцитозу й молекулярні детермінанти старіння і загибелі еритроцитів, у тому числі ериптозу та нецитолізу, висвітлити факти й суперечності, наявні на сучасному етапі вивчення цього питання.

*Ключові слова:* еритроцит, еритродієрез, фагоцитоз, ериптоз, фосфатидилсерин, внутрішньоклітинна концентрація Ca<sup>2+</sup>

*Перелік основних скорочень:*

CD47 – кластер диференціації 47 (Cluster of Differentiation 47), поверхневий білок еритроцитів, ліганд для SIRP $\alpha$  рецептора макрофагів.

SIRP $\alpha$  – сигнальний регуляторний протеїн альфа (Signal regulatory protein alpha), регуляторний мембранний глікопротеїн, належить до родини SIRP, рецептор макрофагів, який взаємодіє із CD47 еритроцитів.

PS – фосфатидилсерин (Phosphatidylserine), негативно заряджений фосфоліпід внутрішнього моношару плазматичної мембрани клітин.

*Рецептори макрофагів, які безпосередньо взаємодіють із фосфатидилсерином плазматичної мембрани еритроцитів:*

Stabilin-2 – Стабілін-2;

Tim-1 – Т-клітинний імуноглобулін і муциновий домен 1 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 1, також відомий як HAVCR1 – Hepatitis A virus cellular receptor);

Tim-4 – Т-клітинний імуноглобулін і муциновий-домен-вмісна молекула (T-cell membrane protein 4, також відомий як TIMD-4 – T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4);

BA11 – специфічний для мозку інгібітор ангіогенезу 1 (Brain-specific angiogenesis inhibitor 1);

CD300 receptors – CD300 рецептори

*Рецептори макрофагів, які опосередковано взаємодіють із фосфатидилсерином плазматичної мембрани еритроцитів:*

$\alpha v \beta 3$  – інтегрин, взаємодіє з адаптерною молекулою MFG-E8;

$\alpha v \beta 5$  – інтегрин, взаємодіє з адаптерною молекулою MFG-E8;

рецептор Мер тирозинкінази (MerTK) – Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER, взаємодіє із адаптерними молекулами Gas 6 та Protein S

*Розчинні білки (адаптерні молекули), які зв'язують фосфатилсерин плазматичної мембрани еритроцитів із рецепторами макрофагів:*

MFG-E8 – глобулярний білок молочного жиру (Milk fat globule-EGF factor 8 protein), також відомий як лактадерин, інтегрин-зв'язуючий глікопротеїн;

Gas 6 – продукт специфічного гена затримки росту GAS-6 (Growth arrest specific 6), ліганд для рецептора тирозинкінази MerTK;

Protein S – отриманий зі сироватки протеїн S, ліганд для рецептора тирозинкінази MerTK

Тривалість життя еритроцитів людини у середньому становить 100–120 днів. Це період, коли еритроцити перебувають у периферичній крові, циркулюють у судинах від моменту їхнього надходження у кровотік із червоного кісткового мозку до руйнування макрофагами печінки та селезінки.

Зрілі еритроцити поступово старіють і вилучаються із циркуляції. Старіння еритроцитів – це фізіологічний процес, однак, уніфікованого погляду на молекулярні детермінанти старіння та загибелі еритроцитів усе ще немає [50].

Руйнування зазнають: 1) фізіологічно старі еритроцити, термін перебування яких у циркуляції наближається до 120 днів; 2) ушкоджені й інфіковані еритроцити; 3) молоді еритроцити, які були утворені за умов гіпоксії, після повернення до умов нормоксії.

Під час старіння еритроцита відбувається низка структурних і функціональних змін, які є ознаками старіння, або маркерами старіння. Наприклад, абсолютним маркером віку еритроцитів людини та кількох інших видів ссавців є співвідношення протеїнів 4.1a / 4.1b. Структурний протеїн 4.1 з'єднує спектрин мембранного цитоскелету з внутрішньоклітинною поверхнею плазматичної мембрани еритроцитів. Цей протеїн синтезується у формі 4.1b. В еритроциті відбувається його модифікація способом деамідування двох аспарагінових залишків (Asn478 та Asn502), причому деамідування Asn478 здійснюється практично одразу після синтезу протеїну, натомість деамідування Asn502 – пізніше, у процесі старіння еритроцита. Унаслідок цього протеїн 4.1b перетворюється до форми 4.1a. Саме тому протеїн 4.1 вважають «молекулярним годинником» еритроцитів [17].

У процесі старіння еритроцитів знижується активність внутрішньоклітинних ферментів, порушується кальцієвий гомеостаз, зменшується вміст вуглеводних компонентів плазматичної мембрани (глюкози, галактози, манози тощо), посилюються процеси



десіалювання мембранних глікокон'югатів, унаслідок чого зменшується поверхневий заряд еритроцитів, відбувається окисна модифікація структур клітини, з'являються антитіла до компонентів мембрани тощо [79].

Фізіологічний процес руйнування еритроцитів називають еритродієрезом. Він відбувається: 1) всередині судин (внутрішньосудинний гемоліз) або 2) внаслідок захоплення еритроцитів макрофагами селезінки, купферівськими клітинами печінки чи макрофагами кісткового мозку (внутрішньоклітинний гемоліз) після рецептор-опосередкованого розпізнавання їх безпосередньо або за допомогою опсонинів. У нормі на внутрішньоклітинний гемоліз припадає 80–90 %, і лише 10–20 % становить внутрішньосудинне руйнування еритроцитів [4].

#### **Внутрішньосудинний гемоліз еритроцитів**

Під час внутрішньосудинного гемолізу руйнування еритроцита відбувається у судинному руслі з вивільненням його вмісту у плазму крові внаслідок механічної травми, фіксації на поверхні еритроцита компонентів системи комплементу, дії ендотоксинів тощо.

Внутрішньосудинний гемоліз – це комплемент-залежний процес руйнування еритроцитів, які на своїй поверхні містять IgM (рідше IgG), у кров'яному руслі, а також результат фізичного пошкодження еритроцитів унаслідок турбулентного руху крові, під час фазових переходів і під час інвазії паразитами (малярія, бабезіоз) [5]. Зазвичай його спостерігають під час ушкодження тканин (травми), інфікування гемолітичними мікроорганізмами, захворювань, зокрема, спадкових і набутих анемії.

У процесі внутрішньосудинного гемолізу еритроцити проходять кілька послідовних стадій: передгемолітична стадія – сферуляція еритроцитів; осмотичний гемоглобіноліз – розпад і вихід частини гемоглобіну (лабільно зв'язаного гемоглобіну) у плазму крові внаслідок того, що еритроцит досягнув критичного об'єму, а саме 146 % від нормального (87 мкм<sup>3</sup>) об'єму дискоцита; хімічний гемоглобіноліз – зміна хімічного складу (електрохімічних і колоїдно-осмотичних властивостей) еритроцитів із повним розпадом гемоглобіну; остаточне руйнування клітинної структури [1].

Унаслідок руйнування еритроцитів безпосередньо у кров'яному руслі більша частина гемоглобіну потрапляє у плазму крові, де і взаємодіє з гаптоглобіном. Комплекс гаптоглобіну з вільним гемоглобіном перешкоджає його проникненню крізь фільтруючу мембрану у клубочках нефронів, після чого цей комплекс поглинають тканинні макрофаги за участю scavenger-рецепторів CD163 [66, 95].

Експресія CD163 виявлена у моноцитах (низький рівень), а також у макрофагах червоної пульпи селезінки та клітинах Купфера печінки (високий рівень) [89, 114]. В еритроцитах людини CD163 був ідентифікований як рецептор ендодитозу, який зв'язує лише комплекс гаптоглобіну з гемоглобіном [56].

Виникає запитання: чи є альтернативні шляхи захисту організму від токсичної дії позаклітинного гемоглобіну, окрім CD163-опосередкованого захоплення макрофагами його комплексу з гаптоглобіном? Особливо це стосується випадків кліренсу вільного гемоглобіну в умовах важкого гемолізу, коли запаси гаптоглобіну швидко вичерпуються. Як з'ясувалося, виявлено безпосередню взаємодію CD163 макрофагів людини з гемоглобіном незалежно від гаптоглобіну [94]. Розчинний CD163 (sCD163) у плазмі крові утворює комплекс із гемоглобіном, який пізніше взаємодіє з IgG. Відбувається Fcγ-рецептор-опосередкований ендодитоз комплексу sCD163-Hb-IgG моноцитами та макрофагами [99].

Інша частина гемоглобіну у плазмі крові окиснюється до метгемоглобіну та розпадається на гем і глобін. Протеїн гемопексин зв'язує гем у плазмі крові та транспортує його

у печінку, тим самим запобігаючи виведенню гемму зі сечею. Комплекс гемопексину з гемом розпізнає рецептор CD91 / LRP1 на поверхні гепатоцитів. Далі цей комплекс вилучається з кровотоку завдяки рецептор-опосередкованому ендоцитозу. Також комплекс гемопексин-гем фагоцитують макрофаги селезінки, печінки та кісткового мозку. Крім гепатоцитів, CD91 / LRP1 експресується на поверхні кількох інших типів клітин: макрофагів, нейронів і синцитіотрофобластів. Роль цих типів клітин, що експресують LRP1, і можливий внесок альтернативних рецепторів у кліренс комплексу гемму з гемопексином потребують подальшого ретельного вивчення [96].

#### **Внутрішньоклітинний гемоліз еритроцитів. Ериптоз**

Основна маса еритроцитів як за фізіологічних умов, так і під час більшості патологічних станів зазнає внутрішньоклітинного гемолізу, внаслідок якого і гем, і глобін надходять у цитоплазму клітин мононуклеарної фагоцитарної системи після руйнування фагоцитованих ними еритроцитів [4].

На сьогодні немає єдиної думки щодо того, як макрофаги печінки та селезінки визначають, який еритроцит фагоцитувати, а який «відремонтувати» і повернути у кровотік. Загалом у дослідженнях важко ідентифікувати еритроцити, призначені для елімінації *in vivo*, оскільки ті клітини, які на своїй поверхні несуть молекулярні сигнали для вилучення із кров'яного русла, швидше за все, фагоцитують макрофаги, а тому вони не будуть доступними для аналізу. Щоденний кліренс еритроцитів становить лише 0,8 % на добу, у циркуляції залишається невелика кількість клітин, які на своїй поверхні несуть молекулярні сигнали для ініціації фагоцитозу макрофагами у будь-який момент відбору проби крові. Тому більшість гіпотез щодо ймовірних молекулярних сигналів, які запускають кліренс еритроцитів, ґрунтуються на роботах *in vitro* або на даних, одержаних під час вивчення моделей тварин [25].

Припускають, що молекулярні сигнали елімінації еритроцитів не накопичуються поступово, а навпаки, виникають як швидкий і нелінійний каскад подій на термінальній стадії процесу старіння, ймовірно, незадовго до того, як еритроцити будуть захоплені макрофагами [36].

У людини все ще дискутується питання внеску печінки та селезінки в еритрофагоцитоз [15, 16]. Захоплення еритроцитів макрофагами печінки, очевидно, більшою мірою пов'язане зі стресом або із запальними станами [97, 101].

Більшість еритроцитів руйнують макрофаги селезінки. Частина капілярів впадає у венозні пазухи (синуси) селезінки, проте більшість із них безпосередньо відкриваються у червону пульпу органа, де кров виходить у міжсинусовий простір. Еритроцити, які вільно вийшли з капілярів у червону пульпу, «протискуються» назад до венозних пазух крізь вузький щілиноподібний простір між ендотеліоцитами. Нормальні еритроцити легко деформуються та потрапляють до венозних пазух. Натомість, старі та змінені еритроцити застоюються у міжсинусовому просторі та руйнуються макрофагами.

Здатність еритроцитів деформуватися залежить від форми клітин, в'язкості цитоплазми та механічних властивостей мембрани. Форма двоввігнутого диска є оптимальною для того, щоб еритроцит міг деформуватись, оскільки забезпечує максимальну поверхню клітини при заданому об'ємі та можливість змінювати форму без зміни об'єму еритроцита.

Здатність еритроцитів до деформації надзвичайно важлива для реалізації їхніх реологічних властивостей і транспортних функцій крові під час циркуляції у капілярах. Для цього об'єм еритроцита людини має утримуватися на рівні приблизно 55–60 % від макси-

мального сферичного об'єму, який могла би охопити площа його мембрани (Optimal-volume-ratio range, OVR). Те, наскільки об'єм еритроцита буде збережений у таких межах, визначає тривалість його перебування у кровообігу [69]. Збільшення об'єму еритроцита в 1,7 разу понад його нормальний об'єм призводить до гемолізу. Якщо значення OVR вище 65 %, то спостерігають набряк еритроцита, а якщо нижче 50 % – його дегідратацію [27, 31, 32, 43, 65, 68].

Найбільше значення у виникненні змін об'єму еритроцита мають поступове зниження активності натрієвої помпи, а також зниження інтенсивності гліколізу та зменшення кількості молекул АТФ. У процесі старіння еритроцита кількість натрієвих pomp у перерахунку на клітину зменшується до 70 %. Окрім того, відбувається зменшення трансмембранних градієнтів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  і зниження рівня АТФ до 40 % [37, 67, 70].

За відсутності фізичного ушкодження тривалість життя еритроцита обмежується розвитком старіння. У старіючому еритроциті зменшується кількість утвореної в ньому АТФ, а відтак порушуються процеси відновлення форми еритроцита, захист клітинних компонентів від окиснення, транспортування катіонів. Деструктивні зміни у плазматичній мембрані еритроцита призводять до зростання її проникності, а зменшення кількості утвореної в ньому АТФ – до порушення трансмембранного транспортування іонів. З припиненням обміну речовин в еритроциті він циркулює у крові не більше 24 год. Старий еритроцит більш чутливий до змін складу позаклітинного середовища, а тому легше руйнується.

До настання фізіологічного старіння еритроцити можуть зазнавати пошкоджень, унаслідок чого активуються механізми їхньої запрограмованої смерті, або ериптозу. На відміну від старіння, яке триває майже 120 днів, ериптоз розвивається упродовж <1 год до 48 год [61]. Ознаками ериптозу є зморщування клітини, везикуляція мембрани, а також перерозподіл ліпідів у плазматичній мембрані, який призводить до експонування фосфатидилсерину на її зовнішній поверхні. Фізіологічне значення ериптозу полягає у пришвидшеному кліренсі пошкоджених та інфікованих, наприклад, збудником малярії, еритроцитів.

У кров'яному руслі еритроцити найчастіше зазнають пошкоджень у капілярах легень унаслідок оксидативного стресу або в судинах нирок в умовах гіперосмотичного середовища. Ериптоз також зумовлюють різні ксенобіотики.

Фізіологічне значення ериптозу полягає у вилученні дефектних еритроцитів до настання їхнього гемолізу, тому що гемоглобін, який виходить з еритроцитів під час їхнього внутрішньосудинного руйнування, закупорює ниркові каналці нефронів у процесі фільтрування крові в судинних клубочках.

Серед еритроцитів різних вікових популяцій, одержаних від здорових добровольців, ериптоз виявився найбільш інтенсивним у фракції найстаріших клітин. Схильність до ериптозу зростає з віком еритроцитів, і цей ефект певною мірою можна пояснити посиленою чутливістю старих клітин до оксидативного стресу [42].

Активатори ериптозу реалізують свою дію за допомогою зовнішніх і внутрішніх механізмів. У першому випадку загибель еритроцитів ініціює зв'язування Fas-ліганда з Fas-рецептором (CD95) на мембрані еритроцита й утворення Fas-асоційованого комплексу з доменом смерті FADD, який активує прокаспазу-8 і у наступну чергу – каспазу-3. У старіючих еритроцитах або еритроцитах, які зазнали впливу оксидативного стресу, відбувається безпосереднє активування каспази-3, внаслідок чого знижується активність амінофосфоліпід-трансферази (фліпази), яка підтримує функціональну асиметрію мембранних фосфоліпідів, а відтак – екстерналізація фосфатидилсерину і каспаза-3-опосередкована деградація протеїну смуги 3 [59, 77]. Цей протеїн виконує функцію іонного обмінника (Cl<sup>-</sup>/

$\text{HCO}_3^-$ ), якоря для закріплення цитоскелету в мембрані та сайту для зв'язування ферментів гліколізу [3, 22]. В еритроцитах із виснаженими запасами АТФ ініціація ериптозу пов'язана з активацією протеїнкінази С і фосфорилуванням неселективних катіонних каналів, що призводить до їхнього відкриття і надходження іонів кальцію в клітину.

Ключовими подіями ериптозу є збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , порушення взаємодії цитоскелету з плазматичною мембраною, втрата плазматичної мембрани через утворення мікроезистул, зморщування клітин, поява у зовнішньому ліпідному шарі фосфатидилсерину (рис. 1). Термінальною стадією ериптозу є еритрофагоцитоз.

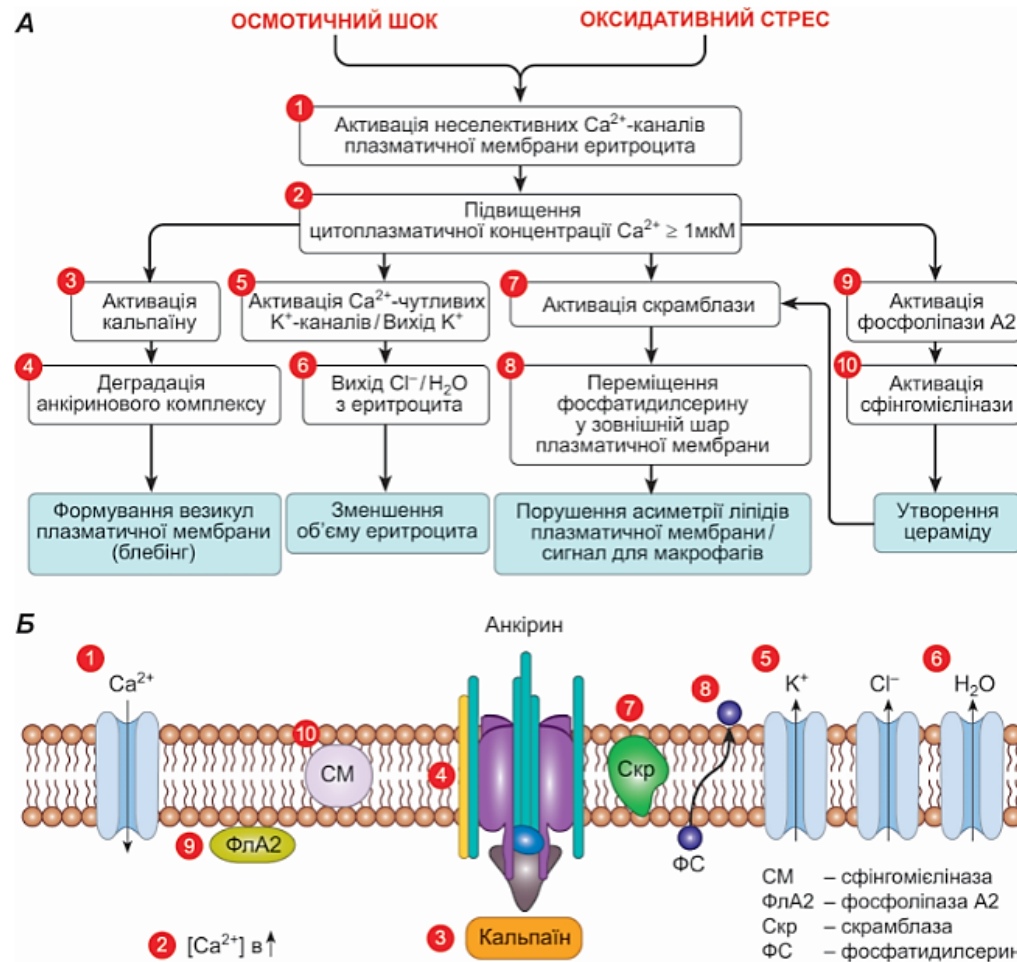


Рис. 1. Механізми ериптозу: А – блок-схема основних подій ериптозу; Б – роль плазматичної мембрани та ферментів у розвитку основних подій ериптозу. Джерело: рисунок автора

### Тригери та молекулярні механізми внутрішньоклітинного руйнування еритроцитів

Захоплення еритроцитів макрофагами здійснюється внаслідок: 1) зміни поверхневих властивостей еритроцитів, наприклад, фіксації імуноглобулінів, експозиції фосфатидилсерину у зовнішньому ліпідному шарі плазматичної мембрани, для яких на макрофагах є специфічні рецептори ( $\text{Fc}\gamma\text{R}$ ,  $\text{Stabilin-2}$ ,  $\text{Tim-1}$ ,  $\text{Tim-4}$  тощо); 2) порушення здатності ери-

троцитів деформуватися і проходити фільтраційним руслом селезінки. Вилучення еритроцитів із кров'яного русла відбувається завдяки  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним і рецептор-опосередкованим механізмам.

#### **Порушення внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу**

Одним із чинників, який відіграє роль у старінні та руйнуванні еритроцитів, є збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

Загальна внутрішньоклітинна концентрація кальцію становить 5,7 мкМ і включає кальцій, зв'язаний з протеїнами, фосфоліпідами та неорганічним фосфатом, а також вільний, або іонізований,  $\text{Ca}^{2+}$  [14]. За фізіологічних умов внутрішньоклітинна концентрація іонізованого кальцію в еритроцитах людини становить 30–60 нМ. Значний градієнт між цитоплазмою еритроцитів і плазмою крові, в якій концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  дорівнює приблизно 1,8 мМ, підтримується завдяки надзвичайно низькій базальній проникності плазматичної мембрани для  $\text{Ca}^{2+}$ . Ще одним механізмом для забезпечення низької внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є функціонування потужної  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани еритроцита [13, 102].

Порушення транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  в еритроцит чи його виведення з клітини  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою призводить до надмірного зростання цитоплазматичної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

Як наслідок, відбувається активування  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних білків: 1) фосфоліпази A2, 2)  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$ -каналів, 3)  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої скрамблази тощо.

Фактично, збільшення цитоплазматичної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є тригером для реалізації механізмів ериптозу.

Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  із зовнішньоклітинного середовища в еритроцит забезпечують  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани. До них належать неселективні потенціалкерovanі катіонні канали, TRPC канали, потенціалкерovanі  $\text{Ca}^{2+}$  канали  $\text{Ca}_v2.1$ , потенціалкерovanі аніонні канали (VDAC), NMDA рецептор, механочутливі Piezo1 канали.

Неселективні потенціалкерovanі катіонні канали плазматичної мембрани еритроцитів є проникними для  $\text{Ca}^{2+}$ , проте їхня молекулярна ідентичність залишається невідомою [49].

В еритроцитах людини виявлено ще один тип неселективних потенціалкерovanих катіонних каналів TRPC6 [35], а також методами Western blot та фармакологічної взаємодії з  $\omega$ -agatoxinTK (але не методом patch-clamp) одержано підтвердження наявності каналів  $\text{Ca}_v2.1$  [107]. Потенціалкерovanі аніонні канали плазматичної мембрани еритроцитів VDAC теж є проникними для  $\text{Ca}^{2+}$ . Відомо, що проникність каналів VDAC1 для  $\text{Ca}^{2+}$  є досить низькою, а відношення коефіцієнтів проникності для  $\text{Ca}^{2+}$  та для  $\text{Cl}^-$  ( $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cl}^-}$ ) становить 0,02–0,38 [41].

У плазматичній мембрані еритроцитів шурів і клітин попередників еритроцитів людини лінії UT-7/Еро наявні NMDA рецептори (NMDAR) [75]. Ці рецептори є ліганд-керovanими неселективними катіонними каналами, крізь які у клітину проникають іони  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Na}^+$ , причому проникність для  $\text{Ca}^{2+}$  у 10 разів більша, ніж для двох інших катіонів. Згодом NMDAR було виявлено і в плазматичній мембрані циркулюючих еритроцитів здорових людей. Еритроцити у кров'яному руслі мають невелику кількість копій рецепторів, яка до того ж відрізняється у різних вікових популяціях клітин: більше у молодих та менше – у зрілих і старих еритроцитах. В еритроцитах людини активність NMDAR стимулюють гліцин і глутамат плазми крові, що може спричинити значний притік  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини та зростання його цитоплазматичної концентрації [76].

Збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в еритроциті частково зумовлене дефіцитом АТФ унаслідок зниження активності ферментів гліколізу та пентозофосфат-

ного шляху у старіючому еритроциті, а відтак – пригнічення первинно-активного виведення кальцію з клітини за допомогою  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи.

Вичерпування запасів АТФ в еритроциті призводить до підвищення жорсткості плазматичної мембрани клітини через пригнічення фосфорилування спектрину. За нормальних умов фосфорилування білків мембранного скелету відбувається зворотна дисоціація комплексу спектрину з протеїном 4.1, а тому зменшується натяг плазматичної мембрани, що є необхідною умовою для деформації дискоцита під час проходження крізь вузький капіляр.

Унаслідок деформації еритроцита в капілярі активуються механочутливі іонні канали плазматичної мембрани Piezo1, які забезпечують надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у його цитоплазму. Як наслідок, утворюється комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM). Білок адуцин бере участь в утворенні зв'язку між спектрином і актином, а також має ділянки для приєднання кальмодуліну. Відбувається  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-опосередковане пригнічення активності адуцину та полімеризації актинових філаментів. До того ж взаємодія протеїну 4.1 з  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ініціює короткочасне та зворотне послаблення зв'язку спектринової мережі з білками біліпідного шару плазматичної мембрани, що в сукупності сприяє гнучкості еритроцита. Еритроцит набуває нормальної форми дискоцита, а  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани забезпечує вихід надлишку катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  з еритроцита.

Отже, зменшення входу  $\text{Ca}^{2+}$  в еритроцит і його внутрішньоклітинної концентрації є необхідною умовою для відновлення зв'язку спектринової мережі з біліпідним шаром плазматичної мембрани з метою підтримання форми двоввігнутого диска. Проте зменшення функціональної активності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани еритроцитів сприяє генеруванню механочутливими іонними каналами Piezo1 піків внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  і активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$  каналів (каналів Гардоса). Збільшення тривалості активного стану цих каналів зумовлене сповільненим виведенням катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  з еритроцитів [28, 57].

Активация  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$  каналів відбувається за умов збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до  $\geq 1$  мкМ [73]. Відкриття  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$ -каналів призводить до виходу з клітини катіонів  $\text{K}^+$ , аніонів  $\text{Cl}^-$  та молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , внаслідок чого зменшується об'єм еритроцита та підвищується в'язкість його внутрішньоклітинного вмісту [62]. Ущільнення еритроцитів людини під час їхнього старіння відбувається за безпосередньої участі каналів Гардоса [69].

Збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  через зменшену активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани еритроцита відбувається у міру накопичення клітиною HbA1c, який є одним із вікових маркерів еритроцитів [67].

За умов гіперглікемії спостерігають глікацію поверхневих білків еритроцита й гемоглобіну. У старих / глікованих еритроцитах розвивається оксидативний стрес, відбувається порушення асиметрії ліпідів у плазматичній мембрані та поява фосфатидилсерину в її зовнішньому ліпідному шарі, а також виникає підвищена схильність до гемолізу [21].

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до розвитку подій у двох напрямках. По-перше, порушується асиметрія фосфоліпідів плазматичної мембрани еритроцита з перерозподілом фосфатидилсерину у її зовнішній моношар. Макрофаги розпізнають фосфатидилсерин на поверхні еритроцита як сигнал до його руйнування.

По-друге, зростання цитоплазматичної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  спричиняє активацію кальпаїну та сприяє розщепленню протеїнів цитоскелету – актину, спектрину, анкірину та протеїну смуги 4.1, а також протеїну смуги 3 і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани [13]. У

такий спосіб відбувається дестабілізація клітинної мембрани еритроцитів, порушення взаємодії мембранного цитоскелету з біліпідним шаром.

Зменшення концентрації АТФ у старіючому еритроциті та підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  негативно впливають на функціонування ферментів, які підтримують асиметричний розподіл фосфоліпідів між зовнішнім і внутрішнім ліпідними шарами плазматичної мембрани.

У нормі фосфоліпиди, що містять нейтральний холін (фосфатидилхолін і сфінгомієлін), перебувають у зовнішньому шарі плазматичної мембрани еритроцитів, тоді як заряджені фосфоліпиди, які мають у своєму складі аміногрупу (фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол і фосфатидилетаноламін), є у внутрішньому ліпідному шарі мембрани.

Асиметричний розподіл фосфоліпідів у плазматичній мембрані еритроцитів підтримують ферменти: 1) АТФ-залежна фліпаза, яка транспортує аміновмісні фосфоліпиди із зовнішнього ліпідного шару у внутрішній; 2) АТФ-залежна флопаза, яка каталізує перенесення фосфоліпідів, що містять холін, у зворотному напрямку, від внутрішнього ліпідного шару до зовнішнього; 3)  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна скрамблаза, яка забезпечує двостороннє транспортування фосфоліпідів за градієнтом концентрації для досягнення більш симетричного їхнього розподілу [44].

За умов високої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі еритроцитів відбувається активація скрамблази – ферменту, який каталізує переміщення фосфатидилсерину у зовнішній фосфоліпідний шар плазматичної мембрани [109], а також пригнічення фліпази. Поява у зовнішньому ліпідному шарі плазматичної мембрани негативно зарядженого фосфатидилсерину (цей процес також називають експозицією чи екстерналізацією фосфатидилсерину) є маркером порушення ліпідної асиметрії та ериптозу еритроцитів, а також сигналом для елімінації таких еритроцитів макрофагами. Роль ферменту флопази у порушенні мембранної асиметрії ліпідів ще остаточно не з'ясована. Ймовірно, він може бути залучений до швидкого переміщення фосфатидилсерину в зовнішній ліпідний моношар плазматичної мембрани еритроцитів [12, 44].

$\text{Ca}^{2+}$ -залежний фермент фосфоліпаза А2 ініціює деградацію мембранних фосфоліпідів з утворенням арахідонової кислоти й фактора активації тромбоцитів. Посилує цей процес осмотичний шок, унаслідок чого фактор активації тромбоцитів призводить до розпаду сфінгомієліну плазматичної мембрани з утворенням кераміду [63, 64]. Керамід сприяє  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливому скрамблінгу ліпідів еритроцитарної мембрани [58, 60].

Ериптоз значною мірою також пов'язаний з активацією  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного  $\mu$ -кальпаїну – цистеїнової ендопептидази, яка призводить до деградації протеїнів, зокрема, цитоскелету, порушення зв'язку між мембранним цитоскелетом і плазматичною мембраною еритроцитів, що сприяє вивільненню мікровезикул [82]. На думку Knowles та співавт., цитоскелет еритроцитів не руйнується, а втягується всередину клітини під час деформації мембрани під напругою зсуву у кровотоці [54]. Це, очевидно, є причиною вивільнення мікровезикул, позбавлених білків цитоскелету.

#### **Везикуляція плазматичної мембрани еритроцитів**

Порушення асиметрії фосфоліпідів у плазматичній мембрані еритроцитів і екстерналізація фосфатидилсерину є основними чинниками у формуванні та вивільненні везикул [44].

Макрофаги селезінки забезпечують кліренс внутрішньоеритроцитарних паразитів чи аномальних включень, які накопичуються в еритроциті під час його циркуляції у кров'яному руслі. Упродовж життєвого циклу еритроцитів відбувається втрата ними гемо-

глобіну, у тому числі необоротно модифікованого, способом везикуляції [111]. Очевидно, це дає змогу збільшити тривалість перебування еритроцитів у циркуляції.

Відомо, що у спленектомізованих осіб еритроцити втрачають 15 % гемоглобіну поступово упродовж періоду циркуляції еритроцита лінійним способом. У здорових суб'єктів додатково ще 5 % гемоглобіну втрачається упродовж другої половини життя еритроцитів [112].

У щурів везикули еритроцитарного походження швидко виводяться з кровообігу головним чином клітинами печінки Купфера і, меншою мірою, іншими макрофагами мононуклеарної системи фагоцитів. Втрата гемоглобіну еритроцитами людини аналогічна втраті гемоглобіну у щурів, тому, ймовірно, механізми везикуляції є схожими. Приблизно 20 % гемоглобіну, а також 20 % площі поверхні еритроцит людини втрачає упродовж свого життя. Експозиція фосфатидилсерину на зовнішній поверхні еритроцитів призводить до вилучення як везикул із поверхні батьківської клітини, так і цілих еритроцитів із кровотоку клітинами Купфера й іншими макрофагами мононуклеарної фагоцитарної системи [113].

Позаклітинні везикули класифікують за їхнім внутрішньоклітинним походженням. Під час дозрівання ретикулоцитів протеїни, які не будуть входити до складу мембрани зрілого еритроцита, секвеструються у внутрішніх везикулах, наявних у багатовезикулярних тілцях. Ці везикули називають екзосомами, оскільки виділення їх у позаклітинне середовище відбувається внаслідок злиття багатовезикулярних тілець з плазматичною мембраною клітини. Ще один підтип позаклітинних везикул відомий як мікровезикули, або ектосоми, які вивільняються назовні брунькуванням плазматичної мембрани [6, 30, 100].

До позаклітинних везикул еритроцитарного походження належать мікровезикули, екзовезикули, ектосоми, нановезикули та мікрочастинки [48, 70]. Їхню появу *in vivo* ініціюють підвищення внутрішньоклітинної концентрації катіонів кальцію, зменшення молекул АТФ у клітині та вплив оксидативних стресових умов [45].

Вважають, що утворення нановезикул відбувається під час ериптозу, кластеризації протеїну смуги 3 та, ймовірно, в умовах оксидативного стресу. Через зміну функціональної активності неспецифічних катіонних каналів відбувається підвищення концентрації  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі еритроцитів, які зазнають ериптозу, а відтак – активація кальпаїну, скрамблази та флопази, а також пригнічення фліпази [20]. Порушення фосфоліпідної асиметрії, яке при цьому виникає, сприяє появі нановезикул [45].

У механізмі кластеризації протеїну смуги 3 окиснення гемоглобіну призводить до утворення геміхрому з подальшою агрегацією мультимерів протеїну смуги 3 та деградацією протеїнів мембранного цитоскелету [103].

Гіпотеза утворення нановезикул за умов оксидативного стресу ґрунтується на тому, що активні форми кисню індують зв'язування гемоглобіну з протеїном смуги 3, активацію кальцієвих каналів, фосфорилування протеїнів і агрегацію протеїнів смуги 3 [103]. Аргументом на користь цієї гіпотези є пригнічення утворення нановезикул за впливу антиоксидантів [98].

Якщо клітини-попередники еритроцитів у процесі ремодельовання під час їхнього дозрівання виділяють у позаклітинне середовище екзосоми, то зрілі еритроцити утворюють мікровезикули [26].

Під час енуклеації пізнього еритробласта і його перетворення на ретикулоцит увесь спектрин, який спочатку містився у значно більшому за розмірами попереднику, потрапляє в ретикулоцит [115]. Ретикулоцит під час перетворення на зрілий еритроцит теж втрачає частину біліпідної плазматичної мембрани, а тому щільність розташування спектрину



на мембрані зростає, і клітина набуває форми двоввігнутого диска [46, 52]. Отже, це добре регульований процес, під час якого у мембрані еритроцита залишається строго збалансована кількість протеїнів мембранного каркасу для підтримання біліпідного шару.

Постає запитання: чи відбувається реконструкція мембранного цитоскелету еритроцитів під час старіння *in vivo*, оскільки втрата біліпідного шару у складі везикул, мабуть, призведе до надлишку спектрину в клітині, хоча насправді такий дисбаланс для еритроцитів у циркуляції не спостерігають. Виявляється, що у процесі старіння еритроцитів людини зменшується не лише площа поверхні мембрани клітин, але і вміст спектрину й інших компонентів мембранного скелету. Причому в еритроцитах людини вміст спектрину був тим нижчим, чим вище співвідношення протеїнів 4.1a/4.1b. Отже, зменшення спектрину в еритроцитах є явищем, пов'язаним із віком клітин [23].

Чи можлива втрата спектрину завдяки явищам протеолізу у старіючому еритроциті? Вважають, що протеолітичне зменшення вмісту спектрину в еритроциті малоімовірно. Доведено, що еритроцити містять компоненти убіквітин-протеасомної системи деградації білків [87]. Зрілі еритроцити людини містять 20S протеасоми, проте кількість 26S протеасомних комплексів була мінімальною [83]. Очевидно, окрім вільних від спектрину везикул, утворених біліпідним шаром плазматичної мембрани, також вивільнюються везикули, у складі яких наявний спектрин, а механізми цих процесів різні.

На ймовірне вивільнення спектрину разом із везикулами вказує і той факт, що у процесі старіння еритроцита не відбувається збільшення мономерів чи димерів вільного спектрину або його фрагментів, утворених під час дисоціації мембранного цитоскелету [24].

На частку найстаріших і найбільш щільних еритроцитів у кров'яному руслі людини припадає приблизно 1,0 % клітин. Площа поверхні цих еритроцитів менша на 17 % порівняно з молодими клітинами, а їхній об'єм – на 25 %. Особливість полягає у тому, що зменшення площі поверхні й об'єму еритроцита упродовж старіння відбувається збалансовано, і в циркуляції еритроцити зберігають форму двоввігнутого диска та здатність до деформації [108].

З огляду на це, старими еритроцитами є клітини, які підтримувались у «здоровому» стані завдяки постійному видаленню пошкоджених ділянок мембрани та включень способом везикуляції у селезінці, а тому змогли пройти контроль на наступний раунд у циркуляції.

Остаточне вилучення еритроцита з кровотоку відбувається, коли настає перетин певного порога розміру клітини та жорсткості її плазматичної мембрани, внаслідок чого вже менший і з порушеною здатністю до деформації еритроцит сповільнює рух у венозних синусах печінки та селезінки, що сприяє його взаємодії з макрофагами. Вони розпізнають фосфатидилсерин у зовнішньому шарі плазматичної мембрани старих або пошкоджених еритроцитів як сигнал «з'їж мене» [72]. Поверхня еритроцитів містить і інші сигнали, сумарна взаємодія яких визначає інтенсивність фагоцитозу.

#### **Сигнальні механізми ініціації еритрофагоцитозу**

Розпізнавання макрофагами фосфатидилсерину на зовнішній поверхні еритроцитів є одним із етапів рецептор-залежного вилучення з кровотоку старих або ушкоджених клітин. Взаємодія між фосфатидилсерином і рецепторами макрофага буває безпосередньою та опосередкованою [90]. Безпосереднє розпізнавання фосфатидилсерину на зовнішній поверхні плазматичної мембрани здійснюють рецептори макрофага Stabilin-2, BA11, Tim-1, Tim-4, CD300 [8, 34]. Інтегрини  $\alpha v \beta 3$  та  $\alpha v \beta 5$ , а також рецептор Mer тирозинкінази взаємодіють з фосфатидилсерином опосередковано за участю опсонинів MFG-E8, Gas 6 та протеїну S (рис. 2).

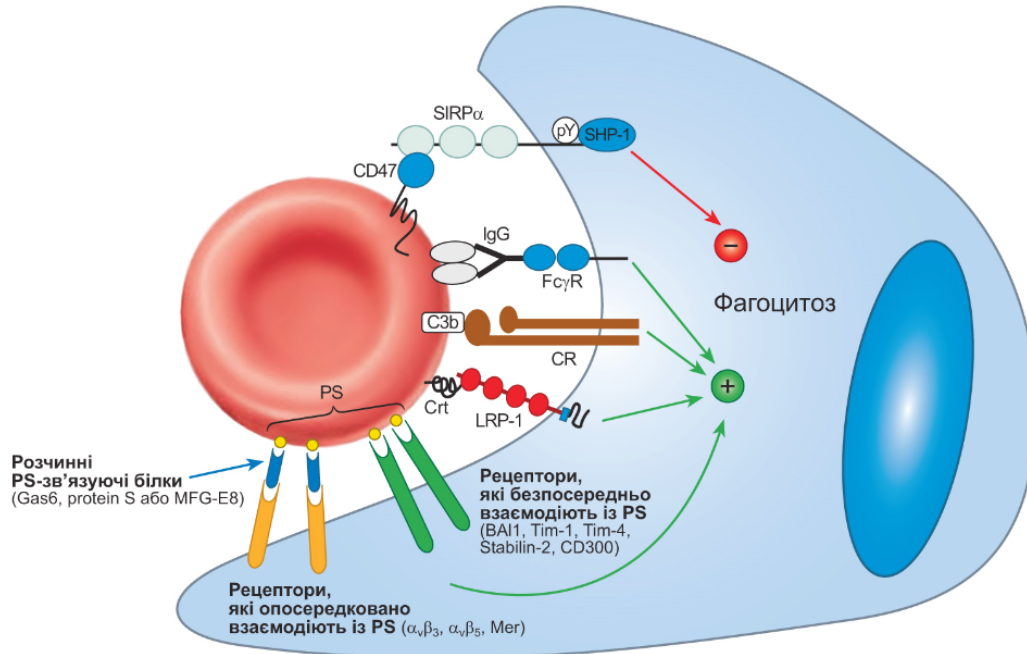


Рис. 2. Механізми еритрофагоцитозу. Фагоцитоз ініціює (+) взаємодія рецепторів макрофага з відповідними лігандами поверхні еритроцита: Fc $\gamma$ -рецепторів з IgG, CR з фактором комплементу C3b, LRP-1 з калретикуліном, PS-рецепторів (TIM-1, TIM-4, Stabilin-2 тощо) безпосередньо з фосфатидилсерином і PS-рецепторів ( $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5, Mer), які опосередковано взаємодіють із фосфатидилсерином, з розчинними PS-зв'язуючими білками (MFG-E8, Gas 6, Protein S). Пригнічує фагоцитоз (-), стимульований Fc $\gamma$ R, CR та LRP-1, взаємодія рецептора макрофага SIRP $\alpha$  з CD47 еритроцита. Джерело: за даними Qadri S. M. and al., 2017 [90]

Наявність фосфатидилсерину в зовнішньому шарі плазматичної мембрани еритроцитів розпізнають не лише макрофаги селезінки та печінки. На поверхні гладеньком'язових клітин стінки артерій також наявні рецептори до фосфатидилсерину. На зразках сонної артерії людини *in vitro* показано здатність гладеньком'язових клітин фагоцитувати старі еритроцити, зовнішній шар плазматичної мембрани яких містить фосфатидилсерин [55].

Еритроцити, в яких індукували експозицію фосфатидилсерину в зовнішньому ліпідному шарі плазматичної мембрани та втрату здатності деформуватися, зазнавали фагоцитозу ендотеліальними клітинами *in vitro* як у статичних умовах, так і в умовах потоку під час перфузії [33].

У старіючих еритроцитах не лише з'являються сигнали для ініціації фагоцитозу, але й послаблюються сигнали, які запобігають поглинанню еритроцитів макрофагами та їхній елімінації з кровотоку.

Відомо, що еритроцити містять поверхневий білок CD47, який захищає їх від фагоцитозу. Він є лігандом для сигнального регуляторного протеїну SIRP $\alpha$  макрофагів. Сигнальний регуляторний протеїн (Signal regulatory protein, SIRP), також відомий як SHPS-1 або SIRPA, – це трансмембранний протеїн, який має три імуноглобулінових домени у позаклітинній ділянці та сайти фосфорилювання тирозину з цитоплазматичного боку. Він зв'язується з SHP-1 і SHP-2 [38, 106].

Взаємодія SIRP $\alpha$  макрофагів селезінки з CD47 еритроцитів сприяє фосфорилуванню тирозину у складі протеїну SIRP $\alpha$  та його асоціації з фосфатазою SHP-1. Одночасно з активуванням SHP-1 фосфатази відбувається інактивування молекули *myosin-II*. Комплекс SIRP $\alpha$ -CD47 негативно регулює Fc $\gamma$ -рецептор-залежний фагоцитоз завдяки дефосфорилуванню *myosin-IIA*. Унаслідок цього пригнічується скоротлива активність цитоскелету, що бере участь у втягуванні клітини в макрофаг [104]. У такий спосіб гальмується фагоцитоз еритроцитів, і вони продовжують циркулювати у кров'яному руслі. Утворення комплексу SIRP $\alpha$ -CD47 називають сигналом «не їж мене» [78].

В еритроцитах CD47 є частиною Rh-комплексу і взаємодіє з протеїном смуги 3 та протеїном смуги 4.2, які перебувають у складі одного макрокомплексу. Цікаво, що у Rh-null чи протеїн 4.2-дефіцитних пацієнтів, в яких була редукована експресія CD47 в еритроцитах, спостерігали легку форму гемолітичної анемії [81]. Можливо, гемолітична анемія у цих осіб частково була наслідком пригнічення інгібуючого впливу CD47-SIRP $\alpha$  на макрофаги селезінки.

Водночас конформаційна перебудова білка CD47, яку спостерігають у старих еритроцитах, може перемикає сигнал з «не їж мене» на «з'їж мене». Очевидно, конформаційні зміни молекули CD47 спричиняють продукти пероксидного окиснення ліпідів. Як наслідок, відбувається зв'язування тромбоспондину-1 (TSP-1) з CD47, що створює новий сайт зв'язування для SIRP $\alpha$  [11, 19]. Своєю чергою, цей альтернативний сайт зв'язування для SIRP $\alpha$  індукуює фагоцитоз.

Тромбоспондин є першим ідентифікованим ендogenousним лігандом для CD47 [39]. Старі еритроцити мають здатність зв'язувати TSP-1, а дія на старіючі еритроцити TSP-1-похідними частинками сприяє їхньому фагоцитозу макрофагами червоної пульпи селезінки людини. Аналогічно конформаційних змін зазнає CD47 еритроцитів, які тривалий час зберігалися, внаслідок чого відбулося зв'язування CD47 з TSP-1 [25].

Зниження експресії трансмембранного протеїну еритроцитів CD47 спостерігали також у осіб з ожирінням [110]. Зменшення експресії CD47 в еритроцитах миші було асоційоване зі зростанням кліренсу еритроцитів завдяки їхньому фагоцитуванню макрофагами [85]. Проте для еритроцитів людини є суперечливі дані щодо залежності між інтенсивністю фагоцитозу червоних кров'яних клітин і рівнем експресії на їхній поверхні CD47. Arndt P.A. та Garratty G. (2004) не виявили жодних доказів того, що еритроцити зі зменшеною кількістю CD47 на поверхні їхньої плазматичної мембрани (Rh<sub>null</sub> еритроцити), більшою мірою зазнають фагоцитозу порівняно з еритроцитами із нормальною кількістю CD47 [10]. Разом з тим, R.K. Tsai зі співавторами (2010) продемонстрували, що активність гальмування фагоцитозу еритроцитів людини залежить від щільності CD47 на їхній поверхні [105].

З наведених фактів випливає, що комплекс CD47-SIRP $\alpha$  має подвійну роль у регулюванні фагоцитозу еритроцитів макрофагами, а сам механізм вилучення еритроцитів з кровотоку складний і не до кінця зрозумілий [29]. Очевидно, CD47 виконує роль молекулярного перемикача у регулюванні фагоцитозу [25].

Макрофаги також містять рецептор (LRP-1/ CD91), який розпізнає калретикулін на поверхні еритроцитів. Взаємодія LRP-1 з калретикуліном спричиняє фагоцитоз еритроцитів у тому разі, коли пригнічується утворення комплексу CD47-SIRP $\alpha$  [40, 84].

Протеїн смуги 3, трансмембранний протеїн, на частку якого припадає 25 % від загальної кількості мембранних протеїнів, є мішенню для природних антитіл у процесі елімінації старих і пошкоджених еритроцитів макрофагами. Протеїн складається з двох доменів: 1) мембранного домену з функцією аніонного обмінника, який після кластеризації

розпізнають природні антитіла IgG ізотипу та 2) цитоплазматичного домену, який відповідає за зв'язування цитоскелету з плазматичною мембраною.

Досі нема єдиної думки щодо механізму, який призводить до утворення епітопу на макромолекулі протеїну смуги 3 та до зв'язування природних антитіл. Вважають, що оксидативне пошкодження гемоглобіну в період перебування еритроцита у циркуляції призводить до утворення геміхромів, які зв'язуються з протеїном смуги 3 та спричиняють його кластеризацію [9, 86]. Природні антитіла виявляють підвищену спорідненість до кластерів протеїну смуги 3 [47].

Згідно з іншою гіпотезою, протеолітична деградація протеїну смуги 3 є важливою для формування епітопів для зв'язування з природними антитілами [51]. Проте природні антитіла не є істотними опсонінами через їхню низьку спорідненість і кількість у плазмі крові. Кластеризація протеїнів смуги 3 робить можливим двовалентне зв'язування природних антитіл, а відтак – стимулювання осадження C3b завдяки генеруванню комплексів C3b2-IgG, які діють як потужні попередники конвертази C3 альтернативного шляху комплементу. Такі комплекси є більш стійкими до інактивації факторами Н та І. Приєднання C3b до еритроцитів (опсонізація) сприяє їхньому розпізнаванню макрофагами червоної пульпи селезінки, які містять на своїй поверхні рецептори до комплементу (CR1) [71].

Зв'язування антитіл не тільки з кластеризованим, але і з олігомеризованим протеїном смуги 3 збільшується, якщо у плазмі крові людини наявні індуквані антитіла до лактоферину. Антитіла до лактоферину не виявляють у здорових осіб, проте вони є у плазмі крові пацієнтів з аутоімунними захворюваннями та за наявності антинейтрофільних цитоплазматичних антитіл (ANCA) [71].

Зменшення вмісту мембранного протеїну смуги 3,  $\beta$ -субодиниці спектрину з одночасним збільшенням вмісту протеїнів смуги 4.5 та смуги 4.2, що призводять до зменшення деформабельності мембрани еритроцитів і пришвидшення процесів старіння, спостерігали за нокаутом гена *pttg* у мишей [2].

Макрофаги печінки та селезінки фагоцитують і метаболізують імунні комплекси, які переносять на своїй поверхні еритроцити. На поверхні еритроцитів людини та вищих приматів наявний рецептор комплементу 1 (CR1), який у кров'яному руслі зв'язує опсонізовані частинки (імунні комплекси), що несуть C3b / C4b [53]. У такий спосіб ці опсонізовані частинки транспортуються до селезінки та печінки, де їх фагоцитують макрофаги, а неушкоджений еритроцит продовжує циркулювати у кровотоці. Після зв'язування CR1 з частинками, опсонізованими C3b та C4b, активується вивільнення АТФ, збільшується рухливість ліпідної фракції мембрани еритроцита, що, у свою чергу, полегшує кластеризацію CR1 і тим самим підвищує стійкість зв'язування опсонізованих частинок з CR1 на поверхні еритроцита [80].

### Неоцитоліз

У людини, яка проживає на рівні моря в умовах нормоксії, щосекунди два мільйони еритроцитів руйнуються та замінюються на нові еритроцити, які утворюються у червоному кістковому мозку внаслідок низки послідовних перетворень клітин попередників. З червоного кісткового мозку у кровотік надходять ретикулоцити, які містять органели, окрім ядра, та через 1–2 доби (у середньому 20 год) перетворюються на зрілі еритроцити. Нормальний стаціонарний еритропоез за умов нормоксії відбувається з майже постійною швидкістю утворення еритроцитів, яка становить  $\sim 160 \times 10^6$  еритроцитів за хвилину [74].

За умов гіпоксії спостерігають стресовий еритропоез, або стрес-еритропоез. Збільшення кількості еритроцитів у периферичній крові є одним із механізмів адаптації організму до середовища з низьким парціальним тиском кисню, внаслідок чого покращується

забезпечення киснем усіх тканин. Випадки гострої тканинної гіпоксії, такі як втрата крові, гемоліз і підвищена продукція еритропоєтину, різко стимулюють еритропоез і появу молодих клітин у циркуляції.

Стресовий еритропоез в основному досліджували на моделі миші, яку одержали способом індукування фенілгідразинном ліпідної пероксидації та гемолітичної анемії. У людини ознаки стресового еритропоезу виявляють під час гострої анемії. За цих умов він схожий на еритропоез плода [88], а відтак – збільшується частка клітин-попередників крові, які містять HbF. Гіпоксія також індукує появу HbF-вмісних еритроцитів у культурі клітин-попередників від пацієнтів зі серпоподібно-клітинною анемією і таласемією. Помірне збільшення рівня мРНК та протеїну  $\gamma$ -ланцюга, а також кількості еритроцитів з HbF спостерігали у людей після 17-денного перебування в умовах гіпоксії на висоті понад 3100 м [93].

Постає необхідність коригування кількості еритроцитів, наприклад, після повернення до умов нормоксії. Припускають, що зменшення еритроцитарної маси відбувається завдяки нецитолізу – селективному руйнуванню наймолодшої популяції еритроцитів крові, нецитів, одразу після їхнього надходження з кісткового мозку [7].

Неоцити – це молоді ( $\leq 30$  днів) та менш щільні еритроцити, які здатні довше циркулювати у кров'яному руслі. Термін «неоцит» виник наприкінці 70-х років ХХ ст. у трансфузіології. У 1978 р. була одержана фракція молодих еритроцитів кроля шляхом центрифугування по плавучій густині у градієнті арабіногалактану. Під час переливання їх тваринам з'ясувалося, що ці еритроцити живуть на 50 % довше, ніж нефракціоновані клітини.

Вдруге термін неоцит почали застосовувати в іншому контексті для трактування «космічної анемії» [7], а також процесів деакліматизації людей після перебування у високогір'ї [91].

За умов гіпоксії клітини-попередники еритроцитів дозрівають у червоному кістковому мозку під впливом еритропоєтину у високих концентраціях. Такі еритроцити, очевидно, мають певні біохімічні особливості для їхнього функціонування саме в умовах гіпоксії. Оскільки вони більш чутливі до продуктів ліпідної пероксидації, то після повернення людини до умов нормоксії швидко елімінуються з кров'яного русла.

Кроком для доведення або спростування гіпотези нецитолізу стануть дослідження співвідношення протеїнів 4.1a / 4.1b як абсолютного маркера віку еритроцитів незалежно від їхньої щільності чи метаболічної активності [92]. Ці дані можна буде використати для оцінки селективного видалення молодих клітин, що дає прямі докази існування нецитолізу. Друге – необхідно виявити причини селективного кліренсу клітин, які утворені в умовах високогір'я. Молоді клітини, мічені для передчасного видалення з кров'яного русла, несуть на своїй поверхні сигнали «з'їж мене» або втратили сигнали «не їж мене», а тому розпізнаються макрофагами з метою запобігання внутрішньосудинному гемолізу.

Розуміння фізіологічних основ руйнування еритроцитів важливе як з теоретичної, так і з практичної точки зору для клінічної медицини, розробки нових терапевтичних підходів, наприклад, для лікування малярії, корекції адаптивних можливостей людини до екстремальних станів (умови гіпоксії, невагомості тощо). Хоча на сьогодні наявна велика кількість фактичного матеріалу, однак об'єднати його у струнку теорію ще не вдається через наявні прогалини у цій сфері, яка потребує подальшого вивчення.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Атауллаханов Ф. И., Корунова Н. О., Спиридонова И. С. и др. Как регулируется объем эритроцита, или Что могут и чего не могут математические модели в биологии // Биологические мембраны. 2009. Т. 26. № 3. С. 163–79.
2. Канюка О. П., Філяк Є. З., Кулачковський О. Р. та ін. Кількісні зміни основних компонентів еритроцитарної мембрани, що визначають архітектоніку клітин за нокауту гена *pttg* // Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86. N 2. С. 41–49.
3. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степная Е. А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2004. 200 с.
4. Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева. Т. 3. М.: Ньюдиамед, 2005. 416 с.
5. Уразова О. И., Новицкий В. В. Лабораторная диагностика гематологических синдромов и болезней. Томск: Печатная мануфактура, 2008. 97 с.
6. Alaarg A., Schiffelers R. M., van Solinge R. W., van Wijk R. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia // Front. Physiol. 2013. Vol. 4. P. 365.
7. Alfrey C. P., Rice L., Udden M. M., Driscoll T. B. Neocytolysis: physiological down-regulator of red-cell mass // Lancet. 1997. Vol. 349. N 9062. P. 1389–1390.
8. Arandjelovic S., Ravichandran K. S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis // Nat. Immunol. 2015. Vol. 16. N 9. P. 907–917.
9. Arashiki N., Kimata N., Manno S. et al. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence // Biochemistry. 2013. Vol. 52. N 34. P. 5760–5769.
10. Arndt P. A., Garratty G. Rh(null) red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes // Br. J. Haematol. 2004. Vol. 125. N 3. P. 412–414.
11. Barclay A. N., van den Berg T. K. The interaction between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRPAlpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target // Annu. Rev. Immunol. 2014. Vol. 32. P. 25–50.
12. Bevers E., Comfurius P., Dekkers D., Zwaal R. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1439. N 3. P. 317–330.
13. Bogdanova A., Makhro A., Wang J. et al. Calcium in red blood cells—a perilous balance // Int. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. P. 9848–9872.
14. Bookchin R. M., Lew V. L. Progressive inhibition of the Ca pump and Ca:Ca exchange in sickle red cells // Nature. 1980. Vol. 284. P. 561–563.
15. Bosman G. J. Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences // Front. Physiol. 2013. Vol. 4. P. 376.
16. Bosman G. J., Willekens F. L., Werre J. M. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? // Cell Physiol. Biochem. 2005. Vol. 16. P. 1–8.
17. Brovelli A., Minetti G. Red cell ageing. In: Bernhardt I, Ellory JC (eds). Red Cell Membrane Transport in Health and Disease. Springer: Heidelberg, Germany, 2003. P. 673–690.
18. Bruce L. J., Ghosh S., King M. J. et al. Tanner Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex // Blood. 2002. Vol. 100. N 5. P. 1878–1885.
19. Burger P., Hilarius-Stokman P., de Korte D. et al. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis // Blood. 2012. Vol. 119. P. 5512–5521.
20. Burnier L., Fontana P., Kwak B. R., Angelillo-Scherrer F. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine // Thromb. Haemost. 2009. Vol. 101. N 3. P. 439–451.

21. *Catan A., Turpina C., Diotela N.* et al. Aging and glycation promote erythrocyte phagocytosis by human endothelial cells: Potential impact in atherothrombosis under diabetic conditions // *Atherosclerosis*. 2019. Vol. 291. P. 87–98.
22. *Chu H., Puchulu-Campanella E., Galan J. A.* et al. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. Vol. 109. P. 12794–12799.
23. *Ciana A., Achilli C., Gaur A., Minetti G.* Membrane remodelling and vesicle formation during ageing of human red blood cells // *Cell Physiol. Biochem*. 2017. Vol. 42. N 3. P. 1127–1138.
24. *Ciana A., Achilli C., Minetti G.* Spectrin and other membrane-skeletal components in human red blood cells of different age // *Cell Physiol. Biochem*. 2017. Vol. 42. N 3. P. 1139–1152.
25. *de Back D. Z., Kostova E. B., van Kraaij M.* et al. Of macrophages and red blood cells; a complex love story // *Front. Physiol*. 2014. Vol. 5. P. 9.
26. *de Vooght K. M., Lau C., de Laat P. P.* et al. Extracellular vesicles in the circulation: are erythrocyte microvesicles a confounder in the plasma haemoglobin assay? // *Biochem. Soc. Trans*. 2013. Vol. 41. N 1. P. 288–292.
27. *Derganc J., Bozic B., Svetina S., Zeks B.* Equilibrium shapes of erythrocytes in rouleau formation // *Biophys. J*. 2003. Vol. 84. P. 1486–1492.
28. *Dyrda A., Cytlak U., Ciuraszkiewicz A.* et al. Local membrane deformations activate Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> and anionic currents in intact human red blood cells // *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. N 2. P. e9447.
29. *Ensinck M. A., Brajovich M. E. L., Borrás S. G.* et al. Erythrocyte senescent markers by flow cytometry // *Open Journal of Blood Diseases*. 2019. Vol. 09. N 03. P. 47–59.
30. *Fader C. M., Colombo M. I.* Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation // *Autophagy*. 2006. Vol. 2. N 2. P. 122–125.
31. *Fedosov D. A., Dao M., Karniadakis G. E., Suresh S.* Computational biorheology of human blood flow in health and disease // *Ann. Biomed. Eng*. 2014. Vol. 42. P. 368–387.
32. *Fedosov D. A., Noguchi H., Gompper G.* Multiscale modeling of blood flow: from single cells to blood rheology // *Biomech. Model. Mechanobiol*. 2014. Vol. 13. P. 239–258.
33. *Fens M. H., van Wijk R., Andringa G.* et al. A role for activated endothelial cells in red blood cell clearance: implications for vasopathology // *Haematologica*. 2012. Vol. 97. P. 500–508.
34. *Flannagan R. S., Jaumouille V., Grinstein S.* The cell biology of phagocytosis // *Annu. Rev. Pathol*. 2012. Vol. 7. P. 61–98.
35. *Foller M., Kasinathan R. S., Koka S.* et al. TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes // *Cell Physiol. Biochem*. 2008. Vol. 21. N 1–3. P. 183–192.
36. *Franco R. S.* The measurement and importance of red cell survival // *Am. J. Hematol*. 2009. Vol. 84. P. 109–114. doi: 10.1002/ajh.21298
37. *Franco R. S., Puchulu-Campanella M. E., Barber L. A.* et al. Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging // *Am. J. Hematol*. 2013. Vol. P. 44–51.
38. *Fujioka Y., Matozaki T., Noguchi T.* et al. A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2- domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion // *Mol. Cell. Biol*. 1996. Vol. 16. N 12. P. 6887–6899.
39. *Gao A. G., Frazier W. A.* Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins // *J. Biol. Chem*. 1994. Vol. 269. N 47. P. 29650–29657.
40. *Gardai S. J., McPhillips K. A., Frasch S. C.* et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte // *Cell*. 2005. Vol. 123. P. 321–334.
41. *Ginzel D., Silberberg S. D., Shoshan-Barmatz V.* Modulation of the voltage-dependent anion

- channel (VDAC) by glutamate // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000. Vol. 32. N 6. P. 571–583.
42. *Ghashghaeinia M., Chuitmans J. C. A., Akel A.* et al. The impact of erythrocyte age on eryptosis // *Br. J. Haematol.* 2012. Vol. 157. N 5. P. 606–614.
43. *Gompper G., Fedosov D. A.* Modeling microcirculatory blood flow: current state and future perspectives // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2016. Vol. 8. 157–168.
44. *Graham T.* Flippases and vesicle-mediated protein transport // *Trends Cell Biol.* 2004. Vol. 14. N 12. P. 670–677.
45. *Harisa G. I., Badran M. M., Alanazi F. K.* Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach: Erythrocyte nanovesicles // *Saudi Pharm J.* 2017. Vol. 25. N 1. P. 8–17.
46. *Holroyde C. P., Gardner F. H.* Acquisition of autophagic vacuoles by human erythrocytes. Physiological role of the spleen // *Blood.* 1970. Vol. 36. P. 566–575.
47. *Hornig R., Lutz H. U.* Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies // *Exp. Gerontol.* 2000. Vol. 35. N 8. P. 1025–1044.
48. *Jank H., Salzer U.* Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils // *Sci. World J.* 2011. Vol. 11. P. 173–185.
49. *Kaestner L.* Cation channels in erythrocytes – historical and future perspective // *Open Biol. J.* 2011. Vol. 4. P. 27–34.
50. *Kaestner L., Minetti G.* The potential of erythrocytes as cellular aging models // *Cell Death & Differentiation.* 2017. Vol. 24. P. 1475–1477.
51. *Kay M. M.* Band 3 and its alterations in health and disease // *Cell. Mol. Biol.* 2004. Vol. 50. N 2. P. 117–138.
52. *Kent G., Minick O. T., Volini F. I., Orfei E.* Autophagic vacuoles in human red cells // *Am. J. Pathol.* 1966. Vol. 48. P. 831–857.
53. *Khera R., Das N.* Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications // *Mol. Immunol.* 2009. Vol. 46. N 5. P. 761–772.
54. *Knowles D., Tilley L., Mohandas N., Chasis J.* Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. N 24. P. 12969–12974.
55. *Kolb S., Vranckx R., Huisse M.-G.* et al. The phosphatidylserine receptor mediates phagocytosis by vascular smooth muscle cells // *J. Pathol.* 2007. Vol. 212. N 3. P. 249–259.
56. *Kristiansen M., Graversen J. H., Jacobsen C.* et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor // *Nature.* 2001. Vol. 409. N 6817. P. 198–201.
57. *Kuchel P. W., Shishmarev D.* Accelerating metabolism and transmembrane cation flux by distorting red blood cells // *Sci. Adv.* 2017. Vol. 3. N 10. P. eaao1016.
58. *Lang F., Gulbins E., Lang P. A.* et al. Ceramide in suicidal death of erythrocytes // *Cell. Physiol. Biochem.* 2010. Vol. 26. N 1. P. 21–28.
59. *Lang F., Gulbins E., Lerche H.* et al. Eryptosis, a window to systemic disease // *Cell Physiol. Biochem.* 2008. Vol. 22. P. 373–80.
60. *Lang F., Qadri S. M.* Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes // *Blood Purification.* 2012. Vol. 33. N 1–3. P. 125–130.
61. *Lang K. S., Duranton C., Poehlmann H.* et al. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes // *Cell Death Differ.* 2003. Vol. 10. P. 249–256.
62. *Lang K. S., Lang P. A., Bauer C.* et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death // *Cell Physiol. Biochem.* 2005. Vol. 15. N 5. P. 195–202.



63. Lang K. S., Myssina S., Brand V. et al. Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes // *Cell Death Differ.* 2004. Vol. 11. N 2. P. 231–243.
64. Lang P. A., Kempe D. S., Tanneur V. et al. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor // *J. Cell Sci.* 2005. Vol. 118. P. 1233–1243.
65. Lanotte L., Mauer J., Mendez S. et al. Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. Vol. 113. P. 13289–13294.
66. Levy A. P., Asleh R., Blum S. et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2010. Vol. 12. N 2. P. 293–304.
67. Lew V. L., Daw N., Etzion Z. et al. Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells // *Blood.* 2007. Vol. 110. P. 1334–1342.
68. Lew V. L., Raftos J. E., Sorette M. P. et al. Generation of normal human red cell volume, hemoglobin content and membrane area distributions, by “birth” or regulation? // *Blood.* 1995. Vol. 86. P. 334–341.
69. Lew V. L., Tiffert T. On the mechanism of human red blood cell longevity: Roles of Calcium, the Sodium Pump, PIEZO1, and Gardos Channels // *Front Physiol.* 2017. Vol. 12. N 8. P. 977.
70. Lutz H. U., Bogdanova A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans // *Front. Physiol.* 2013. Vol. 4. P. 387.
71. Lutz H. U. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells // *Transfus Med Hemother.* 2012. Vol. 39. N 5. P. 321–327.
72. Lutz H. U., Bogdanova A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans // *Front Physiol.* 2013. Vol. 4. P. 387.
73. Maher A. D., Kuchel P. W. The Gardos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. Vol. 35. N 8. P. 1182–1197.
74. Mairbäurl H. Neocytolysis: how to get rid of the extra erythrocytes formed by stress erythropoiesis upon descent from high altitude // *Front Physiol.* 2018. Vol. 9. P. 345.
75. Makhro A., Wang J., Vogel J. et al. Functional NMDA receptors in rat erythrocytes // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010. Vol. 298. N 6. P. C1315–C1325.
76. Makhro A., Hanggi P., Goede J. et al. N-Methyl d-Aspartate (NMDA) receptors in erythroid precursor cells and in circulating human red blood cells contributes to the regulation of intracellular calcium levels // *Am. J. Physiol.* 2013. Vol. 305. N 11. P. C1123–C1138.
77. Mandal D., Mazumder A., Das P. et al. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 39460–39467.
78. Matozaki T., Murata Y., Okazawa H., Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway // *Trends Cell Biol.* 2009. Vol. 19. N 2. P. 72–80.
79. Mehdi M. M., Singh P., Rizvi S. I. Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: correlation with markers of oxidative stress // *Dis Markers.* 2012. Vol. 32. N 3. P. 179–186.
80. Melhorn M. I., Brodsky A. S., Estanislau J. et al. CR1-mediated ATP Release by Human Red Blood Cells Promotes CR1 Clustering and Modulates the Immune Transfer Process // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. N 43. P. 31139–31153.
81. Miller Y. E., Daniels G. L., Jones C., Palmer D. K. Identification of a cell-surface antigen produced by a gene on human chromosome 3 (cen-q22) and not expressed by Rhnull cells // *Am. J. Hum. Genet.* 1987. Vol. 41. N 6. P. 1061–1070.
82. Morel O., Jesel L., Freyssinet J., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. Vol. 31. N 1. P. 15–26.

83. *Neelam S., Kakhniashvili D. G., Wilkens S.* et al. Functional 20S proteasomes in mature human red blood cells // *Exp. Biol. Med* (Maywood). 2011. Vol. 236. N 5. P. 580–591.
84. *Nilsson A., Vesterlund L., Oldenborg P. A.* Macrophage expression of LRP1, a receptor for apoptotic cells and unopsonized erythrocytes, can be regulated by glucocorticoids // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. Vol. 417. N 4. P. 1304–1309.
85. *Olsson M., Nilsson A., Oldenborg P. A.* Dose-dependent inhibitory effect of CD47 in macrophage uptake of IgG-opsonized murine erythrocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 352. N 1. P. 193–197.
86. *Pantaleo A., Giribaldi G., Mannu F.* et al. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions // *Autoimmun. Rev.* 2008. Vol. 7. N 6. P. 457–462.
87. *Pasini E. M., Kirkegaard M., Mortensen P.* et al. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells // *Blood.* 2006. Vol. 108. N 3. P. 791–801.
88. *Paulson R. F., Shi L., Wu D. C.* Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells // *Curr. Opin. Hematol.* 2011 May. Vol. 18(3). P. 139–145.
89. *Pulford K., Micklem R., McCarthy S.* et al. A monocyte/macrophage antigen recognized by the four antibodies GHI/61, BerMAC3, Ki-M8 and SM4 // *Immunology.* 1992. Vol. 75. N 4. P. 588–595.
90. *Qadri S. M., Bissinger R., Solh Z., Oldenborg, P.-A.* Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes // *Blood Reviews.* 2017. Vol. 31. N 6. P. 349–361.
91. *Rice L., Ruiz W., Driscoll T.* et al. Neocytolysis on descent from altitude: a newly recognized mechanism for the control of red cell mass // *Ann. Intern. Med.* 2001. Vol. 134. N 8. P. 652–656. 10.7326/0003-4819-134-8-200104170-00010
92. *Risso A., Ciana A., Achilli C.* et al. Neocytolysis: none, one or many? A reappraisal and future perspectives // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5. P. 54.
93. *Risso A., Fabbro D., Damante G., Antonutto G.* Expression of fetal hemoglobin in adult humans exposed to high altitude hypoxia // *Blood Cells Mol. Dis.* 2012. Vol. 48. N 3. P. 147–153.
94. *Schaer D. J., Schaer C. A., Buehler P. W.* et al. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin // *Blood.* 2006. Vol. 107. N 1. P. 373–380.
95. *Schaer C. A., Vallelian F., Imhof A.* et al. CD163- expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system // *J. Leukoc Biol.* 2007. Vol. 82. P. 106–110.
96. *Schaer D. J., Vinchi F., Ingolia G.* et al. Buehler Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways—basic science, clinical perspectives, and drug development // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5. P. 415.
97. *Stijlemans B., Cnops J., Naniima P.* et al. Development of a pHrodo-based assay for the assessment of in vitro and in vivo erythrophagocytosis during experimental trypanosomiasis // *PLoS Negl Trop Dis.* 2015. Vol. 9 (3). P. e0003561.
98. *Stowell S. R., Smith N. H., Zimring J. C.* et al. Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization // *Transfusion.* 2013. Vol. 53. N 10. P. 2248–2257.
99. *Subramanian K., Ruijuan Du, Tan N. S.* et al. CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms // *J. Immunol.* 2013. Vol. 190. N 10. P. 5267–5278.

100. *Thery C., Ostrowski M., Segura E.* Membrane vesicles as conveyors of immune responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 9. N 8. P. 581–593.
101. *Theurl I., Hilgendorf I., Nairz M.* et al. On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver // *Nat. Med.* 2016. Vol. 22. P. 945–951.
102. *Tiffert T., Bookchin R. M., Lew V. L.* Calcium homeostasis in normal and abnormal human red cells. In *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*; Bernhardt, I., Ellory, C., Eds.; Springer Verlag: Heidelberg, Germany. 2003. P. 373–405.
103. *Tissot J.-D., Canellini G., Rubin O.* et al. Blood microvesicles: from proteomics to physiology // *Translational Proteomic.* 2013. Vol. 1. N 1. P. 38–52.
104. *Tsai R. K., Discher D. E.* Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells // *J. Cell Biol.* 2008. Vol. 180. N 5. P. 989–1003.
105. *Tsai R. K., Rodriguez P. L., Discher D. E.* Self inhibition of phagocytosis: the affinity of ‘Marker of Self’ CD47 for SIRPα dictates potency of inhibition but only at low expression levels // *Blood Cells Mol. Dis.* 2010. Vol. 45. N 1. P. 67–74.
106. *van den Berg T. K., van Beek E. M., Bühring H. J.* et al. A nomenclature for signal regulatory protein family members // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175. N 12. P. 7788–7789
107. *Wagner-Britz L., Wang J., Kaestner L., Bernhardt I.* Protein kinase Calpha and P-type Ca channel CaV2.1 in red blood cell calcium signalling // *Cell Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 31. N 6. P. 883–891.
108. *Waugh R. E., Narla M., Jackson C. W.* et al. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age // *Blood.* 1992. Vol. 79. N 5. P. 1351–1358.
109. *Wesseling M. C., Wagner-Britz L., Boukhdoud F.* et al. Measurements of intracellular Ca<sup>2+</sup> content and phosphatidylserine exposure in human red blood cells: methodological issues // *Cell Physiol Biochem.* 2016. Vol. 38. N 6. P. 2414–2425.
110. *Wiewiora M., Piecuch J., Sedek L.* et al. The effects of obesity on CD47 expression in erythrocytes // *Cytometry B Clin Cytom.* 2017. Vol. 92. N 6. P. 485–491.
111. *Willekens F. L., Were J. M., Groenen-Döpp Y. A.* et al. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? // *Br. J. Haematol.* 2008. Vol. 141. N 4. P. 549–556.
112. *Willekens F. L., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Döpp Y. A.* et al. Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation // *Blood.* 2003. Vol. 101. N 2. P. 747–&51.
113. *Willekens F. L., Werre J. M., Kruijt J. K.* et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors // *Blood.* 2005. Vol. 105. N 5. P. 2141–2145.
114. *Zwadlo G., Voegeli R., Schulze Osthoff K., Sorg C.* A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process // *Exp. Cell Biol.* 1987. Vol. 55. N 6. P. 295–304.
115. *Zweig S. E., Tokuyasu K. T., Singer S. J.* Member-associated changes during erythropoiesis. On the mechanism of maturation of reticulocytes to erythrocytes // *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* 1981. Vol. 17. P. 163–181.

Стаття надійшла до редакції 14.02.20

доопрацьована 18.05.20

прийнята до друку 19.05.20

---

**CELLULAR MECHANISMS OF ERYTHRODIERESIS**

---

**T. Korol**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: tetiana.korol10@gmail.com*

Normally erythrodiereis is in a dynamic equilibrium with the process of erythropoiesis, and is therefore one of the factors to providing a relatively constant number of red blood cells in the bloodstream. The physiologically old, damaged and non-viable erythrocytes, as well as the erythrocytes which are produced during stress erythropoiesis, are destroyed. Erythrocyte clearance is a selective process. First of all, the cells that have lost their ability to deform are removed from the bloodstream. The deformability of red blood cells depends on the shape of the cells, the viscosity of the cytoplasm and the mechanical properties of the membrane. Old and altered erythrocytes are quite rigid, and are therefore delayed in the narrow capillaries and venous sinuses of the liver and spleen. In addition, macrophages of the liver and spleen phagocytize erythrocytes, which expose "eat me" signaling molecules on their surface. Exposure of phosphatidylserine on the outer cell surface of erythrocytes and vesicles results in their elimination from the bloodstream by Kupffer cells and other mononuclear phagocytes. During the initiation of erythrophagocytosis, the phosphatidylserine of the outer lipid layer of the erythrocyte plasma membrane directly interacts with the receptors Stabilin-2, TIM-1, TIM-4 or CD300 of macrophages. The macrophage's integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$ , as well as the Mer receptor tyrosine kinase indirectly interact with the cell surface-exposed phosphatidylserine through the soluble proteins MFG-E8, Gas 6 and protein S. Clustering of the erythrocyte membrane protein band 3 causes the binding of natural antibodies, and opsonization of erythrocytes with C3b enhances this process and facilitates the recognition of such cells by red pulp macrophages in the spleen. In senescent erythrocytes, the formation of the CD47-SIRP $\alpha$  complex («do not eat me» signal), is suppressed, and this is an additional stimulus for erythrocytes removing by splenic and liver macrophages.

The purpose of the review is to describe the mechanisms of erythrophagocytosis and the molecular determinants of erythrocyte senescence and death, including eryptosis and neocytolysis, and to illustrate the substantiated facts and contradictions that exist at the present time of the study of this scientific problem.

*Keywords:* erythrocyte, erythrodiereis, phagocytosis, eryptosis, phosphatidylserin, intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration

## **ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ ГІСТАМІНУ І КВЕРЦЕТИНУ**

**Н. Гарасим, М. Вербещук, Н. Боднарчук, М. Галан, Д. Санагурський**

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

Досліджували вміст продуктів ліпопероксидації та окисної модифікації білків у плазмі крові щурів за дії кверцетину і гістаміну. Кверцетин використовували у концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 мМ, а гістамін – 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ. Встановлено, що кверцетин у плазмі крові щурів зумовлює зростання вмісту гідропероксидів і ТБК-позитивних продуктів, крім концентрації 0,5 мМ, за якої вміст вторинних продуктів знижується, а вміст первинних продуктів ліпопероксидації залишається у межах контролю. Зростання вмісту гідропероксидів та зниження ТБК-позитивних продуктів показано за впливу гістаміну у концентраціях 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ. Поєднана дія гістаміну і кверцетину зумовлює значне зростання вмісту первинних продуктів ліпопероксидації у плазмі крові, тоді як вміст ТБК-позитивних продуктів ПОЛ знижується. Кверцетин у діапазоні концентрацій 0,1÷1 мМ інтенсифікує накопичення карбонільних груп білків основного і нейтрального характеру, тоді як у концентраціях 3; 5 мМ – уповільнює процес окисної модифікації білків. Гістамін у всіх досліджуваних концентраціях призводить до підвищення вмісту карбонільних груп білків, крім концентрації 0,1 мкМ. На тлі дії гістаміну високої концентрації кверцетин знижує інтенсивність окисної модифікації білків. Одночасна дія гістаміну низької концентрації та кверцетину в концентраціях 0,5 і 5 мМ зумовлює накопичення карбонільних груп білків нейтрального характеру, а також основного характеру лише за впливу кверцетину в концентрації 5 мМ. За результатами дисперсійного аналізу встановлено, що на накопичення ТБК-позитивних продуктів і карбонільних груп білків основного характеру максимальний вплив чинить кверцетин. На накопичення гідропероксидів ліпідів сильний вплив має гістамін. Кверцетин у концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3 мМ зумовлює сильну тісноту взаємозв'язку між окремими досліджуваними показниками вільнорадикальних процесів, у плазмі крові щурів. Біофлавоноїд у концентрації 5 мМ призводить до формування взаємозв'язку середньої сили. Гістамін у концентраціях 10; 1; 0,1 мкМ спричиняє тісноту взаємозв'язку середньої сили між окремими показниками вільнорадикального окиснення. Гістамін у концентрації 0,01 мкМ зумовлює значне посилення кореляційної залежності між показниками ПОЛ і окисної модифікації білків. Поєднана дія кверцетину у концентрації 0,1 мМ і гістаміну у концентрації 0,01 мкМ зумовлює посилення кореляційного зв'язку між показниками ТБК-позитивних продуктів і продуктами окисної модифікації білків.

*Ключові слова:* пероксидне окиснення ліпідів, окисна модифікація білків, кверцетин, гістамін

Процеси пероксидного окиснення (ПОЛ), які потрібні для нормального функціонування біохімічних і фізіологічних систем, у нормі невинно відбуваються в усіх клітинах живих організмів. Продукти пероксидного окиснення мембранотоксичні, вони деформують мембрани клітин, змінюють електричний потенціал, осмотичний

тиск у клітинах, пошкоджують структуру білків і нуклеїнових кислот [2, 10, 19, 23, 24]. Актуальність досліджень вільнорадикальних окиснювальних реакцій обумовлена їхньою роллю у патогенезі більшості патологічних процесів.

Гістамін є одним із моноамінів, який має широкий спектр впливу на організм за різних фізіологічних і патологічних станів, включаючи проліферацію та диференціацію клітин, кровотворення, ембріональний розвиток, регенерацію тканин, загоєння ран, регулює діяльність центральної нервової, серцево-судинної, травної, ендокринної та імунної систем [9, 13, 18, 20].

Біофлавоноїди – це група природних поліфенольних сполук, які містяться у складі вищих рослин і мають широкий спектр біологічної дії [6]. До цієї групи сполук належить кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонол). Вважають, що його антиоксидантна активність є вищою, ніж у відомого антиоксиданта – альфа-токоферолу. В останні роки значно зросла увага дослідників до кверцетину у зв'язку з виявленням нових видів його біологічної активності: імуностимулюючої, інгібуючої дії на фермент 5-ліпоксигеназу (ключового ферменту метаболізму арахідонової кислоти), яка впливає на синтез лейкотрієнів і загалом на запальні процеси; протидіабетичної, інгібуючої дії на фермент протеїнкіназу С [1, 17, 22]. Є відомості, що кверцетин знижує вміст гістаміну в біологічних рідинах, хоча до кінця не з'ясованим залишається механізм такої дії. Також цікаво дослідити вплив цих сполук на процеси ліпопероксидації.

Мета роботи – вивчити інтенсивність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків у плазмі крові щурів за дії *in vitro* кверцетину і гістаміну

#### Матеріали та методи

Було проведено дослід на безпородних білих щурах масою тіла  $180 \pm 10$  г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин підбирали за принципом аналогів. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом.

У першій серії досліджень до цільної крові додавали розчин кверцетину, щоб кінцева концентрація становила 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 мМ. 1 мМ і 3 мМ – концентрації кверцетину, які використовуються у медицині і фармації (разова доза за перорального споживання). Кверцетин розчиняли у теплому фізіологічному розчині (37 °С). У другій серії досліджень до крові додавали розчин гістаміну, щоб кінцева концентрація становила 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ. Ці концентрації ми обрали, враховуючи результати досліджень інших науковців. Розчини готували, використовуючи 0,9 % NaCl. У третій серії експерименту до цільної крові додавали гістамін (у концентраціях 0,01 і 10 мкМ) і кверцетин (у концентраціях 0,1; 0,5; 3; 5 мМ). Зразки крові, до якої додавали фізіологічний розчин (0,01 мл) нами прийнято за контроль. Інкубували 5 хв, після чого центрифугували за 3000 об/хв упродовж 10 хв. Для аналізу відбирали плазму крові. У відібраних зразках визначали інтенсивність процесів ПОЛ за вмістом гідропероксидів ліпідів і ТБК-позитивних продуктів [12, 14]. Принцип методу реєстрації вмісту гідропероксидів ліпідів полягає в тому, що в розбавлених водних розчинах гідропероксиди ліпідів окиснюють  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ . Останній виявляють за допомогою кольорової реакції з тіоціанатом амонію. Принцип методу визначення ТБК-позитивних продуктів ґрунтується на активації ПОЛ іонами двовалентного феруму до рівня, який реєструється спектрофотометрично. За високої температури у кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворюючи забарвлений триметиновий комплекс. Рівень окиснювальної модифікації білків у плазмі крові досліджували за методом І.Ф. Мещишена [11], який базується на тому, що кінцеві продукти вільнорадикального окиснення білків можуть реагувати з 2,4-динітрофенілгідра-

зином (ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували за 370 та 430 нм проти контролю. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєструються за 370 нм, а основного характеру – за 430 нм. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [21].

Результати досліджень статистично обробляли з обчисленням середніх арифметичних величин ( $M$ ), стандартної похибки ( $m$ ) і ступеня вірогідності різниці ( $p$ ) між показниками. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Статистичну обробку всіх результатів досліджень проводили з використанням програми «Excel-2010» для Windows. Проводили кореляційний і дисперсійний аналіз, застосовуючи пакет прикладних статистичних програм у Excel (Correlation; ANOVA: Two-Factor With Replication).

### Результати і їхнє обговорення

Оскільки розчини кверцетину і гістаміну готували, використовуючи фізіологічний розчин (з метою збереження еритроцитів, щоб не відбувся гемоліз), до інтактних зразків крові було додано також 0,9 % NaCl. Порівнявши вміст гідропероксидів у плазмі крові інтактних тварин ( $0,0055 \pm 0,0004$  ум. од./мг білка) та у плазмі, до якої додавали фізіологічний розчин ( $0,0065 \pm 0,0005$  ум. од./мг білка), ми виявили зростання вмісту гідропероксидів. Тому за нами було прийнято зразки плазми крові, до якої додавали фізіологічний розчин. Встановлено, що вміст гідропероксидів ліпідів зростає за впливу кверцетину в концентрації 1 і 5 мМ на 100 та 203 % відповідно (рис. 1), тоді як за концентрацій 0,1; 0,3; 0,5 та 3 мМ не встановлено достовірних змін гідропероксидів ліпідів.

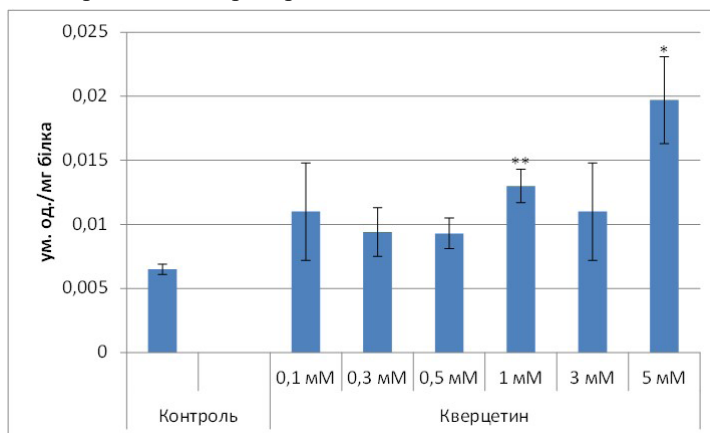


Рис. 1. Вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові шурів за дії кверцетину в концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 мМ (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ )

Додавання до крові гістаміну зумовлює зростання у плазмі вмісту гідропероксидів ліпідів. Так, за концентрації гістаміну 0,01; 0,1; 1 та 10 мкМ вміст гідропероксидів підвищується в 11,9; 7,3; 6,2; 5,7 рази (рис. 2). Отже, за зниження концентрації гістаміну зростає вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові.

Однчасна дія кверцетину і гістаміну зумовлює виражений прооксидантний ефект, про що свідчить значне підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів у плазмі крові (у  $15,26 \div 28,22$  рази щодо контролю), порівняно з окремою дією цих чинників (рис. 3). Найвираженіше зростання вмісту продуктів ліпопероксидації відбувається за поєданої дії

гістаміну в концентрації 0,01 мкМ і кверцетину (0,1; 0,5; 3; 5 мМ). Відомо, що кверцетин в організмі може виступати у ролі прооксиданта, посилюючи вільнорадикальні процеси. Під час знешкодження гістаміну, зокрема, за дії гістамінази, утворюються продукти окисного дезамінування цього біогенного аміну: альдегід, пероксид водню і аміак. Отже, одночасне додавання до крові гістаміну і кверцетину в плазмі посилюють токсичні ефекти цих сполук.

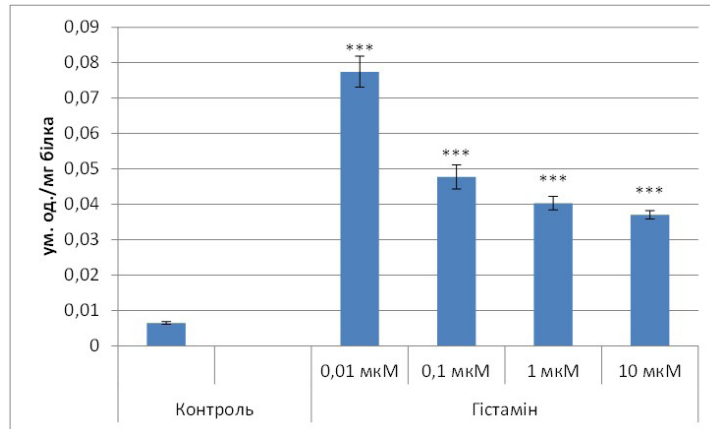


Рис. 2. Вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів за дії гістаміну в концентраціях 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ (\*\*\*) –  $p \geq 0,999$ )

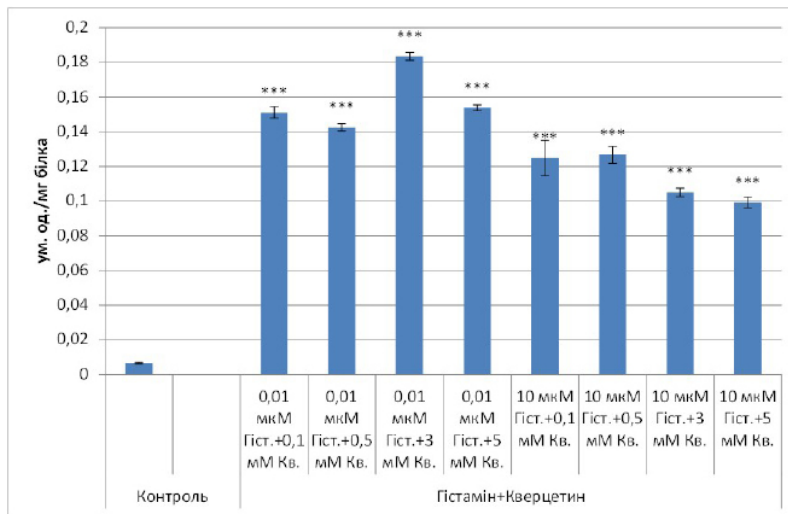


Рис. 3. Вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів за одночасного впливу гістаміну в концентрації 0,01; 10 мкМ і кверцетину в концентрації 0,1; 0,5; 3; 5 мМ (\*\*\*) –  $p \geq 0,999$ )

Отже, одна з терапевтичних концентрацій кверцетину (1 мМ) призводить до зростання вмісту гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів. За дії кверцетину в максимальній досліджуваній концентрації відбувається зростання вмісту первинних продуктів ПОЛ. Щодо поєднаної дії гістаміну і кверцетину, то за усіх концентрацій відбувається посилення інтенсивності утворення гідропероксидів ліпідів.

Порівнявши вміст ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові інтактних щурів ( $0,198 \pm 0,01$  мкмоль/мг білка) з їхнім вмістом у плазмі, де містився фізіологічний розчин



( $0,234 \pm 0,006$  мкмоль/мг білка), ми виявили незначне, проте достовірне зростання цього показника на 18 %.

Порівняно з контролем, вміст ТБК-позитивних продуктів значно зростає за впливу кверцетину в концентрації 0,1 і 3 мМ (на 88 і 68 % відповідно; рис. 4). Менш виражена інтенсивність зростання вмісту цих продуктів у плазмі зафіксована за впливу кверцетину в концентраціях 0,3 і 1 мМ (на 20 і 27 % відповідно).

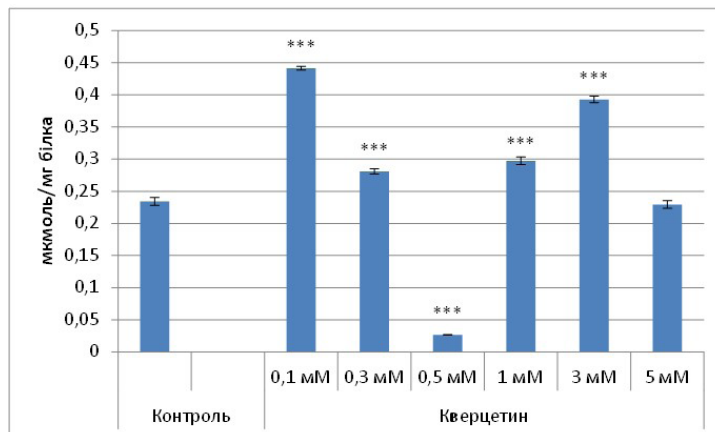


Рис. 4. Вміст ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові щурів за дії кверцетину в концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 мМ (\*\*\*) –  $p \geq 0,999$ )

Кверцетин у концентрації 5 мМ не впливає на вміст ТБК-позитивних продуктів, тоді як у 10 разів нижча від попередньої концентрація зумовлює зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації на 89 % (рис. 4).

Додавання до цільної крові гістаміну в концентраціях 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ забезпечує зниження (на 38, 38, 57, 29 % відповідно) вмісту ТБК-позитивних продуктів у плазмі (рис. 5). Показано, що поєднана дія гістаміну і кверцетину також зумовлює зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів, крім дослідних зразків, де одночасно додавали гістамін у концентрації 10 мкМ і кверцетин у концентрації 3 мМ. За таких умов вміст вторинних продуктів ліпопероксидації зростає на 29 % (рис. 6).

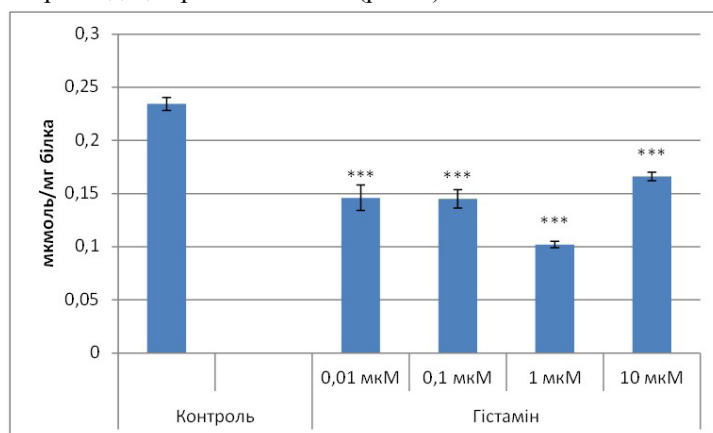


Рис. 5. Вміст ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові щурів за дії гістаміну в концентрації 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ (\*\*\*) –  $p \geq 0,999$ )

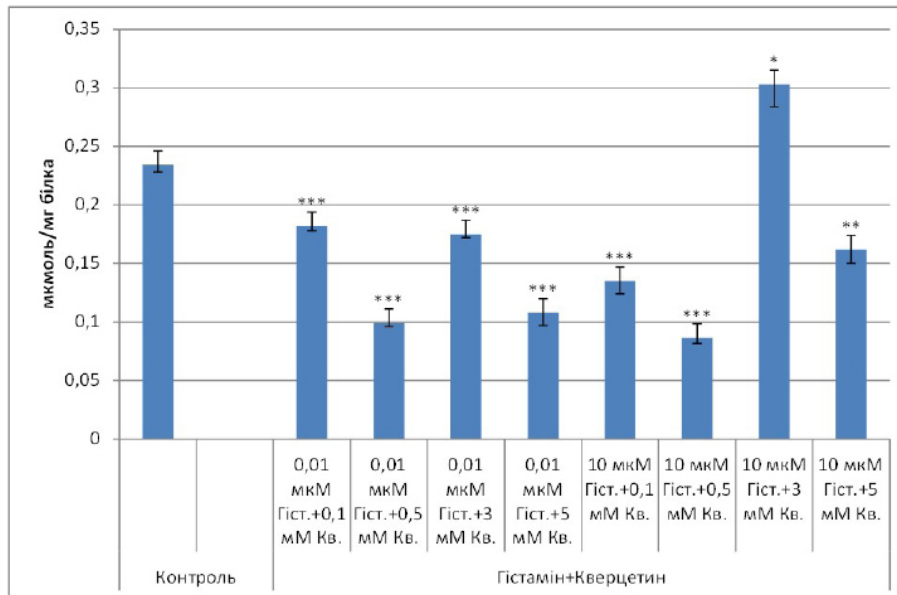


Рис. 6. Вміст ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові щурів за одночасного впливу гістаміну в концентрації 0,01; 10 мкМ і кверцетину в концентрації 0,1; 0,5; 3; 5 мМ (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

Отже, нами встановлено, що терапевтичні концентрації кверцетину (1 і 3 мМ) зумовлюють зростання інтенсивності процесів ПОЛ у плазмі крові щурів. Оскільки наші дослідження проведені *in vitro*, то за цих умов не відбувається повноцінного знешкодження лікарського препарату (наприклад, цитохромами Р-450). Додавання до цільної крові кверцетину в терапевтичних концентраціях зумовлює більш агресивну його дію, порівняно з тим впливом, який відбувається за перорального вживання препарату. Цим ми пояснюємо шкідливий вплив кверцетину в терапевтичних концентраціях на вільнорадикальні процеси у плазмі крові щурів.

Варто відмітити, що вміст ТБК-позитивних продуктів зростає за дії кверцетину низьких концентрацій (0,1 та 0,3 мМ).

У науковій літературі є повідомлення, що під час модифікації флавоноїдів (кверцетину) можуть з'являтися високореакційні проміжні сполуки, які мають ушкоджуючі властивості щодо компонентів біологічних систем. Метаболіти кверцетину потенційно можуть впливати на процеси передачі внутрішньоклітинних сигналів, будучи навіть у мінорній кількості щодо вихідного флавоноїда [16]. Цим можна пояснити зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові за дії кверцетину.

Також встановлено, що всі застосовані у досліді концентрації гістаміну призводять до дозозалежного зростання вмісту гідропероксидів та до зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові щурів. Такі результати узгоджуються з літературними даними, де показано, що за підшкірного введення щурам гістаміну в концентрації 1 і 8 мкг/кг на 1-шу добу відбувається підвищення вмісту гідропероксидів і зниження кількості ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові [2]. Отже, відбувається утворення первинних продуктів ліпопероксидації, проте надалі продовження ланцюгів ліпопероксидації не відбувається. Зростання вмісту гідропероксидів ліпідів за зниження концентрації гістаміну в

плазмі крові відбувається за рахунок того, що низькі концентрації зумовлюють респіраторний вибух, який супроводжується викидом активних форм кисню, тоді як високі, навпаки, виявляють протизапальну дію [7].

Поєднана дія гістаміну і кверцетину зумовлює значне зростання вмісту первинних продуктів ліпопероксидації, тоді як ТБК-позитивні продукти ПОЛ у переважаючій більшості спадають. Нами зроблено висновок, що кверцетин посилює ефект гістаміну на вміст продуктів ліпопероксидації. Під фармакологічною несумісністю розуміють таке поєднання препаратів, яке призводить до надмірної зміни їхньої біологічної активності, що робить таку комбінацію ліків непридатною для лікування. Фармакологічна несумісність проявляється під час потрапляння в організм і зумовлена фармакокінетичними і фармакодинамічними змінами [15]. Ймовірно, за поєднання гістаміну, кверцетину і фізіологічного розчину відбувається зміна властивостей цих сполук. Порівняння дії кверцетину, гістаміну й одночасного впливу гістаміну та кверцетину показує, що прооксидантні властивості зростають у напрямку розташування сполук (у цьому реченні).

Вивчаючи вміст карбонільних груп білків нейтрального характеру (КГБ н.х.) у плазмі крові щурів, встановили, що за додавання до крові фізіологічного розчину відбувається підвищення їхнього вмісту на 29 % (вміст окисно модифікованих білків у плазмі крові інтактних тварин становив  $7,17 \pm 0,13$  мкмоль/хв • мг білка, а у плазмі, до якої додавали фізіологічний розчин, –  $9,26 \pm 0,11$  мкмоль/хв • мг білка). Отже, фізіологічний розчин інтенсифікує процес окисної модифікації білків плазми крові. Тому для порівняння дії гістаміну і кверцетину ми використали як контроль зразки крові, до якої додавали фізіологічний розчин.

Нами виявлено, що вміст КГБ н.х. значно зростає за впливу кверцетину в концентрації 1 мМ (на 94 %). Менш виражена інтенсивність зростання вмісту цих продуктів у плазмі зафіксована за впливу кверцетину концентрацій 0,1; 0,3 та 0,5 мМ (на 22, 52 і 43 % відповідно). Варто зазначити, що досліджуваний біофлавоноїд чинить протекторну дію на білки за концентрації 3 і 5 мМ, за яких інтенсивність окисної модифікації білків знижується на 13 і 27 % відповідно, порівняно з експериментальною групою, до зразків якої додавали фізіологічний розчин (рис. 7). Отже, нашими дослідженнями підтверджено, що кверцетин у концентрації 3 мМ (терапевтична доза, яка застосовується в медицині) є оптимальним для захисту клітин від шкідливої дії вільних радикалів на білкові структури.

Додавання до цільної крові гістаміну в концентраціях 0,01; 0,1; 1 та 10 мМ, у плазмі вміст КГБ н.х. збільшується на 61, 10, 27 і 100 % відповідно (рис. 8). Отже, гістамін у максимальній і мінімальній досліджуваних концентраціях інтенсифікує процес окисної модифікації білків. Ймовірно, додавання до крові гістаміну активує роботу гістамінази, яка каталізує окислювальне дезамінування гістаміну. При цьому утворюється  $H_2O_2$ , який ушкоджує структуру протеїнів. Мінімальна і максимальна концентрації гістаміну, ймовірно, найбільш ефективно активують роботу гістамінази, в результаті чого утворюється висока концентрація шкідливого для клітини пероксиду водню. Відомо, що гістаміназа міститься в еозинофілах.

Показано, що поєднана дія гістаміну максимальної концентрації (10 мкМ) і кверцетину зумовлює зниження вмісту КГБ н.х. Так, кверцетин у концентраціях 0,1; 0,5; 3; 5 мМ на фоні дії гістаміну (10 мкМ) значно знижує вміст продуктів окисної модифікації білків на 73, 52, 72, 82 % відповідно. Варто зазначити, що кверцетин на фоні впливу гістаміну мінімальної досліджуваної концентрації (0,01 мкМ) або не змінює вмісту КГБ н.х., або підвищує їх. Нами виявлено, що кверцетин у концентраціях 0,5 і 5 мМ на тлі дії

гістаміну (0,01 мкМ) інтенсифікує окисну модифікацію білків на 19 і 47 % відповідно, а біофлавоноїд у концентраціях 0,1 і 3 мМ не впливає на накопичення КГБ н.х. (рис. 9).

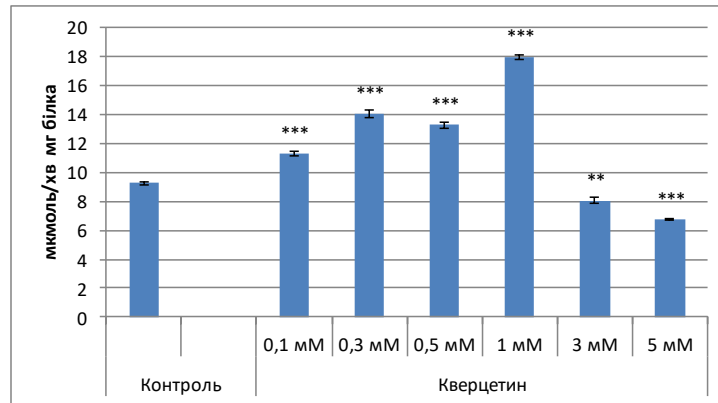


Рис. 7. Вміст карбонільних груп білків нейтрального характеру у плазмі крові щурів за впливу кверцетину в діапазоні концентрацій 0,1–5 мМ (\*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

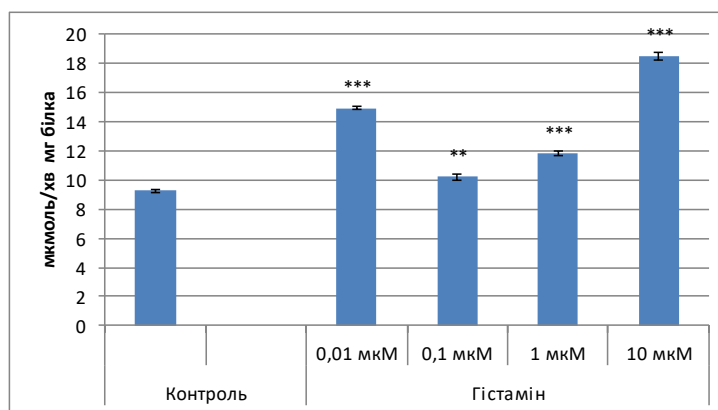


Рис. 8. Вміст карбонільних груп білків нейтрального характеру у плазмі крові щурів за дії гістаміну (\*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

Нами також показано зростання вмісту карбонільних груп білків основного характеру (КГБ о.х.) у плазмі крові за дії фізіологічного розчину удвічі, порівняно зі зразками інтактних щурів ( $10,47 \pm 0,09$  мкмоль/хв• мг білка проти  $4,77 \pm 0,08$  мкмоль/хв• мг білка). Відповідно, в подальшому аналізі як контрольну групу використовували значення карбонільних груп білків за дії фізіологічного розчину. Інтенсивність накопичення КГБ о.х. у плазмі крові за дії кверцетину є такою ж, як і інтенсивність утворення КГБ н.х. (рис. 10).

Додавання до цільної крові гістаміну в концентраціях 0,01; 1 та 10 мкМ веде до збільшення (на 38, 11, 21 % відповідно) вмісту КГБ о.х. у плазмі. Гістамін у концентрації 0,1 мкМ не змінює вмісту цих продуктів (рис. 11).

Показано, що поєднана дія гістаміну і кверцетину зумовлює зниження вмісту карбонільних груп, крім дослідних зразків, де одночасно додавали гістамін у концентрації 0,01 мкМ і кверцетин у концентрації 5 мМ. За таких умов вміст продуктів зростає на 27 % (рис. 12).

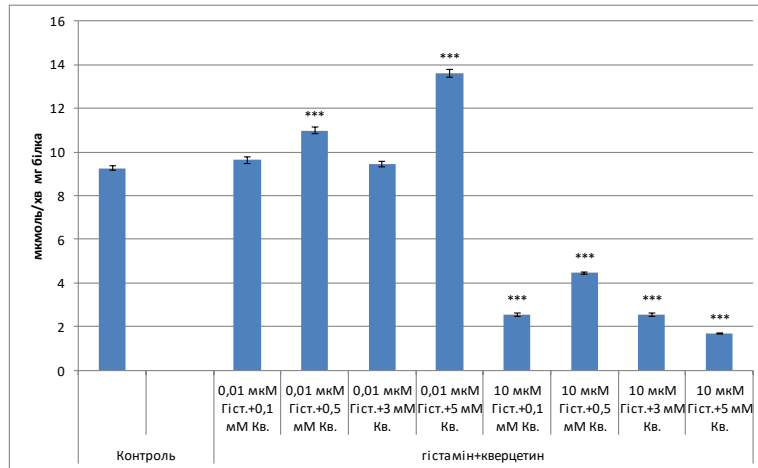


Рис. 9. Вміст карбонільних груп білків нейтрального характеру у плазмі крові щурів за поєднаного впливу гістаміну і кверцетину (\*\*\*) –  $p \geq 0,999$ )

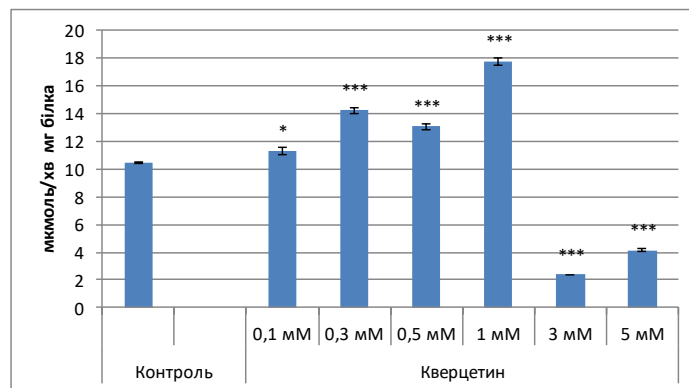


Рис. 10. Вміст карбонільних груп білків основного характеру у плазмі крові щурів за дії кверцетину (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

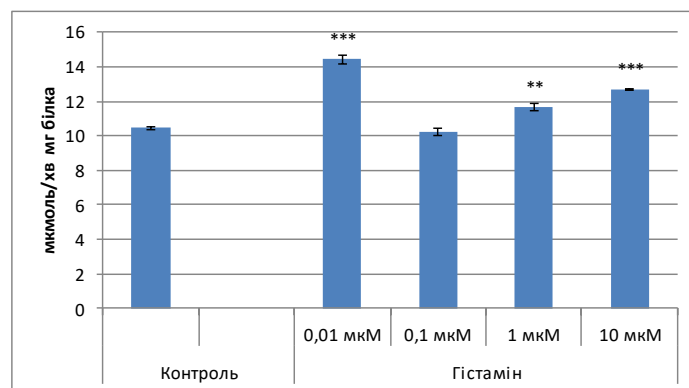


Рис. 11. Вміст карбонільних груп білків основного характеру у плазмі крові щурів за впливу гістаміну (\*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

Варто відмітити, що за одночасного впливу гістаміну в концентрації 10 мкМ та кверцетину в концентрації 0,1; 0,5; 3 та 5 мМ інтенсивність окисної модифікації білків знижується більш виражено (на 81, 65, 82, 89 % відповідно), порівняно з дією гістаміну мінімальної концентрації (0,01 мкМ) на фоні впливу кверцетину (0,1 мМ – на 57 %; 0,5 мМ – на 20 %; 3 мМ – на 59 %). За поєднаного впливу гістаміну в концентрації 0,01 мкМ та кверцетину в концентрації 5 мМ виявлено підвищення вмісту КГБ о.х. на 27 % (рис. 12).

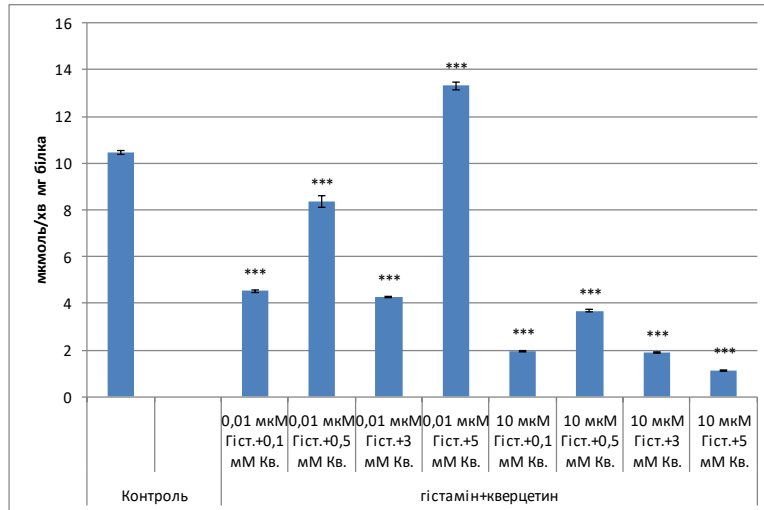


Рис. 12. Вміст карбонільних груп білків основного характеру у плазмі крові щурів за поєднаного впливу гістаміну і кверцетину (\*\*\*) –  $p \geq 0,999$ )

Отже, кверцетин у діапазоні концентрацій 0,1–1 мМ інтенсифікує процес накопичення КГБ о.х. і КГБ н.х., тоді як флавоноїд у концентраціях 3 і 5 мМ – уповільнює. Гістамін у всіх досліджуваних концентраціях зумовлює підвищення вмісту карбонільних груп білків, окрім концентрації 0,1 мкМ, за якої вміст КГБ о.х. залишається на рівні контролю. Відомо, що продукти ПОЛ можуть порушувати синтез білків, змінювати проникність судин і характер запальної реакції. Є припущення, що це призводить до нерегульованої модифікації білків і втрати їхньої біологічної активності, а також до появи шкідливих метаболітів. Усе це викликає метаболічну (ендогенну) інтоксикацію організму, зумовлюючи безліч внутрішньоклітинних змін, зокрема, апоптоз. Відомо, що ступінь нагромадження вторинних метаболітів визначає перебіг і наслідки патологічного стану [5]. За результатами наших досліджень, вміст гідропероксидів ліпідів зростає за дії гістаміну, що може, у свою чергу, зумовлювати ушкодження білків плазми крові. На тлі дії гістаміну високої концентрації кверцетин понижує інтенсивність окисної модифікації білків. Одночасна дія гістаміну низької концентрації та кверцетину в концентрації 0,5 і 5 мМ зумовлює накопичення КГБ н.х.; а також КГБ о.х. лише за впливу кверцетину в концентрації 5 мМ. Ймовірно, гістамін у високій концентрації реагує з кверцетином, і тому інтенсивність окисної модифікації білків знижується. За додавання до крові низьких концентрацій гістаміну відбувається ураження ним клітин крові. Зокрема, нейтрофіли виділяють активні форми кисню, а кверцетин, таким чином, не вступає в реакцію з біогенним аміном. Тому інтенсифікуються процеси окисної модифікації білків з утворенням КГБ н.х. і КГБ о.х., з переважанням останніх.

Вивчаючи вплив кверцетину, гістаміну та поєднану дію цих сполук на накопичення ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові щурів, ми встановили, що біофлавоноїд має мак-

симальну частку впливу (47 %; рис. 13). Менш виражений вплив чинять гістамін (22 %) і його поєднана дія з кверцетином (28 %).

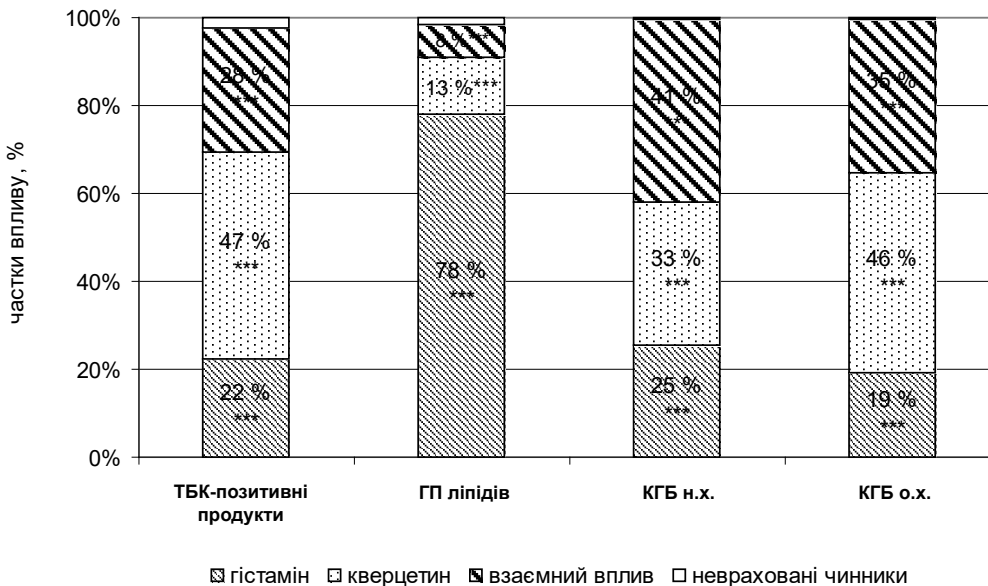


Рис. 13. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу гістаміну, кверцетину і поєднаної їхньої дії на накопичення ТБК-позитивних продуктів, гідропероксидів ліпідів, карбонільних груп білків нейтрального й основного характеру у плазмі крові щурів

Встановлено, що гістамін чинить потужний вплив на накопичення первинних продуктів ПОЛ, зокрема, гідропероксидів ліпідів (78 %). Найменший вплив на цей показник має поєднане введення гістаміну і кверцетину (8 %). Вивчаючи дію кверцетину, гістаміну та поєднану дію цих сполук на інтенсивність накопичення КГБ н.х., взаємний вплив є найвагомим, і його частка становить 41 % (рис. 13). Провівши дисперсійний аналіз даних КГБ о.х. у плазмі крові щурів, встановили, що на кверцетин припадає максимальна частка впливу (46 %).

Отже, встановлено, що на вміст ТБК-позитивних продуктів і КГБ о.х. максимальний вплив чинить кверцетин (47 і 45 % відповідно). Його вплив є негативним, оскільки переважно спричиняє інтенсифікацію утворення вторинних продуктів ліпопероксидації й ушкодження білкових структур. Тобто кверцетин зумовлює розгалуження ланцюга ПОЛ, у результаті чого накопичуються стабільні продукти – ТБК-позитивні продукти, які є токсичними для організму [3]. Відомо, що окиснення за участю активних форм кисню зумовлює утворення карбонільних похідних, дисульфідів, цистеїнсульфенової, цистеїнсульфінової або цистеїнсульфонової кислот, а також сульфоксиду метіоніну [11]. Тому можна твердити, що кверцетин сприяє вільнорадикальному окисненню білкових структур. На накопичення гідропероксидів ліпідів сильний вплив має гістамін (частка впливу – 78 %).

Провівши кореляційний аналіз показників вільнорадикальних реакцій за дії гістаміну і кверцетину у плазмі крові щурів, встановили, що в контрольних зразках тіснота взаємозв'язку між вмістом КГБ н.х. і вмістом гідропероксидів ліпідів є середньою. Так, коефіцієнт кореляції ( $r$ ) становить 0,69 (див. таблицю). Тіснота взаємозв'язку між іншими показниками є слабкою.

Коефіцієнти кореляції показників вільнорадикальних процесів у плазмі крові щурів у контролі та за дії гістаміну і кверцетину

КГБ н.х.-КГБ о.х.		ТБК л.п.-КГБ о.х.		ГП-КГБ о.х.		ГП-КГБ н.х.		ГП-ТБК л.п.	
-0,3	0,43	0,24	0,23	0,69	-0,04	Контроль			
0,7	-0,31	-0,82	0,06	-0,0001	0,3	Фізіологічний розчин			
0,03	0,08	-0,69	0,01	-0,88	0,55	Кверцетин; 0,1 мМ			
0,73	0,22	0,23	-0,16	0,15	0,48	Кверцетин; 0,3 мМ			
-0,55	-0,13	0,23	0,84	-0,35	0,34	Кверцетин; 0,5 мМ			
0,45	-0,36	-0,94	-0,37	-0,47	0,15	Кверцетин; 1 мМ			
-0,74	0,74	-0,48	0,12	0,39	0,53	Кверцетин; 3 мМ			
-0,23	0,62	0,58	0,57	-0,24	0,45	Кверцетин; 5 мМ			
0,47	0,66	0,72	-0,95	-0,58	-0,79	Гістамін; 0,01 мкМ			
0,44	-0,23	0,49	-0,46	-0,46	-0,61	Гістамін; 0,1 мкМ			
-0,68	-0,3	-0,12	-0,05	-0,36	0,64	Гістамін; 1 мкМ			
0,64	0,26	-0,2	0,31	0,4	-0,6	Гістамін; 10 мкМ			
-0,01	-0,85	-0,32	0,15	-0,94	0,27	Гіст. 10 мкМ + кверц. 0,1 мМ			
-0,55	-0,8	0,37	-0,6	0,2	0,07	Гіст. 10 мкМ + кверц. 0,5 мМ			
0,52	-0,46	-0,5	-0,75	-0,07	-0,08	Гіст. 10 мкМ + кверц. 3 мМ			
0,48	0,31	-0,2	0,25	0,22	0,87	Гіст. 10 мкМ + кверц. 5 мМ			
-0,71	-0,8	0,75	0,12	-0,59	0,03	Гіст. 0,01 мкМ + кверц. 0,1 мМ			
0,04	-0,62	-0,71	-0,06	-0,1	0,12	Гіст. 0,01 мкМ + кверц. 0,5 мМ			
-0,42	0,55	0,07	0,12	0,53	0,26	Гіст. 0,01 мкМ + кверц. 3 мМ			
-0,86	-0,04	-0,18	-0,8	0,87	0,03	Гіст. 0,01 мкМ + кверц. 5 мМ			

За додавання до крові фізіологічного розчину між показниками КГБ н.х. і ТБК-позитивних продуктів, а також між КГБ о.х. і КГБ н.х. взаємозв'язок посилюється. Так, коефіцієнти кореляції сягають  $-0,8$  та  $0,7$  відповідно. Це свідчить про зміну прооксидантного стану у плазмі крові щурів за дії фізіологічного розчину.

За додавання до крові кверцетину в концентрації  $0,1$  мМ тіснота взаємозв'язку між вмістом КГБ н.х. і гідропероксидів ліпідів значно посилюється і  $r = -0,88$ . Проте між вмістом ТБК-позитивних продуктів і гідропероксидів ліпідів, а також між вмістом КГБ н.х. і ТБК-позитивних продуктів взаємозв'язок середньої сили ( $r = 0,5$  та  $r = -0,69$  відповідно). Останній коефіцієнт кореляції є із знаком мінус, що свідчить про різноспрямовані процеси між зазначеними показниками. Результати кореляційного аналізу засвідчують, що кверцетин у концентрації  $0,1$  мМ зумовлює інтенсифікацію окисної модифікації білків та утворення вторинних продуктів ПОЛ, тобто відбувається процес розгалуження ланцюгів процесу ліпопероксидації.

За дії кверцетину в концентрації  $0,3$  мМ у плазмі крові щурів кореляційний зв'язок між досліджуваними показниками є слабким, і лише між вмістом КГБ н.х. і КГБ о.х. він



є сильним і позитивним ( $r = 0,7$ ; див. таблицю). Це свідчить, що накопичення КГБ о.х. і КГБ н.х. взаємопов'язані, а утворення одних груп тягне за собою утворення інших. З літературних джерел відомо, що за умов окисного стресу та надмірної генерації активних форм кисню розвиваються процеси неконтрольованої модифікації білків, які спричиняють фрагментацію білків, їхню денатурацію, а також утворення первинних амінокислотних радикалів, що далі вступають у вторинну взаємодію зі сусідніми амінокислотними залишками, а це, загалом, створює досить складну картину пошкоджувальної дії активних форм кисню на білкові макромолекули. Усе це призводить до втрати білками їхньої біологічної активності й порушення обмінних, зокрема, регенеративних процесів [4].

За додавання до крові кверцетину в концентрації 0,5 мМ встановлено високу кореляцію між вмістом КГБ о.х. та гідропероксидів ліпідів ( $r = 0,8$ ), проте між показниками КГБ о.х. і КГБ н.х. тіснота взаємозв'язку є середньої сили, негативною ( $r = -0,55$ ) (див. таблицю). Згідно з нашими дослідженнями, вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів за дії кверцетину в концентрації 0,5 мМ незначно і недостовірно зростає, а вміст КГБ о.х. підвищується менш інтенсивно, порівняно з кверцетином у концентрації 0,3 мМ. Отже, інтенсивність вільнорадикального окиснення ліпідів і білків знижується.

Плазма, до якої додавали кверцетин у концентрації 1 мМ, характеризується посиленням тісноти взаємозв'язку між вмістом КГБ н.х. і ТБК-позитивних продуктів у плазмі. Коefіцієнт кореляції між цими показниками становить  $r = -0,9$  (див. таблицю). Така тіснота взаємозв'язку між цими показниками є і за дії фізіологічного розчину, тобто за «контролю».

За додавання до крові кверцетину в концентрації 3 мМ, тіснота взаємозв'язку між КГБ о.х. і ТБК-позитивними продуктами, а також між КГБ о.х. і КГБ н.х. набуває значної сили:  $r = 0,74$  і  $r = -0,74$  відповідно. Середньої сили взаємозв'язок спостерігається між показниками ТБК-позитивних продуктів і гідропероксидами ліпідів ( $r = 0,53$ ; див. таблицю).

Кверцетин у концентрації 5 мМ зумовлює середню тісноту взаємозв'язку між показниками КГБ н.х. і ТБК-позитивних продуктів ( $r = 0,58$ ) і між КГБ о.х. та гідропероксидами ліпідів, ТБК-позитивними продуктами ( $r = 0,57$  та  $r = 0,62$  відповідно) (див. таблицю). За дії кверцетину в концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3 мМ між окремими досліджуваними показниками переважала сильна тіснота взаємозв'язку, проте за впливу біофлавоноїда у концентрації 5 мМ переважає тіснота взаємозв'язку середньої сили. Це свідчить про зміну біохімічних процесів, які відбуваються у плазмі крові щурів за максимальної концентрації кверцетину, що відображається у зниженні інтенсивності окисної модифікації білків і зростанні утворення первинних продуктів ліпопероксидації. Тобто процес спрямований на ініціацію ланцюгів ПОЛ.

Показано, що за додавання до крові гістаміну в концентрації 10 мкМ між значеннями тісноти взаємозв'язку між ТБК-позитивними продуктами і гідропероксидами ліпідів існує середня кореляція ( $r = -0,63$ ). Ця кореляція є негативною і відображає різноспрямовані процеси, тобто вміст ТБК-позитивних продуктів знижується на фоні підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів. Середня тіснота взаємозв'язку свідчить про опосередковану дію гістаміну в концентрації 10 мкМ на накопичення первинних і вторинних продуктів ПОЛ. Гістамін не виступає окисником. Він може діяти на клітини, зокрема, нейтрофіли, зумовлюючи надмірне вивільнення чи, навпаки, зниження вивільнення вільних радикалів. Тому зв'язок між показниками ПОЛ є середньої сили (зміни показників залежать від наявності вільних радикалів у плазмі крові). Встановлено середньої сили тісноту взаємозв'язку між КГБ о.х. і КГБ н.х. ( $r = 0,64$ ) (див. таблицю).

Додавання до крові гістаміну в концентрації 1 мкМ веде до середньої тісноти взаємозв'язку, аналогічно концентрації 10 мкМ ( $r = 0,64$  та  $r = -0,68$ ). Додавання до крові

гістаміну в концентрації 0,1 мкМ у плазмі крові щурів зумовлює середньої сили тісноту взаємозв'язку між ТБК-позитивними продуктами і гідропероксидами ліпідів ( $r = -0,6$ ) (див. таблицю).

За дії гістаміну в концентрації 0,01 мкМ тіснота взаємозв'язку між ТБК-позитивними продуктами і гідропероксидами ліпідів становить  $r = -0,79$ . Це свідчить, що гістамін у концентрації 0,01 мкМ зумовлює утворення первинних продуктів ліпопероксидації і не веде до перетворення гідропероксидів ліпідів у вторинні продукти. ТБК-позитивні продукти корелюють із КГБ н.х. ( $r = 0,72$ ). Сильна кореляційна залежність зафіксована також між гідропероксидами ліпідів і КГБ о.х. ( $r = -0,95$ ) (див. таблицю). Середню кореляцію виявлено між гідропероксидами ліпідів і КГБ н.х. ( $r = -0,58$ ), а також між ТБК-позитивними продуктами і КГБ о.х. ( $r = 0,66$ ).

Потрібно зазначити, що за дії гістаміну в концентраціях 10; 1; 0,1 мкМ тіснота взаємозв'язку є середньою між окремими показниками вільнорадикального окиснення. Гістамін у концентрації 0,01 мкМ зумовлює значне посилення кореляційної залежності між показниками ПОЛ і окисної модифікації білків (див. таблицю). Це свідчить, що гістамін у найнижчій досліджуваній концентрації чинить відмінну дію на процеси ліпопероксидації та модифікацію білків.

Сильна кореляція зафіксована за поєданого впливу гістаміну в концентрації 10 мкМ і кверцетину в концентрації 0,1 мМ, між показниками гідропероксидів ліпідів і КГБ н.х. ( $r = -0,94$ ). Ця висока і негативна тіснота взаємозв'язку відображає те, що поєднання речовин у зазначених комбінаціях концентрацій зумовлює утворення гідропероксидів ліпідів на фоні зниження вмісту КГБ н.х. Ймовірно, відбувається інтенсифікація утворення вільних радикалів у крові, які і започатковують утворення гідропероксидів ліпідів. Відомо, що показники пероксидного окиснення білків є надійнішим і більш раннім маркером окиснювальних пошкоджень тканин, ніж ПОЛ, оскільки продукти окисної модифікації білків стабільніші порівняно з пероксидами ліпідів, які швидко метаболізуються під дією пероксидаз і низькомолекулярних антиоксидантів [8]. Тому можна зробити висновок, що за поєданого впливу гістаміну в концентрації 10 мкМ і кверцетину в концентрації 0,1 мМ ініціюються процеси ПОЛ (початковий етап). Вторинні продукти ПОЛ також високою мірою корелюють із карбонільними групами білків основного характеру ( $r = -0,85$ ).

Дія кверцетину в концентрації 0,5 мМ на фоні впливу гістаміну в концентрації 10 мкМ зумовлює високу тісноту взаємозв'язку між ТБК-позитивними продуктами і КГБ о.х. ( $r = -0,8$ ). Середню кореляційну залежність виявлено між показниками КГБ о.х. і гідропероксидами ліпідів, КГБ н.х. ( $r = -0,6$  та  $r = -0,55$  відповідно) (див. таблицю).

Поєднаний вплив гістаміну в концентрації 10 мкМ та кверцетину в концентрації 3 мМ веде до сильної кореляційної залежності між КГБ о.х. і гідропероксидами ліпідів ( $r = -0,75$ ). Між показниками КГБ о.х. і КГБ н.х., а також гідропероксидами ліпідів спостерігається середньої сили взаємозв'язок ( $r = 0,52$  та  $r = -0,5$ ) (див. таблицю).

Нами встановлено сильну кореляційну залежність між показниками ТБК-позитивних продуктів і гідропероксидами ліпідів у плазмі крові щурів за впливу гістаміну в концентрації 10 мкМ і кверцетину в концентрації 5 мМ ( $r = 0,87$ ).

За наявності у крові гістаміну (0,01 мкМ) і кверцетину (0,1 мМ) посилюється кореляційний взаємозв'язок між показниками ТБК-позитивних продуктів і продуктами окисної модифікації білків ( $r = 0,75$  і  $r = -0,80$ ). Сильна кореляція наявна і між КГБ о.х. і КГБ н.х. ( $r = -0,71$ ; див. таблицю). Середня тіснота взаємозв'язку є між гідропероксидами ліпідів і КГБ н.х. ( $r = -0,59$ ). Така кореляція встановлюється на фоні зростання вмісту гідропероксидів ліпідів і повернення вмісту КГБ н.х. до меж «контролю».

За наявності у крові гістаміну (0,01 мкМ) і кверцетину в концентрації 0,5 мМ виявлено кореляцію сильної сили між КГБ н.х. і ТБК-позитивними продуктами ( $r = -0,71$ ). Така кореляція є негативною і відображає різноспрямовані процеси у плазмі крові щурів. Зокрема, вміст ТБК-позитивних продуктів знижується, а вміст КГБ н.х. зростає. Між КГБ о.х. і ТБК-позитивними продуктами зафіксовано середню кореляцію ( $r = -0,62$ ) (див. таблицю).

Середню тісноту взаємозв'язку за одночасної дії гістаміну в концентрації 0,01 мкМ і кверцетину в концентрації 3 мМ виявлено між КГБ н.х. і гідропероксидами ліпідів ( $r = 0,53$ ), а також між КГБ о.х. і ТБК-позитивними продуктами ( $r = 0,55$ ).

За дії гістаміну в концентрації 0,01 мкМ і кверцетину в концентрації 5 мМ виявлено значної сили тісноту взаємозв'язку. Зокрема, між КГБ н.х. і гідропероксидами ліпідів ( $r = 0,87$ ), між КГБ о.х. і гідропероксидами ліпідів ( $r = -0,80$ ), між КГБ н.х. і КГБ о.х. ( $r = -0,86$ ).

Отже, кверцетин у плазмі крові щурів зумовлює незначне зростання вмісту гідропероксидів і ТБК-позитивних продуктів, крім концентрації 0,5 мМ, за якої вміст вторинних продуктів знижується, а вміст первинних залишається у межах контролю. Гістамін веде до зростання вмісту гідропероксидів і зниження кількості ТБК-позитивних продуктів. Поєднана дія гістаміну і кверцетину зумовлює значне зростання ГП ліпідів, тоді як ТБК-позитивні продукти ліпопероксидації спадають. Кверцетин у діапазоні концентрацій 0,1÷1 мМ інтенсифікує накопичення КГБ о.х. і КГБ н.х., тоді як у концентраціях 3 і 5 мМ – уповільнює. Гістамін призводить до підвищення вмісту карбонільних груп білків, крім концентрації 0,1 мкМ. На тлі дії гістаміну високої концентрації кверцетин знижує інтенсивність окисної модифікації білків. Одночасна дія гістаміну низької концентрації та кверцетину в концентрації 0,5 мМ і 5 мМ зумовлює накопичення КГБ н.х., а також КГБ о.х. лише за впливу кверцетину в концентрації 5 мМ. За результатами дисперсійного аналізу встановлено, що на накопичення ТБК-позитивних продуктів і КГБ о.х. максимальний вплив чинить кверцетин, тоді як на накопичення гідропероксидів ліпідів сильний вплив має гістамін. Кверцетин у концентраціях 0,1–3 мМ зумовлює між окремими досліджуваними показниками вільнорадикальних процесів у плазмі крові щурів сильну тісноту взаємозв'язку, біофлавоноїд у концентрації 5 мМ веде до формування взаємозв'язку середньої сили. Гістамін у концентраціях 0,1–10 мкМ спричиняє тісноту взаємозв'язку середньої сили між окремими показниками вільнорадикального окиснення, а в концентрації 0,01 мкМ зумовлює значне посилення кореляційної залежності між показниками ПОЛ і окисної модифікації білків. Поєднана дія кверцетину в концентрації 0,1 мМ і гістаміну в концентрації 0,01 мкМ зумовлює посилення тісноти кореляційної залежності.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Билык О. В., Рыбальченко В. К., Романюк Б. П.* Биофлавоноид кверцетин и перспективы его использования в медицине // *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. 2007. Т. 2. № 1. С. 4–8.
2. *Бішко О. І.* Вільнорадикальні процеси за введення щурам гістаміну та гіпохлориту натрію: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.02. Львів, 2016. 20 с.
3. *Гарасим Н. П., Бішко-Москалюк О. І., Мандзинець С. М.* та ін. Вплив гістаміну та гіпохлориту натрію на вільнорадикальні процеси в селезінці щурів // *Фізіол. журнал*. 2018. Т. 64. № 2. С. 80–89.
4. *Денисенко О. І.* Окисна модифікація білків як чинник патогенезу алергодерматозів // *Укр. журнал дерматології, венерології, косметології*. 2004. № 1. С. 24–26.
5. *Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопр. мед. химии*. 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26.

6. *Дутка В., Ковальський Я., Деркач Ю., Панас О.* Електронні властивості та будова молекул кверцетину, лютеоліну та морину // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. хім. 2014. Вип. 55. Ч. 2. С. 501–507.
7. *Искусных А. Ю., Башарина О. В., Артюхов В. Г., Алабовский А. А.* Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса перексидного окисления липидов в крови доноров // Вестн. ВГУ. Сер. химия, биология, фармация. 2008. № 1. С. 93–96.
8. *Кімак Г. Б., Мельничук Г. М.* Зміни показників перекисного окиснення ліпідів і перекисного окиснення білків у ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит молодих осіб внаслідок комплексного лікування // Інновації в стоматології. 2018. № 1. С. 17–21.
9. *Лусс Л. В.* Роль аллергии и псевдоаллергии в формировании аллергических заболеваний кожи // Аллергология. 2000. №3. С.29–33.
10. *Лятин В. П., Казимирко Н. К.* Состояние перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты у борцов в ходе тренировочного цикла и в зависимости от времени года // Педагогіка, психологія та медико-біологічні проблеми фізичного виховання та спорту. 2003. № 19. С. 3–7.
11. *Мецишиен І. Ф.* Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Буковин. мед. вісн. 1998. Т. 2. № 1. С. 156–158.
12. *Олексюк Н. П., Янович В. Г.* Активність про- і антиоксидантних систем у печінці прісноводних риб у різні пори року // Укр. біохім. журн. 2010. 82 (3). С.41–48.
13. *Радченко О. М.* Гістамін як життєво важливий універсальний регулятор // Раціональна фармакотерапія. 2017. № 4 (45). С. 5–9.
14. *Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
15. *Чекман І. С., Бобирьов В. М., Кресюн В. Й.* Фармакологія. Вінниця: Нова книга, 2014. 432 с.
16. *Червяковский Е. М., Власова Т. М., Гулеп А. А.* и др. Хроматографический анализ и идентификация основных продуктов окисления кверцетина // Труды Белорус. гос. унта. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2006. Т. 1. № 1. С. 159–170.
17. *Eid H. M., Haddad P. S.* The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms // Curr Med Chem. 2017/ 24(4). P. 355–364. doi: 10.2174/0929867323666160909153707.
18. *Greaves M. W., Sabroe R. A.* Histamine: the quintessential mediator // J. Dermatol. 1996. Vol. 23 (11). P. 735–740.
19. *Kota V. Ramana, Sanjay Srivastava, Sharad S. Singha.* Lipid peroxidation products in human health and disease 2016 // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. ID 2163285, 2 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2017/2163285>.
20. *Lieberman P.* The basics of histamine biology // Ann allergy asthma immunol. 2011. Vol. 106. P. 2–5. doi: 10.1016/j.anai.2010.08.005. Epub 2010 Sep 16.
21. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Boiological Chemistry. 1951. Vol. 193 (1). P. 404–415.
22. *Marunaka Y., Marunaka R., Sun H.* et al. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure // Molecules. 2017 Vol. 29. 22 (2). pii: E209. doi: 10.3390/molecules22020209.
23. *Michael M. Gaschlera, Brent R. Stockwell* Lipid peroxidation in cell death // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. N 482 (3). P. 419–425. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
24. *Niki E.* Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers // Biofactors. 2008. Vol. 34 (2). 171–180.

## INTENSITY OF FREE-RADICAL PROCESSES IN PLASMA OF RAT BLOOD DUE TO HISTAMINE AND QUERCETIN

N. Harasym, M. Verbeschuk, N. Bodnarchuk, M. Galan, D. Sanagursky

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

The content of products of lipoperoxidation and oxidative modification of proteins in rat blood plasma under the action of quercetin and histamine was investigated. Quercetin was used at concentrations of 0.1; 0.3; 0.5; 1; 3; 5 mm, and histamine - 0.01; 0.1; 1; 10  $\mu\text{m}$ . It was found that quercetin in the blood plasma of rats causes a slight increase in the content of hydroperoxides and TBA-positive products, except the concentration of 0.5 mm, at which the content of secondary products is reduced and the content of primary remains within the control. Histamine at concentrations of 0.01; 0.1; 1; 10  $\mu\text{m}$  leads to an increase in the content of hydroperoxides and a decrease in the number of TBK-positive products. The combined effect of histamine and quercetin causes a significant increase in primary lipoperoxidation products, whereas TBK-positive lipid peroxidation products decrease. Quercetin in the concentration range of 0.1–1 mM intensifies the accumulation of carbonyl groups of proteins of basic and neutral nature, while flavonoid at concentrations of 3.5 mM – slows down. Histamine at all tested concentrations leads to an increase in the content of carbonyl groups of proteins, except the concentration of 0.1  $\mu\text{m}$ . Against the background of high concentration histamine, quercetin reduces the intensity of oxidative modification of proteins. The simultaneous action of low concentration histamine and quercetin at a concentration of 0.5 and 5 mm leads to the accumulation of carbonyl groups of proteins of a neutral nature, as well as to the main only when exposed to quercetin at a concentration of 5 mm. According to the analysis of variance, it was found that quercetin has a maximum effect on the accumulation of TBA-positive products and carbonyl groups of proteins of basic character. Histamine is strongly influenced by the accumulation of lipid hydroperoxides. Quercetin at concentrations of 0.1; 0.3; 0.5; 1; 3 mm determines between the indices of free radical processes under study, in the blood plasma of rats, a strong interconnectedness, and a bioflavonoid at a concentration of 5 mm leads to the formation of interconnections of average strength. Histamine at concentrations of 10; 1; 0.1  $\mu\text{m}$  causes a close correlation of the mean strength between the individual indices of free radical oxidation. Histamine at a concentration of 0.01  $\mu\text{m}$  causes a significant increase in the correlation between the parameters of sex and oxidative modification of proteins. The combined effect of quercetin at a concentration of 0.1 mm and histamine at a concentration of 0.01  $\mu\text{m}$  causes a change in the nature of the correlation dependence, which becomes strong between most of the studied parameters.

*Keywords:* lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, quercetin, histamine

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ Й АНТИОКСИДАНТНОЇ  
АКТИВНОСТІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ АНТИОКСИДАНТІВ  
НА МОДЕЛІ *PARAMECIUM CAUDATUM***

**Д. Пилипенко**

*Національний технічний університет  
«Харківський політехнічний інститут»  
вул. Кирпичова, 2, Харків 61002, Україна  
e-mail: pdmforwork@gmail.com*

Антиоксидантні препарати активно застосовуються в медичній практиці для лікування запальних процесів у кардіологічних, офтальмологічних, аутоімунних, онкологічних та інших захворюваннях. Застосування методів нанобіотехнології є перспективним напрямом сучасної фармації, оскільки дає змогу створити препарати якісно нового рівня. Інкапсуляція активних фармацевтичних інгредієнтів до складу ліпосомальних наночастинок допомагає підвищити біодоступність і ефективність природних антиоксидантів, створити водорозчинні ін'єкційні форми гідрофобних сполук. Біотестування є простим, інформативним експрес-методом оцінки токсичності й антиоксидантної активності лікарських препаратів, що може бути обґрунтованою альтернативою використанню лабораторних тварин на етапі скринінгу. Одноклітинні інфузорії виду *Paramecium caudatum* є поширеним тест-об'єктом завдяки високій чутливості до змін навколишнього середовища; великим розмірам клітини, що забезпечує можливість спостереження за змінами морфології та руху клітини; простоті культивування.

Метою роботи є оцінка токсичності й антиоксидантної активності ліпосомальних форм антиоксидантів: кверцетину, куркуміну, коензиму Q10 та цитохрому С за допомогою біотестування на культурі *Paramecium caudatum*.

Досліджено токсичність ліпосомальних форм кверцетину, куркуміну, коензиму Q10 та цитохрому С у дозах 25–100 мкг/мл на культурі *Paramecium caudatum*. Інкубація культури *Paramecium caudatum* із ліпосомальними формами кверцетину, куркуміну та коензиму Q10 сприяла розмноженню культури, тоді як ліпосомальний цитохром С викликав лізис клітин протягом 24 год. Встановлено, що на токсичність ліпосомального препарату впливає його ліпідний склад. Включення до складу ліпідної мембрани аніонного фосфоліпиду дипальмітоїлфосфатидилгліцерину суттєво зменшує виживання тест-культури, порівняно із ліпосомами, що містять лише фосфатидилхолін. На моделі оксидативного стресу *Paramecium caudatum*, індукованого гідроген пероксидом, ліпосомальні форми кверцетину, куркуміну та коензиму Q10 зумовлюють дозозалежний антиоксидантний ефект, що проявлявся у збільшенні стійкості тест-культури до токсиканта.

*Ключові слова:* ліпосомальні антиоксиданти, токсичність, антиоксидантна активність, біотестування, *Paramecium caudatum*

Процеси пероксидного окиснення ліпідів розвиваються під час багатьох захворювань різної етіології: ішемічна хвороба серця, цукровий діабет, катаракта, онкологічні, аутоімунні захворювання та ін. [23]. Для гальмування розвитку оксидативного стресу та нормалізації функціонального стану організму застосовують антиоксиданти різної природи.

Тому створення ефективних антиоксидантних препаратів є актуальним завданням сучасної фармації.

Серед екзогенних антиоксидантів велику групу становлять біофлавоноїди, серед них – кверцетин (Quer) і куркумін (Cur). Quer – один із широко відомих природних рослинних антиоксидантів, який успішно застосовується як протизапальний засіб, кардіопротектор, антигіпоксант та ін. [29]. Доведена фармакологічна активність Cur: протизапальна, протипухлинна, нейро-, гепато-, кардіопротекторна та ін. [26]. Серед ендogenous сполук добре відома антиоксидантна активність цитохрому С (CytC) та коензиму Q10 (Q10) – переносників електронів у процесі окисного фосфорильовання мітохондрій. Завдяки своїй біологічній ролі ці сполуки знайшли застосування у терапії станів, пов'язаних із порушеннями клітинного дихання та синтезу АТФ, насамперед у кардіології [2, 19].

Перспективним напрямом нанобіотехнології є включення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) до складу ліпосомальних наночастинок (Ls) [17]. Створення Ls форм антиоксидантів дає змогу підвищити їхню біодоступність і ефективність, створити ін'єкційні водорозчинні форми ліпофільних антиоксидантів, зменшити побічні ефекти на організм. На сьогоднішній день в Україні запропоновано способи одержання Ls форм Quer [8], Q10 [7], CytC [9] та Cur [22], які перебувають на різних стадіях розробки, в тому числі вперше у світі в Україні виробляється Ls-Quer («Ліпофлаво», розчин для ін'єкцій та очні краплі). Важливим етапом розробки лікарського препарату є дослідження фармакологічної активності, для проведення яких використовують лабораторних тварин (щурів, мишей та ін.), проте вартість тварин і їхнього утримання є високою. Тому актуальності набуває використання біотестування для первинного скринінгу токсичності й антиоксидантної активності досліджуваних препаратів.

Принцип біотестування заснований на адаптації тест-організмів до змін умов навколишнього середовища. Методики біотестування досить прості, інформативні, експресні та не потребують дорогого спеціального обладнання. Серед тест-організмів у фармації широко використовуються інфузорії виду *Paramecium caudatum* завдяки таким перевагам: поєднання ознак як окремої еукаріотичної клітини, так і самостійного організму; висока чутливість до змін навколишнього середовища; можливість завдяки великим розмірам клітини фіксувати зміни морфологічних ознак клітини, рухливість, ріст, виживання культури, отримуючи кількісні показники; короткий життєвий цикл дає можливість простежити реакцію на досліджувану речовину в ряду поколінь; прості умови культивування, невибагливість і швидка адаптація до змін умов навколишнього середовища; можливість проведення експрес-контролю; економічність проведення дослідження [28]. Висока чутливість *Paramecium caudatum* дає змогу визначити токсичність низьких доз АФІ та оцінити ступінь токсичного впливу за специфічними реакціями задовго до загибелі клітини [6, 28]. Модель оксидативного стресу на *Paramecium caudatum* використовується для дослідження антиоксидантних властивостей широкого спектра лікарських форм: розчинів [14], екстрактів [11], сиропів [13], м'яких лікарських форм [16], нанопрепаратів [15] та ін.

Метою роботи є порівняльна оцінка токсичності й антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur, Q10 і CytC на моделі *Paramecium caudatum*.

#### Матеріали та методи

У роботі використовували Quer (PVP Sociedade Anonima, Бразилія); Q10 (Hangzhou Huadong Medicine Group Kangrun Pharmaceutical Co., Ltd, Китай); CytC (Hebei Lead Bio-Chemicals Co., Ltd, Китай); Cur, одержаний за розробленим методом [10]; фосфатидилхолін яєчного жовтка (EPC) та дилпальмітоїлфосфатидилгліцерин (DPPG) (Lipoid, Німеччина);

лактоза (Sigma Aldrich); 0,01 М фосфатний буфер рН 6,7–7,0. Ліпосоми одержували методом ліпідної плівки за відомими методами [7–9, 22].

Культивування *Paramecium caudatum* здійснювали на середовищі Лозина-Лозинського із використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* як корму [13, 28].

Токсичність Ls препаратів і окремих ліпідів оцінювали за виживанням та інтенсивністю розмноження культури *Paramecium caudatum* протягом 72 год інкубації у поживному середовищі із додаванням досліджуваних препаратів за температури 20–25 °С [11, 13, 16]. Як контроль використовували культуру *Paramecium caudatum* без додавання препаратів. Підрахунок клітин проводили через 24, 48 і 72 год після додавання досліджуваних препаратів за допомогою оптичного мікроскопа.

Вивчення антиоксидантної активності проводили на моделі оксидативного стресу *Paramecium caudatum*, індукованого додаванням 1 % розчину гідроген пероксиду [4, 13, 16]. Культуру *Paramecium caudatum* інкубували протягом 24 год із досліджуваними препаратами в дозах 25, 50, 75 і 100 мкг/мл (за АФІ) за температури 20–25 °С, після чого змішували 1 мл культури *Paramecium caudatum* із 1 мл розчину гідроген пероксиду. Як контроль використовували культуру *Paramecium caudatum* без додавання препаратів. Спостереження за змінами морфології та руху клітин здійснювали за допомогою оптичного мікроскопа, фіксували час загибелі 100 % клітин. Антиоксидантну активність оцінювали за допомогою індексу біологічної активності ( $I_{BA}$ ) – відношення середнього часу загибелі 100 % клітин у досліджуваному зразку до контролю [5]. За значення  $I_{BA}$  в діапазоні  $1,00 \pm 0,10$  – антиоксидантна активність відсутня, досліджуваний зразок не відрізняється від контролю;  $I_{BA} > 1,10$  – досліджуваний зразок проявляє антиоксидантну активність, підвищуючи стійкість клітин до токсиканта;  $I_{BA} < 0,90$  – досліджуваний зразок проявляє токсичний вплив, зменшуючи життєздатність клітин.

Достовірність результатів оцінювали за допомогою критерію Стьюдента ( $n=5$ ,  $P < 0,05$ ) відповідно до ДФУ 2.0.

### Результати і їхнє обговорення

**Дослідження токсичності ліпосомальних форм антиоксидантів на культурі *Paramecium caudatum*.** Проведено вивчення токсичності Ls форм Quer, Cur, Q10, CytC на культурі *Paramecium caudatum* у концентраціях 25–100 мкг/мл (за АФІ). Встановлено, що у досліджуваному діапазоні концентрацій протягом 24 год інкубації культури із Ls формами Quer, Cur та Q10 спостерігається збільшення чисельності клітин до 180 % (рис. 1), при цьому клітини зберігають нормальну морфологію та характер рухової активності. Крім того, у дозах 25 і 50 мкг/мл чисельність клітин, інкубованих із Ls формами АФІ, не знижувалася порівняно із контролем протягом 72 год інкубації (рис. 1а, 1б).

За збільшення дози препаратів до 75 мкг/мл через 72 год спостерігали зниження чисельності клітин у Ls-Cur (до 40 % від початкової чисельності) і Ls-Quer (до 70 %) (рис. 1в). У максимальній використованій дозі всі досліджувані препарати викликають суттєве зниження чисельності клітин *Paramecium caudatum* через 72 год (рис. 1г), причому токсичність зростає у ряду: Ls-Quer < Ls-Q10 < Ls-Cur.

Інкубація із Ls-CytC призводила до 100 % лізису клітин *Paramecium caudatum* у всіх досліджуваних концентраціях протягом 24 год (рис. 1). При цьому вільна форма CytC в концентраціях 10–400 мкг/мл не викликає загибелі, змін морфології або характеру руху протягом 72 год.

На токсичність Ls препаратів можуть впливати як фізико-хімічні властивості АФІ, так і склад ліпідів у мембрані. Досліджувані препарати у своєму складі містять ЕРС (Ls-



Quer –100 %), EPC:DPPG – 10:1 (Ls-Cur, Ls-Q10) та EPC:DPPG – 6:5 (Ls-CytC). Різниця у ліпідному складі передусім обумовлена вимогами одержання стабільних і стандартних Ls із високим ступенем включення АФІ у їхню мембрану та водне середовище [17]. Ступінь включення, у свою чергу, залежить від фізико-хімічних властивостей АФІ: заряду, структури та ін. Встановлено, що введення до складу Ls аніонних фосfolіпідів дає змогу підвищити включення у них АФІ. Заряд АФІ, зокрема, позитивно зарядженого CytC, дає змогу включити даний АФІ до Ls за рахунок аніонного фосfolіпиду [9]. Крім цього, включення в Ls DPPG допомагає покращити технологічні параметри під час виробництва Ls препаратів [22].

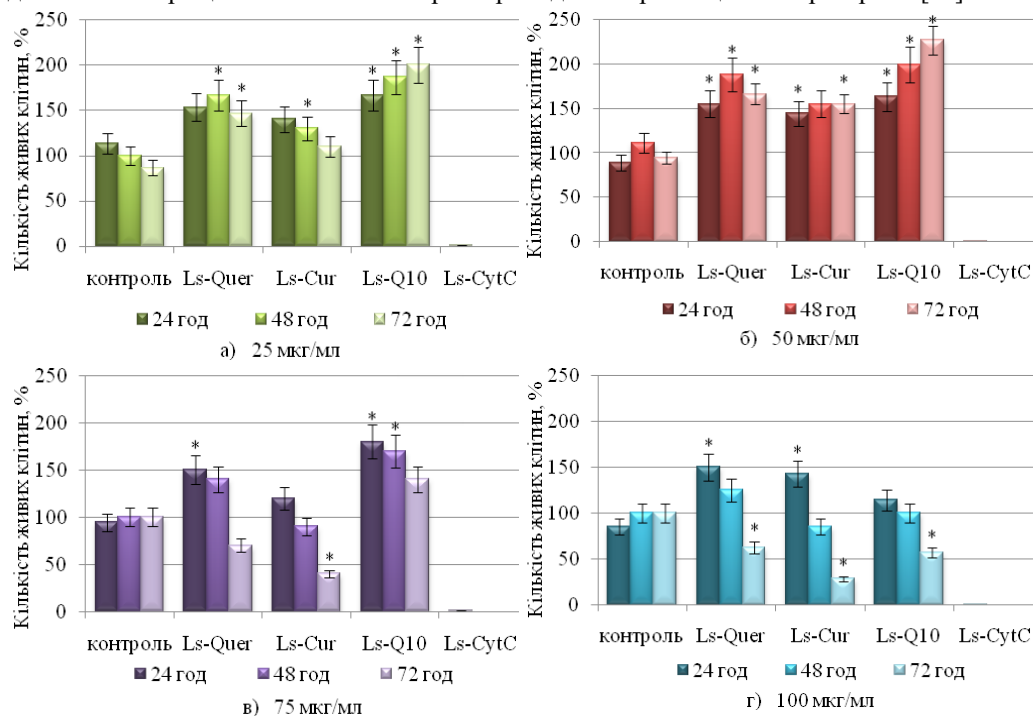


Рис. 1. Токсичність Ls форм антиоксидантних препаратів на культурі *Paramecium caudatum* протягом 72 год (\* достовірність  $P < 0,05$ , порівняно із контролем;  $n=5$ )

Зниження активності *Paramecium caudatum* та їхня 100 % загибель може бути пов'язана зі значною кількістю DPPG в Ls. Підтвердженням цього є роботи [1, 4], в яких продемонстровано, що аніонні фосfolіпіди (кардіоліпін, фосфатидилгліцерин, фосфатидна кислота) в концентраціях вище 335 мкМ проявляють бактерицидну активність щодо грамнегативних бактерій *E. coli* BL21(DE3) та грампозитивних бактерій *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, а також показана антибактеріальна активність «порожніх» Ls на основі кардіоліпину щодо резистентного штаму *M. tuberculosis* MS-115 із множинною стійкістю до антибіотиків. Автори пояснюють це розвитком вільнорадикальних процесів під дією аніонних фосfolіпідів [12]. Крім того, в основі токсичного впливу аніонного фосfolіпиду DPPG на клітини *Paramecium caudatum* може лежати ряд механізмів: зміна температури фазового переходу в мембрані *Paramecium caudatum*, що може змінювати її плинність і проникність [18]; відомо, що аніонні фосfolіпіди впливають на міжфазні ефекти, включаючи електростатичну взаємодію у процесі поверхневого зв'язування білків, впливаючи на позаклітинні процеси під час порушення нормальної мембранної асиметрії [3].

**Дослідження токсичності ліпідів на культурі *Paramecium caudatum*.** Проведено вивчення токсичності «порожніх» Ls на основі ЕРС (аналогічно ліпідному складу Ls-Quer) та суміші ЕРС:DPPG у співвідношеннях 10:1 (аналогічно ліпідному складу Ls-Cur, Ls-Q10) та 6:5 (аналогічно ліпідному складу Ls-CytC) в інтервалі концентрацій 250–4000 мкг/мл на культурі *Paramecium caudatum*.

Показано, що за інкубації культури *Paramecium caudatum* з Ls на основі ЕРС та суміші ЕРС:DPPG (10:1) протягом 24 год не спостерігали ні загибелі, ні підвищення інтенсивності поділу клітин порівняно із контролем. При цьому у зразках із ЕРС через 48 год інкубації спостерігали зниження чисельності живих клітин до 60–65 % за концентрації ліпідів більше 3000 мкг/мл (рис. 2), тоді як у зразках із сумішшю ЕРС:DPPG зниження чисельності живих клітин спостерігали за концентрації ліпідів більше 1000 мкг/мл (рис. 3).

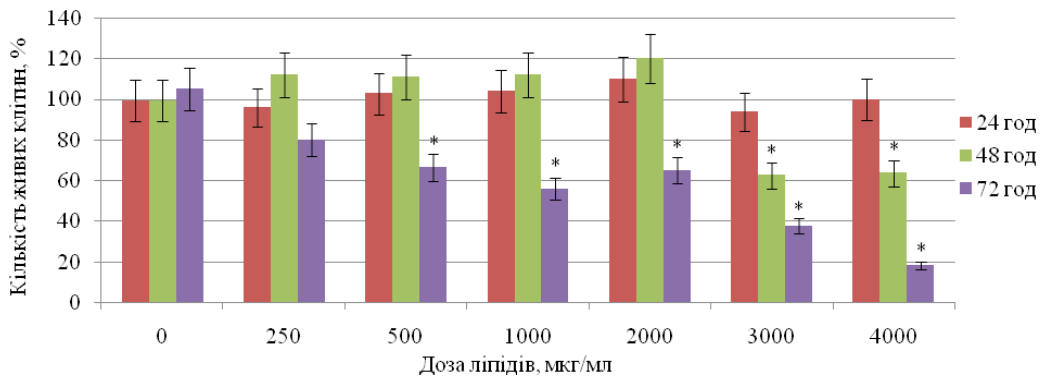


Рис. 2. Залежність чисельності культури *Paramecium caudatum* від дози ліпідів (ЕРС) через 24, 48 і 72 год інкубації (\* достовірність  $P < 0,05$ , порівняно із контролем;  $n=5$ )

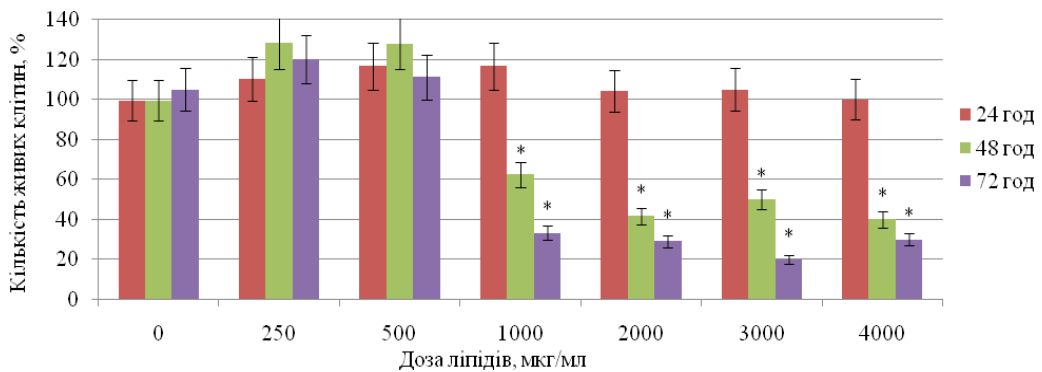


Рис. 3. Залежність чисельності культури *Paramecium caudatum* від дози ліпідів (ЕРС:DPPG – 10:1) через 24, 48 і 72 год інкубації (\* достовірність  $P < 0,05$ , порівняно із контролем;  $n=5$ )

Інтерес викликає збільшення чисельності *Paramecium caudatum* за інкубації з ЕРС протягом 48 год у дозах менше 2000 мкг/мл, що може бути обумовлено використанням ЕРС клітиною як будівельного матеріалу для мембран або джерела поживних речовин [3, 20, 25].

Культивування *Paramecium caudatum* з Ls на основі суміші ЕРС:DPPG (6:5) в усіх досліджуваних концентраціях призводило до повного лізису клітин протягом 24 год. Цьому передувала вакуолізація цитоплазми (рис. 4б), набухання клітини (рис. 4в), в результаті чого відбувається укорочення поздовжньої осі клітини, розрив клітинної мембрани та

вихід вмісту клітини у зовнішнє середовище. Отримані результати вказують на те, що включення до складу Ls аніонного фосфоліпиду DPPG значно збільшує токсичний вплив Ls на *Paramecium caudatum*, що слід брати до уваги під час розробки складу Ls препаратів.



Рис. 4. Зміна морфології клітин *Paramecium caudatum* під впливом Ls на основі суміші EPC:DPPG (6:5): а – нормальна морфологія клітин; б – вакуолізація цитоплазми; в – набухання клітини та розрив клітинної мембрани (збільшення мікроскопа 100×)

Таким чином, вивчення антиоксидантної активності Ls препаратів на культурі *Paramecium caudatum* обмежується Ls із низьким вмістом аніонних фосфоліпідів (DPPG) через високу чутливість *Paramecium caudatum*.

**Вивчення антиоксидантної активності ліпосомальних форм кверцетину, куркуміну та убіхінону на моделі *Paramecium caudatum*.** Антиоксидантну активність Ls форм Quer, Cur і Q10 проводили після інкубації з досліджуваними препаратами протягом 24 год, оскільки, як раніше було показано (рис. 1), протягом цього часу Ls препарати не виявляють токсичного впливу на культуру *Paramecium caudatum*. Як плацебо використовували «порожні» Ls на основі EPC.

Результати дослідження антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur і Q10 представлені у табл. 1. Під дією гідроген пероксиду в контролі спостерігали уповільнення руху клітин протягом 3 хв (рис. 6 – контроль), деформацію клітин, блебінг клітинної мембрани та зупинку руху 100 % клітин (рис. 5).

Таблиця 1

Результати дослідження антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur і Q10

Препарат	Доза АФІ							
	25 мкг/мл		50 мкг/мл		75 мкг/мл		100 мкг/мл	
	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА
Контроль	8,28±0,15		8,11±0,23		8,17±0,33		8,45±0,18	
Плацебо	8,82±0,14	1,06	9,05±0,39	1,11	9,42±0,39	1,15	7,95±0,11	0,94
Ls-Quer	9,67±0,13*	1,17	10,47±0,15*	1,29	10,82±0,45*	1,32	9,83±0,15*	1,16
Ls-Cur	9,80±0,16*	1,18	9,95±0,21*	1,23	10,62±0,30*	1,30	9,48±0,19*	1,12
Ls-Q10	9,82±0,22*	1,19	9,75±0,31*	1,20	10,80±0,41*	1,32	9,08±0,15	1,07

\*достовірність  $P < 0,05$ , порівняно із контролем;  $n=5$

Усі досліджувані препарати виявили дозозалежний антиоксидантний ефект у дозах 25–75 мкг/мл ( $P < 0,05$ ), тоді як у дозі 100 мкг/мл ефект знизився у зразках Ls-Quer та Ls-Cur ( $P < 0,05$ ), а у Ls-Q10 не відрізнявся від контролю ( $P > 0,05$ ), що може бути пов'язано із

високою дозою як АФІ, так і ліпідів Ls мембрани. Необхідно відмітити, що «порожні» Ls у досліджуваних дозах не забезпечували статистично достовірного збільшення часу зупинки клітин *Paramecium caudatum* порівняно з контролем ( $P>0,05$ ).

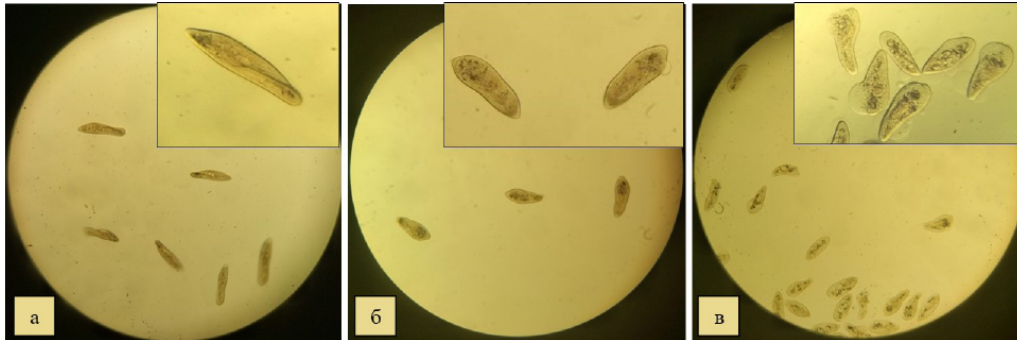


Рис.5 Зміна морфології клітин *Paramecium caudatum* під впливом гідроген пероксиду: а – нормальна морфологія клітин; б – уповільнення та набухання клітин; в – блебінг мембрани, деформація та повна зупинка клітин (збільшення мікроскопа 100×)

Ls антиоксидантні препарати виявили близький антиоксидантний ефект, при цьому підвищення стійкості *Paramecium caudatum* до дії токсиканта виявлялось не тільки у збільшенні часу повної зупинки, але й у суттєвому збільшенні часу збереження нормальної рухової активності (рис. 6).

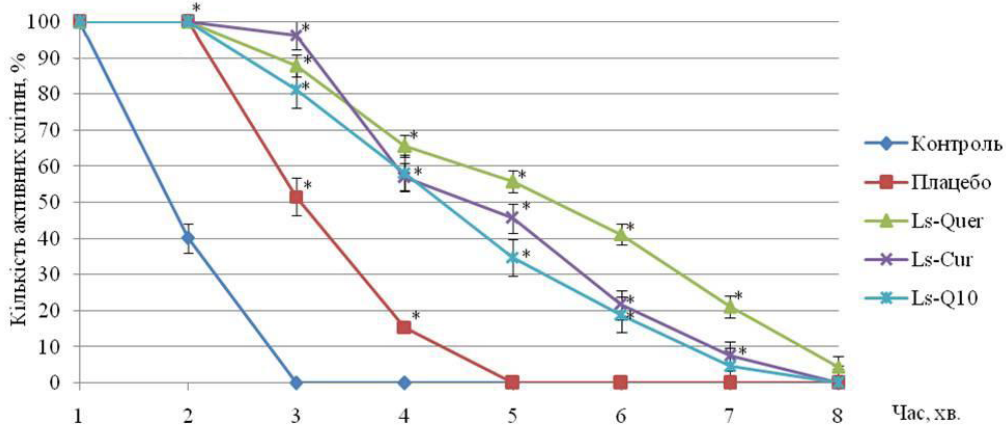


Рис. 6. Кількість клітин *Paramecium caudatum*, які зберегли рухову активність під дією гідроген пероксиду (доза досліджуваних препаратів 50 мкг/мл) (\* достовірність  $P<0,05$ , порівняно із контролем;  $n=5$ )

Отримані результати узгоджуються із даними літератури щодо вивчення *in vitro* антиоксидантних властивостей Quer, Cur та Q10 у різних лікарських формах. Вільні форми Quer (Мол. маса = 302,236) у дозі 50 мкМ та Q10 (Мол. маса = 863,34) у дозі 10 мкМ зменшували пошкодження ДНК, індуковане додаванням гідроген пероксиду, на культурі клітин слизової оболонки носа людини на 52,3 та 27,7 % відповідно [24]. Cur (Мол. маса = 368,38) та Q10 у дозі 5 мкМ пригнічували утворення активних форм кисню в культурі клітин і пов'язані з ними шляхи, що викликають розвиток остеокластогенезу [21]. Необхідно відмітити, що антиоксиданти у вільній формі мають вкрай низьку біодоступність, тому в наведе-

дених вище роботах їх використовували у високих дозах. Для підвищення біодоступності та зменшення ефективної дози АФІ синтезували хітин-глюканові комплекси Quer і Cur [27], що ефективно знижували вільнорадикальні процеси у культурі мононуклеарних клітин периферичної крові у дозі 50–100 мкг. У даній роботі Ls форми антиоксидантів виявляли антиоксидантні властивості на моделі *Paramecium caudatum* вже у дозі 25 мкг.

Таким чином, досліджено токсичність Ls форм Quer, Cur, Q10 і CytC у дозах 25-100 мкг/мл на тест-системі *Paramecium caudatum*. Встановлено, що протягом 24 год Ls форми Quer, Cur, Q10 у використовуваних дозах не виявляють токсичного впливу на культуру *Paramecium caudatum*, проте інкубація із Ls формою CytC призводить до лізису клітин. Проведено порівняння токсичності Ls на основі ЕРС та суміші ЕРС:DPPG у співвідношеннях 10:1 і 6:5 на культурі *Paramecium caudatum*. Встановлено, що включення до складу Ls мембрани аніонного фосфоліпиду DPPG призводить до збільшення токсичності для культури *Paramecium caudatum*. Проведено порівняння антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur, Q10 на моделі оксидативного стресу *Paramecium caudatum*: усі досліджувані препарати продемонстрували дозозалежні антиоксидантні властивості.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г., Жогина Ю. А. и др. Влияние экзогенного кардиолипина на рост и жизнеспособность *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* // Докл. Академии наук. 2010. Т. 434. № 5. С. 705–708.
2. Ващенко В. И., Хансон К. П., Шабанов П. Д. Цитохром С как лекарственное средство: прошлое, настоящее, будущее // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2005. Т. 4. № 1. С. 27–37.
3. Ипатова О. М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. М.: Изд-во ГУ НИИ Биомед. химии РАМН, 2005. 318 с.
4. Мукулович Ю. Л., Сорокоумова Г. М., Селищева А. А., Швец В. И. Антибактериальная активность экзогенных анионных фосфолипидов в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Escherichia coli* // Тонкие химические технологии. 2016. Т. 11. № 3. С. 64–73.
5. Пат. 2125262 РФ, МПК G01N 33/00, 33/18, C12Q 1/04. Способ биологического мониторинга экологических систем и объектов / Бузлама В.С., Ващенко Ю.Е., Востроилова Г.А., Титов Ю.Т. (РФ); № 97108740/13; Заявл. 10.06.1997; Опубл. 20.01.1999.
6. Пат. 2281507 РФ, МПК G01N 33/483. Способ оценки токсичности бактериальных антигенов / Жукова С.И., Адельшин Ф.К., Храпова Н.П. (РФ); Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; № 2004133598/15; Заявл. 20.04.2006; Опубл. 10.08.2006. Бюл. № 22, 9 с.
7. Пат. 91702 України, МПК B01F 3/00, 3/08, 3/20, 3/22. Спосіб одержання кардіопротекторного засобу на основі ліпосомальних наночастинок / Шахмаев А.Е., Горбач Т.В., Краснополяский Ю.М. (Україна); № u201401941; Заявл. 26.02.2014; Опубл. 10.07.2014. Бюл. № 13, 14 с.
8. Пат. 111762 України, МПК A61K 9/127, 47/44, 31/353, A61P 39/06, 9,10, 27,02, Спосіб отримання фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин / Григор'єва Г.С., Краснополяський Ю.М., Коначович Н.Ф., Пасечнікова Н.В. (Україна); ТОВ «НАНОМЕДТРАСТ»; № a201407695; Заявл. 08.07.2014; Опубл. 10.06.2016. Бюл. № 11, 10 с.
9. Пат. 118583 України, МПК A61K 9/127, 47/44, 38/41 A61P 27/12, Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпо-

- сомальна композиція, отримана таким способом / Григор`єва Г.С., Кацай О.Г., Краснопольський Ю.М. та ін. (Україна); ТОВ «НАНОМЕДТРАСТ»; № а201610776; Заявл. 27.10.2016; Опубл. 11.02.2019. Бюл. № 3. 17 с.
10. Пилипенко Д. М., Краснопольський Ю. М. Виділення та очистка куркуміноїдів із кореневища *Curcuma Longa L.* // Укр. біофарм. журнал. 2019. Т. 4. № 61. С. 60–64.
  11. Пузырева И. Н., Огай М. А., Петров А. Ю. Экспресс-анализ биологической активности композиции из спиртоводного извлечения расторопши, астрагала и таурина // Научные ведомости. Сер. Медицина. Фармация. 2016. Т. 12 (233). № 34. С. 131–134.
  12. Смирнова Т.Г., Микулович Ю.Л., Андреевская С.Н. и др. Лизопроеизводные кардиолипина подавляют жизнеспособность чувствительного и резистентного штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Биофарм. журнал. 2011. Т. 3. № 2. С. 19–27.
  13. Степанова Э. Ф., Темірбулатова А. М., Воронова Л. С., Зилфикаров И. Н. Разработка сиропов композитного состава с фитоконпонентами адаптогенного действия // Науч. ведомости. Сер. Медицина. Фармация. 2011. Т. 22 (117). № 16/2. С. 131–137.
  14. Грутаев И. В. Экспериментальное изучение влияния синтетических олигопептидов на модели свободноживущей инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* // Укр. біофарм. журнал. 2011. Т. 5. № 16. С. 42–45.
  15. Умнова О. А. Сравнение биологической активности фитохимических композиций в нативной и липосомальных формах // Вестн. Москов. ун-та. Сер. 2 Химия. 2010. Т. 51. С. 476–484.
  16. Федоровська М. І., Половко Н. П., Стрілець О. П. Вивчення антиоксидантних властивостей дерматокосметичних засобів з рослинними субстанціями на біологічній моделі *Paramecium caudatum* // Укр. біофарм. журнал. 2018. Т. 2. № 55. С. 22–25.
  17. Швец В. И., Краснопольський Ю. М., Сорокоумова Г. М. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике. М.: Ремедиум, 2017. 200 с.
  18. Beltran-Gracia E., Lopez-Camacho A., Higuera-Ciajara I. et al. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications // Cancer Nanotechnology. 2019. Vol. 10. Article number: 11.
  19. DiNicolantonio J. J., Bhutani J., McCarty M. F., O'Keefe J. H. Coenzyme Q10 for the treatment of heart failure: a review of the literature // Open Heart. 2015. Vol. 2. N 1. e000326.
  20. Esko J. D., Nishijima M., Raetz C. R. Animal cells dependent on exogenous phosphatidylcholine for membrane biogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. N 6. P. 1698–1702.
  21. Moon H. J., Ko W. K., Han S. W. et al. Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. Vol. 418. N 2. P. 247–253.
  22. Pylypenko D., Prochorov V., Dudnichenko O., Krasnopolsky Y. Nanobiotechnological obtaining of liposomal forms of antioxidant preparations based on bioflavonoides // Scientific Journal "Science Rise" Pharmaceutical Sciences. 2019. Vol. 6. N 22. P. 11–15.
  23. Ramana K. V., Srivastava S., Singhal S. S. Lipid peroxidation products in human health and disease // Oxid. Med. Cell. Longev. 2014. Vol. 2014. 162414.
  24. Reiter M., Rupp K., Baumeister P. et al. Antioxidant effects of quercetin and coenzyme Q10 in mini organ cultures of human nasal mucosa cells // Anticancer Res. 2009. Vol. 29. N 1. P. 33–39.
  25. Ridgway N. D. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 6-th edition. Elsevier Science, 2016. P. 209-236.

26. Shimatsu A., Kakeya H., Imaizumi A. et al. Clinical application of “curcumin”, a multi-functional substance // *Anti-Aging Med.* 2012. Vol. 9. N 1. P. 43–51.
27. Singh A., Lavkush, Kureel A. K. et al. Curcumin loaded chitin-glucan quercetin conjugate: Synthesis, characterization, antioxidant, in vitro release study, and anticancer activity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 110. P. 234–244.
28. Suezov R., Grishina P., Ponyaev A. et al. Relative cytotoxicity of complexes of platinum(II) and palladium(II) against pure cell culture *Paramecium caudatum* and human cell lines A431 and HaCaT // *Mediterr. J. Chem.* 2018. Vol. 7. N 1. P. 28–38.
29. Xu D., Hu M. J., Wang Y. Q., Cui Y. L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application // *Molecules.* 2019. Vol. 24. N 6. 1123.

Стаття надійшла до редакції 20.05.20

доопрацьована 14.07.20

прийнята до друку 28.07.20

## STUDY OF TOXICITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LIPOSOMAL ANTIOXIDANTS USING *PARAMECIUM CAUDATUM* MODEL

D. Pylypenko

*National Technical University “Kharkiv Polytechnic Institute”  
2, Kyrpychov St., Kharkiv 61002, Ukraine  
e-mail: pdmforwork@gmail.com*

Antioxidant drugs are actively used in medical practice for the treatment of inflammatory processes in various cardiac, ophthalmic, autoimmune, cancer and other diseases. The use of nanobiotechnological methods is a promising area of modern pharmacy, as it allows for creation of drugs of a qualitatively new level. Encapsulation of active pharmaceutical ingredients in liposomal nanoparticles makes it possible to increase the bioavailability and efficacy of natural antioxidants, to create water-soluble injectable forms of hydrophobic compounds. Biotesting is a simple, informative and rapid method to evaluate the toxicity and antioxidant activity of drugs, which can be a valid alternative to the use of laboratory animals at the screening stage. *Paramecium caudatum* is an unicellular infusoria widely used as test-object due to high sensitivity to environmental changes; big cell size, which makes it possible to monitor changes in morphology and mobility of the cells; easy cultivation.

The aim of the study is to evaluate the toxicity and antioxidant activity of liposomal forms of antioxidants: quercetin, curcumin, coenzyme Q10 and cytochrome C by biotesting method using *Paramecium caudatum*.

The toxicity of liposomal forms of quercetin, curcumin, coenzyme Q10 and cytochrome C at doses of 25–100 µg/ml using *Paramecium caudatum* was studied. Incubation of *Paramecium caudatum* with liposomal forms of quercetin, curcumin and coenzyme Q10 led to growth of the cell culture, whereas liposomal cytochrome C caused cell lysis within 24 hours. It is established that toxicity of liposomal preparation is influenced by its lipid composition. Incorporation of anionic phospholipid (dipalmitoylphosphatidylglycerol) in lipid membrane significantly reduces the survival of the test culture compared with liposomes containing only phosphatidylcholine. In the model of oxidative stress induced in *Paramecium caudatum* by hydrogen peroxide, liposomal forms of quercetin, curcumin and coenzyme Q10 demonstrated dose-dependent antioxidant effects, which resulted in tolerance increasing of the test culture to the toxicant.

*Keywords:* liposomal antioxidants, toxicity, antioxidant activity, biotesting, *Paramecium caudatum*

## **МЕТОДИ ОЦІНКИ ПОСУХОСТІЙКОСТІ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ**

**С. Пикало\*, О. Демидов, Т. Юрченко, С. Хоменко, О. Гуменюк,  
М. Харченко, Н. Прокопів**

*Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України  
с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл. 08853, Україна  
e-mail: pykserg@ukr.net*

Пшениця, будучи одним із найцінніших злаків планети, відіграє провідну роль у харчовому забезпеченні людства. Ареал пшениці дуже великий, оскільки культивують її на п'яти континентах у більшості країн світу. Генетичне вдосконалення пшениці має вирішальне значення, адже безпосередньо впливає на економічний розвиток, міжнародну торгівлю зерном і продовольчу безпеку країни. У зв'язку з цим актуальність досліджень у вирішенні багатьох генетико-селекційних задач стосовно цієї культури зростає і набуває якісно нового характеру. Збільшення врожайності є найважливішим критерієм у вирощуванні будь-яких сільськогосподарських культур, зокрема, пшениці. Посуха – один із найголовніших обмежуючих чинників довкілля, що знижують продуктивність рослин. Щоб гарантувати сільське господарство від втрат у посушливі роки, необхідно мати стійкі до дефіциту вологи сорти. Саме тому одним із пріоритетних напрямів селекції пшениці є створення сортів, стійких до дії водного дефіциту. Успіх селекції у створенні посухостійких форм багато в чому залежить від правильної оцінки ступеня їхньої стійкості. Результати, отримані в ході аналізу літературних даних, свідчать, що для скринінгу сортозразків пшениці на посухостійкість є багато методів, заснованих на різних принципах дії, і кожен із них має свої переваги та недоліки. Для прискорення селекційного процесу й отримання достовірних результатів необхідно застосовувати різні методики дослідження зразків за конкретними ознаками стійкості до стресу. Вибір способу значною мірою залежить від ступеня його трудомісткості, тривалості оцінки і пропускну здатності. Тому створення нових і вдосконалення вже наявних методів оцінки селекційного матеріалу пшениці на посухостійкість в умовах наростання водного дефіциту або підвищення температури дасть можливість об'єктивно характеризувати рівень адаптивності перспективних генотипів і прогнозувати їхню поведінку у відповідних екологічних умовах.

*Ключові слова:* пшениця, посуха, стійкість, методи, водний дефіцит, оцінка

Пшениця займає чільне місце серед зернових культур у всьому світі і є головним продовольчим продуктом приблизно для 35 % населення Земної кулі, забезпечуючи близько 20 % потреб людства в енергії [56]. Ця культура також займає перше місце у світі за посівними площами (близько 230 млн га) і валовим збором зерна (понад 766,4 млн т) [70]. Поширеність цієї культури зумовлена її високою біологічною пластичністю щодо екологічних умов і, перш за все, високою поживністю зерна, з якого отримують багато харчових продуктів [18, 48].

Генетичний потенціал вітчизняних сортів м'якої пшениці коливається в межах 11–14 т/га, проте у виробничих умовах реалізується лише 45 % [7]. Є багато чинників, які не дають змоги повною мірою реалізувати детермінований спадковий потенціал сортів.



Тому одним із пріоритетних напрямів генетики, селекції та біотехнології є створення сортів пшениці, толерантних до несприятливих екологічних чинників довкілля – посухи, екстремальних температур, засолення, забруднення іонами токсичних металів тощо.

Серед усіх природних чинників, які найбільш негативно впливають на фізіологічні процеси росту і розвитку рослин пшениці та призводять до зниження урожаю, є водний дефіцит, спричинений посухою [55, 69, 86]. Відомо, що нестача води у ґрунті завдає значно більшої шкоди рослинництву, ніж усі інші стресові фактори, разом узяті [52]. Шкідлива дія посухи полягає, в першу чергу, у зневодненні та порушенні метаболічних процесів у рослинах, що призводить до розпаду білків, зміни колоїдно-хімічного стану цитоплазми клітини і, як наслідок, до зниження кількості накопиченої рослинами органічної речовини [52, 78, 87]. Посуха може також спровокувати засолення ґрунтів [52]. Стрес, викликаний водним дефіцитом, може бути первинним у разі посухи, а також вторинним у разі сольового стресу [52, 87]. Очікується, що з прогресуючим глобальним потеплінням клімату періодичність повторення посух по роках буде тільки посилюватися [89].

Реакція рослин на водний стрес залежить від кількох факторів, таких як стадія розвитку, ступінь тяжкості і тривалості стресу, а також генетичні особливості сорту [54, 69, 87]. У вирішенні даної проблеми адаптивний сорт є найдешевшим і доступним засобом підвищення врожайності за умов водного дефіциту. Тому для стабільного отримання зернової продукції та для селекції загалом суттєве значення має добір генотипів пшениці, здатних переносити дефіцит вологи у ґрунті. Селекція пшениці на посухостійкість є визначальною передумовою для підвищення її пластичності й продуктивності та дає змогу розширити посіви цієї культури у районах із несприятливими кліматичними умовами [13, 84, 87]. Успіх селекції пшениці на стійкість до водного дефіциту значною мірою залежить від правильної оцінки цієї ознаки у створюваних сортах. Тому методологічне забезпечення всебічного дослідження біологічної та агрономічної стійкості рослин даної культури до посухи є пріоритетним завданням багатьох селекційних установ України [44]. Варто зазначити, що стійкість рослин до будь-якого стресу є відносною характеристикою, тому для її визначення у селекційній практиці досить часто використовують сорти-класифікатори [47].

Для прискорення селекційного процесу пшениці й отримання достовірних результатів необхідно застосовувати різні методики дослідження зразків за конкретними ознаками стійкості. Достовірність оцінки тим чи іншим методом залежить від того, наскільки сильно корельює з істинною стійкістю рослин фізіологічна ознака, що лежить в основі даного діагностичного способу [5, 6]. Ефективна робота в цьому напрямі можлива на основі знання і використання фізіологічних механізмів виникнення у рослин стійкості. Розглядаючи цю проблему, генетики та селекціонери зосереджують свої зусилля головним чином на використанні класичної адаптивної селекції для створення нових сортів. Класичні методи, що застосовуються для оцінки посухостійкості рослин, умовно розподіляють на три групи: прямі, вегетаційні та непрямі [49].

**Прямі методи.** У селекційній практиці зернових колосових культур на сьогодні широко використовують спосіб оцінки стійкості генотипів до посухи, що заснований на проведенні польових дослідів [29]. Тут враховують і оцінюють особливості росту і розвитку досліджуваних рослин, а також їхню продуктивність в умовах водного дефіциту [79, 85]. За настання посухи на рівні цілої рослини враховують такі параметри як швидкість і ступінь втрати тургору, ступінь відмирання листя, глибина залягання коріння, товщина кутикули, зміна контролю змикання продохів тощо [19, 79, 86]. Найбільш повним і об'єктивним по-

казником стійкості рослини до посухи вважається її урожайність за умов водного дефіциту. Для виявлення посухостійких форм у польових умовах запропоновано кілька критеріїв добору, що передбачають визначення врожайності зерна у стресових і нестресових умовах – стійкість і сприйнятливість генотипів до дії водного дефіциту [76, 94]. Кількісною мірою посухостійкості вважається ступінь зниження продуктивності в екстремальних умовах, порівняно з оптимальними умовами росту [11, 83]. Індекси посухостійкості, які враховують рівень втрати урожаю під впливом посухи порівняно з оптимальними умовами, використовують для добору посухостійких форм [71, 83, 94]. Ці індекси базуються як на стійкості, так і на чутливості зразків до водного стресу. Дослідники із CIMMYT розширили поняття про посухостійкість як відношення урожаю в однакових умовах посухи у різних сортів і запропонували розглядати його на генетичному рівні [88]. R. A. Fisher і R. Maurer [73] запропонували індекс сприйнятливості до стресу (SSI) у зернових культур, який характеризує рівень чутливості сортозразка до різних стресових факторів, зокрема – посухи. Цей показник дає змогу оцінити відносну сприйнятливість кожного генотипу в досліджуваному наборі, тому чим він менший, тим більший рівень посухостійкості зразка. G.C.J. Fernandez [72] представив новий розширений показник під назвою індекс толерантності до стресу (STI), який може бути використаний для ідентифікації форм із високим рівнем урожайності як у стресових, так і в оптимальних умовах. Цей показник характеризує здатність зразка утримувати стабільний рівень урожайності незалежно від стресових факторів. Різні автори використовували індекс толерантності до стресу для визначення стійкості до посухи у сортів із високою врожайністю [8, 71, 72, 83]. P. Gavuzzi та співавтори [74] для аналізу зернових культур запровадили індекс урожайності у стресових умовах (YI), який визначається відношенням урожайності сорту під впливом стресового чинника до середньої урожайності вивчених генотипів в аналогічних умовах. У роботі Н.О. Вус і співавторів [8] показано, що для більш ґрунтовної оцінки зразків за посухостійкістю доречно використовувати не один, а комплекс індексів. Слід зазначити, що під час обчислення всіх індексів використовують не більше чотирьох параметрів – урожайність сорту за умов посухи і за достатнього зволоження та середні урожайності набору сортів у вказаних умовах. Середні урожайності набору сортів також використовують для характеристики умов середовища, рівня інтенсивності посухи, а рівні урожайності сортів характеризують реакцію окремих зразків на дію посухи [8, 62, 83]. До основних переваг методу оцінки посухостійкості за використання вищезазначених індексів належать доступність необхідних даних, можливість вивчення значного обсягу набору сортів, простота розрахунків і визначення в одиницях найважливішої агрономічної характеристики – урожайності [62]. Таким чином, використання індексів оцінки посухостійкості, які обчислюють для широкого спектра культур (зокрема, пшениці), значно спрощує виявлення стійких форм.

У польових умовах посухостійкість визначають також способом, розробленим у Науково-дослідному інституті сільського господарства Південного Сходу Росії, який дає змогу ранжувати сорти чи лінії пшениці за посухостійкістю в будь-який окремо взятий посушливий рік, а за потенційною продуктивністю – в оптимальні роки [24]. На основі визначення сухої маси колосся у період цвітіння та повної стиглості проводять розрахунки показника коефіцієнта реалізації колоса – відношення сухої маси колоса у фазу повної стиглості зерна до сухої маси колоса у фазу цвітіння. Використовуючи такий метод, науковці Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН (МПІ) за величиною коефіцієнта реалізації колоса виділили посухостійкі лінії конкурсного випробування ярої м'якої пшениці, які згодом були передані на державне сорто випробування [13].

Оцінка стійкості рослин у польових умовах є досить трудомістким заняттям, займає досить тривалий час, потребує відповідних умов середовища для ефективного фенотипового прояву бажаної ознаки, а тому передбачає застосування значних матеріальних ресурсів. Часом буває важко або навіть неможливо створити два фони вирощування (оптимальний і екстремальний), що необхідно для діагностики посухостійкості. Складність цього методу полягає також у просторовій гетерогенності фізичних і хімічних властивостей ґрунту, а також у сезонних коливаннях кількості атмосферних опадів.

**Вегетаційні методи.** Ці методи передбачають застосування вегетаційних приміщень або спеціальних засушників із контрольованими умовами вирощування, де як основний критерій стійкості рослин слугує рівень їхньої урожайності за стресових умов порівняно з контролем [41].

Для попереднього оцінювання стійкості сортів до атмосферної посухи деякі селекційні установи використовують суховійні камери, в які вміщують вегетаційні посудини з рослинами [12]. Через суховійну камеру пропускають сильний потік зневодненого повітря (відносна вологість 18–20 %) за температури близько 40 °С, тобто створюють приблизно такі умови, які бувають у природі під час суховію. Стійкість оцінюють, порівнюючи врожайність рослин у контрольних посудинах і тих, що зазнали дії суховійної установки.

І.І. Туманов [46] розробив т. зв. метод в'янення, який полягає в тому, що рослини висівають у посудині місткістю 6–7 кг ґрунту і вирощують їх за штучного зрошення. Потім у певні фази розвитку зрошення припиняють, запас вологи у посудинах швидко витрачається, і рослини в'януть. Коли в'янення досягає такого ступеня, що у найменш стійких сортів починає відмирати листя, полив відновлюють і продовжують до кінця вегетації. У таких самих посудинах і за таких самих умов, але за постійного зрошення, для контролю вирощують ті ж сорти. Порівняння врожайності досліджуваних рослин із контрольними дає змогу визначити ступінь посухостійкості: що менша різниця в урожаї між рослинами, які зазнали в'янення, і контрольними, то стійкіший сорт до посухи. Варто зазначити, що цей метод активно використовують у сучасних дослідженнях [39, 93].

Однак вегетаційні методи є досить трудомісткими і громіздкими, а тому мають низьку пропускну здатність, що обмежує їхнє застосування для оцінки стійкості селекційного матеріалу до стресів. Окрім того, деякі вчені вважають, що селекція на посухостійкість за величиною урожайності є досить складним завданням, тому що успадковуваність урожайності в умовах стресу зазвичай низька через невелику генотипову дисперсію або через значну варіансу взаємодії генотип-середовище [71, 80]. Як наслідок, селекційне поліпшення стає довготривалим і ненадійним.

Таким чином, за стресових умов урожайність не завжди є найбільш придатною і простою ознакою для оцінки посухостійкості. Включення фізіологічних і біохімічних ознак у потенційно високопродуктивний генотип пшениці може поліпшити його адаптивність, дає можливість глибше вивчити його реакцію на мінливість середовища, а тому є важливою складовою селекційного процесу цієї культури.

**Непрямі методи.** Оскільки безпосередня оцінка рівня агрономічної стійкості рослин до посухи є тривалим і трудомістким завданням, у селекційній та інтродукційній практиці широко використовують непрямі лабораторні методи оцінки біологічної стійкості за фізіологічними, анатомічними, морфологічними та біохімічними показниками [23, 60, 95]. Ці підходи полягають у використанні не самої стійкості до нестачі вологи, а будь-якої іншої біологічної властивості, пов'язаної з даною ознакою. На сьогодні існує ціла низка непрямих методів оцінки посухостійкості рослин пшениці. Найбільш використовуваними з них

є реєстрація товщини листя і визначення у них відносного вмісту води (RWC) [58, 60, 61, 81], визначення інтенсивності транспірації проростків і виносу з транспіраційною вологою мінеральних іонів [31], вимірювання електроопору у верхній частині проростків пшениці за допомогою голчастих електродів [26], реєстрація електропровідності листя за здатністю листків виділяти або утримувати різну кількість електролітів [4, 21, 32]. До відомих належать також методи оцінки посухостійкості за оптичною густиною екстрактів листя, ростовою реакцією, ступенем відновлення мітотичної активності меристеми пагона після підсушування, величиною енергетичного заряду аденозинфосфатної системи [12, 15]. Один із відомих способів заснований на визначенні швидкості гідролізу статолітного крохмалю у клітинах кореневого чохла рослини [11]. Даний показник визначають візуально під мікроскопом і оцінюють в умовних балах.

Є різні методи тестування в лабораторних умовах, проте всі вони базуються на порівнянні біометричних характеристик або біохімічних показників рослин після перенесення їх у селективні умови [11, 26, 58]. Біохімічний підхід оцінки пшениці на стійкість до нестачі вологи полягає у реєстрації зміни активності різних ферментів (нітратредуктази, пероксидази) [28], вимірюванні концентрації вільного проліну [2, 90], визначенні вмісту загального білка, гліколіпідів і фосфоліпідів у фракції мембран хлоропластів [20, 60], аналізі накопичення рослинами цукрів [1]. Серед механізмів адаптації рослин до водного дефіциту важливе значення має накопичення сумісних осмолітів, одним із яких є пролін. Відомо, що збільшення вмісту цієї амінокислоти у клітинах рослин сприяє підвищенню стійкості до осмотичного стресу [22, 90]. Тому динаміку змін вмісту проліну в рослинах широко використовують як показник їхньої підвищеної стійкості до водного дефіциту. Одержані у багатьох працях результати опосередковано підтверджують гіпотезу про провідну роль проліну як осмопротектора за водного стресу [27, 37, 90]. Основна перевага біохімічних методів полягає в тому, що їх можна використовувати в оцінці стійкості на різних етапах розвитку рослин, що значно поглиблює уявлення про посухостійкість.

На даний час найефективнішими є методи ранньої діагностики на насінні та проростках, оскільки вони дають змогу проводити оцінку впродовж року й аналізувати велику кількість селекційного матеріалу [5, 6]. В Інституті рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН група дослідників розробила спосіб оцінки стійкості сортів зернових колосових культур до стресових умов вирощування, зокрема, посухи, який включає дію на насіння стресових факторів із подальшою оцінкою кількості виживання сукупності насіння конкретної партії сорту, що виражає його стійкість [35]. Даний метод передбачає опромінення насіння електромагнітними полями надзвичайно високих частот і нагрівання його в межах 26–85 °C з подальшою оцінкою ступеня виживання залежно від часу опромінювання. Той зразок насіння, який за часом опромінювання більше витримує свою життєздатність, – відображає вищу стійкість сорту до стресових умов вирощування. Як зазначають автори, запропонований лабораторний спосіб не виключає інші, а лише є розпізнавальним і дає змогу оцінювати велику кількість вихідного селекційного матеріалу та подальше вивчення наявних сортів.

Одним із методів оцінки посухостійкості сільськогосподарських культур, у тому числі пшениці, є визначення відсотка пророслого насіння на розчинах речовин, що викликають зниження водного потенціалу в клітинах [33]. Встановлено, що висока частка пророслого насіння на субстраті з осмотиком характеризує його здатність проростати у ґрунті за дуже малих запасів вологи [6]. Тому визначення кількості пророслого насіння на розчинах із високим осмотичним тиском, які імітують умови фізіологічної посухи, дає

можливість на ранніх етапах онтогенезу оцінити відносну посухостійкість рослин. У ролі осмотика, як правило, використовують високомолекулярний поліетиленгліколь (ПЕГ) або дисахарид сахарозу, однак подібними властивостями характеризується і такий 6-атомний спирт, як низькомолекулярний маніт. Показано [40], що поряд із сахарозою маніт має аналогічну спроможність до моделювання водного стресу, а це робить його перспективним для ранньої діагностики посухостійкості сортів пшениці. У відділі біотехнології, генетики і фізіології МПП науковці розробили та запатентували [34] спосіб оцінки стійкості генотипів пшениці до дії водного дефіциту, що обумовлений здатністю насіння різних сортів проростати неоднаково на високоосмотичних розчинах із манітом. Застосовуючи запропонований спосіб, для достовірної оцінки слід використовувати насіння одного року репродукції та однієї фракції. Даний винахід спрямований на розв'язання проблеми посухостійкості пшениці та сприятиме створенню нових сортів із цінними практичними властивостями.

Досить важливим показником адаптивності рослин пшениці до посухи є швидкість росту пагонів і зародкових коренів та їхньої довжини, тому посухостійкість даного злаку часто визначають за морфометричними показниками проростків за умов осмотичного стресу. Установлено, що критерієм оцінювання може слугувати співвідношення довжини та сирової маси кореневої системи до наземної частини рослини [4]. О.В. Бичкова та Л.П. Хлебова [5] досліджували особливості проростання насіння пшениці на розчинах сахарози з високим осмотичним тиском і виявили, що, окрім схожості, такі ознаки як довжина головних зародкових коренів і довжина проростка можуть додатково вказувати на посухостійкість конкретного генотипу. Відомий спосіб визначення посухостійкості на ранніх етапах онтогенезу рослин, що передбачає пророщування насіння, підсушування проростків за оптимальних для рослин температур і визначення вмісту води в меристемах у післястресовий період [36]. У інших дослідженнях [3] показником стійкості генотипів пшениці до осмотичного стресу був ступінь пригнічення накопичення сирової маси проростками за зниженого осмотичного потенціалу. При цьому чим менше пригнічувалися ріст і накопичення біомаси проростків у розчині ПЕГ порівняно з контролем, тим стійкішим виявлявся зразок.

Як зазначають Г.С. Россихіна та В.Я. Попов [44], у зв'язку з недостатньо високим рівнем формалізації процесів реалізації непрямих методів оцінки посухостійкості допускає несанкціоновану появу артефактів у процесі проведення модельних експериментів. Наведений недолік є причиною суттєвого зниження достовірності результатів експериментів, а також неможливості в деяких випадках забезпечення їхньої повторності. Тому науковці Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара запропонували підхід до підвищення рівня формалізації процесу дослідження стійкості рослин пшениці до посухи на прикладі математичного моделювання даного процесу [44]. Як ключові напрями було вибрано забезпечення можливості нормованого варіювання рівнем посухи, визначення якості контрольних зразків рослин, планування експерименту, розробку та дослідження ефективного методу визначення посухостійкості рослин. Автори дійшли висновку, що використання запропонованого підходу у практиці лабораторних експериментів забезпечує суттєве зниження кількості артефактів і сприяє підвищенню ефективності селекційної та інтродукційної практики у польових умовах.

**Комплексні методи.** Комплексне оцінювання зразків на різних етапах розвитку рослин дає змогу більш об'єктивно та достовірно оцінити генотипи за стійкістю до водного дефіциту. Слід підкреслити, що від достовірності методу залежить ступінь збігу результатів оцінки одного й того ж набору сортів у повторних циклах діагностики. У відділі біотех-

нології, генетики і фізіології МПП унаслідок застосування комплексу лабораторних методів оцінки за ознаками, пов'язаних з посухостійкістю рослин (проростання зерна в розчині сахарози, інтенсивність виходу електролітів із тканин листка, інтенсивність росту кореневої системи), визначено кращі за стійкістю до водного дефіциту сорти пшениці м'якої озимої миронівської селекції [4]. Виділені генотипи можуть слугувати цінним генетичним матеріалом у подальшому селекційному процесі цієї культури.

Лабораторні методи ранньої діагностики посухостійкості на насінні та проростках дають змогу проводити оцінку стійкості до посухи впродовж року й аналізувати велику кількість селекційного матеріалу, проте ними не передбачено визначення врожайних властивостей генотипу у стресових умовах вирощування. Тому для прискорення селекційного процесу та водночас об'єктивної оцінки стійкості генотипів пшениці до водного дефіциту доцільно застосовувати комбіновані методи, що передбачають поетапне проведення лабораторних і вегетаційних дослідів [5, 45].

Д.С. Тагіманова та співавтори [45] дійшли висновку, що під час проведення оцінки на посухостійкість необхідно використовувати комплекс методів, за допомогою яких можна було б не лише оцінювати різні аспекти толерантності сортів пшениці на ранніх етапах розвитку рослин, а й прогнозувати їхню потенційну врожайність. Автори аргументують це тим, що посухостійкі форми, як правило, є низьковрожайними внаслідок протиріччя цих двох властивостей рослин, тому необхідно добирати форми, що поєднують їх на певному рівні в одному генотипі. Дослідники виявили, що показники стійкості, отримані на різних рівнях організації (клітини, проростки, дорослі рослини), переважно збігалися для більшості досліджених генотипів пшениці.

В умовах лабораторії селекції ярої пшениці МПП на основі комплексного використання методів ранньої діагностики посухостійкості й аналізу коефіцієнта реалізації колоса виділено лінії пшениці ярої, стійкі до водного дефіциту [13]. Комплексне використання непрямих методів аналізу посухостійкості дало змогу ранжувати і виділяти серед селекційного матеріалу посухостійкі лінії. Ефективність використання комплексу методів для визначення стійкості до посухи підтверджено занесенням нових сортів до Державного Реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні [14]. Виявлено високоадаптивні лінії пшениці ярої, які передано на державне сортопробування як нові сорти.

Використання подібних підходів дає змогу комплексно і з необхідною вірогідністю (що більше відповідає польовим умовам) оцінити селекційний матеріал за посухостійкістю. Таким чином, сортозразки отримують поглиблену оцінку стійкості до стресу, що уточнює результати їхньої первинної діагностики. Така поетапність роботи дає можливість порівняно швидко і досить точно виявити з великої кількості сортів рослин, що оцінюються, найбільш посухостійкі.

**Біотехнологічні методи.** Принципово новим підходом на сьогоднішній день є застосування методів біотехнології, що значно полегшує та прискорює традиційний селекційний процес створення нових ліній і сортів пшениці. Варто зазначити, що за останні десятиліття, поряд із морфолого-анатомічними та фізіолого-біохімічними методами оцінки стресостійкості рослин, біотехнологічні підходи набули досить значного поширення [17, 30]. Сучасні біотехнології дають змогу суттєво скоротити терміни добору й оцінки сортів і успішно застосовуються селекціонерами по всьому світу.

Особливої актуальності набуває застосування культури тканин і органів *in vitro* – біологічної системи, де немає механізмів регуляції, що діють на рівні цілого організму [42]. Метод культури тканин та органів *in vitro* нині широко використовують для вирішення

прикладних завдань селекції різних сільськогосподарських рослин і, зокрема, пшениці [16, 67]. Особливістю культури соматичних тканин рослин є можливість регенерації повноцінних організмів завдяки властивості тотипотентності рослинної клітини [42, 65]. Культура ізольованих тканин є екологічно безпечною, малозатратною за часом і ресурсами технологією для вивчення стресостійкості форм зернових, що базується на використанні калюсних культур та культивуванні *in vitro* клітин у специфічних умовах [30, 42]. Ці підходи застосовують для скринінгу стійких форм, створення й ідентифікації соматоклональних варіантів із підвищеною стійкістю, а також для вивчення реакції клітин на токсичність селективних агентів.

У злаків, як правило, оцінку *in vitro* проводять на калюсах, оскільки інші технології (зокрема, протопластів, ембріокультури, культури пиляків) ще недостатньо розроблені [17]. Перевагами калюсних культур, порівняно з клітинними, є менший період необхідного культивування і, як наслідок, менша генетична нестабільність. Для отримання калюсу зі соматичних клітин використовують незрілі та зрілі зародки, незрілі суцвіття, сегменти колеоптиля, мезокотила та молодих листків, апікальні меристеми пагонів [30, 42, 65]. За умов *in vitro* можна задавати різні параметри, подібні до тих, в яких у подальшому зростатимуть дорослі рослини, в т. ч. і екстремальні умови вирощування. При цьому стійкі форми можна ідентифікувати шляхом порівняння росту калюсів на селективному середовищі за наявності й відсутності стресового агента. На даний час селективні системи для добору стійких до водного дефіциту форм розроблені для багатьох злакових культур. У багатьох працях науковці показують можливість використання методу *in vitro* для тестування селекційного матеріалу на стійкість до несприятливих факторів середовища [43, 45, 57, 75]. Зокрема, на прикладі м'якої пшениці виявлено кореляційний зв'язок між реакціями клітинних систем *in vitro* і посухостійкістю рослини [45]. У роботі В.М. Россеева та співавторів [43] у результаті порівняльного вивчення сортів пшениці м'якої ярої виявлено, що індекси стійкості сортозразків, визначені шляхом тестування *in vitro*, відображають їхню посухостійкість у польових умовах.

На клітинному рівні стійкість до водного дефіциту виявляється у толерантності клітин до наявності у живильному середовищі осмотично активних речовин. Для імітації *in vitro* стресового ефекту водного дефіциту застосовують такі осмотики як ПЕГ (поліетиленгліколь) або маніт [16, 57]. Варто зазначити, що у більшості робіт для отримання посухостійких рослин як селективний фактор використано ПЕГ. Через його високу молекулярну масу ПЕГ не може проникати крізь мембрану клітини, щоб змінити її осмотичний потенціал [66]. Механізм моделювання ним умов дефіциту вологи в культивованих клітинах подібний до того, який спостерігають у клітинах інтактних рослин за умов посухи [75]. Значно рідше під час добору та скринінгу *in vitro* стійких до водного стресу зразків застосовують маніт. Слід відмітити, що, порівняно з непроникаючим ПЕГ, маніт проникає у рослинну клітину та знижує нормальний водний потенціал, чим спричиняє зневоднення й гальмування багатьох фізіологічних і метаболічних процесів [10]. Єгипетські дослідники [51] встановили чітку позитивну кореляцію між виживаністю калюсів пшениці на селективних середовищах із різними концентраціями маніту й життєздатністю цих генотипів у польових умовах. О.В. Дубровна зі співавторами [16] під час проведення клітинної селекції м'якої пшениці на посухостійкість порівнювали ефективність використання селективних систем із ПЕГ та манітом. При цьому калюс культивували на середовищі зі селективними факторами у таких концентраціях: ПЕГ – 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 %, маніт – 0,6; 0,8; 1,0 та 1,2 М. Автори показали, що селективна система з манітом є ефективнішою, оскільки за-

безпечує повнішу елімінацію чутливих клітин і вищу життєздатність рослин-регенерантів. Підвищену стійкість до посухи було підтверджено у нащадків більшості отриманих після клітинної селекції форм, що вказує на мутаційну природу стійкості. Аналогічні результати для м'якої пшениці продемонстрували й інші автори [57].

У відділі біотехнології, генетики і фізіології МПП методом прямого добору проведено скринінг *in vitro* гібридів  $F_2$  пшениці м'якої та твердої ярої на стійкість до водного дефіциту за рівнем виживання калюсів на селективних середовищах із манітом концентраціями 0,2; 0,4; 0,6 та 0,8 М [38]. Показано, що зі збільшенням концентрації маніту в усіх генотипів відбувалося пригнічення росту калюсної культури, що свідчить про токсичний вплив стресового чинника. У результаті досліджень виділено генотипи, калюси яких характеризувалися здатністю до росту на селективному середовищі з осмотично активною речовиною та зберігали ознаку стійкості протягом усього циклу культивування. Підвищену посухостійкість виділених ліній згодом було виявлено у польових випробуваннях. Таким чином, результати роботи підтвердили застосування культури тканин *in vitro* як тест-системи для проведення скринінгу генотипів пшениці на стійкість до водного стресу.

Однак для практичного використання клітинних технологій з метою оцінки та добору стійких сортів необхідно, щоби ступінь стійкості на рівні культури клітин і цілої рослини тісно корелював, чого не завжди можливо досягти. Так, у роботі E. Farshadfar і співавторів [71] під час скринінгу генотипів м'якої пшениці на посухостійкість не виявлено достовірного кореляційного зв'язку між результатами оцінки *in vivo* та *in vitro*. Автори підсумували, що результати скринінгу *in vitro* не можна узагальнити на рівні *in vivo* та навпаки, тому показники стійкості, отримані вищезгаданими методами, не завжди корелюють між собою і повинні розглядатись окремо або доповнювати один одного. Слід також зауважити, що скринінг і добір селекційного матеріалу пшениці на клітинному рівні не завжди виправдані та ефективні з економічної точки зору. Разом з тим, незважаючи на вищезгадані недоліки, використання тканинних і клітинних культур у більшості випадків дає можливість ефективно прискорити селекційний процес і вважається важливим доповненням до класичних методів селекції сільськогосподарських рослин, зокрема, пшениці.

**Молекулярно-генетичні методи.** Подальший прогрес у вивченні посухостійкості пшениці буде залежати не лише від розвитку клітинних технологій, але й від більш глибокого пізнання молекулярних механізмів регуляції та експресії генів, що детермінують дану ознаку [53, 78]. Останні розробки у галузі молекулярної генетики надали селекціонерам потужні інструменти для виявлення форм із господарсько-цінними ознаками. Накопичено вже багато даних, які свідчать про важливе значення молекулярних механізмів у формуванні стійкості рослин до різного роду стресів [25, 63, 91]. Вважається, що одним із можливих механізмів адаптації рослин до стресових умов є збільшення геномної нестабільності й, відповідно, розширення генетичного різноманіття [69, 89]. Дослідження багатьох авторів показують, що значну роль у процесах адаптації рослин до несприятливих факторів зовнішнього середовища відіграє активування мобільних генетичних елементів і генів, що кодують білки, залучені в адаптивних реакціях [25, 53, 59, 68]. Тож пошук джерел стійкості, маркування й ідентифікація генів, що відповідають за посухостійкість рослин, лежить в основі технології створення нових сортів багатьох сільськогосподарських культур.

Під час посухи рослини реагують на водний дефіцит, змінюючи експресію генів і вироблення відповідного білка [64, 78, 89]. E. Sivamani та співавтори [91] дослідили, що ген *HVA1* сприяє росту рослин пшениці за умов посухи. У літературі наводяться дані на користь того, що ген *Dreb1* у третій хромосомі геному А може відповідати за формування



стійкості до абіотичних стресових чинників, зокрема, до посухи [53, 63]. А.В. Бавол зі співавторами [53] провели ідентифікацію *Dreb1* генів у рослин-регенерантів пшениці, індукованих зі стійких калюсних ліній, за допомогою функціональних маркерів, спеціально синтезованих для А, В і D геномів пшениці. Доволі значного поширення набула практика використання відомих головних генів і їхніх комбінацій (пірамідкування), що пов'язано з наявністю молекулярних маркерів до цих генів і, відповідно, з можливістю використання їх у MAS (marker-assisted selection) [9]. Багато дослідників [50, 53, 68, 88, 92] дійшли висновку, що IRAP, RAPD, SSR та ISSR маркери значною мірою асоційовані з генами посухостійкості пшениці, а їхнє використання дає змогу перевести скринінг на генотипову основу.

За умов стресу відбувається також активація мобільних генетичних елементів, яка призводить до підвищення мутабельності за рахунок більш високої частоти їхніх переміщень у ділянки активного еухроматину [25, 53, 77]. В. McClintock [82] уперше запропонувала гіпотезу про те, що індукція міграції мобільних генетичних елементів, спричинена стресовими чинниками, найімовірніше, є реакцією геному на несподівані зміни середовища. Ці елементи індують генетичну мінливість у широкому діапазоні – від структурних перебудов хромосом до незначних змін експресії генів [25, 77]. Доведено підвищення активності ретротранспозонів за умов абіотичного стресу та виявлено їхню транскрипційну активність, що свідчить про значну роль цих елементів у формуванні відповіді на дію стресових чинників [77]. Результати роботи дослідників Інституту фізіології рослин і генетики НАН України [53] свідчать про активацію ретротранспозону *Cassandra* у м'якої пшениці у процесі добору на стійкість до водного дефіциту й показано специфічність змін у спектрах продуктів ампліфікації ДНК. Методом IRAP-аналізу виявлено, що амплікони розміром 596 п.н. та 717 п.н. – продукти генів *DrebA1* та *DrebB1* відповідно, наявні у стійких до водного дефіциту рослин і відсутні у нестійких форм. Дослідники із Національного інституту генетичної інженерії та біотехнології (Іран) та Державного університету Південної Дакоти (США) у спільних дослідженнях [59] методом транскриптомного аналізу досліджували гени, що беруть участь у реакції на водний дефіцит у сортів м'якої пшениці місцевої селекції. Моделюючи умови посухи, вчені у сорту L-82 виявили підвищений рівень експресії генів, пов'язаних із захистом від окисного стресу. Автори наголосили, що виділений стійкий сорт може бути використаний як донор генів посухостійкості і є цінним вихідним матеріалом у подальшій селекції пшениці.

Молекулярні маркери можуть мати перевагу під час ідентифікації стійких форм рослин у видів, механізм стійкості яких реалізується на різних етапах онтогенезу, що може бути складно або зовсім неможливо виконати іншими методами. Однак залучення у селекційний процес нових генів стійкості потребує проведення додаткової тривалої роботи з пошуку генетичних маркерів, які зчеплені або асоційовані з цільовими генами. Даний підхід характеризується надзвичайним рівнем складності й потребує дороговартісного обладнання, а тому далеко не завжди є економічно виправданим.

Таким чином, аналіз літературних джерел засвідчив, що для тестування перспективних зразків пшениці є багато методів, заснованих на різних принципах дії, і кожен із них має свої переваги та недоліки. Переважна їхня більшість не є на сьогоднішній день оптимальними, внаслідок чого актуальною залишається задача створення нових і вдосконалення вже наявних методів оцінки селекційного матеріалу пшениці. Вибір способу значною мірою залежить від ступеня його достовірності, трудомісткості, тривалості оцінки і пропускну здатності. Нерідко той чи інший спосіб чітко розділяє за стійкістю контрастні

види рослин, проте не у змозі диференціювати за групами стійкості різні сорти однієї культури, що знижує його придатність для селекційної практики. Значна частина методів діагностики сортозразків на посухостійкість передбачає завдання певної шкоди рослині, що ускладнює або робить неможливою оцінку за іншою не менш важливою ознакою, а також вирощування рослин до отримання нащадків. Дослідження, спрямовані на розв'язання даної проблеми, є актуальними і значущими, оскільки вони орієнтовані на розвиток розуміння реакцій рослин на посуху та широке впровадження нових методів для вирішення прикладних завдань селекції пшениці.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абдуллаев А. А., Джумаев Б. Б., Эргашев А. и др. Влияние засухи на фотосинтетические параметры флаговых листьев различных сортов пшеницы // Изв. АН Республики Таджикистан. Отд. биол. и мед. наук. 2010. № 4 (173). С. 46–53.
2. Андрющенко В. К., Саянова В. В., Жученко А. А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourn* // Изв. АН Молд. ССР. Сер. биол. и хим. наук. 1981. Т. 4. С. 55–60.
3. Борисова О., Ружицька О. Фізіолого-біохімічні показники проростків пшениць *Triticum aestivum* L. та *Triticum spelta* L. за моделювання водного дефіциту // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2014. Т. 23. № 1129. С. 81–88.
4. Булавка Н. В., Юрченко Т. В., Кучеренко О. М., Пірич А. В. Сорти пшениці м'якої озимої, стійкі до впливу негативних чинників довкілля // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2018. Т. 14. № 3. С. 255–261.
5. Бычкова О. В., Хлебова Л. П. Физиологическая оценка засухоустойчивости яровой твердой пшеницы // Acta Biologica Sibirica. 2015. Т. 1. № 1–2. С. 107–116.
6. Варавкин В. А., Таран Н. Ю. Диагностика засухоустойчивости сортов пшеницы разной селекции по осморегуляторным свойствам семян // ScienceRise. 2014. Т. 3. № 1(3). С. 18–22.
7. Васильківський С. П., Гудзенко В. М., Кочмарський В. С., Кириленко В. В. Реалізація потенціалу сортів зернових культур – шлях вирішення продовольчої проблеми // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017. Т. 21. С. 47–51.
8. Вус Н. О., Кобизева Л. Н., Безугла О. М. Селекційна цінність зразків нуту за посухостійкістю в умовах східного Лісостепу України // Наук. доп. НУБіП України. 2017. № 4 (68). <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/9108>
9. Галаєв О. В., Бабаянц Л. Т. Молекулярно-генетичні маркери для ідентифікації генів стійкості до грибкових захворювань пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) // 36. наук. праць СГІ–НЦНС. 2015. № 25. С. 61–75.
10. Генерозова И. П., Маевская С. Н., Шугаев А. Г. Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 1. С. 45–52.
11. Генкель П. А., Баданова К. А., Левина В. В. О новом лабораторном способе диагностики жаро- и засухоустойчивости для селекции // Физиология растений. 1970. Т. 17. № 2. С. 431–437.
12. Григорюк И. А., Ткачев В. И., Савинская С. В., Мусиенко Н. Н. Современные методы исследования и оценки засухо- и жаростойкости растений. К.: Науковий світ, 2003. 139 с.
13. Демидов О. А., Хоменко С. О., Федоренко І. В., Федоренко М. В. Оцінка посухостійкості ліній пшениці ярої і умовах Лісостепу України // Селекція і насінництво. 2016. Вип. 110. С. 53–60.

14. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2019 рік; Міністерство аграрної політики та продовольства України. К., 2019. 497 с. <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>
15. Дорощев В. Ф., Руденко М. И., Удачин Р. А. Засухоустойчивые пшеницы: методич. указания / под ред. В.Ф. Дорощева. Л.: ВИР, 1974. 186 с.
16. Дубровна О. В., Бавол А. В., Зінченко М. О. та ін. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2011. Т. 9. № 1. С. 10–16.
17. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. К.: Логос, 2014. 375 с.
18. Жемела Г. П., Кузнецова О. А. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м'якої озимої // Вісн. Полтав. держ. аграрної академії. 2012. № 3. С. 23–25.
19. Зыкин В. А., Россеева Л. П., Белан И. А., Кадиков Р. К. Методика оценки селекционных форм и сортов мягкой пшеницы при испытании на отличимость, однородность и устойчивость к факторам среды: метод. рекомендации. СО РАСХН, СибНИИСХ, ФГОУ ВПО БГАУ. Уфа, 2004. 39 с.
20. Кобилецька М., Рибак О., Телегій М. Активовані саліцилатом зміни інтенсивності пероксидації ліпідів у рослинах пшениці та кукурудзи за умов посухи // Біол. студії. 2017. Т. 11. № 3–4. С. 62–63.
21. Кожушко Н. Н. Выход электролитов как критерий оценки засухоустойчивости и особенности его использования для зерновых культур. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды / под ред. Г.В. Удовенко. Л.: Колос, 1976. С. 32–42.
22. Колупаев Ю. Е., Вайнер А. А., Ястреб Т. О. Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // Вісн. Харк. нац. агр. ун-ту. Сер. біол. 2014. Т. 2. № 32. С. 6–22.
23. Корхова М. М., Уліч Л. І. Вивчення посухостійкості сортів озимої пшениці порівняльним експрес-методом // Агробіологія. 2010. Вип. 2 (69). С. 113–115.
24. Кумаков В. А., Евдокимова О. А., Буянова М. А. Способы ранжирования генотипов яровой пшеницы по их потенциальной продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам среды по накоплению и распределению сухой массы растений в период вегетации // Сельскохозяйств. биология. 2000. № 1. С. 108–112.
25. Кунах В. А. Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин. К.: Логос, 2013. 300 с.
26. Ляшок А. К., Мусич В. Н. Способы отбора устойчивых озимых и яровых растений из ярово-озимых гибридов в фитотроне. Системы интенсивного культивирования растений: сб. науч. тр. Л., 1987. С. 125–129.
27. Маленька У., Кобилецька М., Терек О. Вплив саліцилової кислоти на вміст вільних амінокислот і проліну в рослин пшениці та кукурудзи за умов посухи // Біол. студії. 2014. Т. 8. № 2. С. 123–132.
28. Маменко Т. П., Ярошенко О. А. Зміни активності антиоксидантних ферментів у листках озимої пшениці, індуковані саліциловою кислотою в умовах посухи // Физиология и биохимия культ. растений. 2010. Т. 42. № 6. С. 513–521.
29. Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур / за ред. В. В. Волкодава. 2000. К.: Алефа, С. 10–50.

30. Моргу́н В. В., Дубровна О. В., Моргу́н Б. В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці // Физиология растений и генетика. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
31. Моргу́н В. В., Стасик О. О., Кірізі́й Д. А., Прядкіна Г. О. Зв'язок реакції фотосинтетичних показників і зернової продуктивності на ґрунтову посуху в контрастних за стійкістю сортів озимої пшениці // Физиология растений и генетика. 2016. Т. 48. № 5. С. 371–381.
32. Никитин В. А. Быстрый способ определения электропроводности растительной ткани // Физиология растений. 1964. Т. 13. № 2. С. 373–376.
33. Олейникова Т. В., Осипов Ю. Ф. Определение засухоустойчивости сортов пшеницы и ячменя, линий и гибридов кукурузы по прорастанию семян на растворах сахарозы с высоким осмотическим давлением. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды / под ред. Г. В. Удовенко. Л.: Колос, 1976. С. 23–32.
34. Пат. 132899 Україна, МПК А01Н 1/04. Спосіб оцінки генотипів пшениці м'якої озимої до дії водного дефіциту / Юрченко Т.В., Демидов О.А., Пикало С.В., Прокопик Н.І., Фоманюк В.А.; Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН. № 201811089; Заявл. 09.11.2018; Опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5. 4 с.
35. Пат. 25624 Україна: МПК А01С 1/00. Спосіб оцінки стійкості сортів зернових колосових культур до стресових умов вирощування / Діндорого В. Г., Клименко І. І., Луценко Л. А., Валивахін Г. М., Контар О. А.; Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва УААН. № 200704566; Заявл. 24.04.2007; Опубл. 10.08.2007, Бюл. № 12. 5 с.
36. Пат. 42371 А Україна: МПК А01С 1/00, А01G 7/00. Спосіб оцінки посухостійкості озимої пшениці / Жук О. І., Григорюк І. П.; Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. № 2001010698; Заявл. 30.01.2001; Опубл. 15.10.2001, Бюл. № 9.
37. Пикало С. В., Зінченко М. О., Волощук С. І., Дубровна О. В. Селекція *in vitro* тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту // Biotechnologia Acta. 2015. Т. 8. № 2. С. 69–77.
38. Пикало С. В., Демидов О. А., Прокопик Н. І. та ін. Скринінг *in vitro* гібридів F<sub>2</sub> пшениці ярої на стійкість до водного дефіциту // ScienceRise: Biological Science. 2018. № 3(12). С. 12–18.
39. Посылаева О. А., Кириченко В. В. Исходный материал сои для селекции на жаро- и засухоустойчивость // Вестн. Белорус. гос. сельскохоз. академии. 2014. № 3. С. 94–98.
40. Прокопик Н. І., Чугункова Т. В., Хоменко С. О. Оцінка посухостійкості сортів пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження за умов осмотичного стресу // Наук. доп. НУБіП України. 2019. № 3 (79). URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/12692>
41. Прянишников Д. Н. Вегетационный метод и его роль в агрохимическом исследовании. М.: Изд-во АН СССР, 1963. С. 5–16.
42. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 1. С. 3–18.
43. Россеев В. М., Белан И. А., Россеева Л. П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вест. Алт. гос. агр. ун-та. 2011. Т. 76. № 2. С. 32–34.
44. Россихіна Г. С., Попов В. Я. Систематизація та вдосконалення методологічного забезпечення дослідження посухостійкості рослин // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія, екологія. 2009. Вип. 17. Т. 1. С. 199–204.
45. Тагиманова Д. С., Ергалиева А. Ж., Райзер О. Б., Хапилина О. Н. Оценка генотипов яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость в условиях *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 2. С. 42–46.

46. Туманов И. И. Недостаточное возобновление и завядание растения как средства повышения его засухоустойчивости // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1926. Т. 16. № 4. С. 293–388.
47. Уліч Л. І., Бочкарьова Л. П., Лисікова В. М., Семеніхін О. В. Посухостійкість сортів пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.), придатних до поширення в Україні // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2008. № 1. С. 106–113.
48. Черенков А. В., Гасанова І. І., Солодушко М. М. Пшениця озима – розвиток та селекція культури в історичному аспекті // Бюл. Ін-ту сільськогосп. степ. зони. 2014. № 6. С. 3–6.
49. Шелепов В. В., Маласай В. М., Пензев А. Ф. и др. Морфология, биология, хозяйственная ценность пшеницы. К.: Изд-во Мироновск. ин-та пшеницы, 2004. 524 с.
50. Abd El-Hadi A. A. Molecular characterization of some durum wheat drought tolerant mutants by RAPD and ISSR analysis // Arab J. Biotech. 2012. Vol. 15. N 1. P. 77–90.
51. Ahmed A. Response of immature embryos *in vitro* regeneration of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under different osmotic stress of mannitol // J. Agric. Sci. 1999. Vol. 30. N 3. P. 25–34.
52. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 2005. Vol. 24. N 1. P. 23–58.
53. Baval A. V., Zinchenko M. O., Dubrovna O. V. Molecular polymorphism of wheat cell lines resistant to metabolites produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* under the effect of osmotic stress // Cytol. Genet. 2014. Vol. 48. N 1. P. 49–54.
54. Beltrano J., Marta G. R. Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscularmycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: Effect on growth and cell membrane stability // Braz. J. Plant Physiol. 2008. Vol. 20. N 1. P. 29–37.
55. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? // Austr. J. Agric. Res. 2005. Vol. 56. N 11. P. 1159–1168.
56. Breiman A., Graur D. Wheat evaluation // Isr. J. Plant Sci. 1995. Vol. 43. N 2. P. 58–95.
57. Butt A., Ahmed N., Mubin M. et al. Effect of PEG and mannitol induced water stress on regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Pak. J. Agri. Sci. 2015. Vol. 52. N 4. P. 1025–1033.
58. Catsky J. Water saturation deficit (relative water content). Methods of Studying Plant Water Relations / Ed. N. Slavik. Springer-Verlag, 1974. P. 136–156.
59. Chaichi M., Sanjarian F., Razavi K., Gonzalez-Hernandez J. L. Analysis of transcriptional responses in root tissue of bread wheat landrace (*Triticum aestivum* L.) reveals drought avoidance mechanisms under water scarcity // PloS one. 2019. Vol. 14. N 3. e0212671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212671>
60. Chaichi M., Sanjarian F., Razavi K., Gonzalez-Hernandez J. L. Phenotypic diversity among Iranian bread wheat landraces, as a screening tool for drought tolerance // Acta Physiologiae Plantarum. 2019. Vol. 41. N 6. P. 1–15.
61. Chandra D., Islam M. A. Genetic variation and heritability of excised-leaf water loss and its relationship with yield and yield components of F<sub>5</sub> bulks in five wheat crosses // J. Biol. Sci. 2003. Vol. 3. N 11. P. 1032–1039.
62. Chernobai L. N., Ponurenko S. G., Sikalova O. V. Evaluation of stability for maize genotype characteristics by drought tolerance indices under different hydrothermal conditions // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal). 2016. Vol. 8. N 6. P. 69–75.
63. De Leonardis A. M., Marone S., Mazzucotelli E. et al. Durum wheat genes upregulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner // Plant Sci. 2007. Vol. 172. N 5. P. 1005–1016.

64. Dehghani I., Mostajeran A., Esmaeili A., Ghannadian M. The role of *DREB2* gene in drought tolerance of common wheat (*Triticum aestivum* L.) associated with *Azospirillum Brasilense* // Applied Ecology and Environmental Research. 2019. Vol. 17. N 2. P. 4883–4902.
65. Dodig D., Zorić M., Mitić N. et al. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat // Plant Cell, Tiss .Org. Cult. 2008. Vol. 95. N 1. P. 107–114.
66. Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanassov A. *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Bulg. J. Plant Physiol. 1996. Vol. 22. N 3–4. P. 30–39.
67. Dubrovna O. V., Baval A. V. Variability of the wheat genome during *in vitro* culture // Cytol. Genet. 2011. Vol. 45. N 5. P. 333–340.
68. Eid M. Validation of SSR molecular markers linked to drought tolerant in some wheat cultivars // J. Plant Breed. Genet. 2018. Vol. 6. N 3. C. 95–109.
69. Fàbregas N., Fernie A. R. The metabolic response to drought // J. Exp. Bot. 2019. Vol. 70. N 4. P. 1077–1085.
70. FAO. Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report. № 4. December 2019. Rome. 46 p. <http://www.fao.org/3/ca7236en/ca7236en.pdf>
71. Farshadfar E., Jamshidi B., Cheghamirza K., da Silva J. A. T. Evaluation of drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in vivo* and *in vitro* techniques // Ann. Biol. Res. 2012. Vol. 3. N 1. P. 465–476.
72. Fernandez George C. J. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. Proceeding of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and other Food Crops in Temperature and Water Stress. Aug. 13–16, Shanhua, Taiwan, 1992. P. 257–270.
73. Fisher R. A., Maurer R. Drought resistance in spring wheat cultivars. 1. Grain yield responses // Aust. J. Agr. Res. 1978. Vol. 29. N 5. P. 897–912.
74. Gavuzzi P., Rizza F., Palumbo M. et al. Evaluation of field and laboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals // Can. J. Plant Sci. 1997. Vol. 77. N 4. P. 523–531.
75. Gawande N. D., Mahurkar D. G., Rathod T. H. et al. *In vitro* screening of wheat genotypes for drought tolerance // Ann. Plant Physiol. 2005. Vol. 19. N 2. P. 162–168.
76. Geravandi M., Farshadfar E., Kahrizi D. Evaluation of some physiological traits as indicators of drought tolerance in bread wheat genotypes // Rus. J. Plant Physiol. 2011. Vol. 58. N 1. P. 69–75.
77. Grandbastien M.-A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // Trends Plant Sci. 1998. Vol. 3. N 5. P. 181–187.
78. Grzesiak M. T., Hordyńska N., Maksymowicz A. et al. Variation among spring wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in response to the drought stress. II – Root system structure // Plants. 2019. Vol. 8. N 12. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8120584>
79. Haley S. D., Quick J. S., Morgan J. A. Excised-leaf water status evaluation and associations in field-grown winter wheat // Can. J. Plant Sci. 1993. Vol. 73. N 1. P. 55–63.
80. Koszegi B., Farshadfar E., Vaguifalvi A., Sutka J. Drought tolerance studies on wheat/Rye disomic chromosome addition lines // Acta Agron. Hung. 1996. Vol. 44. P. 121–126.
81. Makar O. O., Patsula O. I., Kavulych Y. Z. et al. Excized leaf water status as a measure of drought resistance of Ukrainian spring wheat // Studia Biologica. 2019. Vol. 13. N 2. P. 41–54.
82. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // Science. 1984. Vol. 226. N 4676. P. 792–801.
83. Mehraban A., Tobe A., Gholipouri A. et al. Evaluation of drought tolerance indices and yield stability of wheat cultivars to drought stress in different growth stage // World J. Environ. Biosci. 2018. Vol. 7. N 1. P. 8–14.

84. *Mwadingeni L., Shimelis H., Dube E.* et al. Breeding wheat for drought tolerance: Progress and technologies // *J. Integr. Agr.* 2016. Vol. 15. N 5. P. 935–943.
85. *Plaut Z.* Plant exposure to water stress during specific growth stages // *Encyclopedia of Water Science.* 2003. P. 673–675.
86. *Rane J. M., Maheshwari S. N.* Effect of pre-anthesis water stress on growth, photosynthesis and yield of six wheat cultivars differing in drought tolerance // *Ind. J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 6. N 1. P. 53–60.
87. *Raveena, Bharti R., Chaudhary N.* Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2019. Vol. 8. N 9. P. 1780–1792.
88. *Ribaut J.-M., Poland D.* Molecular approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environments. A Strategic Planning Workshop held at CIMMYT. 1999. 180 p.
89. *Sallam A., Alqudah A. M., Dawood M. F.* et al. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. N 13. 3137. <https://doi.org/10.3390/ijms20133137>
90. *Sattar S., Afzal R., Bashir I.* et al. Biochemical, molecular and morpho-physiological attributes of wheat to upgrade grain production and compete with water stress // *Int. J. Innovative Approaches in Agricultural Research.* 2019. Vol. 3. N 3. P. 510–528.
91. *Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M.* et al. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene // *Plant Sci.* 2000. Vol. 155. N 1. P. 1–9.
92. *Sönmezoğlu Ö. A., Terzi B.* Characterization of some bread wheat genotypes using molecular markers for drought tolerance // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2018. Vol. 24. N 1. P. 159–166.
93. *Ștefîrță A., Brânză L., Leahu I.* et al. Identificarea implicării statusului apei în formarea stres-memoriei la plantele expuse repetat la stresul cauzat de secetă // *Buletinul AȘM. Științele vieții.* 2017. N 1 (331). P. 48–58.
94. *Talebi R., Fayaz F., Naji A. M.* Effective selection criteria for assessing drought stress tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2009. Vol. 35. N ½. P. 64–74.
95. *Yadav A. K., Carroll A. J., Estavillo G. M.* et al. Wheat drought tolerance in the field is predicted by amino acid responses to glasshouse-imposed drought // *J. Exp. Bot.* 2019. Vol. 70. N 18. P. 4931–4948.

Стаття надійшла до редакції 29.11.19

доопрацьована 20.02.20

прийнята до друку 11.03.20

---

**METHODS FOR EVALUATION OF WHEAT BREEDING MATERIAL  
FOR DROUGHT TOLERANCE**

**S. Pykalo, O. Demydov, T. Yurchenko, S. Khomenko, O. Humeniuk,  
M. Kharchenko, N. Prokopik**

*The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, NAAS of Ukraine  
Tsentralne, Myronivka District, Kyiv Region 08853, Ukraine  
e-mail: pykserg@ukr.net*

Wheat is one of the most valuable cereals on the planet and plays a leading role in the food supply of mankind. The range of wheat is very large, since it is cultivated on five continents in most countries of the world. The genetic improvement of wheat is crucial because of its direct impact on the economic development, international grain trade and food security of the country, so the relevance of research in solving many genetic-breeding problems regarding this crop is growing and acquires a qualitatively new character. The increase in productivity is the most important criterion in the cultivation of any crops, in particular wheat. Drought is one of the main limiting environmental factors that reduce plant productivity. In order to guarantee agriculture from losses in dry years, it is necessary to have varieties tolerant to moisture deficiency. That is why one of the priority areas of wheat breeding is the creation of varieties tolerant to the action of water deficiency. The success of breeding when creating drought tolerant forms largely depends on the correct assessment of the degree of their tolerance. Conducting research on the assessment of genotypes for tolerance to water stress is one of conditions for increasing efficiency of the breeding process of this culture. The results obtained in the analysis of literature data, found that for screening of wheat varieties for drought tolerance there are many methods based on different principles of action, and each of them has its advantages and disadvantages. To accelerate the breeding process and obtain reliable results, it is necessary to apply various methods of researching samples on specific signs of tolerance to stress. The choice of method largely depends on the degree of its complexity, the duration of the assessment and throughput. Therefore, the creation of new and improvement of existing methods for assessing wheat breeding material for drought tolerance in conditions of increasing water deficit or temperature increase will make it possible to objectively characterize the level of adaptability of promising genotypes and predict their behavior in appropriate environmental conditions.

*Keywords:* wheat, drought, tolerance, methods, water deficit, evaluation



**ПОЛІМОРФІЗМ ШТАМІВ *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*,  
ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ВІДХОДІВ ВУГІЛЬНОЇ ТА ЕНЕРГЕТИЧНОЇ  
ПРОМИСЛОВОСТІ УКРАЇНИ**

**Н. Васильєва, Т. Бродяженко, Т. Васильєва, Н. Лиманська,  
І. Марінова, І. Блайда**

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна  
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua*

У статті наведено результати досліджень зі встановлення варіабельності штамів *Acidithiobacillus ferrooxidans*, які були вперше ізолювані з техногенних відходів підприємств вугільної та енергетичної промисловості України. Ці штами, згідно з результатами попередніх досліджень, повністю відповідають біологічним властивостям бактерій *A. ferrooxidans*, що наведені у визначнику Bergey's Manual of Determinative Bacteriology та інших оригінальних роботах [8, 10, 12, 18], також досліджені штами, незалежно від місця існування, мали стійкість до температури і рН, мали змішаний тип харчування, джерела енергії, які використовували штами, тощо [1, 10, 11]. Приналежність ізолюваних із різних за походженням відвалів ацидофільних хемоліотрофних штамів до *A. ferrooxidans* було досліджено з використанням методу ПЛР. Генетичний поліморфізм штамів було вивчено методом RAPD-ПЛР з використанням універсального праймеру M13. Показано, що ізолювані в ході дослідження з різних техногенних субстратів штами *A. ferrooxidans* характеризуються генетичною різноманітністю. Порівняння отриманих RAPD-профілів показало варіабельність штамів, яка збігається з їхніми основними фенотипічними властивостями, описаними раніше [11]. Найбільш неоднорідні профілі були характерні для *A. ferrooxidans* DTV 1, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* Lad 27. Отримані профілі RAPD послужили основою для генерації дендрограми, яку побудовано з використанням методу Neighbor-Joining і розрахунку матриці подібності, заснованої на коефіцієнті подібності Нея та Лі. На підставі отриманої дендрограми показано формування двох кластерів, які об'єднують подібні між собою штами. Отримані показники вірогідності формування вузлів побудованої дендрограми коливаються від 65,0 до 76,0 %, що підтверджує високий ступінь подібності між штамами, згрупованими по кластерах. Також показано, що до першого з кластерів входять штами, ізолювані з вугілля та відходів його збагачення, а до другого кластеру – штами, ізолювані з відходів спалювання вугілля. Отримані дані підтверджують, що генетична варіабельність штамів залежить від первинного місця виділення штамів, а коефіцієнти подібності між ними (коефіцієнти подібності Нея та Лі) варіюють від 0,182 до 0,80.

*Ключові слова: Acidithiobacillus ferrooxidans, ПЛР, RAPD-ПЛР, генетичний поліморфізм*

Описані в літературі штами *A. ferrooxidans* демонструють значний фенотипічний розкид за такими ознаками як відношення до рН і температури, здатність до автотрофного і міксотрофного росту, діапазон стійкості до токсичних іонів металів і здатності до окислення сульфідів металів. Практично всі відомі штами *A. ferrooxidans* відрізняються також високим генетичним поліморфізмом – ступінь мінливості сягає 98,0 % [4, 18, 20, 22, 26–28]. Основними місцями існування *A. ferrooxidans* є поліметалеві природні середовища – сульфідні руди, кислі шахтні води, вулканічні відкладення, надзвичайно різнома-

нітні в географічному аспекті, що сприяє високому ступеню поліморфізму штамів роду *Acidithiobacillus*. В умовах різних екологічних ніш і за адаптації до конкретних субстратів штами цього виду характеризуються різними швидкостями росту, стійкістю до іонів важких металів і активністю окислення двовалентного заліза та/або природного сульфідного мінерального субстрату, а також техногенних відходів, таких як відходи збагачення і спалювання вугілля [1–3, 10, 17, 20]. Відомо, що штами *A. ferrooxidans* є найважливішими учасниками процесів бактеріального вилуговування металів із природних сульфідних руд за рахунок здатності використовувати як джерела енергії велике коло субстратів окиснення за досить широких діапазонів фізико-хімічних параметрів середовища. Наявні в літературі дані свідчать про значне різноманіття штамів *A. ferrooxidans*, як за фенотиповими, так і за генетичними ознаками. Вони різняться за розміром геному, змістом GC пар у ДНК, ступенем ДНК-ДНК гомології тотальних геномів, мають досить різноманітні плазмідні профілі, оптимальні для росту значення рН і температури, різний рівень стійкості до іонів важких металів і токсичних елементів, активність до окислення різних субстратів тощо.

Зараз штами *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* широко використовують для біологічного вилуговування металів, десульфурації вугілля і природного газу, дезактивації промислових відходів тощо [10, 11].

Оскільки саме штами *A. ferrooxidans* відіграють найважливішу роль у біотехнологічних процесах, їхнє вивчення на молекулярному рівні має велике значення для кращого розуміння філогенезу між видами, а також для розуміння залежності між геномною та фенотипічною мінливістю штамів *Acidithiobacillus* у процесі визначення мікроеволюційних механізмів утворення нових, важливих для біотехнологічних процесів видів.

Вважається, що схожість між штамми, які порівнюють і які ізолювані з різних географічних зон і місць існування, обумовлена подібними умовами мікрооточення, що сприяє селекційному тиску на штами. Це відображається як генетичний і фенотипічний поліморфізм і впливає на філогенетичні відносини штамів *A. ferrooxidans*, що, безсумнівно, має важливе значення. Так, Г.І. Каравайко, зі співавторами в одну генетичну групу об'єднали штами *A. ferrooxidans*, ізолювані з пірит-халькопіритових руд і мідних рудників, розташованих у різних географічних районах. Високу генетичну спорідненість цих штамів автори пов'язують з однаковими селективними умовами місць існування [4, 5, 15, 16].

На сьогоднішній день для ідентифікації та дослідження мінливості штамів різних мікроорганізмів широко використовують молекулярні технології на підставі ПЛП і RAPD-ПЛП. При RAPD-ПЛП використовують короткі довільні праймери, які гібридизуються з ДНК-мішенню за низької температури відпалу та за використання консенсусного праймера M13 [6, 14, 23]. Хоча RAPD піддавали критиці за недостатню відтворюваність і чутливість умов реакції, цей метод використовували у дослідженні геномного різноманіття серед штамів *A. ferrooxidans*, що дало змогу провести як міжвидову, так і внутрішньовидову дискримінацію штамів [7, 13, 19, 26–28].

На даний час інформація про поширення, різноманітність і властивості штамів *A. ferrooxidans* у відвальних продуктах паливно-енергетичного комплексу України досить обмежена. Вивчення їхніх основних біологічних і молекулярно-генетичних властивостей, їхньої подібності до типового штаму *A. ferrooxidans* ATCC 23270 має важливе теоретичне і практичне значення [1, 11].

Мета роботи полягала в тому, щоб із використанням методики, заснованої на ПЛП і RAPD ПЛП, вивчити геномну мінливість серед штамів *A. ferrooxidans*, ізолюваних з відходів вугільної та енергетичної промисловості України.

**Матеріали та методи**

Експериментальна частина роботи виконана у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

**Бактеріальні штами й умови їхнього вирощування.** У роботі використовували штами *A. ferrooxidans*, ізолювані безпосередньо з вугілля та відходів після збагачення або спалювання вугілля (табл. 1). Усі дослідження проводили у порівнянні з типовим штамом *A. ferrooxidans* ATCC 23270 [25].

Таблиця 1

Штами *A. ferrooxidans*, ізолювані з відвальних продуктів ПЕК України [1, 11]

№	Штам	Джерело виділення
1	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	Типовий штам (буре вугілля зі шахт США)
2	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv red 9	Червоний відвал, ЦЗФ «Червоноградська», Львівська обл.*
3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv black 37	Чорний відвал, ЦЗФ «Червоноградська», Львівська обл.**
4	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DTV 1	Золошлак Добротвірської ТЕС, «ДТЕК Західенерго», Львівська обл.
5	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 5	Зола виносу Ладижинської ТЕС, «ДТЕК Західенерго», Вінницька обл.
6	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 27	Зола виносу Ладижинської ТЕС, «ДТЕК Західенерго», Вінницька обл.
7	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Coal 17	Вугілля шахти «Червоноградська», Львівська обл.

**Примітки:** \* – термін збереження 36–60 місяців; \*\* термін збереження 12–24 місяці

Культивування досліджених ацидофільних хемолітотрофних штамів здійснювали за загальноприйнятими методиками на середовищі Сільвермана-Лундгрема 9К [8, 11].

**Виділення ДНК і проведення ПЛР і RAPD ПЛР.** Безпосередньо перед проведенням аналізів ПЛР і RAPD ПЛР штами вирощували на рідкому середовищі 9К без заліза за температури  $30,0 \pm 2,0$  °C на гойдалці за 120 об/хв протягом трьох днів.

Виділення й очищення ДНК досліджуваних штамів *A. ferrooxidans* проводили з використанням набору F1021 (SureFast® PREP Bacteria, Congen Biotechnologie GmbH, Germany), згідно з інструкцією виробника [9].

Під час проведення RAPD-ПЛР використовували універсальний праймер M13 [11, 21]. Ампліфікацію здійснювали згідно з такими параметрами: 35 циклів, що складаються з денатурації за 94 °C – 1 хв, відпалу праймерів за 45 °C – 1 хв і елонгації за 72 °C – 2 хв. Перед ампліфікацією суміш прогрівали за 94 °C протягом 3 хв, а після 35 циклів наставав етап елонгації за 72 °C протягом 5 хв.

Продукти ампліфікації розділяли в 1,5 % агарозному гелі. ДНК фарбували бромистим етидієм.

Як стандарти молекулярної маси ДНК використовували маркери Lambda DNA/EcoRI plus HindIII Marker (ThermoFisher Scientific Inc) і маркери 100 bp + 50 bp (SibEnzyme).

**Статистичний аналіз.** Коефіцієнти подібності Nei & Li [7] використовували для розрахунку спорідненості досліджуваних штамів між собою. Коефіцієнт подібності Nei & Li був розрахований за статистичним рівнянням:

$$F = 2 * N_{xy} / (N_x + N_y),$$

де F – коефіцієнт подібності,  $N_x$  і  $N_y$  – кількість фрагментів зі штаму, відповідно, тоді як  $N_{xy}$  – кількість фрагментів, спільних для двох штамів.

Отримані дані були проаналізовані шляхом порівняння профілів ПЛР RAPD згідно з наявністю або відсутністю (1 або 0 відповідно) кожної смуги ДНК, що відтворюється.

Матрицю подібності було згенеровано з використанням коефіцієнта подібності Нея та Лі, а дендрограму побудовано з використанням методу Neighbor-Joining (NJ method) [24].

### Результати і їхнє обговорення

На підставі результатів досліджень, опублікованих раніше, ізольовані з відходів вугільної та енергетичної промисловості України і вивчені мезофільні штами залізоокиснювальних штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій віднесено до нових представників виду *A. ferrooxidans* [1, 10, 11].

Спільними властивостями для усіх штамів, незалежно від місця існування, були стійкість до температури і рН, змішаний тип харчування, джерела енергії, які використовували штами, тощо [1, 10, 11].

Після проведення ПЛР-RAPD з використанням праймеру M13 було отримано від 1 до 6 ампліконів ДНК досліджуваних штамів (рис. 1). Отримані продукти ампліфікації вказують на високий рівень генетичного поліморфізму. Серед вивчених профілів виявлено як ідентичні, так і досить неоднорідні профілі (рис. 1).

Як видно з наведеної електрофореграми, подібні профілі реєстрували для штамів *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. ferrooxidans* Lv black 37, *A. ferrooxidans* Coal 17 і *A. ferrooxidans* Lv red 9; неоднорідні профілі були характерні для *A. ferrooxidans* DTV 1, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* Lad 27 (рис. 1).

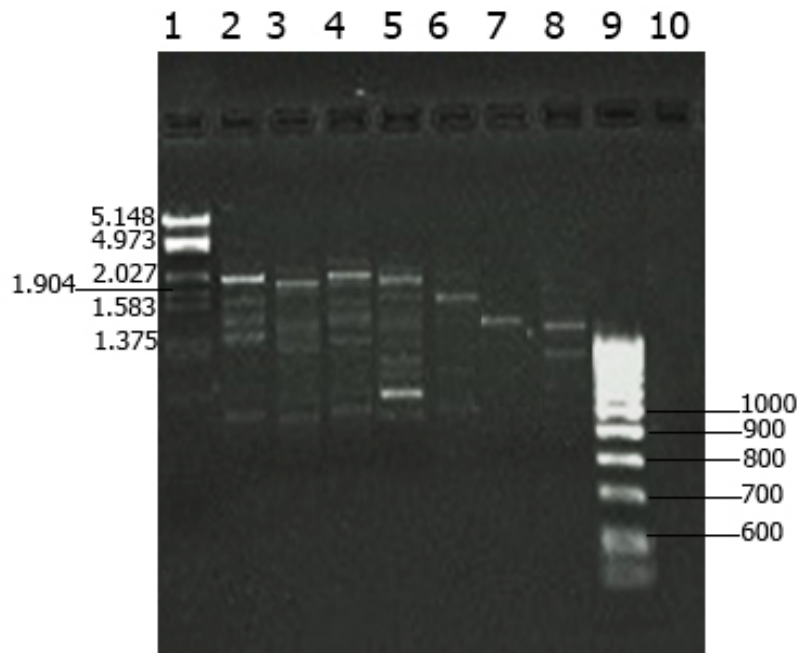


Рис. 1. Електрофореграма агарозного гелю з продуктами RAPD, які отримали шляхом ампліфікації ДНК штамів *A. ferrooxidans* з використанням праймера M13. Доріжки: 1 – маркери молекулярної маси Lambda DNA / EcoRI plus HindIII Marker; 2 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* ATCC 23270; 3 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lv black 37; 4 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Coal 17; 5 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lv red 9; 6 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* DTV 1; 7 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lad 5; 8 – амплікон ДНК штаму *A. ferrooxidans* Lad 27; 9 – маркери молекулярної маси 100 bp + 50 bp (SibEnzyme, Росія); 10 – негативний контроль

Надалі кожен амплікон розглядали як окрему одиницю виміру, і дані були перетворені на матрицю, створену на підставі розмірів отриманих фрагментів під час проведення ПЛР RAPD. Згідно з результатами RAPD-аналізу, штами, ізольовані з вугілля та відходів його збагачення, незалежно від терміну зберігання, мають досить високу подібність між собою (рис. 1).

Отримані на її основі коефіцієнти подібності було застосовано для генерації дендрограми, побудованої з використанням методу NJ у програмі MEGA10 (рис. 2). До розрахунку подібності між штамми було включено модель Кімури. Для оцінки достовірності формування вузлів дендрограми виконали бутстреп із кількістю ітерацій 1000 (рис. 2).

Отриману дендрограму можна поділити на два кластери, перший із яких містить у собі штами *A. ferrooxidans* Lv black 37, *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Coal 17 і типовий штам *A. ferrooxidans* 23270.

Ступінь схожості між штамми, які віднесені до даного кластеру, підтверджений показником імовірності формування вузла, отриманого під час проведення бутстреп аналізу. Як видно з рис. 3, показники вірогідності формування вузлів у першому кластері коливаються від 65,0 до 71,0 %. Це підтверджує високий ступінь подібності між штамми, залученими до даної філогенетичної групи на підставі матриці подібності, отриманої за результатами ПЛР RAPD.

Штами, виділені з відходів спалювання вугілля *A. ferrooxidans* Lad 27, *A. ferrooxidans* Lad 5 (зола виносу Ладижинської ТЕС) і *A. ferrooxidans* DTV 1 (зола шлак Добротвірської ТЕС), створюють другий кластер. Для всіх вузлів дендрограми також показано високий ступінь подібності – від 65,0 до 76,0 % (рис. 2).

Навіть незважаючи на подібність між профілями штамів, що належать до одного кластеру, ми не спостерігали повної ідентичності – ми відзначали відсутність профілів у вивчених штамів, які збігаються повністю, а це вказує на високу генетичну варіабельність досліджених штамів.

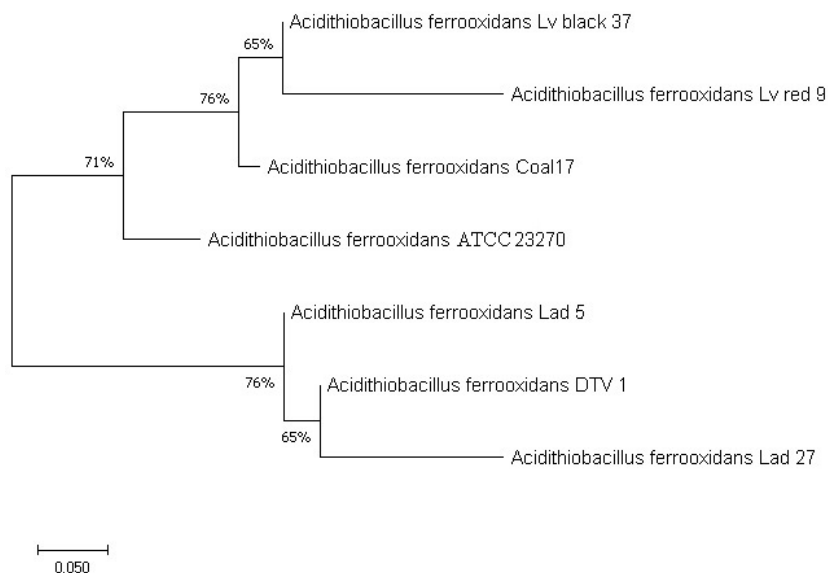


Рис. 2. Дендрограма генетичних відмінностей досліджених штамів *A. ferrooxidans*, побудована з використанням методу NJ та моделі Кімури на підставі даних RAPD-аналізу (у вузлах індекси бутстрепа, %)

Як додатковий метод перевірки генетичної схожості між дослідженими штамми *A. ferrooxidans* ми використовували матрицю подібності, засновану на коефіцієнті Ней і Лі (табл. 2).

Таблиця 2

Парні коефіцієнти генетичної подібності, розраховані за методом Nei & Li для різних штамів *A. ferrooxidans*

Штам	<i>A. ferrooxidans</i> 23270	<i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37	<i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9	<i>A. ferrooxidans</i> DTV 1	<i>A. ferrooxidans</i> Lad 5	<i>A. ferrooxidans</i> Lad 27
<i>A. ferrooxidans</i> 23270	1,00					
<i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37	0,545	1,00				
<i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9	0,333	0,545	1,00			
<i>A. ferrooxidans</i> DTV 1	0,286	0,333	0,286	1,00		
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 5	0,250	0,286	0,250	0,500	1,00	
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 27	0,374	0,250	0,220	0,500	0,800	1,00
<i>A. ferrooxidans</i> Coal 17	0,500	0,182	0,500	0,457	0,444	0,344

У даному разі цілком ідентичними вважаються об'єкти з цифровим виразом генетичних дистанцій, рівним 1, а відмінними – об'єкти зі значенням, рівним нулю. Обчислені коефіцієнти генетичної подібності варіювали від 0,80 для штамів *A. ferrooxidans* Lad 27 і *A. ferrooxidans* Lad 5 (табл. 2), що належать до другого кластеру дендрограми, яку було згенеровано за даними RAPD-аналізу (рис. 1). Так само для штамів, що належать до другого кластеру (*A. ferrooxidans* Lad 5, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* DTV 1), було показано ступінь генетичної подібності на рівні 0,50 (табл. 2).

Типовий штам *A. ferrooxidans* 23270 має схожість на рівні 0,545 і 0,50 зі штамми *A. ferrooxidans* Lv black 37 і *A. ferrooxidans* Coal 17. Високий ступінь генетичної подібності (0,545) було показано між штамми *A. ferrooxidans* Lv red 9 і *A. ferrooxidans* Lv black 37 (табл. 2). Між штамми *A. ferrooxidans* Coal 17 і *A. ferrooxidans* Lv red 9 ступінь генетичної подібності становив 0,50 (табл. 2).

Отримані дані свідчать про наявність внутрішньовидового генетичного поліморфізму між різними штамми *A. ferrooxidans*, яка залежить від місця їхнього виділення.

Отримані дані можуть свідчити про те, що подібний генотип найчастіше переважає в субстратах одного типу, в якому наявні подібні чинники або умови, які можуть діяти як свого роду тиск добору для даної групи мікроорганізмів.

Внутрішньовидова генетична різноманітність, що спостерігається на основі RAPD ПЛР, відповідала нашим очікуванням. Як показано в дослідженнях [13, 16, 18], мікроеволюція штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій у кожній екологічній ніші супроводжувалася змінами в нуклеотидній послідовності їхньої хромосомної ДНК. Однак точний біологічний механізм, що лежить в основі цього розмаїття штамів, на даний час не є цілком зрозумілим.

Таким чином, у статті наведено результати оцінки генетичного поліморфізму нових штамів *A. ferrooxidans*, які були вперше ізольовані з кам'яного вугілля та продуктів його переробки – збагачення і спалення. За допомогою ПЛР і RAPD-ПЛР встановлено генетичні відмінності штамів і показано її залежність від умов існування штамів та місця ізоляції. Мабуть, ця залежність формується під селективним тиском (впливом) абіогенних і біоген-

них чинників довкілля. Проведені дослідження сприятимуть розумінню формування філогенетичних зв'язків між штамми *A. ferrooxidans* у специфічних техногенних субстратах і допоможуть передбачити їхній біотехнологічний потенціал залежно від первинного місця існування.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Блайда И. А., Васильєва Т. В., Іваниця В. А. Биотехнология извлечения редких металлов из отходов энергетики и угольной промышленности. Одесса: ОНУ, 2018. 171 с.
2. Иванов М. В., Каравайко Г. И. Геологическая микробиология // Микробиология. 2004. Т. 73. № 5. С. 581–597.
3. Каравайко Г. И., Дубинина Г. А., Кондратьева Т. Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 593–629.
4. Канаева З. К., Булаев А. Г., Канаев А. Т., Кондратьева Т. Ф. Физиологические свойства штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans*, выделенных из месторождений сульфидных руд республики Казахстан // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 323–330.
5. Тушикина О. В., Саморукова В. Д., Кондратьева Т. Ф. Особенности роста и окисления природных пиритов представителями ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Микробиология. 2009. Т. 8. № 2. С. 202–212.
6. Albesharat R., Ehrmann M. A., Korakli M. et al. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies // Syst. Appl. Microbiol. 2011. Vol. 34. N 2. P. 148–155.
7. Akbar T., Akhtar K., Ghauri M. A. et al. Relationship among acidophilic bacteria from diverse environments as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) // World J. Microb. Biot. 2005. Vol. 21. N 5. P. 645–648.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. East Lansing, MI: Springer US, 2005. 1203 p.
9. Blanca E., Bustos K., Morales G., Salazar O. Rapid and specific detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* by PCR // Hydrometallurgy. 2008. Vol. 92. N 3–4. P. 102–106.
10. Blayda I. A., Vasyleva T. V., Baranov V. I. et al. Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates // Biotechnol. Acta. 2015. Vol. 8. N 6. P. 56–62.
11. Blayda I., Vasylieva T., Sliusarenko L. et al. Isolation and study of the main properties of acidophilic chemolithotrophic bacteria that have been isolated from the waste dumps by fuel-energy complex of Ukraine // Biol. Stud. 2018. Vol. 12. N 3–4. P. 3–16.
12. Bonnefoy V., Holmes D. S. Genomic insights into microbial iron oxidantion and iron uptake strategies in extremely acidic environments // Environ. Microbiol. 2012. Vol. 14. N 7. P. 1597–1611.
13. Chen Hong, Yang Bo, Chen Xin-Hua. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China // Microbiol. Res. 2009. Vol. 164. N 6. P. 613–623.
14. Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. N 5. P. 2528–2532.
15. Kanaeva Z. K., Bulaev A. G., Kanaev A. T., Kondrat'eva T. F. Physiological properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from sulfide ore deposits in Kazakhstan // Microbiol. 2015. Vol. 84. N 3. P. 370–376.
16. Karavaiko G. I., Turova T. P., Kondrateva T. F. et al. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans* // J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. Vol. 53. P. 113–119.

17. Kuzmishyna S., Hnatysh S., Moroz O. et al. Microbiota of Chervonograd Mining Region // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2014. Вип. 67. С. 234–242.
18. Liu Qian, Zhou Hong-bo, Yang Bo, Chen Xin-hua. Phenotypic and genetic characterization of a novel strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (AF2) // J. Cent. South Univ. T. 2011. Vol. 18. N 2. P. 386–391.
19. Mohapatra D. R., Gould W. D., Dinardo O., Koren D. W. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: A review of molecular methods // Minerals Engineering. 2011. Vol. 24. N 8. P. 709–718.
20. Ni Yong-Qing, He Kai-Yu, Bao Jing-Ting, Yang Yuan. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China// FEMS Microbiol Ecol. 2008. Vol. 64. P. 248–259.
21. Prillinger H., Molnar O., Eliskases-Lechner F., Lopandic K. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese// Antonie van Leeuwenhoek. 1999. N 75. P. 267–283
22. Rawlings D. E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria // Hydrometallurgy. 2001. Vol. 59. P. 187–201.
23. Reginensi S. M., Gonzalez M. J., Olivera J. A. et al. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk // Int. J. Food Microbiol. 2011. Vol. 148. N 1. P. 36–41.
24. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.
25. Valdüs J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R. J. et al. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications // BMC Genomics. 2008. Vol. 9. P. 579–597.
26. Venturi M., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. Typing of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex RAPD–PCR profile // Int. J. Food Microbiol. 2012. Vol. 156. N 2. P. 122–126.
27. Waltenbury D. R., Leduc L. G., Ferroni G. D. The use of RAPD genomic fingerprinting to study relatedness in strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* // J. Microbiological. 2005. Vol. 65. N 1. P. 103–112.
28. Wu Xue-ling, Liu Li-li, Zhang Zhen-zhen, Deng Fan-fan. Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from different environments by three PCR-based methods // J. Cent. South Univ. 2015. Vol. 22. P. 455–465.

Стаття надійшла до редакції 27.08.19

доопрацьована 14.02.20

прийнята до друку 26.02.20



**DEFINITION OF GENETIC POLYMORPHISM OF STRAINS  
*ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* THAT WERE ISOLATED  
FROM WASTE OF COAL AND ENERGY INDUSTRY OF UKRAINE**

**N. Vasylieva, T. Brodiazhenko, T. Vasylieva, N. Limanska,  
I. Marinova, I. Blayda**

*National I.I. Mechnikov University  
2, Dvorianska St., Odessa 65082, Ukraine  
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua*

The results of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains genetic variability studies that were first isolated from waste by coal and energy industries of Ukraine are reported in this article. These strains, according to the results of previous studies, are fully consistent with the biological properties of *A. ferrooxidans* bacteria given in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology and other original works [8, 10, 12, 18] also strains studied, regardless of habitat, were resistant to temperature and pH, had a mixed type of food, similar energy sources used by strains, etc. [1, 10, 11]. Using PCR was confirmed the affiliation of isolated from different of origin dumps of acidophilic chemolithotrophic strains with *A. ferrooxidans*. Genetic polymorphism of the strains was studied by RAPD-PCR using universal primer M13. It was shown that strains of *A. ferrooxidans* that were isolated from various dumps have a wide genetic diversity. By PCR, their affiliation with the species *A. ferrooxidans* was confirmed. Comparison analysis of the obtained RAPD profiles showed the variability of the strains which coincides with their main phenotypic properties, as described earlier [11]. The most heterogeneous profiles were characteristic of *A. ferrooxidans* DTV 1, *A. ferrooxidans* Lad 5 and *A. ferrooxidans* Lad 27. The obtained RAPD profiles served as the basis for the generation of the dendrogram constructed using the Neighbor-Joining method and calculating the similarity matrix, based on the coefficient of similarity of Nei & Li. Based on the obtained dendrogram, the formation of two clusters that combine similar strains is shown. The obtained indicators of the probability of formation of nodes of the constructed dendrogram range from 65.0 to 76.0 %, which confirms the high degree of similarity between strains grouped by clusters. It is also shown that the first of the cluster includes strains that were isolated from coal and waste from its enrichment, and the second cluster includes strains that were isolated from coal waste. The obtained data confirm that the genetic variability of the strains depends on the primary location of isolation of the strains, and the coefficients of similarity between them varies from 0.182 to 0.80.

*Keywords: Acidithiobacillus ferrooxidans, PCR, RAPD-PCR, genetic polymorphism*

ЕКОЛОГІЯ

УДК 595.44+595.762.12(477.83)

<https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.82.07>

**ПАВУКИ І ТУРУНИ ЯК СКЛАДОВІ РІЗНОМАНІТТЯ ЧЛЕНИСТОНОГИХ  
(ARTHROPODA) ЕКОСИСТЕМ ЛЬВА-СТВИЗЬКОГО МЕЖИРІЧЧЯ  
(РІВНЕНСЬКА ОБЛАСТЬ)**

**А. Гірна, Ю. Канарський, В. Яворницький**

*Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна  
e-mail: ahirna@i.ua, ykanarsky@gmail.com, v.yavornytsky@gmail.com*

Досліджено угруповання епігеобіотних членистоногих мезофауни деяких лісових екосистем Льва-Ствизького межиріччя у межах Волинського Полісся України. Це досить специфічний район, екологічними особливостями якого є домінування оліготрофних лісових і болотних екосистем. Зоологічний матеріал зібраний навесні та влітку 2015 р. методом ґрунтових пасток Барбера. Дослідження проведено на трьох пробних площах: 1) сирий (заболочений) оліготрофний сосновий ліс (*Ledo-Pinion*); 2) пізня вторинна сукцесія (поновлення лісу) після вирубування на місці сирих (заболочених) оліготрофних соснових лісів; 3) сухий оліготрофний сосновий ліс на пісках (*Dicrano-Pinion*). Загалом виявлено 186 видів епігейних членистоногих, у тому числі – 75 видів павуків (Araneae) і 27 видів турунів (Coleoptera, Carabidae). Поряд із цим, у досліджених угрупованнях домінують мурашки (Formicidae), їхня частка становить 82–87 % від загальної чисельності особин членистоногих, тоді як павуків і турунів разом – 6–7 %. З-поміж виявлених павуків 9 видів уперше знайдено в межах Українського Полісся, а 1 вид (*Gnaphosa nigerrima*) є новим для фауни України; 1 вид турунів (*Cymindis vaporariorum*) уперше знайдений для Західного Полісся в межах України. Також виявлено низку інших рідкісних і маловідомих видів павуків і турунів. Видовий склад і структура досліджених угруповань павуків і турунів мають своєрідні риси, зумовлені екологічними та біогеографічними особливостями оліготрофних екосистем регіону. Подальші еколого-фауністичні дослідження зазначених таксономічних груп тут мають бути спрямовані на охоплення ширшого спектра екосистем, насамперед осоково- і пухівково-сфагнових боліт, а також мочажинно-грядових болотних комплексів як унікальних оселищ, що перебувають під охороною в Україні та Європі.

*Ключові слова:* членистоногі, павуки, туруни, оліготрофні екосистеми, Українське Полісся

Межиріччя Льва та Ствиги – найменше досліджена зоологами територія нашої держави, що вважається білою плямою на карті поширення багатьох видів тварин, у тому числі павуків і турунів. Як найзаболоченіша частина Українського Полісся регіон є ключовим модельним об'єктом для дослідження сукцесійних процесів в екосистемах, що відбуваються під впливом постійного зниження рівня обводнення меліорованих земель. На нашу думку, саме накопичення даних щодо структури угруповань окремих груп тварин і їхній аналіз стане ключем для розуміння механізмів і наслідків антропогенно зумовлених змін у функціонуванні території та в перспективі слугуватиме науковим підґрунтям для ведення природоохоронної діяльності. У цьому контексті павуки й туруни є важливими модельними групами для зоогеографічних, екологічних, біоіндикаційних і моніторингових дослі-

джен наземних безхребетних, насамперед зважаючи на їхню велику чисельність і видову різноманітність у поєднанні з належним рівнем таксономічної та фауністичної вивченості.

Територія досліджень розташована у східній частині Волинського (Західного) Полісся, у межах Клесівського (Льва-Ствизького) ландшафтного району Сарненської акумулятивної рівнини (абсолютні висоти 150–180 м) [16]. За геоботанічним районуванням – це Висоцько-Сарненський підрайон Західнополіського округу Східноєвропейської провінції Європейської широколистяно-лісової області. У його рослинному покриві переважають низькобонітетні соснові ліси (зеленомохові, вересові, лишайникові) зі значною участю заболочених сфагнових лісів. Тут збереглися великі масиви оліго- і мезотрофних боліт Українського Полісся – Переброди, Сира Погоня і Кремінне. Відтак, заболоченість підрайону найбільша в Україні – 28 % [1].

Межиріччя Льви та Ствиги розташоване на стику Поліської плити й Українського кристалічного щита, перекритих болотними, водно-льодовиковими й алювіальними відкладами, що утворюють ландшафт хвилясто-грядової алювіально-зандрової рівнини з еоловими формами рельєфу у вигляді континентальних піщаних дюн і кучугур [11, 16]. Цей ландшафт перебував на межі поширення Дніпровського зледеніння, що зумовило збереження низки реліктових елементів флори і фауни, зокрема, рододендрона жовтого (*Rhododendron luteum*). Геоморфологічні особливості району зумовили домінування оліготрофних типів екосистем – осоково- і пухівково-сфагнових боліт, мочажинно-грядових болотних комплексів, соснових борів у всьому гігротопічному спектрі місцезростань – від болотного пригніченого рідколісся до ксеротермних псамофітних угруповань. Це визначає неординарну екологічну й біогеографічну специфіку території досліджень, де перебиваються ареали як бореальних, так і термофільних середземноморських флористичних і фауністичних елементів.

Зважаючи на відсутність літературних даних стосовно більшості груп членистоногих Льва-Ствизького межиріччя, у т. ч. павуків і турунів, метою роботи було дослідити епігеобіонтних членистоногих мезофауни оліготрофних лісових екосистем регіону з різними умовами зволоження та господарським використанням. А саме, виокремити комплекс хижаків, оцінити його різноманітність й участь у ньому павуків і турунів; проаналізувати структуру угруповань обраних груп, охарактеризувати їхню репрезентативність; зосередити увагу на рідкісних і маловідомих видах; окреслити напрями подальших еколого-фауністичних досліджень регіону.

#### Матеріали та методика

Матеріал (епігеобіонтні безхребетні) зібрано упродовж травня-липня 2015 р. за допомогою ґрунтових пасток Барбера (відповідно до стандартної методики [21]) на трьох пробних площах (ПП) в околицях с. Більськ (Рокитнівський р-н, Рівненська обл.). Загальна експозиція становила 4037 пасткодів.

**ПП-1:** 51,494419 N, 27,247846 E; 158 м н. р. м. Сирий оліготрофний сосновий ліс асоціації *Pinetum (sylvestris) ledoso (palustris) – vaccinietum (myrtillis) muscosum*. Дерево-стан висотою 10–15 м та зімкненістю 0,6–0,7 утворений *Pinus sylvestris* з домішкою *Betula pendula* та *Alnus glutinosa* і *Rhododendron luteum* – у підліску. У чагарничковому ярусі домінують *Vaccinium myrtillus*, *V. uliginosum*, *Ledum palustre*. Виражений моховий ярус (до 80–90 %). Пріоритетний тип оселища Natura 2000: 91DO – Заболочені ліси (*Ledo-Pinion*) [13]. Оточений болотним масивом Сира Погоня з пухівково-сфагново-чагарничковими угрупованнями і пригніченою сосною на підвищеннях та шейхцерієво- і осоково-сфагновими фітоценозами у обводнених мочажинах. Територія Рівненського природного заповідника.

**ПП-2:** 51,441599 N, 27,261482 E; 166 м н. р. м. Поновлення лісу після вирубування на місці сирих (заболочених) оліготрофних соснових лісів, що оточують болотні масиви. Деревостан утворений поодинокими невисокими деревами *Pinus sylvestris* і *Betula pendula*. У чагарниковому ярусі, окрім підросту *P. sylvestris* і *B. pendula*, наявні *Rhododendron luteum*, *Frangula alnus*, *Populus tremula*, *Sorbus aucuparia*, *Salix sp.* У чагарничково-трав'яному ярусі заввишки до 100 см домінують *Ledum palustre*, *Vaccinium uliginosum*, *Rhododendron luteum*, *Molinia caerulea*, *Juncus effusus*, а також *Oxycoccus palustris*, *Eriophorum vaginatum*, *Carex nigra*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Andromeda polifolia*, *Calluna vulgaris*, *Lysimachia vulgaris*, *Pteridium aquilinum*. Добре виражений моховий ярус із *Polytrichum sp.*, *Sphagnum sp.*

**ПП-3:** 51,441385 N, 27,242010 E; 167 м н. р. м. Сухий оліготрофний сосняк лишайниково-моховий (*Pinetum (sylvestris) lichenoso-muscosum*) на піщаних і супіщаних ґрунтах. Деревостан з зімкненістю крон 0,6–0,7 формує *Pinus sylvestris* з домішкою *Betula pendula*. Чагарниковий і трав'яний яруси майже відсутні. Лишайниково-моховий ярус представлений *Dicranum sp.*, *Polytrichum sp.*, *Cladonia sp.* Пріоритетний тип оселища Natura 2000: 91T0 – Центральноєвропейські соснові (*Pinus sylvestris*) ліси лишайникові (*Dicrano-Pinion*) [13].

Визначення матеріалу проведено в камеральних умовах за допомогою біокуляра (МБС-10) з використанням відповідної літератури й інтернет-ресурсів [15, 22, 24]. Для уточнення видової приналежності деяких видів павуків застосовано метод висвітлення й очищення хітинових структур копулятивних органів за допомогою 10 % КОН. Номенклатуру павуків наведено за WSC [27], турунів – Freude H. et al. [22]. Класи домінування прийняті за Stöcker G., Bergmann A [26]: ED – еудомінанти (більше 31,2 % від загальної чисельності особин), D – домінанти (10,1–31,1 %), SD – субдомінанти (3,2–10,0 %), R – рецеденти (1,1–3,1 %), SR – субрециденти (менше 1 %). Індекс екологічної ємності біотопу розраховано за формулою функціоналу Сімпсона [20], індекси різноманіття – за методикою, наведеною в праці Е. Мегаррана [12].

### Результати і їхнє обговорення

Загалом в оліготрофних лісових екосистемах району досліджень виявлено 186 видів членистоногих (106–118 видів на окремих пробних площах), що належать до 5 класів: Malacostraca, Arachnida, Chilopoda, Diplopoda, Insecta. Еудомінантами є мурашки (Formicidae), частка яких варіює у межах 82–87 % від загальної чисельності мезоартропод (табл. 1). Частки інших груп, відповідно, набагато менші, понад 1 % мають лише павуки (Araneae) та жуки (Coleoptera: Carabidae, Staphylinidae, Curculionidae). Динамічна щільність епігеобіонтів має близькі значення у лісових екосистемах (ПП-1, ПП-3; табл. 1). В умовах поновлення деревостану після вирубування і формування щільного різновидового трав'яно-чагарникового ярусу (ПП-2) активність мурашок, а відповідно і мезофауни загалом збільшується (від 558–603 до 1018 особин на 100 пасткодів).

Комплекс хижих членистоногих сформований представниками рядів Araneae, Opiliones, Lithobiomorpha, Geophilomorpha, Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae), а також Neuroptera. Їхня частка становить 6,7–9,7 % від загальної чисельності особин, що потрапили у пастки, і 53,8–66,1 % від загальної кількості видів. Вона є найбільшою в сирому сосновому лісі, найменшою – у сухому оліготрофному сосняку. Мурашки за типом живлення є поліфагами, проте надають перевагу хижацтву, тому є основними трофічними конкурентами перелічених груп.

**Павуки (Araneae)** є найрізноманітніше представленою групою епігейних членистоногих за кількістю видів. Відповідно, вони визначають основні тренди зміни чисельності комплексу хижаків на пробних площах. Їхня частка від загальної кількості відловлених

епігеобіонтів (6,0–7,1 %), а також динамічна щільність (43–61 ос. на 100 пастко-діб) є більшою в сирих соснових лісах, порівняно зі сухим (відповідно 3,0 % і 16,5 ос. на 100 пастко-діб; табл. 1), що є закономірним, зважаючи на вологолюбність представників ряду загалом.

Таблиця 1

Епігеобіонтні членистоногі мезофауни лісових екосистем Льва-Ствизького межиріччя

Ряд (Родина)	III-1			III-2			III-3		
	S	D	% від N	S	D	% від N	S	D	% від N
Malacostraca									
Isopoda				1	1,26	<b>0,12</b>	1	0,27	<b>0,05</b>
Arachnida									
Araneae: німфи, імаго	46	42,87	<b>7,11</b>	49	60,80	<b>5,97</b>	31	16,54	<b>2,97</b>
Opiliones	2	1,14	<b>0,19</b>	3	1,61	<b>0,16</b>	2	1,83	<b>0,33</b>
Chilopoda									
Lithobiomorpha	1	1,30	<b>0,21</b>	1	3,56	<b>0,35</b>	1	1,08	<b>0,19</b>
Geophilomorpha	1	0,23	<b>0,04</b>				1	0,05	<b>0,01</b>
Diplopoda									
Chordeumatida (Mastigophorophyllidae)							1	0,05	<b>0,01</b>
Polydesmida (Polydesmidae)	1	0,15	<b>0,03</b>	3	1,49	<b>0,15</b>			
Julida (Blaniulidae)	3	1,68	<b>0,28</b>	1	0,69	<b>0,07</b>	1	0,11	<b>0,02</b>
Polyzoniida (Polyzoniidae)	1	0,53	<b>0,09</b>	1	0,11	<b>0,01</b>			
Insecta									
Blattodea (Blattidae)	1	2,14	<b>0,35</b>	1	3,45	<b>0,34</b>	1	0,48	<b>0,09</b>
Dermoptera							1	0,05	<b>0,01</b>
Coleoptera (Byrrhidae): лич., імаго	1	0,15	<b>0,03</b>	1	0,23	<b>0,02</b>			
Coleoptera (Cantharidae): лич., імаго	1	0,15	<b>0,03</b>	1	0,23	<b>0,02</b>	1	0,11	<b>0,02</b>
Coleoptera (Carabidae)	17	6,25	<b>1,04</b>	10	3,22	<b>0,32</b>	15	7,33	<b>1,31</b>
Coleoptera (Chrysomelidae): лич., імаго	2	2,36	<b>0,39</b>	3	1,61	<b>0,16</b>	4	1,89	<b>0,34</b>
Coleoptera (Curculionidae): лич., імаго	5	35,93	<b>5,96</b>	7	34,02	<b>3,34</b>	8	24,46	<b>4,39</b>
Coleoptera (Elateridae): лич., імаго	9	1,75	<b>0,29</b>	8	2,07	<b>0,20</b>	8	2,37	<b>0,43</b>
Coleoptera (Ipidae)	1	0,31	<b>0,05</b>	1	0,23	<b>0,02</b>	1	0,22	<b>0,04</b>
Coleoptera (Scarabaeidae)				1	0,34	<b>0,03</b>	2	0,11	<b>0,02</b>
Coleoptera (Silphidae): лич., імаго							1	0,11	<b>0,02</b>
Coleoptera (Staphylinidae)	10	6,41	<b>1,06</b>	10	6,44	<b>0,63</b>	7	10,24	<b>1,84</b>
Coleoptera (Tenebrionidae) лич.	1	0,38	<b>0,06</b>				1	0,54	<b>0,10</b>
Diptera: лич.							2	0,16	<b>0,03</b>
Orthoptera (Tettigoniidae)	1	0,08	<b>0,01</b>	1	0,69	<b>0,07</b>	1	0,27	<b>0,05</b>
Orthoptera (Gryllotalpidae)							1	0,54	<b>0,10</b>
Hemiptera (Cicadidae)	1	0,61	<b>0,10</b>	1	0,11	<b>0,01</b>	1	0,48	<b>0,09</b>
Hymenoptera (Formicidae)	5	495,35	<b>82,12</b>	5	889,66	<b>87,36</b>	5	485,51	<b>87,05</b>
Hymenoptera (Tenthredinidae): лич.	2	0,84	<b>0,14</b>	1	0,34	<b>0,03</b>	1	0,22	<b>0,04</b>
Lepidoptera (Geometridae): лич.	2	1,37	<b>0,23</b>	2	1,38	<b>0,14</b>	3	0,59	<b>0,11</b>
Neuroptera (Myrmeleontidae): лич.	1	0,08	<b>0,01</b>						
Trichoptera: лич.	3	1,14	<b>0,19</b>	5	4,83	<b>0,47</b>	4	2,16	<b>0,39</b>
Загалом	118	603,20	<b>100</b>	117	1018,37	<b>100</b>	106	557,77	<b>100</b>

**Примітки:** S – кількість видів, D – динамічна щільність (кількість особин у перерахунку на 100 пасткодіб), N – загальна чисельність відловлених особин; лич. – личинки.

Усього виявлено 75 видів павуків із 16 родин (табл. 2). З-поміж них 35 видів доповнюють фауну Волинського Полісся [3, 7–9], у т. ч. 9 видів уперше виявлені в межах Українського Полісся [4–6, 14], 1 вид – *Gnaphosa nigerrima*, – є новим для фауни України [24]. Значною кількістю видів представлені родини Gnaphosidae (17 видів; 22,7 %) і Lycosidae (15 видів; 20 %). Крім того, частка Lycosidae на площах становить 62,7–69,9 % від загальної чисельності особин павуків.

Кількість видів павуків, що потрапили у пастки, варіює від 31 до 49 (табл. 3). Найменша – спостерігається в сухому сосняку (III-3), найбільша – притаманна вторинній еко-

системі, що поновлюється після вирубування в сирих умовах зволоження (ПП-2). Відтак, для її аранеоугруповань властиві порівняно великі значення індексів видового різноманіття (Шеннона, Маргалєфа, екологічної ємності угруповань, а також вирівняність структури за відсутності еудомінантного за чисельністю класу). У розрідженому деревостані зі щільним трав'яно-чагарниковим ярусом великою є динамічна щільність особин. Тут створюються сприятливі умови для представників родини Gnaphosidae, частка яких становить 28,6 % від загальної кількості видів, 21,6 % від загальної чисельності та є найбільшою з-поміж досліджених екосистем. Характерним є домінування *Arctosa lutetiana*, наявність *Acantholycosa lignaria*, особини якого полюють на мертвій поваленій деревині, а також світлолюбних термофільних *Micaria fulgens*, *Poecilochroa variana*, *Zelotes exiguus*, *Zora silvestris*, *Oxyopes ramosus*.

Таблиця 2

Видовий склад угруповань павуків оліготрофних соснових лісів

Родина / Вид	ПП-1	ПП-2	ПП-3
	% від загальної чисельності		
<b>Araneidae</b>			
* <i>Araneus triguttatus</i> (Fabricius, 1775)	0,2		0,4
<i>Cercidia prominens</i> (Westring, 1851)	0,2	0,2	
<b>Cheiracanthiidae</b>			
** <i>Cheiracanthium oncognathum</i> Thorell, 1871	0,8	0,2	
<b>Clubionidae</b>			
<i>Clubiona comta</i> C. L. Koch, 1839	0,4	0,4	
<b>Gnaphosidae</b>			
* <i>Drassodes pubescens</i> (Thorell, 1856)	0,4	0,6	0,4
* <i>Drassyllus lutetianus</i> (L. Koch, 1866)	0,2		
<i>Drassyllus pusillus</i> (C. L. Koch, 1833)		0,4	
* <i>Gnaphosa montana</i> (L. Koch, 1866)	0,4	0,6	0,4
** <i>Gnaphosa muscorum</i> (L. Koch, 1866)		0,2	
*** <i>Gnaphosa nigerrima</i> L. Koch, 1877	0,2		
* <i>Haplodrassus signifer</i> (C. L. Koch, 1839)	2,6	0,6	4,3
<i>Haplodrassus silvestris</i> (Blackwall, 1833)	1,0	2,6	2,9
<i>Haplodrassus umbratilis</i> (L. Koch, 1866)	3,4	1,4	1,8
<i>Micaria fulgens</i> (Walckenaer, 1802)		0,8	
* <i>Poecilochroa variana</i> (C.L.Koch, 1839)		0,2	
<i>Zelotes clivicola</i> (L. Koch, 1870)	1,8	6,5	
<i>Zelotes electus</i> (C.L.Koch, 1839)			0,7
* <i>Zelotes exiguus</i> (Müller & Schenkel, 1895)		0,2	
<i>Zelotes latreillei</i> (Simon, 1878)		0,8	
* <i>Zelotes petrensis</i> (C.L.Koch, 1839)	2,2	1,4	1,4
<i>Zelotes subterraneus</i> (C. L. Koch, 1833)	5,6	5,2	4,3
<b>Linyphiidae</b>			
* <i>Gongylidiellum latebricola</i> (O.P.-Cambridge, 1871)	0,8		
<i>Macrargus carpenteri</i> (O.P.-Cambridge, 1895)	0,4	0,2	
<i>Microneta viaria</i> (Blackwall, 1841)			3,2
<i>Minyriolus pusillus</i> (Wider, 1834)			1,1
<i>Neriene clathrata</i> (Sundevall, 1830)		0,2	0,7
<i>Walckenaeria antica</i> (Wider, 1834)	0,4		
<i>Walckenaeria cucullata</i> (C.L. Koch, 1836)	0,2		
* <i>Walckenaeria dysderoides</i> (Wider, 1834)		0,4	
<b>Liocranidae</b>			
<i>Agroeca brunnea</i> (Blackwall, 1833)	0,6	0,4	1,4
* <i>Agroeca proxima</i> (O.P.-Cambridge, 1871)	0,2		
<i>Scotina palliardii</i> (L. Koch, 1881)		0,6	
<b>Lycosidae</b>			
** <i>Acantholycosa lignaria</i> (Clerck 1757)		0,2	
<i>Alopecosa aculeata</i> (Clerck, 1757)	32,1	17,7	34,8

Закінчення табл. 2

Родина / Вид	ПП-1	ПП-2	ПП-3
	% від загальної чисельності		
<i>Alopecosa pulverulenta</i> (Clerck, 1757)		0,4	2,2
* <i>Arctosa figurata</i> (Simon, 1876)	0,2		<b>6,1</b>
** <i>Arctosa lutetiana</i> (Simon, 1876)	0,8	<b>14,7</b>	
* <i>Hygrolycosa rubrofasciata</i> (Ohlert, 1865)	0,6	0,4	
** <i>Mustelicosa dimidiata</i> (Thorell, 1875)	0,6		
* <i>Pardosa alacris</i> (C. L. Koch, 1833)			<b>5,7</b>
<i>Pardosa lugubris</i> (Walckenaer, 1802)	<b>25,3</b>	<b>23,2</b>	<b>7,2</b>
<i>Pardosa prativaga</i> (L. Koch, 1870)	0,6		
<i>Piratula latitans</i> (Blackwall, 1841)	0,2		
<i>Piratula uliginosa</i> (Thorell, 1856)	0,2	0,2	
** <i>Trochosa robusta</i> (Simon, 1876)	0,2	0,2	0,7
<i>Trochosa terricola</i> Thorell, 1856	<b>4,0</b>	1,4	<b>6,5</b>
<i>Xerolycosa nemoralis</i> (Westring, 1861)	<b>5,2</b>	<b>4,2</b>	<b>3,6</b>
<b>Miturgidae</b>			
* <i>Zora silvestris</i> Kulczyński, 1897		0,6	
<i>Zora spinimana</i> (Sundevall, 1833)	2,6	1,4	<b>3,2</b>
<b>Oxyopidae</b>			
* <i>Oxyopes ramosus</i> (Martini & Goetze, 1778)		0,2	
<b>Philodromidae</b>			
<i>Philodromus collinus</i> C. L. Koch, 1835	0,2		
* <i>Philodromus margaritatus</i> (Clerck, 1757)	0,2		
<i>Thanatus formicinus</i> (Clerck, 1757)		0,4	
* <i>Thanatus sabulosus</i> (Menge, 1875)	1,4	<b>3,4</b>	1,8
<b>Phrurolithidae</b>			
<i>Phrurolithus festivus</i> (C. L. Koch, 1835)	0,8	2,4	2,2
<b>Pisauridae</b>			
* <i>Dolomedes fimbriatus</i> (Clerck, 1757)	0,2		
<i>Pisaura mirabilis</i> (Clerck, 1757)	0,2	0,2	0,7
<b>Salticidae</b>			
* <i>Aelurillus v-insignitus</i> (Clerck, 1757)			0,4
<i>Euophrys frontalis</i> (Walckenaer, 1802)		0,2	
* <i>Evarcha falcata</i> (Clerck, 1757)		0,6	
<b>Tetragnathidae</b>			
<i>Pachygnatha clercki</i> Sundevall, 1823			0,4
<i>Pachygnatha degeeri</i> Sundevall, 1830	0,2		
<i>Tetragnatha pinicola</i> L. Koch, 1870			0,4
<b>Theridiidae</b>			
<i>Asagena phalerata</i> (Panzer, 1801)	0,4		
* <i>Crustulina guttata</i> (Wider, 1834)		0,4	
* <i>Dipoena melanogaster</i> (C.L.Koch, 1837)	0,2		
* <i>Euryopsis flavomaculata</i> (C. L. Koch, 1836)	0,4	0,2	
<i>Lasaeola tristis</i> (Hahn, 1833)		0,4	
<i>Robertus lividus</i> (Blackwall, 1836)		0,4	
** <i>Robertus neglectus</i> (O. P.-Cambridge, 1871)			0,4
<b>Thomisidae</b>			
** <i>Bassaniodes robustus</i> (Hahn, 1832)	0,4		
** <i>Ozyptila atomaria</i> (Panzer, 1801)	0,4	0,2	
* <i>Tmarus piger</i> (Walckenaer, 1802)		0,2	
<i>Xysticus bifasciatus</i> C. L. Koch, 1837		1,0	0,7
<i>Xysticus luctuosus</i> (Blackwall, 1836)	0,6	0,8	0,4

**Примітки:** \* – вид, уперше виявлений на території Волинського Полісся; \*\* – на території Українського Полісся, \*\*\* – на території України. Жирним шрифтом виділено домінуючі види (субдомінанти, домінуючі, еудомінанти).

Трохи менше видів виявлено у первинному сирому сосновому лісі, оточеному болотним масивом. Для цієї екосистеми низьким є значення індексів різноманіття Шеннона та вирівняності угруповань, що чутливі до розподілу чисельності видів (табл. 3). Тут

характерна найбільша за кількістю видів (26,1 %) і чисельністю особин (69,9 %) частка родини Lycosidae. У складі аранеоугруповань наявні як ксерорезистентні теплолюбні види *Cheiracanthium oncognathum*, *Arctosa figurata*, *Mustelicosa dimidiata*, так і гігро-, й мезо-гігрофільні – *Gnaphosa nigerrima*, *Hygrolycosa rubrofasciata*, *Piratula latitans*, *Dolomedes fimbriatus*. Їхнє поєднання вказує на специфічні умови екосистеми та її унікальність для Волинського Полісся.

Таблиця 3

## Характеристика угруповань епігеобіонтних павуків

Показник	ПП-1	ПП-2	ПП-3
Кількість видів	46	49	31
Динамічна щільність статевозрілих особин (ос. / 100 пасткодів)	38,29	57,01	15,03
Кількість домінантних видів (ED+D+SD)	6	7	9
Частка домінантних видів (% від загальної чисельності)	75,6	74,9	74,6
Частка еудомінантів (ED; % від загальної чисельності)	32,1	0	34,8
Частка домінантів (D; % від загальної чисельності)	25,3	55,6	0
Індекс Шеннона	2,42	2,71	2,60
Індекс Маргалефа	7,24	7,73	5,33
Вирівняність структури угруповання (за індексом Сімсона: 1 – D)	0,82	0,88	0,85
Екологічна ємність угруповання	103,7	156,3	42,7

Найменша кількість видів і динамічна щільність особин павуків спостерігається у сухому сосняку. Особливістю угруповань екосистеми є відсутність домінантного за чисельністю класу, що вплинуло на порівняно високі значення вирівняності й індексу Шеннона. У видовому складі наявні здебільшого звичайні мезофільні та ксеромезофільні види соснових лісів. Специфічним тут є домінування *Arctosa figurata*.

Досліджені екосистеми відрізняються як видовими композиціями, так і набором домінантів, склад яких залежить від характеру рослинного покриву і, відповідно, від мікростаціональних умов, сформованих на поверхні ґрунту. Так, серед 14 видів, відносна чисельність яких в угрупованнях є більшою, ніж 3,2 %, лише 4 види спільні для всіх пробних площ: *Zelotes subterraneus*, *Alopecosa aculeata*, *Pardosa lugubris*, *Xerolycosa nemoralis*.

Значення коефіцієнта фауністичної подібності Жаккара для екосистем, що перебувають в однакових умовах зволоження (ПП-1 і ПП-2), становить 41,8 %, для сформованих соснових лісів (ПП-1 і ПП-3) – 35,1 %. Найменше значення – 33,3 % – властиве ПП-2 і ПП-3. Відтак, умови зволоження є визначальним фактором формування угруповань павуків. У сухому сосняку лишайниково-моховому слід відзначити відсутність видів, які проявляють різні екологічні преференції до вологості у різних регіонах ареалу, обираючи сирі, заболочені або ж ксеротермні екосистеми. Це, насамперед, *Ozyptila atomaria*, *Bassaniodes robustus*, *Arctosa lutetiana*, *Agroeca proxima*, *Scotina palliardii*.

Загалом з-поміж рідкісних маловідомих видів регіону слід виокремити *Cheiracanthium oncognathum*, *Gnaphosa montana*, *G. muscorum*, *G. nigerrima*, *Zelotes exiguus*, *Acantholycosa lignaria*, *Arctosa figurata*, *Hygrolycosa rubrofasciata*, *Mustelicosa dimidiata*, *Scotina palliardii*, *Thanatus sabulosus* і *Bassaniodes robustus*. На трьох із них вартує зосередити особливу увагу.

***Gnaphosa nigerrima*** (ПП-1; 1♂) – уперше зазначений для України. Вид поширений у Європі та північній Росії (західна і північна європейська частина, Сибір до Далекого Сходу) [27]. Трапляється на болотах і заболочених місцевостях [23]. Волинське Полісся, очевидно, є частиною південної межі ареалу, знахідки виду відомі з інших частин регіону, зокрема, зі сфагнових боліт Любешівського району (неопубліковані дані). ***Gnaphosa muscorum*** (ПП-2;



1♂) – уперше виявлений на території Полісся, раніше зазначений для Львівщини [2]. Бо-реомонтанний вид, поширений у Пн Америці, Європі, Росії (від Європейської частини до Далекого Сходу), Казахстані, Китаї, Кореї [27]. Трапляється, насамперед, у сухих світлих хвойних лісах. У Альпах на висоті до 2500 м [23]. *Mustelicoso dimidiata* (ПП-1; 3♂) – степовий вид, відомий в Україні (лісостепова, степова зони; [25]), а також у Росії (від Європейської частини до Пд Сибіру), Туркменистані, Монголії, Китаї [27]. Сарненська рівнина – це на сьогодні крайній північно-західний локалітет виду.

**Туруни (Coleoptera, Carabidae)** становлять одну з найбільших за видовим різноманіттям родин твердокрилих (Coleoptera) і комах загалом. Досліджені угруповання турунів екосистем оліготрофних соснових лісів характеризуються порівняно низькою динамічною щільністю (від 3,2 до 7,3 особини на 100 пастко-діб), що загалом властиве для лучних екосистем і приблизно на порядок менше від значень показників більшості угруповань у мезо- й евтрофних типах лісових екосистем (табл. 4, 5). У загальному видовому складі угруповань брали участь 27 видів, у т. ч. 2 доміанти (*Carabus arvensis*, *Calathus ambiguus*) і 9 субдомінантів (*Nothiophilus aquaticus*, *Dyschirius globosus*, *Poecilus versicolor*, *P. lepidus*, *Pterostichus niger*, *P. oblongopunctatus*, *Calathus micropterus*, *Amara bifrons*, *Harpalus rufipes*), решта видів траплялися поодинокі.

Таблиця 4

Видовий склад турунів оліготрофних соснових лісів

Вид	ПП-1	ПП-2	ПП-3
	% від загальної чисельності		
<i>Carabus arvensis</i> Herbst, 1784	41,6	21,4	13,2
<i>Nebria brevicollis</i> (Fabricius, 1792)			0,7
<i>Nothiophilus aquaticus</i> (Linnaeus, 1758)	9,8	3,6	0,7
<i>Nothiophilus palustris</i> (Duftschmid, 1812)	6,1		
<i>Clivina fossor</i> (Linnaeus, 1758)			1,5
<i>Dyschirius globosus</i> (Herbst, 1783)		28,6	
<i>Miscodera arctica</i> (Paykull, 1798)			0,7
<i>Patrobus atrorufus</i> (Stroem, 1768)	2,4		
<i>Stomis pumicatus</i> (Panzer, 1796)		3,6	
<i>Poecilus versicolor</i> (Sturm, 1824)		7,1	7,4
<i>Poecilus lepidus</i> (Leske, 1785)	1,2		15,4
<i>Pterostichus niger</i> (Schaller, 1783)		17,9	2,9
<i>Pterostichus anthracinus</i> (Illiger, 1798)	1,2		
<i>Pterostichus minor</i> (Gyllenhal, 1827)	1,2		
<i>Pterostichus rhaeticus</i> Heer, 1828	1,2		
<i>Pterostichus diligens</i> (Sturm, 1824)	4,9		
<i>Pterostichus quadrioveolatus</i> Letzner, 1852	1,2		
<i>Pterostichus oblongopunctatus</i> (Fabricius, 1787)	9,8		0,7
<i>Pterostichus melanarius</i> Illiger, 1798	1,2		
<i>Calathus fuscipes</i> (Goeze, 1777)			2,2
<i>Calathus ambiguus</i> (Paykull, 1790)	2,4	7,1	27,9
<i>Calathus micropterus</i> (Duftschmid, 1812)	7,3	3,6	3,7
<i>Oxytelus obscurus</i> (Herbst, 1784)	2,4		
<i>Amara bifrons</i> (Gyllenhal, 1810)		3,6	10,3
<i>Harpalus rufipes</i> (De Geer, 1774)	4,9		9,6
<i>Harpalus latus</i> (Linnaeus, 1758)	1,2		2,9
<i>Cymindis vaporariorum</i> (Linnaeus, 1758)		3,6	

Найменшими показниками видового багатства, чисельності й екологічної ємності угруповання вирізнялася екосистема заростаючої вирубки (ПП-2), що, очевидно, зумовлене несприятливими просторовими умовами для епігейних лісових хижаків, пов'язаними зі значним проективним покриттям трав'яно-чагарничкового ярусу. Угруповання турунів сирого і сухого сосняків (ПП-1,3) мали подібні структурні показники – по 15–17 видів, 6,3–

7,3 особи на 100 пасткодіб, 16–17 одиниць екологічної ємності, але значно відрізнялися за видовим складом (коефіцієнт подібності Жаккара лише 23 %). Для першого закономірно властиві гігро- й тирфофільні види (*Nothophilus palustris*, *Pterostichus rhaeticus*, *Oxypselaphus obscurus*), а для другого – псамофіли (*Clivina fossor*, *Miscodera arctica*, *Amara bifrons*).

Таблиця 5

## Характеристика угруповань турунів

Показник	ПП-1	ПП-2	ПП-3
Кількість видів	17	10	15
Динамічна щільність (особин / 100 пасткодіб)	6,25	3,22	7,33
Індекс Шеннона	2,12	1,97	2,18
Індекс Маргалефа	3,63	2,70	2,85
Вирівняність структури угруповання (за індексом Сімсона: 1 – D)	0,79	0,82	0,85
Екологічна сміність угруповання	16,2	9,9	17,4

Фоновим видом був євритопний палеарктичний *Carabus arvensis*, котрий домінував у всіх угрупованнях (13,2–41,6 %). У районі досліджень також поодинокі відзначені гігрофіл *Carabus clathratus* Linnaeus, 1761 і бореальний псамофіл *C. nitens* Linnaeus, 1758, які, проте, не потрапили у стаціонарні збори. Склад домінантного комплексу угруповань, незважаючи на те, що в ньому наявні загалом широко розповсюджені в лісовій зоні Середньої Європи види, є досить своєрідним і значно відмінним від такого в інших районах Західного Полісся [10, 18, 19].

Зупинимося докладніше на кількох видах, що становлять екологічний та біогеографічний інтерес. *Miscodera arctica* – 1 особина (ПП-3). Голарктичний бореально-монтанний вид, псамофіл. В Україні – дуже рідкісний вид на південній межі ареалу, рекомендований до включення у нове видання Червоної книги України. *Pterostichus rhaeticus* – 1 особина (ПП-1). Рідкісний європейсько-сибірський бореально-монтанний тирфофільний вид, трапляється на оліготрофних болотах і вересовищах. Відомий з Малого Полісся, Розточчя і Волинсько-Прип'ятського району [17, 19]. *Pterostichus quadriveolatus* – 1 особина (ПП-1). Рідкісний європейський монтанний вид. Відомий з Розточчя і Карпат, на Волинському Поліссі – лише за давніми вказівками [17, 19]. *Calathus micropterus* – субдомінант у всіх угрупованнях, європейсько-сибірський бореально-монтанний вид. *Cymindis vaporariorum* – 1 особина (ПП-2). Голарктичний бореально-монтанний вид. Відомий з Карпат, на Волинському Поліссі знайдений уперше [17, 19].

В оліготрофних лісових екосистемах методом ґрунтових пасток виявлено 186 видів членистоногих, що належать до 5 класів: Malacostraca, Arachnida, Chilopoda, Diplopoda, Insecta. Еудомінантами (82,1–87,3 % загальної чисельності мезоартропод) є мурашки (Formicidae). Комплекс хижих членистоногих сформований представниками рядів Araneae, Opiliones, Lithobiomorpha, Geophilomorpha, Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae), а також Neuroptera. Їхня частка становить 6,7–9,7 % від загальної чисельності особин, що потрапили у пастки, і 54,8–66,1 % від загальної кількості видів.

Найрізноманітніше представленою групою хижаків є павуки (Araneae: 75 видів; 40,3 % від загальної кількості видів мезоартропод, 6,0–7,1 % від загальної чисельності). Їхні угруповання мають більшу відносну чисельність, динамічну щільність, значення індексів біорізноманіття й вирівняності структури у сирих екосистемах, порівняно зі сухим сосняком, що є закономірним, зважаючи на екологічні переваги ряду.

Туруни (Coleoptera: Carabidae) є найрізноманітніше представленою у зборах родиною хижих комах (27 видів; 14,5 % від загальної кількості видів мезоартропод, 0,3–1,3 % від загальної чисельності). Їхні угруповання у сформованих лісових екосистемах є репре-

зентативнішими з огляду на наявність рідкісних видів, мають більшу відносну чисельність, динамічну щільність, значення індексів біорізноманіття й вирівняності структури, порівняно з екосистемою, що поновлюється після вирубування.

Угрупування павуків і турунів досліджених екосистем відрізняються видовим складом і складом домінантів, тобто залежать від мікростаціональних умов. Вони є загалом середніми в регіоні, що значною мірою зумовлено специфікою поширення й екологічних умов оліготрофних екосистем загалом. Тут наявні рідкісні та маловідомі види, зокрема, Araneae: *Gnaphosa nigerrima*, *Gnaphosa muscorum*, *Mustelicosia dimidiata*; Carabidae: *Miscodera arctica*, *Pterostichus rhaeticus*, *P. quadrioveolatus*, *Cymindis vaporariorum*.

На території Льва-Ствизького межиріччя подальші дослідження обраних груп мають бути спрямовані на охоплення ширшого спектра оліготрофних типів екосистем, насамперед осоково- і пухівково-сфагнових боліт, а також мочажинно-грядових болотних комплексів як унікальних оселищ, що перебувають під охороною в Україні та Європі.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Геоботаничне районування Української РСР / за ред. А.І. Барбарича. К.: Наук. думка, 1977. 304 с.
2. Гірна А., Леснік В. Аранеокомплекси річищ водотоків басейну верхнього Дністра // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002. Вип. 29. С. 118–126.
3. Гнелица В. А. Пауки Шацького національного природного парка, сем. Linyphiidae // Заповідна справа в Україні. 2012. № 18(1–2). С. 91–95.
4. Гурьянова В. Е. Пауки (Aranei) припочвенного горизонта Полесского государственного заповедника // Вестн. зоологии. 1989. № 2. С. 6–12.
5. Евтушенко К. В. Видовой состав и биотопическое распределение пауков (Aranei) Черниговского Полесья // Ред. ж. Вестн. зоологии. АН УССР. К., 1991. 19 с. Деп. в ВИНТИ. 04.06.1991. N 2339-B91.
6. Евтушенко К. В. К изучению пауков (Aranei) Новгород-Северского Полесья // Ред. ж. Вестн. зоологии АН Украины. К., 1992. 13 с. Деп. в ВИНТИ. 06.01.1993a. N26-B93.
7. Евтушенко К. В. К изучению пауков Волынского Полесья // Ред. ж. Вестн. зоологии АН Украины. К., 1992. 13 с. Деп. в ВИНТИ. 06.01.1993b. N27-B93.
8. Євтушенко К. В. Павуки (Aranei) Шацького національного природного парку // Шацький національний парк. Наук. дослідж. 1983–1993 рр. Ковель: Світязь, 1993 (1996). С. 221–235.
9. Євтушенко К. В. Структура угруповань павуків (Aranei) пригрунтового ярусу чотирьох типових біотопів Шацького національного природного парку // Природа Західного Полісся та прилеглих територій: зб. наук. праць. 2013. № 10. С. 124–130.
10. Канарський Ю., Вабіщевич Ю., Панін Р. Угрупування турунів (Coleoptera, Carabidae) лісових екосистем НПП «Прип'ять-Стохід» (осінній аспект) // Наук. вісн. нац. природного парку «Прип'ять-Стохід». 2017. № 7(2). С. 10–18.
11. Комплексний атлас України. К.: Картографія, 2005. 96 с.
12. Мегарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение / пер. с англ. М.: Мир, 1992. 184 с.
13. Оселищна концепція збереження біорізноманіття: базові документи Європейського Союзу / ред. О.О. Кагало, Б.Г. Проць. Львів: ЗУКЦ, 2012. 278 с.
14. Перелешина В. И. Материалы для фауны пауков западных и юго-западных частей Восточной Европы // Ежегодник Зоол. музея АН СССР. 1930. № 31 (3–4). С. 359–391.

15. Плавильщиков Н. Н. Краткий определитель наиболее распространенных насекомых европейской части России. М.: Топикал, 1994. 544 с.
16. Природа Ровенської області / за ред. К.І. Геренчука. Львів: Вища школа, 1976. 156 с.
17. Різун В. Б. Туруни Українських Карпат. Львів, 2003. 210 с.
18. Різун В. Б. До фауни жуків-турунів (Coleoptera, Carabidae) Українського Полісся // Збереження та відтворення біорізноманіття природо-заповідних територій: матеріали Міжнар. наук-практ. конф., присв. 10-річчю Рівненського природного заповідника (м. Сарни, 11–13 червня 2009 р.). Рівне, 2009. С. 535–543.
19. Різун В. Б., Чумак В. О. До вивчення жуків-турунів (Coleoptera, Carabidae) Волинського Полісся // Природа Західного Полісся та прилеглих територій. Луцьк: Волин. нац. ун-т ім. Лесі Українки, 2010. Вип. 7. С. 149–153.
20. Сметана О. М., Сметана Н. М. Структура наземної мезофауни залізорудних кар'єрів Кривбасу // Наукові основи збереження біотичної різноманітності: темат. зб. Ін-ту екології Карпат НАН України. 2004. Вип. 5. С. 258–264.
21. Dunger W., Fiedler H. J. Methoden der Bodenbiologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart. New York, 1989. 432 S.
22. Freude H., Harde K.-W., Lohse G. A., Klausnitzer B. Die Käfer Mitteleuropas. Bd. 2. Aderphaga 1. Carabidae (Laufkäfer). 2. (erweiterte) Aufl. Heidelberg: Spectrum, 2004. 522 S.
23. Grimm U. Die Gnaphosidae Mitteleuropas (Arachnida, Araneae). Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg. 1985. H. 26. S. 1–318.
24. Nentwig W., Blick T., Gloor D., Hänggi A., Kropf C. (2019). Version 08.2019. Online at <https://www.araneae.nmbe.ch>, accessed on {20.01.2020}. doi: 10.24436/1
25. Polchaninova N., Prokopenko E. An updated checklist of spiders (Arachnida: Araneae) of Left-Bank Ukraine // Arachnologische Mitteilungen. 2019. Vol. 57. P. 60–64.
26. Stöcker G., Bergmann A. Ein Modell der Dominanzstruktur und seine Anwendung. 1. Modellbildung. Modelrealisierung, Dominanzklassen // Arch. Naturschutz u. Landschaft Forschung. 1977. N 17 (1). S. 1–26.
27. WSC (2020). World Spider Catalog. Version 21.0. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on {20.01.2020}. doi: 10.24436/2.

Стаття надійшла до редакції 26.02.20

доопрацьована 01.06.20

прийнята до друку 02.06.20

**SPIDERS AND CARABID BEETLES AS THE ELEMENTS  
OF ARTHROPOD'S DIVERSITY IN ECOSYSTEMS OF LVA-STVYGA  
INTER-RIVER AREA (RIVNE PROVINCE, UKRAINE)**

**A. Hirna, Yu. Kanarsky, V. Yavornytsky**

*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine*

*4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine*

*e-mail: ahirna@i.ua, ykanarsky@gmail.com, v.yavornytsky@gmail.com*

The series of epigeibiotic Arthropoda communities are investigated in several forest and woodland ecosystems of Lva-Stvyga inter-river area within Volyn Polissia region of Ukraine. This is remoted district with peculiar ecological features as well as dominancy of oligotrophic forest and peat-bog ecosystems. The material of epigeibiotic arthropods was

collected in spring and summer 2015 by the method of Barber's pitfall traps. There are three pilot areas explored: 1) wet oligotrophic pine woodland (*Ledo-Pinion*); 2) late secondary succession of wet oligotrophic pine woodland cutting area; 3) dry oligotrophic pine woodland on the sands (*Dicrano-Pinion*). In total, 186 species of epigeibiotic arthropods were explored. There were found 75 species of spiders (Araneae) and 27 species of ground beetles (Coleoptera, Carabidae) among them. Along with that, the ants (Formicidae) have dominancy within related communities with an amount about 82–87 % of total arthropod individual's number, and Araneae both with Carabidae exceed 6–7 % of this number. Nevertheless, there are nine spider species found for the first time for Ukrainian Polissia region and 1 species – *Gnaphosa nigerrima* – for the territory of Ukraine. One Carabid beetle species (*Cymindis vaporariorum*) was found at the first time for West Polissia region of Ukraine. There is also a number of rare and less known Araneae and Carabidae species found. Thus, the species composition and structure of explored Araneae & Carabidae communities show many specific features, which are caused by characteristic ecological and biogeographical peculiarities of oligotrophic ecosystems within investigated area. Following research of related taxonomical groups has to be directed to the wider spectrum of ecosystems covering, especially to peat-bog and mire complexes as unique protected habitats in Ukraine and the European Union.

*Keywords:* Arthropoda, Araneae, Carabidae, oligotrophic ecosystems, Ukrainian Polissia

## ВПЛИВ ТРАНСПОРТНОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА АКУМУЛЯЦІЮ МЕТАЛІВ У РОСЛИНАХ НА ТЕРИТОРІЇ М. ЛЬВОВА

О. Поліщук, М. Лесів, Г. Антоняк

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Саксаганського, 1, Львів 79005, Україна  
e-mail: alex1994pol@gmail.com

У статті наведено результати досліджень впливу автотранспортного навантаження на акумуляцію металів (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb і Zn) у гаметофітах мохів (*Brachythecium rutabulum* (Hedw.) Schimp., *Pyloisia polyantha* (Hedw.) Schimp.) і тканинах водяного макрофіта *Lemna minor* L., зібраних в окремих районах м. Львова. Під час роботи вибрано п'ять ділянок: ділянку № 1 (Стрийський парк), яку використовували як контрольну, і ділянки № 2–5, на яких аналізували інтенсивність транспортного руху та відбирали зразки рослин для досліджень. Ділянки № 2 і № 3 вибрано, відповідно, в середній і кінцевій частинах вул. Стрийської, № 4 – поблизу сполучення вул. Личаківська–Пасічна, № 5 – поблизу вул. Хортицької. На ділянках № 1–4 збирали гаметофіти мохів *B. rutabulum* і *P. polyantha*, в яких визначали концентрацію металів; на ділянках № 2 і № 5 обрано стави, в яких досліджували концентрацію металів у воді й у зразках макрофіта *L. minor*. Концентрацію металів визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрометра C-115PK Selmi. За результатами спостережень, інтенсивність транспортного руху на ділянках № 2–4 висока, а на ділянці № 5 – низька. Встановлено, що на ділянках № 2–4 з інтенсивним рухом автотранспорту рівень акумуляції Mn, Pb і Zn у гаметофітах обох видів мохів і Cu у гаметофіті *B. rutabulum* вірогідно більший порівняно з ділянкою у Стрийському парку. У воді ставу, розташованого на ділянці № 2 з високим рівнем автотранспортного навантаження, встановлено вірогідно більшу концентрацію Cr, Cu, Fe, Pb і Zn, а в рослинах *L. minor* із цієї водойми – більший рівень акумуляції Cr, Fe і Zn порівняно зі ставом на ділянці № 5, де рівень транспортного навантаження незначний. Під час досліджень процесу накопичення металів у рослинах *L. minor* найвищі значення коефіцієнта біоакумуляції встановлено для Mn, Fe і Zn. Отримані результати свідчать про біоіндикаційний потенціал мохів *Brachythecium rutabulum* і *Pyloisia polyantha* та макрофіта *Lemna minor* і вказують на перспективність використання цих рослин під час моніторингу забруднення компонентів довкілля металами в урбоєкосистемі м. Львова та інших містах із високим рівнем транспортного навантаження.

*Ключові слова:* мохоподібні, макрофіти, метали, автотранспорт, урбоєкосистеми

Транспорт належить до важливих джерел забруднення навколишнього середовища у глобальному масштабі, причому рівень викидів шкідливих речовин, пов'язаних із транспортним сектором економіки, нині зростає у багатьох країнах світу [12, 28]. Така динаміка супроводжується погіршенням якості довкілля та має негативні наслідки для здоров'я людей і біорізноманіття. Насамперед це стосується промислових міст, для яких характерний високий рівень автотранспортного навантаження [24]. В Україні на автотранспорт припадає в середньому 34 % від загального обсягу викидів різноманітних поллютантів, проте в багатьох областях викиди від автотранспорту переважають над викидами від стаціонарних джерел [5, 12]. Серед забруднювачів, які потрапляють в атмосферу внаслідок функціонування транспортної галузі, важкі метали належать до

найбільш небезпечних [24, 31]. Metали перебувають у повітрі у складі аерозолів і дрібно- та крупнодисперсних частинок і можуть переміщуватися з атмосферними потоками на значну відстань від джерела емісії [20, 31]. Шляхом сухого та вологого осадження метали потрапляють на поверхню ґрунту, рослинний покрив і у водні об'єкти, акумулюються в компонентах наземної та водної біоти. Тому забруднення атмосферного повітря важкими металами супроводжується їхнім накопиченням в інших компонентах урбоєкосистем (ґрунт, об'єкти гідросфери), що несприятливо впливає на наземні та водні біоценози [21].

Використання рослин-біоіндикаторів – важливий метод дослідження екологічного стану довкілля [3, 7, 23]. Відомо, що інтенсивність акумуляції важких металів та деяких органічних ксенобіотиків у тканинах наземних і водяних рослин значною мірою віддзеркалює вміст цих поллютантів в абіотичних компонентах навколишнього середовища [2, 22]. У біоіндикаційних дослідженнях використовують судинні рослини і мохоподібні, які особливо придатні для екологічної оцінки стану атмосфери завдяки поглинанню ними забруднювачів, головним чином, з повітря й атмосферних опадів [3, 9, 23, 27]. Водночас під час аналізу екологічного стану урбоєкосистем біоіндикаційне значення мають водяні рослини. Низку видів водяних макрофітів визнано як біоіндикатори забруднення водойм важкими металами; крім того, поглинаючи метали, макрофіти виконують роль фітореєдматорів водного середовища [1, 17, 18, 30].

До міст, які зазнають значного впливу транспортної галузі, належить м. Львів – один із найбільших індустріальних центрів і важливий транспортний вузол на території заходу України. Упродовж останніх років кількість приватних автомобілів і засобів громадського транспорту на території м. Львова істотно зросла, що призвело до збільшення обсягу викидів шкідливих речовин [11]. Однак зв'язок між рівнем транспортного навантаження й акумуляцією важких металів у наземних і водяних рослинах на території міста не з'ясовано. Тому метою роботи було проаналізувати інтенсивність транспортного руху в окремих районах м. Львова та дослідити вміст металів у гаметофітах мохів *Brachythecium rutabulum* (Hedw.) Schimp. і *Pylaisia polyantha* (Hedw.) Schimp., а також у тканинах водяного макрофіта *Lemna minor* L., зібраних у цих районах.

#### Матеріали та методи

Територія досліджень охоплювала п'ять ділянок на території м. Львова, а саме: ділянку № 1 у Стрийському парку (49°49'24.0"N 24°01'30.0"E); ділянку № 2 в середній частині вулиці Стрийської (49°48'13.0"N 24°01'06.5"E); ділянку № 3 в кінцевій частині вулиці Стрийської (49°46'38.0"N 24°00'51.5"E); ділянку № 4 поблизу сполучення вулиць Личаківської та Пасічної (49°50'09.5"N 24°04'09.0"E); ділянку № 5 поблизу вул. Хортицької (49°48'12.5"N 24°02'04.5"E). Ділянки № 1–3 і № 5 розташовані у південній частині Львова, ділянка № 4 – у північно-східній частині міста. На ділянках № 2–5 вибрано пункти спостереження за рухом автотранспорту, ділянку № 1 трактували як умовно контрольну під час досліджень рівня акумуляції металів у гаметофітах мохів. Інтенсивність транспортного навантаження визначали методом підрахунку автомобілів різних типів згідно з методикою [10]. Аналізували кількість: 1) легкових автомобілів; 2) вантажних автомобілів різного типу; 3) автобусів різного типу. Спостереження проводили у різні періоди світлового дня; тривалість спостереження – 2 год. Дослідження повторювали тричі.

Вплив транспортного навантаження на рівень накопичення металів у гаметофітах мохоподібних вивчали з використанням мохів *Brachythecium rutabulum* і *Pylaisia polyantha*, зібраних на ділянках № 1–4. Гаметофіти моху *P. polyantha* збирали на ділянках № 1, № 2 і № 4, а моху *B. rutabulum* – на ділянках № 1 і № 3. Відбір і підготовку зразків

проводили з використанням стандартних методів [29]. Під час ідентифікації мохоподібних використовували стереоскопічний мікроскоп XS 6220.

З метою вивчення автотранспортного навантаження на вміст металів у водоймах і водяних рослинах вибрано два стави на території м. Львова, а саме: поблизу вул. Хортицької (став № 1) і в середній частині вул. Стрийської, поблизу перетину вул. Стрийська–Хуторівка–Наукова (став № 2), в яких відбирали проби води і плейстофіта ряски малої (*Lemna minor*). Стави розміщені на досліджуваних ділянках, відповідно, № 5 і № 2, неподалік пунктів спостереження за інтенсивністю транспортного руху.

У рослинному матеріалі (гаметофіти мохів, рослини *L. minor*) і у воді, відібраний із зазначених водойм, аналізували концентрацію Кадмію (Cd), Хрому (Cr), Купруму (Cu), Феруму (Fe), Мангану (Mn), Нікелю (Ni), Плюмбуму (Pb) і Цинку (Zn) із застосуванням атомно-абсорбційного спектрометра C-115PK Selmi (Україна). Зразки рослин попередньо мінералізували, використовуючи концентровану нітратну кислоту (HNO<sub>3</sub>) і гідроген пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [23]. Вміст металів у рослинах виражали в міліграмах у перерахунку на 1 кг сухої маси зразків, а у воді – в мікрограмах на 1 л. У рослинах *L. minor* визначали коефіцієнти біоаккумуляції (КБА) металів за формулою:  $KBA = C1/C2$ , де C1 – концентрація металу в рослинному матеріалі (мг/кг), C2 – концентрація металу у воді (мг/л) [19]. Результати опрацьовували методами варіаційної статистики [32].

#### Результати і їхнє обговорення

Результати досліджень свідчать про різний рівень транспортного навантаження на досліджуваних ділянках вулиць м. Львова. Інтенсивність транспортного руху на ділянках № 2–4 становить, відповідно, 726±95, 993±126 і 1189±122 транспортні засоби за 1 год, а на ділянці № 5 цей показник становить 25±4 транспортних засобів за 1 год. Відповідно до критеріїв оцінки транспортного навантаження (таких, зокрема, як добова інтенсивність транспортного руху) [11], навантаження на ділянках № 2–4 високе, а на ділянці № 5 – низьке. Встановлено, що загальна кількість транспортних засобів і кількість легкових автомобілів, які проїжджають за 1 год через пункт сполучення вул. Личаківської та Пасічної (ділянка № 4), вірогідно більші ( $p < 0,05$ ), а через ділянку № 5 (вул. Хортицька) – менші ( $p < 0,001$ ), порівняно з ділянкою № 2 (середня частина вул. Стрийської).

Результати досліджень свідчать про відмінності в інтенсивності акумуляції окремих металів у гаметофітах мохів *Pylaisia polyantha* і *Brachythecium rutabulum* за умов росту на ділянках із транспортним навантаженням (№ 2–4) і на контрольній ділянці № 1 у Стрийському парку (рис. 1). Зокрема, в гаметофітах *P. polyantha*, зібраних на ділянці № 2, концентрація Pb і Zn більша, відповідно, в 4,3 і 2,4 рази ( $p < 0,05$ ), ніж у зразках, зібраних на території парку (рис. 1, А). Гаметофіти *P. polyantha*, зібрані на ділянці № 4, характеризуються більшим рівнем акумуляції Mn, Pb і Zn, відповідно, в 4,6, 12,5 і 1,7 рази ( $p < 0,05–0,001$ ), ніж ті, що зібрані на контрольній ділянці. Виразніше збільшення концентрації Плюмбуму і Мангану в гаметофітах *P. polyantha* за умов росту на ділянці № 4, ніж на ділянці № 2, відповідає більшій інтенсивності транспортного навантаження у місці сполучення вул. Личаківська–Пасічна, порівняно зі середньою частиною вул. Стрийської.

Аналогічні різниці встановлені під час аналізу концентрації металів у зразках моху *B. rutabulum*, зібраних на ділянці № 3 (кінцева частина вул. Стрийської), порівняно з ділянкою № 1 (рис. 1, Б). Згідно з отриманими результатами, за умов росту *B. rutabulum* на ділянці № 3, яка зазнає транспортного навантаження, в гаметофітах моху значно більшою мірою акумулюються такі метали, як Zn ( $p < 0,001$ ), Cu ( $p < 0,01$ ), Mn і Pb ( $p < 0,05$ ), ніж за умов росту цього виду мохоподібних на території Стрийського парку.



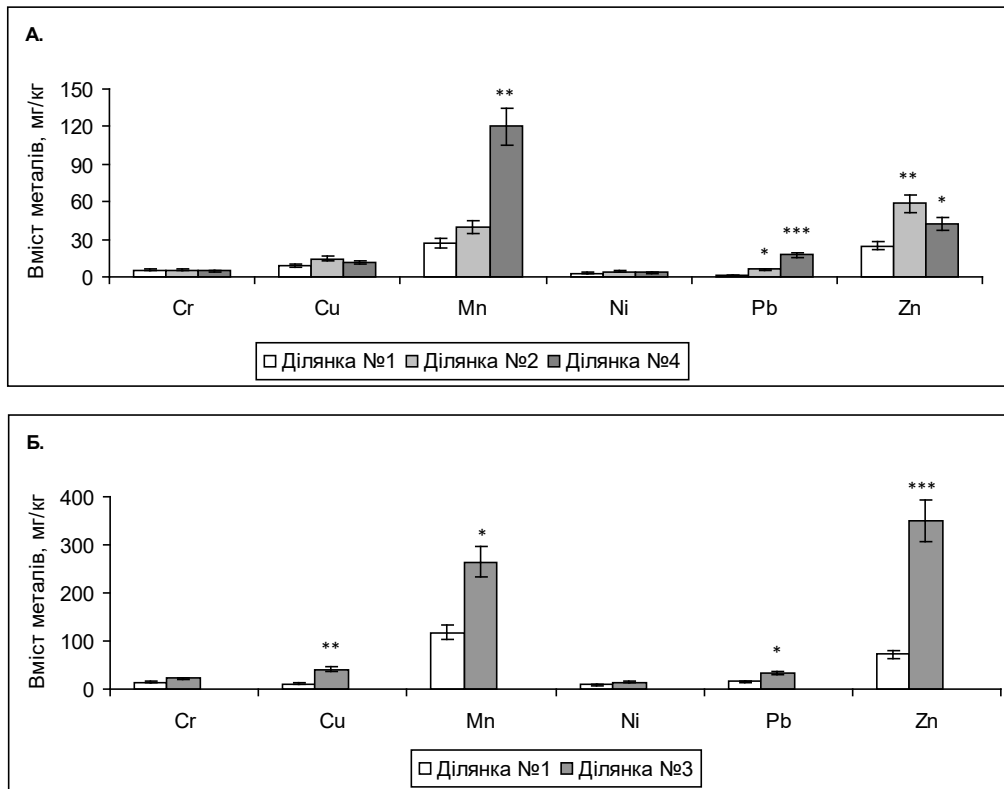


Рис. 1. Концентрація металів у гаметофітах мохів *Pylaisia polyantha* (А) і *Brachythecium rutabulum* (Б), зібраних у Стрийському парку (ділянка № 1) і на ділянках № 2–4, прилеглих до вулиць із різним рівнем транспортного навантаження ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ). Примітки: \*, \*\*, \*\*\* – вірогідність різниць між вмістом металів у гаметофітах мохів, зібраних на ділянках № 2–4 порівняно з ділянкою № 1 (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ )

Із наукових джерел відомо, що транспортне навантаження зумовлює збільшення концентрації Pb, Zn, Cu, Mn (та інших металів) в атмосферному повітрі [33]. Метали надходять у повітря з вихлопними газами автомобілів, сажею, пилом від стирання автомобільних деталей і шин, дорожнього полотна і т. д. [13, 16]. Мохоподібні завдяки морфологічним і фізіологічним особливостям (відсутність справжньої кореневої системи, відсутність або слабкий розвиток кутикули) поглинають метали, головним чином, з повітря й атмосферних опадів, а не зі субстрату, який колонізують [26, 27]. Водночас ці рослини виявляють толерантність до впливу важких металів [26]. Через те мохоподібні більшою мірою, ніж інші компоненти біоти, придатні до використання у біомоніторингових і біоіндикаційних дослідженнях стану атмосфери [26, 27]. У низці праць встановлено ефективність застосування мохів як біоіндикаторів забруднення атмосфери металами в містах України й інших країн [6, 8, 25]. Отримані в нашій роботі результати щодо високого рівня акумуляції Mn, Pb і Zn у гаметофітах *P. polyantha* і *B. rutabulum* та Cu у гаметофіті *B. rutabulum* за умов росту на територіях, прилеглих до вул. Стрийської та сполучення вул. Личаківська–Пасічна, узгоджуються з результатами спостережень щодо інтенсивного руху автотранспорту на досліджуваних ділянках і вказують на біоіндикаційний потенціал

цих видів мохоподібних під час оцінки стану атмосфери в районах із високим рівнем транспортного навантаження.

З метою детальнішого аналізу впливу транспортного навантаження на стан компонентів довкілля в урбоекосистемі м. Львова проведено дослідження вмісту важких металів у воді двох ставів, розташованих, відповідно, поблизу вул. Хортицької (став № 1) і в середній частині вул. Стрийської (став № 2), та рівня акумуляції металів у тканинах плейстофіта *Lemna minor*, зібраного в цих водоймах. Згідно з отриманими результатами, концентрація всіх досліджуваних металів, окрім Cd і Mn, значно більша у воді ставу № 2, розташованого на ділянці з інтенсивним транспортним рухом, порівняно зі ставом № 1, розміщеним на ділянці, де інтенсивність транспортного руху невисока (табл. 1). Найвиразнішу різницю між зазначеними водоймами виявлено в концентрації Zn і Cu (відповідно, в 3,4 і 2,9 разу,  $p < 0,01-0,001$ ), а вміст Cr, Fe і Pb у воді ставів відрізняється, відповідно, в 1,8, 1,6 і 1,9 разу ( $p < 0,05$ ). Такі результати вказують на зв'язок між рівнем транспортного навантаження та забрудненням водного середовища важкими металами. Потрібно зазначити, що вода в обох ставах має високу концентрацію Pb, а за середнім вмістом у воді досліджуваних водойм метали можна розмістити в такому порядку: Fe > Mn > Pb > Zn > Cu > Cr > Cd (табл. 1). Варто зауважити, що високий вміст Pb виявлено і під час досліджень води р. Зубри, русло якої пролягає у південній частині м. Львова [15].

Як відомо, забруднення водойм важкими металами супроводжується їхнім поглинанням і накопиченням у водяних рослинах. Плейстофіти, зокрема, *Lemna minor*, є зручними об'єктами у моніторингових дослідженнях стану водного середовища, оскільки ці рослини не контактують із донними відкладами, а абсорбують метали й інші забруднювачі з товщі води через кореневу систему і поверхню листків, яка стикається з водою. У низці праць встановлено, що різні види роду *Lemna* L. стійкі до дії важких металів і можуть накопичувати їх у високій концентрації [1, 4, 14, 17, 30].

Результати наших досліджень свідчать, що зразки *L. minor*, зібрані зі ставу № 2, містять більшу концентрацію Cr, Fe і Zn, відповідно, в 1,7, 1,5 і 3,2 разу ( $p < 0,05-0,01$ ), ніж рослини зі ставу № 1, розміщеного на ділянці з низьким рівнем транспортного навантаження (табл. 1). Проте вірогідних різниць у концентрації Cu і Pb у зразках ряски із зазначених водойм не виявлено, незважаючи на значні відмінності в концентрації цих металів у воді. Аналіз коефіцієнта біоаккумуляції металів у рослинах *L. minor* свідчить, що цей показник для Cu значно менший у зразках, зібраних зі ставу № 2, порівняно зі зразками ряски зі ставу № 1 (табл. 1). Подібний ефект, хоча й меншою мірою, виявляється щодо Pb. З отриманих даних випливає, що за більшого вмісту Cu і Pb у воді зі ставу № 2 рівень їхньої абсорбції та акумуляції у тканинах *L. minor* відбувається менш інтенсивно, ніж у діапазоні низьких концентрацій зазначених металів у водному середовищі ставу № 1. Натомість, коефіцієнти біоаккумуляції інших металів (у діапазоні концентрацій, зареєстрованих у воді досліджуваних ставів) вказують на пропорційну залежність між їхнім вмістом у водному середовищі та рівнем накопичення у рослинах *L. minor*. Загалом, у цьому дослідженні найбільші значення коефіцієнта біоаккумуляції у рослинах *L. minor* встановлено для Mn (790,3), Fe (416,9) і Zn (331,8) (табл. 1). Такі результати свідчать про біоіндикаційні властивості *L. minor* і значний біоремедіаційний потенціал цього макрофіта. Можливість використання *L. minor* та інших видів ряски з метою очищення стічних вод різноманітних підприємств від важких металів відзначено і в інших експериментальних працях [14, 18].

Вміст металів у воді та рослинах *Lemna minor*  
зі ставів на території м. Львова ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ )

Метали	Став № 1			Став № 2		
	Вміст металів	Вміст металів	КБА	Вміст металів	Вміст металів	КБА
	у воді, мкг/л	у рослинах, мг/кг		у воді, мкг/л	у рослинах, мг/кг	
Cd	2,45±0,30	0,043±0,005	17,9	3,20±0,50	0,052±0,008	16,3
Cr	3,49±0,36	0,148±0,02	42,4	6,34±0,90*	0,247±0,028*	39,0
Cu	6,125±0,80	0,712±0,111	116,2	17,53±2,11**	0,985±0,140	56,2
Fe	331,0±28,0	138,0±11,2	416,9	514,0±47,0*	208,4±24,6*	405,4
Mn	193,1±42,0	152,6±21,0	790,3	224,0±46,0	173,2±28,9	773,2
Pb	11,3±1,7	0,315±0,038	27,8	21,4±2,6*	0,392±0,054	18,3
Zn	6,91±1,12	2,293±0,245	331,8	23,34±1,96***	7,216±0,811**	309,2

**Примітка:** \*, \*\*, \*\*\* – вірогідність різниць у концентрації металів між пробами води і рослинного матеріалу зі ставів № 1 і № 2 (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ )

Результати досліджень доводять, що забруднення атмосферного повітря і водного середовища, зумовлене високим рівнем автотранспортного навантаження в окремих районах м. Львова, супроводжується підвищенням рівня акумуляції важких металів у гаметофітах мохів *Brachythecium rutabulum* і *Pylaisia polyantha* та водяного макрофіта *Lemna minor*, порівняно з рослинами, які ростуть, відповідно, на території Стрийського парку й у водоймі на ділянці з незначною інтенсивністю транспортного руху. Отримані в роботі результати свідчать про біоіндикаційний потенціал мохів *B. rutabulum* і *P. polyantha* та макрофіта *L. minor* і вказують на перспективність використання цих рослин під час моніторингу забруднення компонентів довкілля металами в урбоєкосистемі м. Львова та в інших містах з високим рівнем транспортного навантаження. Водночас результати досліджень вказують на високу здатність *L. minor* до накопичення важких металів у забруднених водоймах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антоняк Г. Л., Багдай Т. В., Першин О. І. та ін. Метали у водних екосистемах та їх вплив на гідробіонти // Біологія тварин. 2015. Т. 17. № 2. С. 9–24.
2. Антоняк Г. Л., Мамчур З. І., Першин О. І. та ін. Біологічна доступність металів та їх акумуляція в тканинах рослин // Вісн. проблем біології і медицини. 2015. Вип. 3. № 2. С. 11–16.
3. Бойко М. Ф. Характеристика мохоподібних як індикаторів стану навколишнього середовища // Чорноморськ. бот. журнал. 2010. Т. 6. № 1. С. 35–40.
4. Бубис О., Антоняк Г. Вплив кадмію, плюмбуму і хрому (VI) на активність ензимів антиоксидантної системи в клітинах ряски (*Lemna minor* L.) // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2014. Вип. 65. С. 161–169.
5. Васькін Р. А., Васькіна І. В. Аналіз динаміки забруднення атмосферного повітря України викидами автотранспорту // Вісн. Кременчуцьк. держ. політех. ун-ту. 2009. Вип. 5 (58). Ч. 1. С. 109–112.
6. Глухов О. З., Маїталер О. В. Індикація техногенного забруднення середовища із застосуванням мохів // Промышленная ботаника. 2007. Вип. 7. С. 3–10.
7. Дідух Я. П., Плюта П. Г. Фітоіндикація екологічних факторів. К., 1994. 280 с.
8. Комісар О. С., Бойко М. Ф. Важкі метали в гаметофітах моху *Bryum argenteum* Hedw. та ґрунтах на територіях заводів міста Миколаєва (Україна) // Чорноморськ. бот. журнал. 2013. Т. 9. № 4. С. 533–541.
9. Мамчур З. Урбанofільні епіфітні мохи у м. Львові // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 54. С. 115–122.

10. М 218-02070915-674:2010. Методика визначення рівня завантаженості та пропускної здатності автомобільних доріг. К., 2010. Режим доступу: [http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id\\_doc=25990](http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=25990)
11. Паньків Н. Є., Тетерко Н. З. Оцінювання забруднення атмосферного повітря внаслідок завантаженості вулиць Львова автотранспортом // Наук. вісн. НЛТУ України. 2016. Вип. 26.8. С. 215–223.
12. Першаков В. М., Белятинський А. О., Степанчук О. В., Кротов Р. В. Дослідження транспортних потоків в аспекті заторових станів дорожнього руху. К.: НАУ, 2015. 177 с.
13. Adamiec E., Jarosz-Krzemińska E., Wieszała R. Heavy metals from non-exhaust vehicle emissions in urban and motorway road dusts // Environ. Monit. Assess. 2016. Vol. 188. P. 369.
14. Al-Khafaji M. S., Al-Ani F. H., Ibrahim A. F. Removal of some heavy metals from industrial wastewater by *Lemna minor* // KSCE J. Civ. Eng. 2018. Vol. 22. N 4. P. 1077–1082.
15. Antonyak H., Lesiv M., Panas N., Yanyshyn S. Levels of heavy metals in several rivers of the Western Bug and Dniester basins in the Lviv region (Western Ukraine) // Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej. 2019. Vol. 35. N 4. P. 11–18.
16. Awofolu O. R. Impact of automobile exhaust on levels of lead in a commercial food from bus terminals // J. Appl. Sci. Environ. Manage. 2004. Vol. 8. N 1. P. 23–27.
17. Bonanno G., Borg J. A., Di Martino V. Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: A comparative assessment // Sci. Total Environ. 2017. Vol. 576. P. 796–806.
18. Galczyńska M., Mańkowska N., Milke J., Buśko M. Possibilities and limitations of using *Lemna minor*, *Hydrocharis morsus-ranae* and *Ceratophyllum demersum* in removing metals with contaminated water // J. Water Land Dev. 2019. N 40 (I–III). P. 161–173.
19. Hawker D., Connell D. An evaluation between bioconcentration factor and aqueous solubility // Chemosphere. 1991. Vol. 23. P. 231–241.
20. Hsu C. Y., Chiang H. C., Chen M. J. et al. Impacts of hazardous metals and PAHs in fine and coarse particles with long-range transports in Taipei City // Environ. Pollut. 2019. Vol. 250. P. 934–943.
21. Järup L. Hazards of heavy metal contamination // Br. Med. Bull. 2003. Vol. 68. N 1. P. 167–182.
22. Kumar D., Anand S., Tiwari J. et al. Removal of inorganic and organic contaminants from terrestrial and aquatic ecosystems through phytoremediation and biosorption. In: Environmental Biotechnology: For Sustainable Future / Eds. R. C. Sobti, A. Kumar, K. R. Naveen. Springer Nature Singapore, 2019. P. 45–71.
23. Ogunkunle C. O., Ziyath A. M., Rufai S. S., Fatoba P. O. Surrogate approach to determine heavy metal loads in a moss species – *Barbula lambaranensis* // J. King Saud Univ. Sci. 2016. Vol. 28. N 2. P. 193–197.
24. Pan L., Wang Y., Ma J. et al. A review of heavy metal pollution levels and health risk assessment of urban soils in Chinese cities // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2018. Vol. 25. N 2. P. 1055–1069.
25. Qarri F., Lazo P., Allajbeu S. et al. The evaluation of air quality in Albania by moss biomonitoring and metals atmospheric deposition // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2019. Vol. 76. P. 554–571.
26. Stanković J. D., Sabovljević A. D., Sabovljević M. S. Bryophytes and heavy metals: a review // Acta Bot. Croat. 2018. Vol. 77. N 2. P. 109–118.
27. Tessier L., Boisvert J. L. Performance of terrestrial bryophytes as biomonitors of atmospheric pollution. A review // Toxicol. Environ. Chem. 1999. Vol. 68. P. 179–220.

28. Tian X., Dai H., Geng Y. et al. Economic impacts from PM2.5 pollution-related health effects in China's road transport sector: A provincial-level analysis // *Environ. Int.* 2018. Vol. 115. P. 220–229.
29. Vanderpoorten A., Papp B., Gradstein R. Sampling of bryophytes. Chapter 13. In: *Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories* / Eds. J. Eymann, J. Degreef, Ch. Häuser et al. Belgian Development Cooperation, 2010. P. 331–345.
30. Velichkova K., Sirakov I., Valkova E. et al. Bioaccumulation and protein content of *Lemna minuta* Kunth and *Lemna valdiviana* Phil. in Bulgarian water reservoirs // *Scientific Papers. Series E. Land Reclamation, Earth Observation & Surveying, Environmental Engineering.* 2017. Vol. 6. P. 104–107.
31. Wan D., Yang G., Yang J., Zhan C. Ecological risks and spatial distributions of heavy metals in Beijing atmospheric dust // *Polish J. Environ. Stud.* 2018. Vol. 27. N 2. P. 881–887.
32. Welham S. J., Gezan S. A., Clark S. J., Mead A. *Statistical Methods in Biology. Design and Analysis of Experiments and Regression.* Taylor & Francis Group, LLC, 2015. 568 p.
33. Yaylalı-Abanuz G. Application of multivariate statistics in the source identification of heavy-metal pollution in roadside soils of Bursa, Turkey // *Arabian Journal of Geosciences.* 2019. Vol. 12. P. 382.

Стаття надійшла до редакції 04.02.20

прийнята до друку 02.06.20

## IMPACT OF VEHICULAR TRAFFIC ON THE ACCUMULATION OF METALS BY PLANTS IN THE TERRITORY OF LVIV

A. Polishchuk, M. Lesiv, H. Antonyak

*Ivan Franko National University of Lviv  
1, Saksagansky St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: alex1994pol@gmail.com*

The study was aimed at investigating the effect of traffic load on the accumulation of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) by moss gametophytes (*Brachythecium rutabulum* and *Pylaisia polyantha*) and aquatic macrophyte *Lemna minor* in the territory of the city of Lviv (Ukraine). In the course of the study, five sites were selected: site 1 in the territory of the Stryiskyi Park, which was used as a control one, and sites 2–5, in which the traffic intensity was analyzed and plant samples were collected. Sites 2 and 3 were selected in the middle and end parts of Stryiska Street, respectively, site 4 was located near the junction of Lychakivska and Pasichna streets, and site 5 was chosen in the immediate vicinity of Khortytska Street. Gametophytes of mosses *B. rutabulum* and *P. polyantha* were collected at sites 1–4 and analyzed for metals content; two ponds were selected at sites 2 and 5, respectively, and metal concentrations were analyzed in water and in the samples of *L. minor*. Metal concentrations were determined using a Selmi C-115PK atomic absorption spectrometer. According to observations, the daily traffic intensity at sites 2–4 was high; at the same time, site 5 was characterized by low traffic intensity. It was found that at sites 2–4 with heavy vehicular traffic, the accumulation levels of Mn, Pb, and Zn in gametophytes of both species of mosses and Cu in gametophyte of *B. rutabulum* were significantly higher compared to the control site in Stryiskyi Park. Significantly higher concentrations of Cr, Cu, Fe, Pb and Zn were found in the water of the pond located at site 2 with a high level of transport load (the middle part of Stryiska Street) compared to the pond at site 5, where the level of transport load was negligible; samples of *L. minor* from this reservoir were characterized by a higher

---

content of Cr, Fe, and Zn compared to the pond at site 5. Investigating the accumulation of metals in *L. minor*, the highest values of bioaccumulation factors were found for Mn, Fe, and Zn. The obtained results show the bioindication potential of the plants *Brachythecium rutabulum*, *Pylaisia polyantha* and *Lemna minor*, and suggest that these species can be used to assess environmental pollution by heavy metals in the urban ecosystem of Lviv and in other areas with high traffic density.

*Keywords:* bryophytes, aquatic macrophytes, metals, vehicular traffic, urban ecosystems

## SPHAGNUM MOSSES OF THE MALE POLISSYA (LVIV REGION)

**Z. Mamchur, Yu. Drach, S. Prytula**

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

The article summarizes current data about the condition and spread of Sphagnum mosses on the territory of Male Polissya in Lviv Region based on the material from our own field research, materials of National Herbarium of Ukraine (*KW*), the Herbarium National Museum of Natural History of the National Academy of Sciences of Ukraine (*LWS*) and literature data. An annotated list of the species of the genus *Sphagnum* was compiled and it includes 15 species together with an indication of place and date of collection, the names of collectors, the spread in Ukraine and biotopes in which the species may occur according to The National Habitat Catalogue of Ukraine and EUNIS. *Sphagnum fallax* (Klinggr.) Klinggr., *S. fimbriatum* Wils. and *S. palustre* L. were determined as the most widespread species of the genus *Sphagnum* in the research area. Two species *S. angustifolium* and *S. inundatum* are indicated for the first time for the territory of Lviv region.

Six regionally rare species were found: *S. capillifolium*, *S. cuspidatum*, *S. fallax*, *S. fimbriatum*, *S. obtusum* and *S. papillosum*. The possible disappearance of a species *Sphagnum centrale*, *S. contortum*, *S. flexuosum* and *S. obtusum* on the territory of the Volytsky Botanical Reserve of national importance was established owing to the draining of wetlands.

Ecological groups of sphagnum species on the research area were analyzed, where the predominance of subheliophytes (7 species, 46.7 %), hygrophytes (13 species, 86.7 %), cold tolerant species (13 or 87.7 %) and acidophiles (8 species, 53.3 %) was identified.

The topicality of the study is determined by the fact that sphagnum mosses are spread much less frequently than other species from the division of bryophytes because they are confined to a narrow range of biotopes. With the drastic changes in the hydrological regime of the environment, which occurred during the second half of the twentieth century, due to the large areas of drained land, the processes of biotope dehydration became irreversible and some species of sphagnum could have disappeared from the territory of Male Polissya.

Due to the sensitivity of bryophytes, in particular species of the sphagnum genus, and due to a disturbance of the hydrological regime of wetlands, the waterlogged mixed coniferous forest in the vicinity of the village Kulychkiv is a promising territory for the creation of a new environmentally protected site or the extension of the Volytsky Botanical Reserve of national importance for the purpose of wetlands preservation here.

*Keywords:* sphagnum mosses, Male Polissya, Volytsky Botanical Reserve, biotopes

### Introduction

The natural area of Male Polissya lies within four regions of Ukraine and covers the northern part of Lviv Region, the southern and southwestern parts of Rivne Region, and partly the north of Ternopil and Khmelnytsky Regions. In Lviv Region, Male Polissya is located within the Volyn-Podolian Upland and has the largest area of wetlands that constitute 59.7 % of the swamps of Lviv Region plains [15]. During the second half of the twentieth century, large areas of these lands were damaged as a consequence of reclamation works, which had an adverse impact on the biogeocenotic cover. As a result, many species from the wetland habitats of this area are now on the verge of extinction and are listed in the Red Data Book of Ukraine (2009). Apparently, there

are reasons to assert that there has been a reduction in the biodiversity of mosses in this area, including sphagnum mosses.

Sphagnum mosses are an important component of the vegetation of sphagnum bogs in swampy forests and wet meadows. With a low need for mineral nutrition, sphagnum mosses can grow on poor soils. Due to their ecological, morphological and anatomical features, as well as the specifics of nutrition, sphagnum mosses are much less common than other species of the division of bryophytes. Instead, they are characterized by a fairly high moisture-holding capacity, as the tissues of these plants consist of two types of cells: dead hyaline cells and living chlorophyllose cells. Anatomical and morphological features of sphagnum mosses, particularly such adaptations as branching architecture, the size and location of leaves on branches and the presence of hyaline cells, enable them to store and transport water. In all species, dead hyaline cells of leaves and stems provide water storage. After surviving significant dehydration, dead hyaline cells are capable of filling with water at the lowest moisture supply, which enables plants to maintain their life functions [7, 20, 22]. This feature is reflected in the name of the genus: in Greek “sphagnus” means “a sponge”.

With the dramatic changes in the hydrological regime of the environment that occurred during the second half of the twentieth century, considering the fact that the area of drained land in this locality was the largest in Ukraine (513.2 thousand hectares, which constitutes 23.5 % of the region’s area) [18], dehydration processes in the biotopes could have become irreversible and sphagnums could have disappeared from certain areas.

Today, there is little information about sphagnum mosses of Male Polissya. From the present-day botanical reserve of national importance “Volytsky”, we have data provided by the Ukrainian researcher, geobotanist and swamp scientist E. Bradis (1950s) [23] and Lviv botanist O. Kuzyarin [14]. In recent decades, studies of coal dumps in the Lviv-Volyn mining region and within the floodplain of the Western Bug River basin have added to the list of species of the genus *Sphagnum* [13, 14].

To understand the present state of the biodiversity and the processes that occur in the research area, it is necessary to conduct an inventory of species diversity of the biota in the first place. Therefore, the aim of our research was to summarize information on the species composition and current distribution of sphagnum mosses on the territory of Male Polissya within Lviv Region.

### Research Area

The western part of Male Polissya is located within the Galicia-Volyn basin. Upper Cretaceous marls with waterproof clay crust are the most common type of rock there. The basin location and, accordingly, the complicated runoff of precipitation contribute to waterlogging of the territory [8, 9].

The area is characterized by water-glacial, alluvial and aeolian (sandy and loess) formations and associated forest ridges, sand dunes and sandy “pine” floodplain terraces, sprawling leveled plains of water-glacial and fluvial accumulation along the main rivers – the Bug and the Styr – and their tributaries [15]. The physical and geographical region of Male Polissya forms an inner lowland with lower absolute heights than the surrounding uplands. The preserved vegetation is dominated by forests, of which the main type are forests consisting of *Pinus sylvestris* L. mixed with *Quercus robur* L., *Populus sp.*, *Betula sp.*, *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth and occasionally *Carpinus betulus* L. The valley of the Western Bug River is dominated by meadows, whereas swamps remain in the valleys of small rivers: the Solokiya, the Bolotnya, the Rata, and the Mlynivka [8, 9].



### Materials and Methods

In the study, we used materials collected during our own field research (35 specimens), data from the National Herbarium of Ukraine (KW), the Museum of Natural History Herbarium, National Academy of Sciences of Ukraine (LWS), and literature data [3, 13, 14, 23].

In the field research, conducted during the vegetation periods of 2018–2019 on the territory of Male Polissya within Lviv Region, the traditional route method was used. The largest number of specimens and the largest number of sphagnum moss species were collected in the Volytsky Botanical Reserve and the adjacent wetlands, in particular in the forests around the village of Kulychkiiv (Fig. 1). Collection and determination were performed according to traditional methods. Latin taxon names were used in accordance with the nomenclature developed by M. Boiko [2]. Ecological groups of bryophytes in relation to light and moisture were determined on the basis of our own observations using the values of the Ellenberg indicators elaborated by R. Düll [5] and M.O. Hill et al. [10].

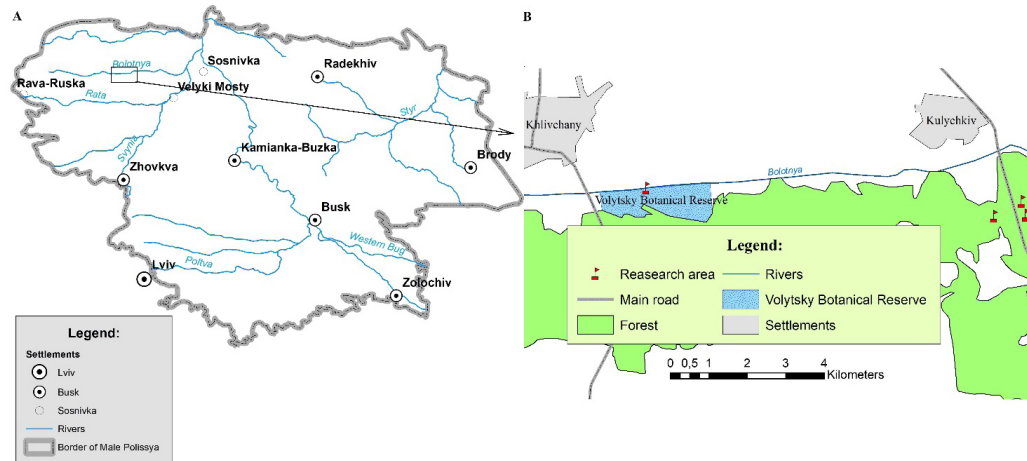


Fig. 1. Map of the research area: (A) Male Polissya within Lviv Region; (B) the Volytsky Botanical Reserve of national importance and the waterlogged mixed coniferous forest in the vicinity of Kulychkiiv village

### Results and Discussion

Based on the results of our own field research as well as the herbarium and literature data, a list including 15 species of *Sphagnum* mosses of Male Polissya was compiled. It indicates a considerable species diversity, as only 26 species of the genus *Sphagnum* are known for Volyn Polissya, and 32 – for Ukraine [2].

The Volytsky Botanical Reserve of national importance located within Sokal District of Lviv Region with the area of 150 hectares was founded in 1978 with the aim to preserve the sedge-sphagnum functional group in the swampy valley of the Bolotnya River (now Khlivchanske Forestry of the Rava-Ruska Forestry State Enterprise – 22, 23, 24 forest quarters).

E. Bradis previously described this territory as a complex of marshes with *Eriophorum vaginatum* and species of the genus *Carex* and elevated areas covered with a continuous sphagnum carpet of *Sphagnum palustre*<sup>1</sup> mixed with *Sphagnum flexuosum* [3]. Today, the mesotrophic swamp of the Volytsky Botanical Reserve has undergone significant changes due to the creation of drainage reclamation canals in the swampy valley of the Bolotnya River. As a consequence of

<sup>1</sup> Species authors are indicated in the annotated list

the violation of the hydrological regime, there has been a significant decrease in the groundwater level, which in different periods can decline from 0.80 to 1.4 m [21]. In addition, self-afforestation by *Pinus sylvestris* can now be observed in this area.

Other research sites – the swampy forests around the village of Kulychkiv (2 and 3 forest quarters) – include mixed coniferous forests where areas with undisturbed hydrological regime have been partially preserved. Five species of sphagnum mosses with a fairly significant projection cover (over 50 %) were found in this area.

Having surveyed the swamps of the Volytsky Botanical Reserve and the forests around the village of Kulychkiv, we identified seven species of the genus *Sphagnum*: *S. angustifolium* (1 locality), *S. cuspidatum* (2), *S. fallax* (3), *S. fimbriatum* (3), *S. girgensohnii* (1), *S. palustre* (5) i *S. squarrosum* (1) (Fig. 2, Table).

According to E. Bradis, such species as *Sphagnum centrale*, *S. contortum*, *S. obtusum*, and *S. flexuosum* were found in the vicinity of Khlivchany village. To date, we have not confirmed the distribution of these species; other researchers (O. Kuzyarin) did not find them either. It is possible that these species disappeared as a result of reclamation drainage works carried out in this territory and the associated disappearance or reduction of biotopes suitable for their life.

Considering the complexity of the identification of species of *S. recurvum* complex [6], the latter could have been included here by mistake. Most of the specimens that we found belong to *S. fallax*, and one specimen belongs to *S. angustifolium*.

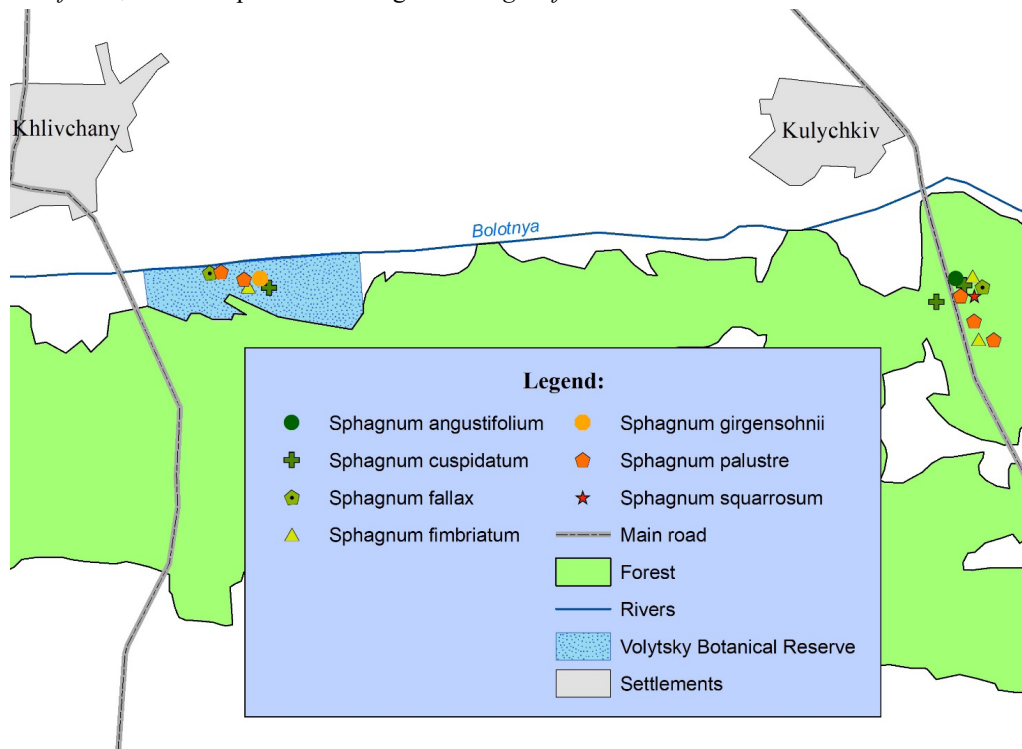


Fig. 2. Distribution of mosses genus *Sphagnum* on the territory of Volytsky Botanical Reserve of national importance and the waterlogged mixed coniferous forest in the vicinity of Kulychkiv village

According to our findings and materials of the Museum of Natural History Herbarium, National Academy of Sciences of Ukraine (LWS) as well as literature sources on Male Polissiya

[13, 14, 23], *Sphagnum capillifolium*, *S. cuspidatum*, *S. fallax*, *S. fimbriatum*, *S. girgensohnii*, *S. inundatum*, *S. magellanicum*, *S. palustre*, *S. papillosum*, *S. squarrosus* occur in other parts of the research area. The most common species of the genus *Sphagnum* in the area under study are *S. palustre*, *S. fimbriatum* і *S. fallax*.

Environmental conditions, particularly the mode of humidification and lighting, are extremely important for sphagnum mosses (Table).

Ecological analysis of the studied species by their response to light indicates the predominance of species that prefer moderately and well-lit areas – subheliophytes (7 species, 46.7 %), heliophytes (5 species, 33.3 %), and hemiscyophytes (3 species, 20 %) on the territory of Male Polissya within Lviv Region. Anatomical and morphological features of sphagnum mosses account for the predominance of light-loving species.

In terms of temperature regime, cold-tolerant species predominate (13, or 87.7 %) and two species are indifferent to temperature (13.3 %). Sphagnums include species that inhabit swamps and wetlands; therefore, they are dominated by hygrophytes (13 species – 86.7 %).

In terms of the reaction to the substrate, predominate acidophiles (8 species, 53.3 %) and hyperacidophiles (4 species, 26.7 %) – the species that are adapted to the conditions of acidic and highly acidic substrate. We detected slightly fewer subacidophiles (3 species – 20 %).

The characteristic life form of sphagnum facilitates the formation of a continuous carpet of many intertwined plant stems, due to which sphagnum mosses can reduce evaporation and retain water for a long time.

Species composition and ecological characteristics of sphagnum mosses of Male Polissya within Lviv Region

Species	Ecological characteristics
<i>Sphagnum angustifolium</i>	subheliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, acidophile
<i>Sphagnum capillifolium</i>	subheliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, acidophile
<i>Sphagnum centrale</i>	subheliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, hyperacidophile
<i>Sphagnum contortum</i>	heliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, subacidophile
<i>Sphagnum cuspidatum</i>	heliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, hyperacidophile
<i>Sphagnum fallax</i>	subheliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, acidophile
<i>Sphagnum fimbriatum</i>	hemiscyophyte, cold-tolerant, hygrophyte, acidophile
<i>Sphagnum flexuosum</i>	subheliophyte, cold-tolerant, hygromesophyte, acidophile
<i>Sphagnum girgensohnii</i>	hemiscyophyte, cold-tolerant, hygrophyte, subacidophiles
<i>Sphagnum inundatum</i>	subheliophyte, indifferent to temperature, hygrophyte, acidophile
<i>Sphagnum magellanicum</i>	heliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, hyperacidophile
<i>Sphagnum obtusum</i>	heliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, acidophile
<i>Sphagnum palustre</i>	subheliophyte, cold-tolerant, hygromesophyte, acidophile
<i>Sphagnum papillosum</i>	heliophyte, cold-tolerant, hygrophyte, hyperacidophile
<i>Sphagnum squarrosus</i>	hemiscyophyte, indifferent to temperature, hygrophyte, subacidophile

Among the abovementioned species, six are rare for the region under study: *Sphagnum capillifolium*, *S. cuspidatum*, *S. fallax*, *S. fimbriatum*, *S. obtusum* and *S. papillosum* [1]. *Sphagnum fimbriatum*, which was found in the Volytsky Botanical Reserve and in the waterlogged mixed coniferous forest near the village of Kulychkiv, is included in the list of plant species under partial protection in Poland [19].

Due to the sensitivity of mosses, especially species of the genus *Sphagnum*, to disturbances of the hydrological regime of wetlands, the waterlogged mixed coniferous forest near the village of Kulychkiv can be a promising area for the creation of a new conservation facility. Alternatively, this area can be included into the Volytsky Botanical Reserve with the aim of protecting the sedge-sphagnum forest swamp here.

Sphagnum mosses are important components of many swamps and wetlands that form the living conditions for other components. Therefore, they are known as “ecosystem engineers”.

Due to such properties, sphagnum mosses can be used as sensitive bioindicators at the beginning of these processes [16].

Changes in the hydrological regime, the chemical composition, the acidity of the substrate, lighting and temperature regime can lead to the complete loss of these species from the natural environment. Such changes can be observed in the study area and are a consequence of both direct anthropogenic intervention (direct destruction of the biotopes by hydraulic engineering, the lowering of groundwater levels through drainage reclamation works, afforestation resulting from the irrationally chosen conservation regime, etc.) and a probable global climate change.

It is extremely important to preserve sphagnum mosses habitats, especially bogs and mesotrophic swamps, which have disappeared en masse in recent decades. It is also important to ensure the quality of the biotopes, as another factor that adversely affects the viability of sphagnum is the entry of nutrients from agricultural lands. Most peat mosses grow in nutrient-poor habitats, and eutrophication through anthropogenic activity exerts a negative influence on their life processes. Swiss bryologists suggest creating buffer zones large enough to protect wetland biotopes with sphagnum mosses from agricultural farms. It should be noted that in Switzerland all species of the genus *Sphagnum* are protected at the state or regional levels [11].

The species composition and distribution of sphagnum mosses in Male Polissya requires further detailed study, as the inventory of these species will provide an opportunity to thoroughly assess the consequences of land drainage in Lviv Region. Preservation of sphagnums and their habitats on the territory of Male Polissya is important inasmuch as swamps are peat sponges that retain moisture and maintain normal water levels of rivers not only of Male Polissya but also of the Volyn-Podolian Upland.

#### **Annotated list of the species of the genus *Sphagnum* for the natural area of Male Polissya (Lviv Region)**

The annotated list has been compiled based on the materials of our own study, data from Herbaria (KW, LWS), and literature sources [13, 14, 23].

The list for each species indicates:

- name and its synonyms in brackets:
- sites of collection:
- collectors' names and collection dates, or literature data:
- distribution in Ukraine [2, 23]:
- biotopes where the species occurs according to the National Habitat Catalogue of Ukraine (NHB) [17].
- biotopes according to *EUNIS* [4].

***Sphagnum angustifolium*** (C.Jensen ex. Russow) C.Jensen – Sokal District: near Kulychkiv, 2 forest quarter, mixed swampy forest, 50°17'07.5"N 24°06'20.8"E (Drach, Mamchur, 2018).

Distribution in Ukraine: Carpathian Mountains, Polissya.

*NHB*: Б4.1 Raised bogs. Б4.2 Spring fens. Б3 Mesotrophic mires. Б2.1.2 Rich fens with calcium-tolerant sphagnum mosses Д1.7.1 Eutrophic swamps with layer of black alder or birch.

*EUNIS*: D1.1 Raised bogs. D2.2 Valley mires, poor fens and transition mires D2.3: Transition mires and quaking bogs. D4.1 Rich fens, including eutrophic tallherb fens and calcareous flushes and soaks. G1.5 Broadleaved swamp woodland on acid peat.

***Sphagnum capillifolium*** (Ehrh.) Hedw. – Sokal District: Chervonohrad mining region, coal dumps of mines «Vizejs'ka» (Kuzyarin, 2013; LWS).

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Foothills, Carpathian Mountains, Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б4.1 Raised bogs. Б4.2 Spring fens. Д1.5.3 Wet oligomesotrophic birch forests. Д2.2.3 Wet scots pine forests. Д2.2.5 Arolla pine forests. Д2.5.1 Bogs with spruce layer. Д2.5.2 Bogs with a layer of pine. С3.5 Anthropogenic outcrops, spoil tips and tailings without vegetation.

*EUNIS*: D1.1 Raised bogs. D2.3 Transition mires and quaking bogs. G3.E Nemoral bog conifer woodland. G4.1 Mixed swamp woodland. X04: Raised bog complexes. G5.6 Early-stage natural and semi-natural woodlands and regrowth. J6.5 Industrial waste.

***Sphagnum centrale*** C. Jensen – Sokal District: near Khlivchany, eutrophic sedge-sphagnum swamp, (1956, Bradis, Kucheryava, Zerov; KW); near Prystan, swamp alder forest (Bradis, Kucheryava, 1956; KW).

Distribution in Ukraine: Carpathian Mountains, Polissya, Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б4.2. Spring fens. Д1.7.2 Bogs with layer of birch. Д2.1.1 Lowland spruce forests.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs. G1.5 Broadleaved swamp woodland on acid peat. G3.1 *Abies* and *Picea* woodland. G4.1 Mixed swamp woodland.

***Sphagnum contortum*** Schultz – Sokal District: near Prystan, swamp alder forest (Bradis, Kucheryava, 1956; KW).

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Mountains, Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б2.1.2 Rich fens with calcium-tolerant sphagnum mosses. Б3 Mesotrophic mires.

Б4.2. Spring fens.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs. D4.1 Rich fens, including eutrophic tallherb fens and calcareous flushes and soaks.

***Sphagnum cuspidatum*** Ehrh. ex Hoffm. – Sokal District: near Prystan, forest cottage (Bradis, Kucheryava, 1956; KW); Volytsky Botanical Reserve, Pine forest, sphagnum-cranberry swamp, 50°17'19.0"N 23°58'30.6"E (Drach, Mamchur, 2018); near Kulychkiv, 2 forest quarter, mixed swampy forest, 50°17'05.5"N 24°06'14.7"E (Drach, Mamchur, 2018); near Sosnivka, Sosnivka forestry, swamp (Kuzyarin, 2008; LWS).

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Mountains, Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.2 Spring fens. Б1.1.4 Dystrophic waters with macrophyte vegetation. Д2.5.2 Bogs with layer of pine.

*EUNIS*: C1.4 Permanent dystrophic lakes, ponds and pools. D2.3 Transition mires and quaking bogs. G3.E Nemoral bog conifer woodland. G4.1 Mixed swamp woodland. G5.6 Early-stage natural and semi-natural woodlands and regrowth. X04 Raised bog complexes.

***Sphagnum fallax*** (Klinggr.) Klinggr. (*S. recurvum* var. *recurvum* P. Beauv., *S. recurvum* var. *mucronatum* (Russ.) Warnst.) – Sokal District: 1 km northward from Sosnivka, wet meadow (Kuzyarin, 2003, 2006; LWS), Volytsky Botanical Reserve, Pine forest, sphagnum-cranberry swamp, 50°17'29.0"N 23°58'13.6"E (Kuzyarin, 1991; LWS; Drach, Mamchur, 2018); near Kulychkiv, 2 forest quarter, mixed swampy forest, 50°17'07.5"N 24°06'20.8"E (Drach, Mamchur, 2018), Kamianka-Buzka District: northeast of Tadani, forest swamp of *Eriophorum* and *Sphagnum* (Kuzyarin, 1993; LWS).

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Foothills, Carpathian Mountains, Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.1 Raised bogs. Б4.2 Spring fens. Б1.1.4 Dystrophic waters with macrophyte vegetation. Д1.5.3 Wet oligomesotrophic birch forests. Д1.7.2 Bogs with

layer of birch. Д2.1.1 Lowland spruce forests. Д2.2.3 Wet Scots pine forests. Д2.5.1 Bogs with spruce layer. Д2.5.2 Bogs with layer of pine.

*EUNIS*: C1.4 Permanent dystrophic lakes, ponds and pools. D1.1 Raised bogs. D2.3 Transition mires and quaking bogs. G1.5 Broadleaved swamp woodland on acid peat. G3.1 *Abies* and *Picea* woodland. G3.E Nemoral bog conifer woodland. G4.1 Mixed swamp woodland. G5.6 Early-stage natural and semi-natural woodlands and regrowth. X04 Raised bog complexes.

***Sphagnum fimbriatum*** Wils. – Sokal District: 1 km northward from Sosnivka, sedge-sphagnum swamp (Kuzyarin, 2003; LWS); Volytsky Botanical Reserve, Pine forest, sphagnum-cranberry swamp, 50°17'19.0"N 23°58'30.6"E (Kuzyarin, 1991; LWS; Drach, Mamchur, 2018); near Kulychkiv, 2-3 forest quarter, mixed swampy forest, 50°17'00.7" N 24°06'38.1"E (Drach, Mamchur, 2018); Busk District: southward of Polonychi, right bank of the river Poltva, Pine forest (Kuzyarin, 2003; LWS); southwest of Bohdanivka, Pine forest, mesotrophic sphagnum swamp (Kuzyarin, 1996; LWS).

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Foothills, Carpathian Mountains, Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.1 Raised bogs. Б4.2 Spring fens. Д1.7.2 Bogs with layer of birch. Д2.2.3 Wet Scots pine forests. Д2.5.2 Bogs with a layer of pine. C3.5 Anthropogenic outcrops, spoil tips and tailings without vegetation.

*EUNIS*: C1.4 Permanent dystrophic lakes, ponds and pools. D1.1 Raised bogs. D2.3 Transition mires and quaking bogs. G1.5 Broadleaved swamp woodland on acid peat. G3.1 *Abies* and *Picea* woodland. G3.E Nemoral bog conifer woodland. G4.1 Mixed swamp woodland. G5.6 Early-stage natural and semi-natural woodlands and regrowth. X04 Raised bog complexes. J3 Extractive industrial sites.

***Sphagnum flexuosum*** Dozy & Molk. (*S. recurvum* var. *amblyphyllum* (Russ.) Warnst.). – Sokal District: near Prystan, forest cottage, mesotrophic sedge-sphagnum swamp (Bradys, 1956) [23].

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Mountains, Forest steppe.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.2 Spring fens.

*EUNIS*: D2.2 Valley mires, poor fens and transition mires. D2.3 Transition mires and quaking bogs.

***Sphagnum girgensohnii*** Russow (*S. fimbriatum* var. *strictum* Lindb.) – Sokal District: Volytsky Botanical Reserve, Pine forest, sphagnum-cranberry swamp, 50°17'19.0"N 23°58'30.6"E (Drach, Mamchur, 2018); Chervonohrad mining region, coal dumps of mines «Nadiya» (Kuzyarin, 2013) [13, 14].

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Foothills, Carpathian Mountains, Forest steppe.

*NHB*: Б2.1.2 Rich fens with calcium-tolerant sphagnum mosses. Б3 Mesotrophic mires. Д2.1.1 Lowland spruce forests. Д2.2.3 Wet Scots pine forests. C3.5 Anthropogenic outcrops, spoil tips and tailings without vegetation.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs. D4.1 Rich fens, including eutrophic tallherb fens and calcareous flushes and soaks. G3.1 *Abies* and *Picea* woodland. G3.E Nemoral bog conifer woodland. J3 Extractive industrial sites.

***Sphagnum inundatum*** Russow (*S. subsecundum* var. *inundatum* (Russow) C. Jensen) – Zhovkva District: near Zavady, the valley of the river Mlynivka, ditch near forest, 50°05'08.7"N 23°54'16.7"E (Mamchur, 2017).

Distribution in Ukraine: Carpathian Mountains, Polissya, Forest steppe.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.1.3 Riverine mesotrophic vegetation on muddy substrata.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs.

***Sphagnum magellanicum*** Brid. – Sokal District: Volytsky Botanical Reserve, Pine forest swamp (Kuzyarin, 2012; LWS); Kamianka-Buzka District: 3 km northeast of Tyshytsya, Pine forest swamp (Kuzyarin, 2010; LWS).

Distribution in Ukraine: Polesia, Carpathian Mountains Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.1 Raised bogs. Д1.5. Wet oligomesotrophic birch forests. Д1.7.2 Bogs with layer of birch. Д2.2.3 Wet Scots pine forests. Д2.5.1 Bogs with spruce layer. Д2.5.2 Bogs with a layer of pine.

*EUNIS*: D1.1 Raised bogs. D2.3 Transition mires and quaking bogs. G1.5 Broadleaved swamp woodland on acid peat. X04 Raised bog complexes. G3.E Nemoral bog conifer woodland /. G4.1 Mixed swamp woodland. G5.6 Early-stage natural and semi-natural woodlands and regrowth.

***Sphagnum obtusum*** Warnst. (*S. recurvum* var. *obtusum* Warnst.) – Sokal District: Volytsky Botanical Reserve, Pine forest swamp (Bradis) [23].

*NHB*: Б4.2 Spring fens.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs.

***Sphagnum palustre*** L. – Sokal District: Volytsky Botanical Reserve, Pine forest, sphagnum-cranberry eutrophic swamp, 50°17'19.0"N 23°58'30.6"E, 50°17'29.0"N 23°58'13.6"E (Bradis, Kucheryava, 1956; Kuzyarin, 1991; LWS; Drach, Mamchur, 2018) [23]; near Kulychkiv, 2 forest quarter, mixed swampy forest 50°17'00.7" N 24°06'38.1"E, 50°16'53.8" N 24°06'48.8"E (Drach, Mamchur, 2018); southward of Kariv, deforestation of Pine forest (Kuzyarin, 1991; LWS); near Dvirtsi, Pine forest (Kuzyarin, 2008; LWS); 1 km northward from Sosnivka, wet meadow (Kuzyarin, 2003, 2006; LWS); Zolochiv District: southwest of Pecheniya, bog (Kuzyarin, 2004; LWS).

Distribution in Ukraine: in all nature zones.

*NHB*: Б3 Mesotrophic mires. Б4.2 Spring fens. Д1.5.3 Wet oligomesotrophic birch forests. Д1.7.1 Eutrophic swamps with layer of black alder or birch Д2.1.1 Lowland spruce forests. Д2.2.3 Wet Scots pine forests.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs. G4.1 Mixed swamp woodland. G1.5 Broadleaved swamp woodland on acid peat. G3.1 Abies and Picea woodland. G3.E Nemoral bog conifer woodland.

***Sphagnum papillosum*** Lindb. – Sokal District: 1 km northward from Sosnivka, wet meadow (Kuzyarin, Virchenko, 2003; KW).

Distribution in Ukraine: Carpathian Mountains, Polissya, Forest steppe.

*NHB*: Б4.1 Raised bogs. Б4.2 Spring fens. Б3 Mesotrophic mires.

*EUNIS*: D1.1 Raised bogs. D2.3 Transition mires and quaking bogs.

***Sphagnum squarrosum*** Crome – Sokal District: near Kulychkiv, 2 forest quarter, mixed swampy forest, 50°17'07.5"N 24°06'20.8"E (Drach, Mamchur, 2018); 1 km northward from Sosnivka, mesotrophic sphagnum swamp (Kuzyarin, 2003; LWS); Kamianka-Buzka District: north-east of Tadani, Pine forest, mesotrophic sphagnum swamp (Kuzyarin, 1993; LWS).

Distribution in Ukraine: Polissya, Carpathian Mountains Forest steppe, Steppe.

*NHB*: Д2.1.1 Lowland spruce forests. Б4.2 Spring fens. Б3 Mesotrophic mires. Д1.7.1 Eutrophic swamps with layer of black alder or birch.

*EUNIS*: D2.3 Transition mires and quaking bogs. G3.1 Abies and Picea woodland. G4.1 Mixed swamp woodland.

## REFERENCES

1. *Boiko M. F.* Rare bryophytes from plane and mountain landscapes of Ukraine // *Chornomors'k. bot. z.* 2010. № 6 (3). P. 294–315. (In Ukrainian)
2. *Boiko M. F.* The Second checklist of Bryobionta of Ukraine // *Chornomors'k. bot. z.* 2014. Vol. 10 (4). P. 426–487. <http://doi:10.14255/2308-9628/14.104/2>.
3. *Bradis Ye. M. Bachuryna H. F.* Wetlands of the USSR. K.: Nauk. dumka, 1969. 244 p. (In Ukrainian)
4. *Davies C. E., Moss D., Hill M. O.* EUNIS Habitat Classification, Revised // Report to European Environment Agency-European Topic Centre on Nature Protection and Biodiversity. 2004. 310 p.
5. *Ellenberg H., Leuschner C.* Zeigerwerte der Pflanzen Mitteleuropas. In: *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen: in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht.* Utb. 2010. 1334 s.
6. *Garrett A. K.* Systematics of the Sphagnum recurvum Complex: Morphological Variation, Hybridization and the Delineation of Intermediate Taxa. Diss. Duke University, 2015. 62 p.
7. *Glime J.M.* Life Cycles and Morphology. Bryophyta – Sphagnopsida in: *Bryophyte ecology* // Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. 2007 <http://www.bryoecol.mtu.edu>.
8. *Herenchuk K. I.* Nature of the Lviv Region. Lviv University, 1972. 152 p. (In Ukrainian)
9. *Herenchuk K. I., Koynova M. M., Tsys P. M.* Natural and geographical division of Lviv and Podolian economic districts. Lviv University, 1964. 221 p. (In Ukrainian)
10. *Hill M. O., Preston C. D., Bosanquet S. D. S., Roy D. B.* BRYOATT: attributes of British and Irish mosses, liverworts and hornworts // Centre for Ecology and Hydrology. NERC Centre for Ecology and Hydrology and Countryside Council for Wales. 2007. 88 p. <http://nora.nerc.ac.uk/1131/1/BRYOATT.pdf>.
11. *Hofmann H., Müller N., Schnyder N.* Merkblätter Artenschutz Moose // BAFU, NISM, FUB 2006. 24 p. [https://www.swissbryophytes.ch/documents/naturschutz/Artenschutz\\_Moose\\_D.pdf](https://www.swissbryophytes.ch/documents/naturschutz/Artenschutz_Moose_D.pdf).
12. *Jones C. G., John H. L., Moshe S.* Organisms as ecosystem engineers // NY, USA: Ecosystem-management, Springer, 1994. Vol. 69 (3). P. 130–147.
13. *Karpinets L. I., Lobachevska O. V., Sokhanchak R. R.* Ecological structure of epigeic synusia of mosses on rock dumps of Chervonograd industrial mining region // *Ukr. Bot. J.* 2017. Vol. 74(2). P. 154–162. (In Ukrainian)
14. *Kuzyarin O. T.* Bryoflora of coal dumps of Lviv-Volynian mining region // *Studia Biologica.* 2013. Vol. 7 (1). P. 105–114. (In Ukrainian)
15. Lviv region: natural conditions and resources: monograph / ed. Dr. Geogr. of sciences, prof. *M.M. Nazaruk.* Lviv: The Old Lev Publishing House, 2018. 592 p. (In Ukrainian)
16. *Mamchur Z., Drach Yu., Chuba M.* The rare species of mosses of high mountains part of the Ukrainian Carpathians: Marmaros and Chornohora ranges // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2019. Issue 80. P. 118–128. DOI: <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2019.80.13> (In Ukrainian)
17. National habitat catalogue of Ukraine // ed. *A.A. Kuzemko, Ya.P. Diduch, V.A. Onyshchenko, Ya. Shaffer.* Kyiv. FOP Klymenko Yu.Ya, 2018. 442 p. (In Ukrainian)
18. *Pankiv Z. P.* Land resources. Lviv, 2008, 272 p. (In Ukrainian)
19. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. 2014. 37 s.
20. *Rydin H., Jeglum J. K.* The biology of peatlands. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, UK, 2005. 382 p.



21. Sokal District Environmental Protection Program for 2016–2020 <http://rajrada.sokal.lviv.ua/?p=79033>
22. Weston D. J., Turetsky M. R., Johnson M. G. et al. The sphagnum project: enabling ecological and evolutionary insights through a genus-level sequencing project // *New Phytologist*. 2018. Vol. 217 (1). P. 16–25.
23. Zerov D. K. Flora of hepatic and sphagnum mosses of Ukraine. Kyiv: Nauk. dumka, 1964. 355 p. (In Ukrainian)

Стаття надійшла до редакції 14.02.20

доопрацьована 20.07.20

прийнята до друку 22.07.20

## СФАГНОВІ МОХИ МАЛОГО ПОЛІССЯ (ЛЬВІВСЬКА ОБЛАСТЬ)

З. Мамчур, Ю. Драч, С. Притула

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

У статті узагальнено сучасні відомості про стан і поширення сфагнових мохів на території Малоого Полісся у Львівській області на основі власних польових досліджень, літературних і гербарних (Національного Гербарію НАН України (KW), Гербарію Державного природознавчого музею НАН України (LWS) даних. Укладено анотований список видів роду *Sphagnum*, що включає 15 видів, із зазначенням місць і дати збору, імен колекторів, поширення в Україні та біотопів, у яких трапляється вид, згідно з Національним каталогом біотопів України та EUNIS. Встановлено, що *Sphagnum fallax* (Klinggr.) Klinggr., *S. fimbriatum* Wils. і *S. palustre* L. є найпоширенішими видами роду сфагнум на території дослідження. Два види – *S. angustifolium* (C. Jensen ex Russow) C. Jensen та *S. inundatum* Russow – уперше наведені для Львівської області.

Виявлено шість регіонально рідкісних видів: *S. capillifolium* (Ehrh.) Hedw., *S. cuspidatum* Ehrh. ex Hoffm., *S. fallax*, *S. fimbriatum*, *S. obtusum* Warnst. і *S. papillosum* Lindb. Зазначено можливе зникнення на території Волицького державного ботанічного заказника видів *Sphagnum centrale* C. Jensen, *S. contortum* Schultz, *S. obtusum* і *S. flexuosum* Dozy & Molk. унаслідок проведення тут гідромеліоративних робіт.

Проаналізовано екологічні групи видів сфагнів на території дослідження, встановлено переважання субгеліофітів (7 видів, 46,7%), гідрофітів (13 видів, 86,7%), холодотолерантних видів (13, або 87,7%) і ацидофілів (8 видів, 53,3%).

Показано актуальність вивчення сфагнів, оскільки вони поширені значно рідше, ніж інші види з відділів мохоподібних, бо приурочені до вузького кола біотопів. А за кардинальних змін гідрологічного режиму середовища, що відбувались упродовж другої половини ХХ ст., зважаючи на значні площі осушених земель, процеси зневоднення біотопів стали незворотними, і деякі види сфагнів могли зникнути з території Малоого Полісся.

Зважаючи на чутливість мохоподібних, зокрема, видів роду сфагнум, до порушення гідрологічного режиму водно-болотних угідь, заболочений мішаний ліс в околицях села Куличків є перспективною територією для створення нового природоохоронного об'єкта або розширення меж Волицького ботанічного заказника з метою збереження тут болотних біотопів.

*Ключові слова:* сфагнові мохи, Мале Полісся, Волицький заказник, біотопи

## МОРФОЛОГІЧНА МІНЛИВІСТЬ ФОЛІАРНИХ ПОКАЗНИКІВ *POPULUS TREMULA* L. В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ

У. Семак, М. Миленька

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет  
імені Василя Стефаника»  
вул. Шевченка, 57, Івано-Франківськ 76000, Україна  
e-mail: [ulianasemak@gmail.com](mailto:ulianasemak@gmail.com)

На основі аналізу модифікації морфологічних параметрів можна оцінити не тільки стан рослинного організму, але й здійснити діагностику стану середовища, що особливо актуально в умовах зростаючих рівнів антропопресії. У статті подано дослідження морфологічних особливостей асиміляційного апарату *Populus tremula* L. в умовах впливу техногенних емісій Бурштинської ТЕС. Методами лінійної морфометрії проаналізовано мінливість морфологічних показників листка при високих рівнях забруднюючих речовин. У зоні впливу промислового об'єкта спостерігається зміна фоліарних показників. Виявлено неоднакову мінливість морфологічних параметрів в умовах впливу промислового забруднення та за мінімізованого техногенного навантаження. Рівні мінливості морфологічних параметрів оцінено через показник коефіцієнта варіації, що для більшості проаналізованих морфологічних ознак в умовах техногенного навантаження характеризується високими і середніми значеннями. Найбільш варіабельними виявилися показники відстані між першою і другою жилкою та довжина другої від основи листка жилки, високомінливою ознакою також є кут між центральною та другою жилкою від основи листкової пластинки. Для біоіндикації техногенного навантаження апробовано показник флуктуючої асиметрії листових пластинок *P. tremula* L. Аналіз флуктуючої асиметрії здійснено на основі лінійних вимірів, а також за даними площі половин листових пластинок. Результати аналізу флуктуючої асиметрії асиміляційного апарату засвідчили зростання аналізованого показника за дії чинників техногенно походження як за лінійними вимірами, так і за показниками площі. Здійснено порівняння двох підходів до оцінки рівня флуктуючої асиметрії. У результаті проведеного дослідження визначено ті фоліарні морфометричні параметри *P. tremula* L., які виявляють високу морфологічну реакційність за дії техногенного навантаження і можуть використовуватись як біоіндикаційні маркери для оцінки стану середовища. Достовірним індикатором техногенного пресингу є рівень флуктуючої асиметрії, що може бути рекомендований до використання у біоіндикаційних дослідженнях.

*Ключові слова:* промислове забруднення, фітоіндикація, лінійна морфометрія, фоліарні показники, флуктуюча асиметрія

Тенденція стрімкого розвитку промисловості обумовлює те, що антропогенний вплив набуває значимості окремого екологічного фактора, який призводить до зміни як абіотичного, так і біотичного компонента екосистем. За цих умов актуальним завданням є пошук об'єктивних методів діагностики стану навколишнього середовища. Інтегральну оцінку якості довкілля дають змогу здійснити біоіндикаційні методи. Найзручнішими об'єктами біоіндикаційних досліджень є рослинні організми, що через особливості своєї життєдіяльності максимально точно відображають умови, в яких зростають, оскільки їхні реакції на стан середовища є пластичними та добре виявляються на рівні морфологічних ознак [6, 7]. Послугуючись фітоіндикаційними методами, можна оцінити як режим

екологічних факторів, так і стан біоти техногенних біосистем загалом [6]. Серед найбільш вживаних і перспективних фітоіндикаційних прийомів провідна роль належить індикації умов середовища за мінливістю морфологічних параметрів [6, 8], при цьому в системі фітоіндикаційних досліджень особливе значення має лінійна морфометрія. Реакція рослин за їхніми морфометричними параметрами є комплексним показником якості довкілля, що відображає стан екосистеми за взаємодії природних і техногенних факторів [6, 8].

Найбільш інформативними біоіндикаційними маркерами є фоліарні показники [10, 11]. Листок, відображаючи функціональний стан рослинного організму, повною мірою характеризує взаємозв'язки у системі «рослина-середовище» [8]. Зважаючи на чутливість морфометричного аналізу асиміляційного апарату, інформація, отримана із обмеженого набору морфоознак, дає можливість охарактеризувати сумарний вплив техногенного пресингу та здійснити інтегральну оцінку середовища [2, 12].

Одним із найбільш точних та інформативних методів у біоіндикації можна вважати прояв флуктуючої асиметрії асиміляційного апарату багаторічних деревних рослин [2–5, 14, 15]. За проявом флуктуючої асиметрії можна дізнатися про рівень стресу, який переживає організм, оскільки флуктуюча асиметрія виявляється мінімальною лише за оптимальних умов середовища і неспецифічно зростає за будь-яких стресових впливів [3, 5, 14]. Рівень флуктуючої асиметрії виступає показником стабільності розвитку організму, адже механізми, які мали би контролювати симетричність в умовах стресу, не здатні протистояти зовнішнім негативним факторам [9, 14–16]. Відхилення від умовної норми показників симетричності в умовах помірного стресу виявляються раніше, ніж виражені морфологічні порушення [12].

Численні дослідження свідчать, що величина флуктуючої асиметрії зростає в місцях високого антропогенного навантаження [3, 5, 14, 15]. Таким чином, показник величини флуктуючої асиметрії є дуже зручним і точним способом оцінки стану довкілля в умовах високих рівнів антропопресії.

Під час проведення біоіндикаційних досліджень найважливішим етапом є вибір адекватного об'єкта біоіндикації. Представники роду *Populus* за даними низки досліджень [1, 2, 14, 15] відзначаються високим біоіндикаційним потенціалом. Однак подальша апробація представників роду як біоіндикаторів залишається актуальною.

Метою дослідження є аналіз морфологічної реакції листків *Populus tremula* L., найбільш поширеного виду дендрофлори золошлаковідвалів Бурштинської ТЕС, на високі рівні техногенного навантаження досліджуваного екотопу.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили в зоні впливу Бурштинської ТЕС – найбільшого забруднювача довкілля на Прикарпатті [9, 10]. До складу емісій входить низка потенційно небезпечних забруднюючих речовин, серед яких аерополітанти (сірчистий і сірчаний ангідриди, оксиди нітрогену, газоподібні продукти неповного згорання, дрібнодисперсні аерозолі тощо), а найбільш небезпечними через високу токсичність для біоти є важкі метали [10, 13]. Об'єктами підвищеної екологічної небезпеки є також золошлаковідвали Бурштинської ТЕС – спеціальні гідротехнічні споруди, де відбувається складування твердих відходів від спалювання вугілля [10]. В умовах золошлаковідвалів спостерігається трансформація природних геохімічних циклів, зміна природного радіоактивного фону через підвищену концентрацію радіоактивних ізотопів у продуктах згорання вугілля [13]. Вивітрювання та розсіювання твердих часток різного ступеня дисперсності з поверхні чаш золовідвалів зумовлює аеротехногенне забруднення довкілля. Унаслідок

потрапляння золошлакових матеріалів із чаш золовідвалів до поверхневих і ґрунтових вод відбувається зміна їхніх хімічних показників [9, 13]. Відбір проб здійснювали на діючому золошлаковідвалі № 3. За умовно чисту територію приймали Галицький національний природний парк. Точки відбору проб містяться на відстані понад 30 км одна від одної, а отже, є добре ізольованими.

Наприкінці вегетаційного періоду, коли завершився повний розвиток асиміляційної системи, на кожній із дослідних ділянок випадково обирали 5 дерев, із яких збирали по 50 листків. Відбір листків здійснювали з гілок одного порядку галуження, розташованих на висоті 1–2 м над поверхнею ґрунту. Обирали рослини приблизно одного віку. Обсяг вибірки становив 500 листків.

Свіжозрізані листки дигіталізували з використанням сканера Samsung SCX-3205. З кожної листкової пластинки за допомогою програмного пакету CoralDRAW X6 знімали по 9 параметрів: 1 – довжина черешка, см; 2 – довжина листка, см; 3 – ширина правої та лівої частини листкової пластинки, см; 4 – довжина першої від основи листка жилки із правого та лівого боку листкової пластинки, см; 5 – довжина другої від основи листка жилки з правого та лівого боку, см; 6 – відстань між першою та другою жилкою, см; 7 – кут між центральною і першою від основи листкової пластинки жилкою; 8 – кут між центральною та другою від основи листка жилкою; 9 – площа половини листкової пластинки, см<sup>2</sup>. Зазначені морфологічні показники відповідно до літературних даних [2, 3, 5, 15] відзначаються максимальною інформативністю для визначення флюктуючої асиметрії.

Биометричний аналіз даних проведено методами математичної статистики. Обчислено середнє арифметичне та його похибка ( $M \pm m$ ); середній квадрат відхилень, або дисперсію ( $Sx^2$ ); коефіцієнт варіації ( $CV$ ).

Значення коефіцієнта асиметрії обчислювали як добуток подвоєного модуля різниці промірів зліва та справа до суми промірів зліва та справа:

$$FA=2|L-R|/|L+R|,$$

де  $FA$  – флюктуюча асиметрія,  $L$  – промір листкової пластинки з лівого боку,  $R$  – промір листкової пластинки з правого боку.

Порівняння середніх арифметичних і визначення достовірності різниці між ними проведено за допомогою  $t$ -критерію Стьюдента. Довірчу ймовірність  $t$ -розподілу було обрано рівною 0,95 % (ймовірність помилки 5 %). Статистичну обробку морфометричних даних проведено з використанням комп'ютерної програми Excel 7.0.

### Результати і їхнє обговорення

Результати проведеного аналізу фоліарних показників методами лінійної морфометрії свідчать про відмінність рівня їхньої мінливості в умовах золошлаковідвалів Буршинської ТЕС і на території із мінімізованим техногенним пресингом. З'ясовано, що модифікація фоліарних показників *P. tremula* в умовах техногенного навантаження та за відсутності такого не є однаковою.

Для оцінки морфологічної мінливості досліджуваних параметрів обчислили коефіцієнт варіації. Більшість морфологічних параметрів в обох моніторингових точках характеризуються середніми показниками варіабельності (див. таблицю).

Найбільш варіабельною ознакою виявився показник відстані між першою та другою жилкою. На території золошлаковідвалів коефіцієнт варіації показника становить 23–29 %. Однак ця ознака показує підвищену варіативність як за високих рівнів антропопресії, так і за мінімізованого впливу техногенного навантаження, і на умовно чистій території становить 19–25 %.

Морфометричні параметри листка *Populus tremula* L.: 1 – територія золошлаковідвалів Бурштинської ТЕС; 2 – умовно чиста територія

№	Морфометричні параметри	Показники						
		M±m		S <sup>2</sup>		CV, %		
		1	2	1	2	1	2	
1	Довжина черешка, см	4,04 ± 0,5	4,57 ± 0,56	0,4	0,54	15,2	15,4	
2	Довжина листка, см	4,46 ± 0,42	4,77 ± 0,42	0,26	0,3	11,4	11	
3	Ширина листка, см	L	2,29 ± 0,2	2,19* ± 0,23	0,06	0,1	10,6	12,4
		R	2,31 ± 0,21	2,25* ± 0,23	0,07	0,1	11,2	12,2
4	Довжина першої жилки, см	L	3,76 ± 0,34	3,66* ± 0,36	0,18	0,23	11,2	12
		R	3,76 ± 0,34	3,68* ± 0,36	0,2	0,24	11,8	12
5	Довжина другої жилки, см	L	2,43 ± 0,47	2,84 ± 0,33	0,4	0,2	25,4	16,4
		R	2,4 ± 0,49	2,64 ± 0,34	0,38	0,2	25,4	16,2
6	Відстань між першою і другою жилкою, см	L	1,47 ± 0,27	1,6* ± 0,28	0,12	0,14	23	19
		R	1,48 ± 0,28	1,55* ± 0,29	0,13	0,14	29	25
7	Кут між центральною і першою жилкою, °	L	42,28 ± 4,91	44,66* ± 4,68	43,32	38,64	14,8	14
		R	41,54 ± 3,52	47,35* ± 4,66	21,26	35,17	10,2	13,2
8	Кут між центральною і другою жилкою, °	L	44,12 ± 7,02	50,8* ± 6,54	79,95	70,37	20,4	16,4
		R	45,8 ± 6,02	53,0* ± 6,22	61,84	71,19	17,4	15,6
9	Площа половини листкової пластинки, см <sup>2</sup>	L	7,25 ± 0,19	10,24* ± 0,5	11,75	11,31	32,9	18,3
		R	9,3 ± 0,26	12,9* ± 0,6	11,58	11,67	28,1	18,3

**Примітки:** L – значення вимірюваного показника з лівого боку листка; R – значення показника з правого боку листка; M±m – середнє арифметичне і похибка середнього; Sx<sup>2</sup> – дисперсія; CV – коефіцієнт варіації; \* – статистично достовірна різниця (p≤0,05)

Високим показником варіативності характеризується також довжина другої жилки, що на золошлаковідвалах становить 25 %, тоді як на контрольній території – 16,2 %. На противагу показник довжини першої жилки, хоч і показує середній рівень варіативності на обох територіях, характеризується трохи меншим коефіцієнтом варіації на золошлаковідвалах – 11,2–11,8 %, тоді як на контрольній території – 12 %. Схожою тенденцією виявляє мінливість ширини листка, що на золошлаковідвалах характеризується нижчим рівнем варіативності (10–11,2 %), ніж на еталонній території (12,2–12,4 %).

Незначне перевищення середнього рівня варіації у кута між центральною та другою жилкою спостерігається на золошлаковідвалах – 20,4 %; на контрольній території коефіцієнт варіації за цією ознакою – 16,4 %. Натомість мінливість показника кута між першою і центральною жилкою становить 14,8–10,2 % на умовно чистій території та 14–13,2 % для золошлаковідвалів.

Інші показники, зокрема, довжина черешка і довжина листка, характеризуються середнім показником коефіцієнта варіації та становлять приблизно 15 і 11 % на обох територіях.

**Перевірка гіпотези критерієм Стьюдента** (гіпотеза справедлива на 95 %) показала достовірну різницю між вибірками за більшістю досліджуваних ознак ( $t_{\text{роз}} > t_{\text{гр}}$ ), за винятком довжини черешка, довжини листка та довжини другої жилки ( $t_{\text{роз}} < t_{\text{гр}}$ ).

Результати аналізу флуктуючої асиметрії листкових пластинок *P. tremula* свідчать, що показники асиметричності листкових пластинок більші на золошлаковідвалах, де середнє значення флуктуючої асиметрії 15,2 %. На противагу показник флуктуючої асиметрії листкових пластинок на території з мінімізованим рівнем антропогенного навантаження становить 9,8 %. Рівні флуктуючої асиметрії листкових пластинок *P. tremula* відображені на рис. 1.

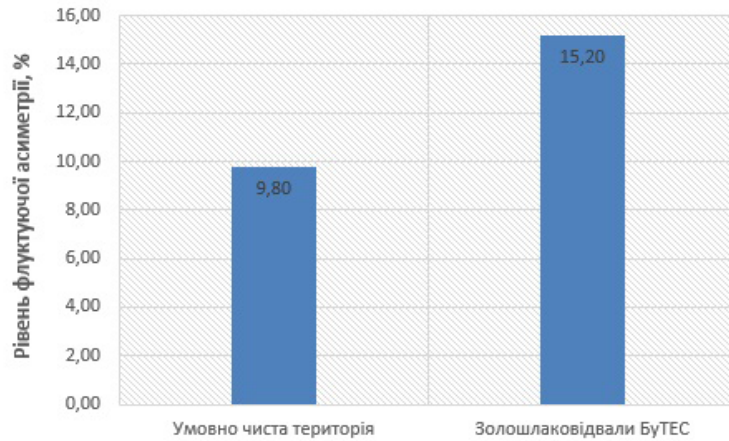


Рис. 1. Флуктуюча асиметрія листкових пластинок *Populus tremula* L. на контрольній території та в умовах техногенного навантаження (лінійна морфометрія)

Обчислено коефіцієнти флуктуючої асиметрії через дані площі правої та лівої половини листкових пластинок.

За результатами вимірів на території золошлаковідвалів рівень асиметрії коливається від 7 до 12 % і в середньому становить 9 %. На умовно чистій території асиметрія становить від 6 до 8 % (усереднено – 6,8 %).

Використання значення площі (рис. 2) дає нижчий рівень асиметрії: на золошлаковідвалах 9 % проти 15 % за лінійними ознаками; на умовно чистій території 6,8 % проти 9 % за лінійними вимірами.

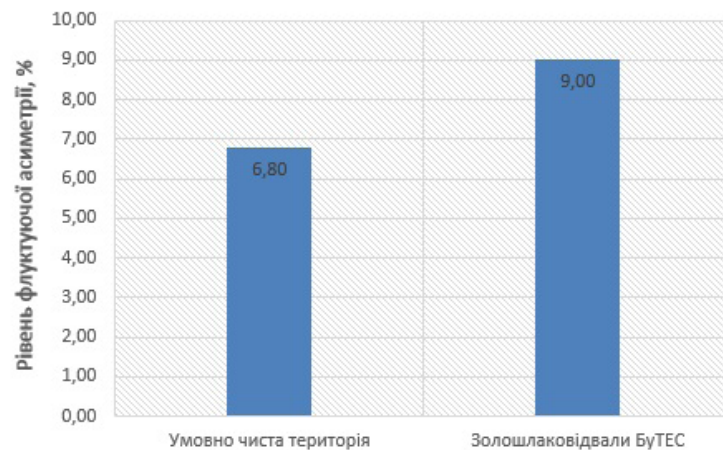


Рис. 2. Рівень флуктуючої асиметрії листкових пластинок *P. tremula* з використанням показників площі

Порівнюючи значення вимірних асиметрій двома різними способами, слід зазначити, що лінійні вимірювання дають ширший діапазон значення асиметрії.

Перевірка гіпотез критерієм Стьюдента показує достовірну різницю для вибірок у разі вимірювання флуктуючої асиметрії через вимірювання площі половин, а також лінійного визначення ( $t_{\text{роз}} > t_{\text{гр}}$ ).

В умовах техногенного навантаження спостерігається морфологічна реакційність асиміляційного апарату *P. tremula*, що виявляється як достовірне зменшення фоліарних показників і модифікація показників мінливості морфоознак.

Такі морфопараметри як довжина черешка, довжина та ширина листка, довжина першої жилки від основи листової пластинки, а також кут між центральною і першою жилкою від основи листка показали середній рівень варіації на обох територіях. Найбільш варіабельною ознакою на обох територіях виявився показник відстані між першою і другою жилкою. Високим показником варіативності також характеризується довжина другої жилки та кут між центральною і другою жилкою.

Таким чином, показники довжини другої жилки та кут між центральною і другою жилкою від основи листової пластинки можна використовувати у біоіндикаційних дослідженнях як високочутливі маркери стану середовища.

Результати дослідження свідчать про зростання флуктуючої асиметрії в умовах техногенного навантаження як із лінійним вимірюванням фоліарних показників, так і з використанням показників площі. Порівнюючи значення вимірної флуктуючої асиметрії двома різними способами, слід зазначити, що лінійні вимірювання дають ширший діапазон значення асиметрії та вищі показники асиметричності порівняно із визначенням флуктуючої асиметрії через вимірювання площ половин листових пластинок.

Отже, *Populus tremula* L. є перспективним видом для оцінки стану довкілля на основі морфометричних даних і за показником флуктуючої асиметрії. Проте для використання показника флуктуючої асиметрії листових пластинок в умовах золошлаковідвалів необхідно врахувати весь комплекс чинників, які могли би призвести до порушення асиметричності білатеральних структур, а тому виникає необхідність детальнішого вивчення всіх факторів впливу. Зважаючи на те, що асиметрія деяких ознак є генетично детермінованою і не пов'язана з впливом факторів зовнішнього середовища, вважаємо за доцільне дослідити неспрямовану асиметрію й антисиметрію аналізованих морфопараметрів у подальших дослідженнях.

#### 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. 18 с.
2. Ганжа Д. Морфологічна реакція листків тополі в різних умовах урботехногенного навантаження // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 60. С. 163–170.
3. Гаврикова В. С. Біоіндикація урбосередовища за показником флуктуючої асиметрії дерев *Acer saccharinum* L. // Наук.-практ. журнал. Екол. науки. 2014. № 6. С. 77–81.
4. Гаврикова В. С. Скринінг видів клена (*Acer*) як тест-об'єктів для оцінювання ступеня забруднення навколишнього середовища // Наук. вісн. НЛТУ України. 2014. Вип. 24 (6). С. 70–73.
5. Глухов А. З., Штирц Ю. А., Демкович А. Е., Жуков С. П. Оценка проявления флуктуирующей асимметрии билатеральных признаков листовой пластинки *Acer pseudoplatanus* L. в условиях придорожных экосистем промышленного города (на примере г. Донецка) // Пром. ботаника. 2011. Вып. 11. С. 90–96.
6. Глухов О. З., Прохорова С. І. Індикація стану техногенного середовища за морфологічною мінливістю рослин // Пром. ботаника. 2008. Вып. 8. С. 3–11.

7. Зайцева І. А. Зміни морфометричних характеристик та стан рослин роду *Ulmus* L. у зелених насадженнях промислових міст Дніпропетровської області // Питання біоіндикації та екології. 2012. Вип. 17. № 1. С. 176–183.
8. Злобін Ю. А., Скляр В. Г., Бондарєва Л. М. та ін. Концепція морфометрії в сучасній ботаніці // Чорномор. ботан. журнал. 2009. Т. 5. №1. С. 5–22.
9. Ковалів Л. М. Екологічні проблеми теплових електростанцій // Наук. вісн. НЛТУ України. 2013. Вип. 23 (18). С. 57–56.
10. Миленька М. М. Біоіндикаційна оцінка екологічного стану Бурштинської урбоєкосистеми: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 2009. 20 с.
11. Морозова Т. В., Курнична Л. І. Морфологічні особливості деревних рослин в умовах аеротехногенного забруднення // Вісн. Прикарпат. нац. ун-ту. Сер. біол. 2012. XVI. С. 175–179.
12. Неверова О. А. Применение фитоиндикации в оценке загрязнения окружающей среды // Биосфера. 2009. Т. 1. № 1. С. 82–92.
13. Неспляк О. С. Екологічні особливості формування флори і рослинності золошлаковідвалів Бурштинської теплової електростанції та їх використання в рекультивативі: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 2011. 23 с.
14. Савосько В. М., Католіченко О. М. Флюктууюча асиметрія листків берези повислої в умовах аеротехногенного забруднення Криворіжжя // Питання біоіндикації та екології. 2014. Вип. 19. № 2. С. 90–102.
15. Штірц Ю. О. Показники асиметрії листкової пластинки *Populus nigra* L. та їх біоіндикаційна інформативність // Чорномор. бот. журнал. 2013. Т. 3. № 9. С. 349–358.
16. Leung B., Forbes M. R., Houle D. Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Stress: Comparing Efficacy of Analyses Involving Multiple Traits // Am. Nat. 2000. Vol. 155 (1). P. 101–115.

Стаття надійшла до редакції 12.12.19

доопрацьована 13.07.20

прийнята до друку 13.08.20

## VARIATION IN LEAF MORPHOLOGICAL TRAITS OF *POPULUS TREMULA* L. UNDER THE CONDITIONS OF TECHNOGENIC LOAD

U. Semak, M. Mylen'ka

Vasyl Stefanyk Precarpathian National University  
57, Shevchenko St., Ivano-Frankivsk 76018, Ukraine  
e-mail: ulianasemak@gmail.com

The article presents the study of leaf morphological features of *Populus tremula* L. Growing under the conditions of the influence emissions from Burshtynska TPP. The methods of linear morphometry were used to analyze the variability of the morphological parameters of leaves at high levels of pollutants. In the zone of influence of the industrial object there is a significant decrease in the foliar parameters. Uneven variability of morphological parameters between the study plots of industrial pollution and with minimized technogenic load are revealed. Levels of variability of morphological parameters are estimated using coefficient of variation, which for most of the analyzed morphological features at the polluted plot load is characterized by high and average values. The most varied ones were the



distance between the first and second veins and the length of the second vein from the base of the leaf vein. For bioindication of anthropogenic load, an index of fluctuating asymmetry of *P. tremul* leaf blades has been tested. The analysis of the fluctuating asymmetry was based on leaf linear measurements and area of the halves of leaf blades. The results indicated an increase in fluctuating asymmetry index in plant growing at the polluted plot, both in linear measurements and in area indices. The comparison of the two approaches to the estimation of the level of fluctuating asymmetry has been carried out. As a result of this study, those foliar morphometric parameters of *P. tremula*, which exhibit high morphological reactivity under the influence of anthropogenic load, can be used as bioindicators for assessing the state of the environment. A reliable indicator of technological pressure is the level of fluctuating asymmetry that can be recommended for use in bioindicative studies.

*Keywords:* industrial contamination, phytoindication, linear morphometry, leaf indexes, fluctuating asymmetry

**КОМПЛЕКСНИЙ ВПЛИВ НІТРАТІВ І БІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ  
НА АКТИВНІСТЬ *IN VITRO* ВІЙОК ФРОНТАЛЬНОГО МИГОТЛИВОГО  
ЕПІТЕЛІУ ЗЯБРОВОГО АПАРАТУ *SINANODONTA WOODIANA*  
(MOLLUSCA, BIVALVIA, UNIONIDAE)**

**А. Стадниченко<sup>1</sup>, О. Уваєва<sup>2\*</sup>, А. Вискушенко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. В. Бердичівська, 40, Житомир 10008, Україна*

<sup>2</sup>*Державний університет «Житомирська політехніка»  
вул. Чуднівська, 103, Житомир 10005, Україна  
e-mail: bio-2016@ukr.net*

Досліджено вплив трьох різних концентрацій (ГДК, 2ГДК, 3ГДК) калій нітрату водного середовища та біотичних чинників (трематодна інвазія і «зяброва вагітність») на тривалість локомоції і частоту биття *in vitro* війок фронтального миготливого епітелію зовнішніх півзябер жабурниці китайської *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) – недавнього вселенця в гідромережу України. Вона заселила численні водойми, локалізовані у межах Кілійської дельти Дунаю, утворивши у них популяції, що відзначаються високими показниками як щільності населення, так і біомаси.

Встановлено, що у вільних від трематодної інвазії самців і латентних самок *S. woodiana* контрольної групи статистично достовірних відмінностей як за тривалістю локомоції війок миготливого епітелію, так і за частотою їхнього биття виявлено не було. У «вагітних» самок, однак, значення першого зі згаданих вище показників зменшилися в 1,5, у другого – в 1,4 разу ( $P > 99,9\%$ ). Слід врахувати, що марсупіальні кишені повністю займали усю площу зовнішньої поверхні півзябер моллюсків. Функціональне навантаження такого високого рівня і є причиною розвитку у піддослідних жабурниць цієї групи декомпенсаційних процесів, що потребують підвищення ефективності протидіючих їм захисних чинників, особливо у особин, заселених паргенітами (спороцистами) і церкаріями *Rhipidocotyle campanula* (Dujardin, 1845). Екстенсивність інвазії хазяїв цими паразитами становила від 50 до 100 %. За інвазії такого рівня спостерігали різке скорочення тривалості функціонування війок респіраторного епітелію зябрового апарату жабурниць. А за поєднаної дії паразитарного чинника і «зябрової вагітності» патогенний вплив на показники функціонування фронтального миготливого зябрового епітелію посилювався ще більше.

За вмісту токсиканта в середовищі на рівні ГДК у жабурниць проявляються перші симптоми впливу на їхній організм отруйного чинника. За підвищення концентрації останнього до 2ГДК і 3ГДК у піддослідних жабурниць розвивається патологічний процес – отруєння, послідовно представлені трьома стадіями – депресивною, сублетальною, летальною. Під час цього відбувається прогресуюче послаблення рухової активності війок миготливого епітелію, що завершується їхнім повним знерухомленням. «Зяброва вагітність» і висока трематодна інвазія посилюють наслідки цього процесу.

*Ключові слова:* *Sinanodonta woodiana*, калій нітрат, біотичні чинники, миготливий епітелій, тривалість і ритм локомоції

В Україні у регіонах активного аграрного виробництва порушення норм і кратності застосування простих нітратних добрив рік від року спричиняло зростання забруднення ними природних континентальних водойм. За діючими наразі нормами ГДК щодо

нітратів у водному середовищі концентрація їх не повинна перевищувати  $45 \text{ мг/дм}^3$  [8], оскільки ці полютанти як токсиканти комбінованої дії (локальної, гемолітичної, нервово-паралітичної) становлять серйозну загрозу для існування гідробіонтів [11, 15]. Серед гідробіонтів від нітратного забруднення середовища насамперед потерпають ті, у процесах життєзабезпечення яких провідну роль відіграє респіраторний миготливий епітелій. Насамперед це двостулкові молюски, у котрих безперервна упродовж усього життя робота війок миготливого епітелію зябрового апарату забезпечує надійне функціонування дихання і живлення цих тварин, без яких неможливим є здійснення ними й інших життєзабезпечуючих фізіологічних процесів. У зв'язку з цим тривалість локомоції війок миготливого епітелію і частота їхнього биття у двостулкових молюсків розцінюються як тест-функція, котра вказує на рівень загального фізіологічного статусу їхнього організму [11]. Різнопланові відомості щодо ступеня чутливості різних видів молюсків до підвищених концентрацій нітратів у водному середовищі та впливу на перебіг у тварин різних фізіологічних процесів наявні в низці публікацій зарубіжних дослідників [19, 20, 22].

З початку XXI ст. у гідромережі Кілійської дельти Дунаю України вперше з'явилася й успішно розселилася жабурниця китайська *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) [5, 9, 10, 16]. У водоймах Європи у цього молюска зареєстровано спороцисти і церкарії трематоди *Rhipidocotyle campanula* (Dujardin, 1845) – звичайного паразита прісноводних риб [12, 17, 18, 21]. Розглядаючи паразитів як обтяжуючий екологічний чинник, який впливає на стан популяції хазяїна, можна використати рівень зараженості як допоміжний показник під час з'ясування інтенсивності функціонування миготливого епітелію молюсків.

Мета даного дослідження полягає у з'ясуванні особливостей впливу різних концентрацій калій нітрату водного середовища на тривалість локомоції *in vitro* і частоту биття війок фронтального миготливого епітелію зовнішніх півзябер у недавнього вселенця у гідромережу України *S. woodiana* в нормі та за дії на неї біотичних навантажень (гельмінтна інвазія *Rh. campanula* і «зяброва вагітність»).

З цього питання станом на сьогодні відомі лише три наукові публікації [4, 14, 15]. Однак усі вони стосуються іншого виду родини перлівницевих, а саме жабурниці качиної *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) – найпоширенішого в Україні виду родини Unionidae. Що ж стосується *S. woodiana*, то її у згаданому вище напрямі раніше не досліджували.

#### Матеріали та методи

Використано 326 екз. жабурниці китайської *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) із низзя Дунаю (м. Вилкове Одеської обл.), зібраних вручну у червні 2011 р. До лабораторії тварин транспортували загорнутими у 6 шарів інтенсивно зволоженої мішковини. За стаціонарних умов основному дослідові передувала, як це наразі вимагається задля дотримання «чистоти» токсикологічного експерименту [13], 15-добова аклімація молюсків до умов лабораторного утримання. Умови його були такими: об'єм акваріумів – 10 л, щільність посадки в них тварин – 3 екз./10 л, температура води – 19–21 °С, водневий показник (рН) – 8,0–8,2, оксигенізація – 7,9–8,3 мг  $\text{O}_2/\text{дм}^3$ . Через кожні 2 доби середовище заміняли свіжим. Жабурниць щодобово годували попередньо мацерованим у воді (5–7 діб) листям частухи (*Alisma plantago* L.). Як токсикант використано  $\text{KNO}_3$  (ч. д. а.). Орієнтаційним дослідом, поставленим за В.А. Алексєєвим [1], спочатку було встановлено значення двох основних токсикологічних показників –  $\text{LC}_0$  (найбільша концентрація, за якої всі тварини залишилися протягом експозиції живими) і  $\text{LC}_{100}$  (найменша концентрація, за якої всі тварини за час експозиції гинули), а опісля у межах останніх було обрано значення тих концентрацій, які надалі застосовували в основному досліді, – 45 мг/дм<sup>3</sup> (ГДК), 90 (2ГДК), 135 мг/дм<sup>3</sup> (3ГДК). Тривалість експозиції – 2 доби.

Мікропрепарати для визначення тривалості локомоції та швидкості (частоти) биття вілок миготливого зяберного епітелію готували за методикою Е.А. Веселова [2]. Досліджували їх із використанням мікроскопа БИОЛАМ ( $\times 203$  і  $\times 450$ ) у 3-разовій повторності, ослаблюючи ступінь освітленості поля зору діафрагмуванням освітлювача. Стаття тварин встановлювали за Б.В. Властовим [3], гельмінтну інвазію – за В.І. Здуном [6]. Цифрові результати дослідів опрацьовано методами базової варіаційної статистики за С.С. Крамаренком [7]. За нормального розподілу встановлення достовірної різниці між різними показниками проводили за допомогою t-критерію Стюдента (значимість відмінностей оцінювали на рівні 1 % чи 5 %).

### Результати і їхнє обговорення

У вільних від трематодної інвазії самців і латентних самок *S. woodiana* контрольної групи статистично достовірних відмінностей як за тривалістю локомоції вілок миготливого епітелію, так і за частотою їх биття виявлено не було (див. таблицю).

Спряжений вплив калій нітрату водного середовища і біотичних чинників на кількісні показники активності фронтального миготливого епітелію зябрового апарату *S. woodiana*

Стать	«Зяброва вагітність»	Інвазія	n	Тривалість локомоції (год.)			Частота биття (уд./хв)		
				lim	M±m	CV	lim	M±m	CV
<b>Контроль</b>									
Самці		–	19	136–319	243,4±7,9	19,2	198–326	310,5±3,7	7,8
Самці		+	11	111–263	212,1±13,8	9,6	220–315	279,4±6,8	10,2
Самки	–	–	24	103–315	249,2±21,6	18,1	254–341	319,3±13,2	9,5
Самки	+	–	16	114–222	166,4±22,2	15,4	199–267	231,2±11,3	12,5
Самки	–	+	13	189–218	200,1±9,9	10,2	169–220	191,2±6,5	14,3
Самки	+	+	10	111–197	129,1±19,1	9,9	184–231	208,6±12,9	8,7
<b>ГДК</b>									
Самці		–	18	168–298	254,0±7,8	18,4	273–321	308,1±8,3	11,4
Самці		+	11	135–276	231,1±12,5	16,4	252–337	325,3±9,8	12,6
Самки	–	–	19	168–297	254,0±7,8	18,4	273–321	309,4±8,3	7,8
Самки	+	–	16	230–279	269,1±18,2	10,9	185–341	329,6±11,1	17,3
Самки	–	+	10	200–291	238,8±10,4	12,6	281–340	328,3±14,5	11,2
Самки	+	+	13	195–248	218,6±10,2	18,3	300–341	303,2±10,2	13,4
<b>2ГДК</b>									
Самці		–	12	163–192	180,5±10,7	9,8	199–258	244,4±11,9	10,6
Самці		+	10	138–171	157,7±17,1	13,5	189–226	203,4±13,6	16,2
Самки	–	–	13	175–199	186,4±10,8	12,3	238–260	250,2±15,5	11,7
Самки	+	–	17	132–158	140,4±19,6	13,4	204–248	213,1±11,4	15,2
Самки	–	+	11	169–185	173,5±16,6	10,4	142–219	161,3±14,5	13,9
Самки	+	+	9	107–123	114,0±16,4	9,8	121–154	144,2±11,7	8,9
<b>3ГДК</b>									
Самці		–	13	103–129	111,1±12,3	17,3	189–221	203,3±10,4	15,0
Самці		+	12	91–122	102,5±9,9	9,7	174–223	182,1±7,8	9,6
Самки	–	–	18	148–181	159,5±8,7	14,1	203–234	225,4±10,1	15,4
Самки	+	–	12	109–199	120,3±13,0	12,7	129–218	171,1±11,3	15,6
Самки	–	+	14	124–167	144,7±11,9	13,5	110–155	131,4±13,2	12,4
Самки	+	+	9	92–128	100,2±10,3	16,2	106–134	120,3±15,9	14,1

Що ж стосується «вагітних» самок, то у них значення першого із згаданих вище показників скоротилося у 1,5, а другого – в 1,4 рази ( $P > 99,9\%$ ). Гадаємо, що це є наслідком високої інтенсивності у них «зябрової вагітності». Адже у цих «вагітних» самок марсупіальні кишені повністю займали всю площу зовнішньої поверхні їхніх півзябер, а ступінь заповнення їх зародковим матеріалом був максимальним. «Зяброва вагітність» такого рівня – це, безперечно, потужне функціональне навантаження, котре, напевно, супроводжується у частини слабших за інших самок розвитком декомпенсаційних процесів. Раніше подібне було відмічено і щодо «вагітних» *A. anatina* [11].

До складу контрольної групи *S. woodiana* входили також самці та самки з гельмінтною інвазією, представленою спороцистами і церкаріями трематоди *Rhipidocotyle campanula*. У *S. woodiana*, як і у інших видів жабурниць, звичайним гостальним біотопом трематоди (довжина тіла – 275–524 мкм, довжина хвоста – 520–4000, розмір спороцисти – 260×1520 мкм) є її статеві залози. Шкодочинність *R. campanula* зумовлюється ступенем інтенсивності інвазії її проміжних хазяїв-молюсків. Встановлено, що у переважній більшості задіяних у нашому досліді жабурниць (92 %) виявлено високий рівень інтенсивності гельмінтної інвазії (ураження паразитами 50–100 % об'єму гонад). Саме через це як у самців, так і у латентних самок, інтенсивно інвазованих *R. campanula*, виявлено скорочення тривалості локомоції війок миготливого епітелію (P=94,5 %). Шкідливий ефект спряженого впливу гельмінтної інвазії та наявності інтенсивної «зябрової вагітності» є набагато потужнішим: значення згаданого вище показника у цьому разі зменшується в 1,3–1,7 разу (P>99,9 %).

У середовищі, концентрація калій нітрату в якому відповідає ГДК, у самців і латентних самок значення обох досліджуваних кількісних показників активності функціонування війок миготливого епітелію зябрового апарату утримуються на рівні норми. У той же час у самок із яскраво вираженою «зябровою вагітністю» тривалість локомоції війок і частота биття їх зростають в 1,1 разу. Це вказує на те, що калій нітрат у концентрації, котра дорівнює ГДК, для цієї категорії *S. woodiana* є небезпечним і викликає розвиток у них патологічного процесу – отруєння, початком якого є стадія стимуляції. Остання якраз і проявилася у нашому досліді як збільшення значень обох показників у особин *S. woodiana* досліджуваних категорій. Це свідчить про підвищення рівня захисно-компенсаторних властивостей цих молюсків у відповідь на ушкоджуючу дію затруєного середовища.

Резистентність самців, інвазованих *R. campanula*, як виявилось, перебуває у прямій залежності від рівня інтенсивності їхньої інвазії. На момент завершення експозиції тварин цієї категорії у токсичному середовищі смертність уражених трематодами піддослідних особин становила 10 %. Зауважимо, що в усіх випадках це була тотальна (генералізована) інвазія. Натомість усі самці з помірною та слабкою інвазією на кінець досліді вижили. Однак особини, що входили до складу цих двох згаданих останніми груп, суттєво різнилися значеннями обох досліджуваних показників, а саме: у разі слабкої інвазії вони лишалися на рівні норми, тоді як за помірної інвазії трохи її перевищували. Це свідчить про стимулювання захисно-приспосувального процесу, спрямованого на нівелювання ушкоджуючого впливу гельмінтів на організм їхніх хазяїв-молюсків.

Для самок особливо небезпечним було поєднання інтенсивно вираженої «зябрової вагітності» і трематодної інвазії помірного або високого ступеня. Такі жабурниці становили приблизно 20 % від загальної кількості досліджених «вагітних» самок. Усі вони загинули до завершення експерименту. У тих же самок, які благополучно вижили упродовж усієї експозиції в токсичному середовищі, було виявлено значне скорочення тривалості локомоції та частоти биття війок миготливого епітелію, що є свідченням перебування їх на депресивній стадії процесу отруєння.

У середовищі, концентрація калій нітрату в якому дорівнює 2ГДК, у всіх категорій піддослідних *S. woodiana* розвивається депресивна стадія процесу отруєння. На це вказує різке падіння у них значень обох досліджуваних показників активності зябрового миготливого епітелію. Причому у вільних від гельмінтної інвазії та «зябрової вагітності» особин воно відбувається значно меншою мірою порівняно з особинами з наявністю у них цих біотичних навантажень (у 1,2–1,4 проти 1,4–1,9 разу). Слід відзначити, що саме за цієї

концентрації калій нітрату в середовищі у жабурниць через 25–35 хв від початку досліду починає проявлятися швидка фізіологічна захисно-приспосувальна реакція, яка полягає в ослизненні поверхні тіла. Шар слизу уповільнює дифузію через шкірні покриви іонів полютанта у внутрішнє середовище *S. woodiana*. Близько моменту завершення досліду, однак, шматки ущільненого слизу, здебільшого у формі тяжів різної довжини і ширини, де-не-де відпадали, оголюючи ділянки зруйнованих шкірних покривів, на яких місцями спостерігали кровотечі.

На момент завершення токсикологічного експерименту в жодній із досліджених груп тварин не відмічено 100%-ного виживання. Найнижчий показник смертності відзначено для самців і латентних самок, вільних від гельмінтів (19,3 %), а найвищий – для всіх використаних у досліді «вагітних» інвазованих *R. campanula* жабурниць (33,7 %). Останні етапи їхнього життя – це стрімко змінюючі одна одну сублетальна і летальна стадії. Перша з них характеризується повним знерухомленням тварин, сповільненням серцебиття, а друга – розвитком у них стану правдивого шоку.

Перебування *S. woodiana* у середовищі, в якому концентрація калій нітрату дорівнює 3ГДК, призводить до вкрай стрімкого розвитку в усіх, без винятку, піддослідних особин процесу гострого отруєння. Під кінець першої доби досліду смертність жабурниць сягнула 49 %, через 36 год від його початку вона досягла 64 %, а на кінець досліду – 98 %. Раніше усіх інших і в найбільших кількостях через отруєння калій нітратом гинули особини, інтенсивно інвазовані спороцистами і церкаріями *R. campanula*, а також «вагітні» самки у разі максимального розростання марсупіальних кишень і екстенсивного заповнення їх зародковим матеріалом.

За концентрацій калій нітрату у водному середовищі, що відповідають значенням ГДК, 2ГДК і 3ГДК, у *S. woodiana* розвивається патологічний процес – отруєння, який полягає у послідовному перебігу трьох його стадій – депресивної, сублетальної і летальної. Перебіг процесу отруєння обтяжують два біотичних чинники, а саме: висока інтенсивність гельмінтної інвазії у всіх без винятку досліджених категорій *S. woodiana* і потужна «зяброва вагітність» у самок. Жабурниця китайська може бути використана як індикаторний вид у процесі екологічного моніторингу за станом забруднення природних вод нітратами. Надійними тест-функціями при цьому можуть бути кількісні показники активності війок фронтального миготливого епітелію їхніх зовнішніх півзябер.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеев В. А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журнал. 1981. Т. 17. № 3. С. 92–100.
2. Веселов Е. А. Биологические тесты при санитарно-биологическом изучении водоемов // Жизнь пресных вод СССР. М.: Изд-во АН СССР, 1959. Т. 4, кн. 2. С. 7–37.
3. Властов Б. В. Порционность яйцекладок, фазы размножения и продолжительность эмбриогенеза при разных температурах у видов перловиц (*Unio*) // Вопр. общ. зоологии и мед. паразитологии. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 63–83.
4. Єрмошина Т. В. Робота війок миготливого епітелію перлівницевиx в умовах антропогенного пресу. Житомир: Вид-во Житомир. держ. ун-ту, 2008. 146 с.
5. Єрмошина Т., Павлюченко О. Інтродукція *Sinanodonta woodiana* (Bivalvia, Unionidae) у басейні річки Гнилоп'ять (Житомирська область, Північна Україна) // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2018. Вип. 79. С. 132–140.
6. Здун В. І. Личинки трематод в прісноводних молюсках України. К.: Вид-во АН УРСР, 1961. 141 с.

7. Крамаренко С. С. Математичні методи в екології : навч. посіб. Миколаїв, 2003. 232 с.
8. Метелев В. В., Канаев А. И., Дзасохова Н. Г. Водная токсикология. М.: Колос, 1971. 247 с.
9. Сон М. О. Моллюски-вселенцы в пресных и солоноватых водах Северного Причерноморья. Одесса: Друк, 2007. 132 с.
10. Стадниченко А. П. Види-вселенці у складі прісноводної малакофауни України // Водні і наземні екосистеми та збереження їх різноманіття – 2019: зб. наук. праць. Житомир, 2019. С. 47–49.
11. Стадниченко А. П., Гирин В. К. Тривалість локомоції війок переживаючих клітин миготливого епітелію зябер жабурниці (Mollusca, Bivalvia, Anodontinae) в залежності від її фізіологічного статусу // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2014. № 1126. Вип. 22. С. 126–130.
12. Стадниченко А. П., Уваєва О. І., Вискушенко Д. А., Шимкович О. Д. Гемоцити інтактною та інвазованою трематодами жабурниці китайської (Mollusca, Unionidae, Anodontinae) // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. біол. 2019. № 1 (75). С. 87–93.
13. Хлебович В. В. Акклимация животных. Л.: Наука, 1981. 136 с.
14. Черномаз Т. В. Работа ресничек переживающих клеток мерцательного эпителия жабер и ноги перловицевых, зараженных *Aspidogaster conchicola* и *Vucephalus polymorphus* // Паразитология. 2001. Т. 35. Вып. 5. С. 443–448.
15. Янович Л. М. Влияние нитрата аммония на быстрые поведенческие и некоторые физиологические реакции перловиц // Гидробиол. журнал. 2000. Т. 36. № 1. С. 75–79.
16. Янович Л. М., Пампура М. М. Новая находка моллюска-вселенца *Sinanodonta woodiana* Lea, 1834 (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) в Украине // Вестн. зоологии. 2011. Вып. 45 (2). С. 186.
17. Янович Л. М., Пампура М. М. Зараженість перлівницевиx (Bivalvia, Unionidae) України трематодою *Rhipidocotyle illense* Ziegler, 1883 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 59. С. 201–208.
18. Cichy A., Urbańska M., Marszewska A. et al. The invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) as a host for native symbionts in European waters // J. Limnol. 2016. 75. P. 288–296. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1334>
19. Corrao N. M., Darby P. C., Pomory C. M. Nitrate impacts on the Florida apple snail, *Pomacea paludosa* // Hydrobiologia. 2006. 568. P. 135–143.
20. Mackie G. L., Claudi R. Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Systems. Second edition. 2009. 550 p.
21. Marszewska A., Cichy A. Unionid clams and the zebra mussels on their shells (Bivalvia: Unionidae, Dreissenidae) as hosts for trematodes in lakes of the Polish lowland // Folia Malacol. 2015. 23 (2). P. 149–154.
22. Soucek D. J., Dickinson A. Acute Toxicity of Nitrate and Nitrite to Sensitive Freshwater Insects, Mollusks, and a Crustacean // Arch. Environ. Con. Tox. 2012. Vol. 62. Is. 2. P. 233–242.

Стаття надійшла до редакції 30.03.20

доопрацьована 02.07.20

прийнята до друку 10.07.20

**COMPOUND EFFECT OF NITRATES AND BIOTIC FACTORS ON THE  
IN VITRO ACTIVITY OF EPITHELIAL CILIA OF OUTER DEMIBRANCHS  
OF *SINANODONTA WOODIANA* (MOLLUSCA, BIVALVIA, UNIONIDAE)**

**A. Stadnychenko<sup>1</sup>, O. Uvayeva<sup>2</sup>, A. Vyskushenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Zhytomyr Ivan Franko State University  
40, Velyka Berdychivska St., Zhytomyr 10008, Ukraine*

<sup>2</sup>*Zhytomyr Polytechnic State University  
103, Chudnivska St., Zhytomyr 10005, Ukraine  
e-mail: bio-2016@ukr.net*

Effects of MPC, 2 MPC, and 3MPC water solutions of potassium nitrate and biotic factors (trematode infection and “gill pregnancy”) were studied on the duration of locomotion and beat frequency of epithelial cilia of outer demibranchs of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834). The species has recently invaded the system of water bodies of Ukraine. It has occupied numerous water bodies in the Kiliya distributary of Danube Delta, establishing populations of density and biomass.

Statistically significant differences by the studied parameters of ciliary epithelium (duration of locomotion and beat frequency of cilia) were not observed in the control group of non-infected males and latent females of *S. woodiana*. In females with “gill pregnancy”, the duration of ciliary locomotion decreased by 1.5 times, and beat frequency by 1.4 times ( $P > 99.9\%$ ). It should be noted that the outer surface of demibranchs of female mollusks was completely covered by the filled to the brim marsupial pockets. Thus, the functional load of gills is high, leading to the development of compensatory processes in experimental animals. The processes induce increased effectiveness of protective factors that counteract them. Another biotic factor negatively affecting the experimental pond mussels was the high rates of trematode infection in the hosts’ reproductive glands which contained sporocysts and cercariae of *Rhipidocotyle campanula* Dujardin, 1845. Prevalence of that infection ranged from 50 to 100 %. These rates of infection were associated with sharply declining functions of cilia of the gill epithelium in studied animals. The compound pathogenic influence of parasite and “gill pregnancy” factors even more affected the functional parameters of outer gill ciliary epithelium.

The MPC levels of toxicant in the water medium were accompanied with the first symptom of intoxication of the Chinese pond mussel, the stage of stimulation. At that point, the functional parameters of epithelial cilia of “pregnant” females and in moderately and weakly infected mollusks of both sexes increased in response to exposure to the toxic factor. With the growing concentrations of toxicant to 2 MPC and 3 MPC, the experimental pond mussels developed the pathological process of intoxication, which progressed from the stage of depression to sublethal and lethal stages. Accordingly, the locomotion activity of ciliary epithelium increasingly declined and, in the end, stopped. The “gill pregnancy” and high rates of trematode infection exacerbated the consequences of the process.

*Keywords:* *Sinanodonta woodiana*, calcium nitrate, biotic factors, ciliary epithelium, duration and rhythm of locomotion



**MAMMALS IN THE COLLECTION OF THE ZOOLOGICAL MUSEUM OF ZAPORIZHIA UNIVERSITY: OVERVIEW AND UNIQUE SPECIMENS**

**I. Zagorodniuk<sup>1</sup>, N. Lebedieva<sup>2</sup>, Z. Barkaszi<sup>1</sup>, O. Korotia<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>National Museum of Natural History, NAS of Ukraine

15, Bohdan Khmelnytsky St., Kyiv 1030, Ukraine

e-mail: igor.zagorodniuk@gmail.com; orcid: 0000-0002-0523-133X

e-mail: zlbarkasi@ukr.net; orcid: 0000-0003-3155-6362

<sup>2</sup>Zaporizhia National University

66, Zhukovsky St., Zaporizhia 69600, Ukraine

e-mail: natalyredfox@gmail.com; orcid: 0000-0001-9831-6975

The history of formation and the current state of mammal collections of the Zoological Museum at Zaporizhia National University are considered. The essay comprises two main sections: a general description of the museum and a survey of unique specimens. The first presents historical information as well as a depiction of the building and a general description of the collection. The second section deals with the analysis of unique specimens as evidence and sources for valuable faunal data and as elements of the museum display. The museum was established in 1997, although the period of amassment of materials and the history of the osteological collection had already begun in 1987, when the Faculty of Biology was established at the University of Zaporizhia. The exposition of the museum consists of both skin-mounts and osteological materials (skulls) displayed in glass cabinets and on stands. This part of the exhibition is designed as a separate hall of the museum ("Green" hall) devoted to mammals and birds. However, the main part of the scientific collection of skulls (more than 800 specimens) is stored in cabinets located in working rooms of the Department of Forest Biology, Game Management, and Ichthyology. These are the working materials collected by scientists and students of the department. The osteological collection includes 240 skulls of *Vulpes vulpes*, 89 of *Canis lupus*, 77 of *Ondatra zibethicus*, 77 of *Lepus europaeus*, 57 of *Nyctereutes procyonoides*, 27 of *Martes foina*, 9 of *Canis aureus*, and 4 of *Lutra lutra*, which is in total 580 specimens. Though the number of ungulate specimens has yet to be accounted, their number is not less than the number of carnivores. The displayed part of the mammal collection is represented by 4 groups of notable specimens, including dynamic figures (representing game mammals of the local fauna), collection of skulls (1 or 2 specimens of each species, mainly of the size of a hedgehog or weasel to the size of a moose), exotic species (including monkeys, megabats, armadillos, etc.), and rare species of fauna of the Azov region. Among faunistically valuable specimens collected in Ukraine are such rare species as follows: 1) *Allactaga major* (1 specimen, 2011, near Primorsky Posad, Zaporizhia Oblast); 2) *Spalax microphthalmus* (1 specimen, skin-mount, Lysa Hora, near Vasylivka, Zaporizhia Oblast, 12.2013); 3) *Plecotus austriacus* (1 specimen, vicinities of Kushugum, Zaporizhia Oblast, 12.2018); 4) *Desmana moschata* (1 specimen, Sumy Oblast, 20.11.2018).

*Keywords:* mammals, mammal collection, zoological museum, universities of Ukraine, national heritage

### Introduction

Zoological collections stored in natural history museums has always been among the objects of interest of museologists as well as researchers and visitors [4, 20]. In Ukraine, zoological museums at universities are important elements of infrastructure also being a teaching ground for faculties of biological or natural sciences [22]. Zoological museums perform a wide range of functions, including research and education [6].

The Zoological Museum of Zaporizhzhia University (ZMZNU: [7]) is almost the youngest among natural history museums of Ukraine. It was created and continues to develop thanks to the care and enthusiasm of local zoologists, game experts, and naturalists [3] at a time when natural science departments of universities are eliminated or merged with other units in many regions of Ukraine. This museum is one of the examples of how an educational and scientific centre must develop and perform all of its functions, including the amassment and storage of unique zoological specimens.

The aim of this work is to describe the key features of the exhibition and scientific collection of the Zoological Museum of Zaporizhzhia National University and to analyse the most notable specimens that provide important museological and faunal information.

### General description of the museum

**Historical details and the building.** The history of amassment of the exhibits starts with the creation of the Faculty of Biology in 1987. The first specimens were produced and stored at the Department of Zoology and Game Management, and displayed in the corridors of the building of the biological faculty until the creation of the zoological museum in a separate building. The Zoological Museum of the Faculty of Biology of Zaporizhzhia National University was founded in 1991 on the basis of skin-mounts of mammals and birds, collections of insects and of bird eggs, which were collected by the staff and students of the faculty, in particular during educational and productive practices. In 1997, the exhibition was transferred from the auditoria of the department to a separate hall with an area of 510 m<sup>2</sup> located in Campus No. 3 of the university.

In 1997, the Zoological Museum was registered at Zaporizhzhia Regional Directorate of Culture. At this time, the exhibition was actively enriched. Until 2009, the exhibits had been produced by taxidermist A. Fateyev, Yu. Onyshchenko, and assistant V. Strelchenko.

In 2010, the Zoological Museum was moved to a new address and since it has been located in a separate venue at 55 Gogol St, Zaporizhzhia (Fig. 1). The exhibition covers an area of 140 m<sup>2</sup>. The Zoological Museum also has a library situated in a separate hall.

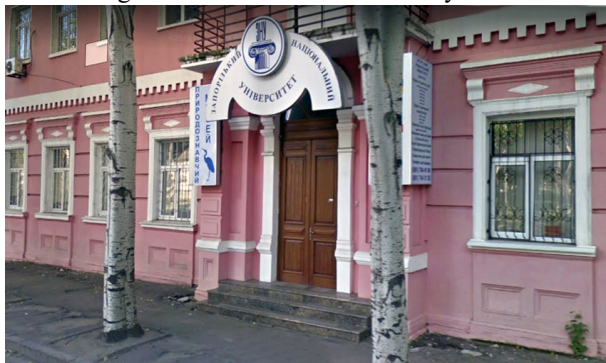


Fig. 1. The entrance to the Zoological Museum of Zaporizhzhia National University. Google Maps 3D image

Рис. 1. Зоологічний музей Запорізького національного університету. Вхід до музею. За 3D-модулем Google Maps

**General description of the exhibition.** The main part of the museum's collection consisting of 7,540 storage units is exhibited in four halls:

- skin-mounts of animals of Zaporizhzhia Oblast in the first hall;

- skin-mounts and skulls of mammals and birds in the “green hall”;
- skin-mounts and fluid-preserved specimens of birds, fishes, amphibians, reptiles, crustaceans, and molluscs in the “blue hall”;
- invertebrates (insects, arachnids, and crustaceans) in the “pink hall”.

A large part of the collection is represented by specimens of nests, clutches, and eggs of about 300 bird species, as well as specimens of 90 species of fish and ca. 70 species of reptiles and amphibians. The insect collection comprises about 7,000 specimens, mostly of lepidopterans.

Skin-mounts, shoulder mounts, and skull mounts of 189 specimens of 94 mammal species are displayed (Table 1), including large series of cleaned and whitened skulls in showcases and stands (Fig. 2). The osteological part of the exhibition consists of 98 specimens (Table 2). Among the 94 species mentioned, 41 represent the fauna of Ukraine and 53 represent distant regions.

Table 1

Distribution of mammal species by the number of specimens in the exhibition of the Zoological Museum, their presence in the fauna of Ukraine (+) and status according to the Red Data Book of Ukraine (RDBU)

Таблиця 1

Розподіл видів ссавців за кількістю зразків в експозиції Зоологічного музею, їхня представленість у фауні України (+) та статус охорони за Червоною книгою України (ЧКУ)

Order, family	Species (види)	Specimens	Presence in the fauna of Ukraine
<b>Cingulata (1)</b>			
Dasyopodidae	<i>Dasyopus novemcinctus</i> (Броненосець дев'ятисмугий)	1	
<b>Eulipotyphla (9)</b>			
Erinaceidae	<i>Erinaceus roumanicus</i> (Їжак білочеревий)	4	+
Soricidae	<i>Sorex araneus</i> (Мідиця звичайна)	1	+
	<i>Crocidura suaveolens</i> (Білозубка мала)	1	+
Talpidae	<i>Desmana moschata</i> (Хохуля руська)	2	+ RDBU
	<i>Talpa europaea</i> (Кріт європейський)	1	+
<b>Lagomorpha (6)</b>			
Leporidae	<i>Lepus europaeus</i> (Засць сірий)	6	+
<b>Rodentia (29)</b>			
Capromyidae	<i>Myocastor coypus</i> (Нутрія)	6	? (introduced)
Chinchillidae	<i>Chinchilla lanigera</i> (Шиншила звичайна)	3	
Caviidae	<i>Cavia porcellus</i> (Кавія)	2	
Sciuridae	<i>Sciurus vulgaris</i> (Вивірка лісова)	2	+
	<i>Marmota bobak</i> (Бабак степовий)	2	+
	<i>Spermophilus suslicus</i> (Ховрах крапчастий)	1	+
Castoridae	<i>Castor fiber</i> (Бобер європейський)	4	+
Gliridae	<i>Glis glis</i> (Вовчок сірий)	1	+
Dipodidae	<i>Allactaga major</i> (Тушкан великий)	1	+ RDBU
Spalacidae	<i>Spalax microphthalmus</i> (Сліпак східний)	1	+
Cricetidae	<i>Phodopus sungorus</i> (Хом'ячок джунгарський)	1	
Arvicolidae	<i>Ondatra zibethicus</i> (Ондатра болотяна)	4	+ (introduced)
	<i>Microtus arvalis</i> (Полівка звичайна)	1	+
	<i>Arvicola amphibius</i> (Щур водяний)	1	
Muridae	<i>Rattus norvegicus</i> (Пацюк мандрівний)	1	+
<b>Primates (10)</b>			
Loridae	<i>Loris tardigradus</i> (Лорі тонкий)	1	
	<i>Nycticebus coucang</i> (Лорі повільний)	3	

Order, family	Species (види)	Specimens	Presence in the fauna of Ukraine
Callithrichidae	<i>Callithrix jacchus</i> (Ігрунка звичайна)	1	
Cebidae	<i>Saimiri sciureus</i> (Саймірі вивірковий)	5	
<b>Chiroptera (6)</b>			
Vespertilionidae	<i>Plecotus austriacus</i> (Вухань австрійський)	1	+ RDBU
	<i>Nyctalus noctula</i> (Вечірниця руда)	1	+ RDBU
	<i>Nyctalus leisleri</i> (Вечірниця мала)	1	+ RDBU
	<i>Eptesicus serotinus</i> (Пергач пізній)	1	+ RDBU
Pteropodidae	<i>Thoopterus nigrescens</i> (Крилан темний)	2	
<b>Carnivora (49)</b>			
Canidae	<i>Vulpes vulpes</i> (Лис рудий)	9	+
	<i>Canis lupus</i> (Вовк сірий)	9	+
	<i>Nyctereutes procyonoides</i> (Снот уссурійський)	2	+
Ursidae	<i>Ursus arctos</i> (Ведмідь бурий)	3	+ RDBU
Procyonidae	<i>Procyon lotor</i> (Рақун північний)	3	
Mustelidae	<i>Martes foina</i> (Куниця кам'яна)	3	+
	<i>Martes martes</i> (Куниця лісова)	2	+
	<i>Mustela nivalis</i> (Ласка)	2	+
	<i>Mustela erminea</i> (Горностай)	1	+ RDBU
	<i>Mustela lutreola</i> (Норка європейська)	3	+ RDBU
	<i>Mustela eversmanni</i> (Тхір степовий)	1	+ RDBU
	<i>Mustela putorius</i> (Тхір лісовий)	1	+ RDBU
	<i>Mustela putorius f. furo</i> (Тхір фретка)	2	
	<i>Meles meles</i> (Борсук європейський)	5	+
	<i>Lutra lutra</i> (Видра річкова)	2	+ RDBU
Felidae	<i>Panthera pardus</i> (Пантера плямиста)	1	
<b>Ceatacea (1)</b>			
Phocoenidae	<i>Phocoena phocoena</i> (Фоцена звичайна)	1	+ RDBU
<b>Perissodactyla (2)</b>			
Equidae	<i>Equus hemionus</i> (Кулан)	2	
<b>Artiodactyla (76)</b>			
Suidae	<i>Sus scrofa</i> (Свиня дика)	14	+
	<i>Sus scrofa f. domestica</i> (Свиня свійська)	1	
Moschidae	<i>Moschus moschiferus</i> (Кабарга)	2	
Cervidae	<i>Dama dama</i> (Лань звичайна)	7	+ (semi-free)
	<i>Cervus elaphus</i> (Олень шляхетний)	6	+
	<i>Capreolus capreolus</i> (Сарна європейська)	11	+
	<i>Capreolus pygargus</i> (Сарна азійська)	2	
	<i>Alces alces</i> (Лось європейський)	5	+
	<i>Alces americanus</i> (Лось американський)	1	
	<i>Rangifer tarandus</i> (Олень північний)	4	
	<i>Ovis musimon</i> (Муфлон європейський)	10	+ (semi-free)
	<i>Ovis nivicola</i> (Баран сніговий)	1	
	<i>Ovis ammon</i> (Архар)	1	
	<i>Capra ibex</i> (Коза гірська)	1	
<i>Capra hircus</i> (Коза камерунська)	3		
<i>Capra hircus f. domestica</i> (Коза свійська)	2		
<i>Saiga tatarica</i> (Сайгак)	4		
<i>Bos taurus</i> (Бик свійський)	1		
In total	species = 94, specimens =	189	species = 41

**Description of the scientific osteological collection.** The osteological collection consists of two main parts: specimens displayed in halls of the Zoological Museum and specimens stored at the Department of Forest Biology, Game Management, and Ichthyology of Zaporizhzhia University. Information on the displayed part of the osteological collection is summarised in Table 2.

This part of the collection consists of 98 specimens of skulls (and antlers and horns) of medium-sized and large mammals (from hedgehog to moose).

Table 2

## Osteological series in the exhibition of the Zoological Museum

Таблиця 2

Остеологічні серії в експозиції Зоологічного музею			
Group of specimens	Number	Group of specimens	Number
Skulls of insectivores	2	Skulls of other carnivorans	5
Skulls of lagomorphs	1	Skulls (full skeleton) of cetaceans	1
Skulls of non-muroid rodents	12	Skulls of equids	1
Skulls of muroid rodents	3	Skulls of cervid ungulates	22
Skulls of primates	2	Skull of bovid ungulates	10
Skulls of mustelid carnivorans	9	Antlers and horns of ungulates	20
Skulls of canid carnivorans	10	<i>In total</i>	<b>98</b>

The main part of the osteological collection is stored at the Department of Forest Biology, Game Management, and Ichthyology (Table 3). This part of the collection also contains additional specimens (mainly skulls of ungulates) used in the training of students. These materials are stored in the building of the Faculty of Biology of Zaporizhia National University (62 Gogol St).

The distribution of species by the number of skulls is presented in Table 3. The osteological collection contains skulls of the grey wolf (*Canis lupus*), red fox (*Vulpes vulpes*), raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), beech marten (*Martes foina*), Eurasian otter (*Lutra lutra*), muskrat (*Ondatra zibethicus*), European hare (*Lepus europaeus*), European roe deer (*Capreolus capreolus*), wild boar (*Sus scrofa*), and other species.

This is a working collection and therefore not described in detail (also a part of the materials is represented only by bone fragments), and its evaluated volume is about 580 skulls of carnivorans and rodents, ca. 50 % of which (240 specimens) belong to the red fox. The number of ungulates is not evaluated, although it is not smaller by its volume.

Table 3

## Distribution of species by the number of specimens (skulls) in the osteological collection\*

Таблиця 3

Розподіл видів за кількістю зразків (черепів) у остеологічній колекції			
Species (Вид)	Skulls	Species (Вид)	Skulls
<i>Vulpes vulpes</i> (Лис рудий)	240	<i>Nyctereutes procyonoides</i> (Єнот уссурійський)	57
<i>Canis lupus</i> (Вовк)	89	<i>Martes foina</i> (Куниця кам'яна)	27
<i>Ondatra zibethicus</i> (Ондатра)	77	<i>Canis aureus</i> (Шакал)	9
<i>Lepus europaeus</i> (Заяць сірий)	77	<i>Lutra lutra</i> (Видра річкова)	4

\*Only the number of verified specimens are indicated from N. Lebedeva's working collection. About the same amount of ungulate skulls is stored in the working collections of the department.

**Information on recent collectors and taxidermists.** The museum's head Oleksandr Korotia and the taxidermist represent the main staff. Many specimens obtained in the past 10 years were collected by Oleksandr Kravtsov. A significant number of specimens comes from different game husbandries where students spend their productive practice or work after graduation. Specimens of game species have been hunted in the south of Ukraine, particularly in Zaporizhia Oblast, since 1993. The presence in the working collections of species listed in the Red Data Book of Ukraine or specimens collected during closed season is related to either confiscation of illegally captured animals during raids to detect violations of legislation or authorised reduce of the number of predators on hunting grounds.

### Unique specimens in the mammal exhibition

There are several notable elements in the mammal exhibition (“green hall”) of the Zoological Museum of ZNU. Some of them represent animals as living things (e.g. dynamic mounts), while others are scientific and game samples. Notably distinguished among them are the following groups of specimens:

1) A significant number of dynamic mounts, including of the beech marten (*Martes foina*), European badger (*Meles meles*), mouflon (*Ovis musimon*) and others (Fig. 2). All of them are specimens from the local fauna. Dynamic compositions are one of the striking features of the museum. The badger specimen is a new addition (the 145<sup>th</sup>) to the recently described general list of museum specimens of the species in Ukraine [2].

2) The collection of mammal skulls displayed in showcases and skull mounts (Fig. 3) representing about 50–60 species (an exact inventory has not been conducted in the museum yet). Specimens of game mammals are especially numerous, which is generally related to the specialization of the university department’s staff (game management) and to the kinds of enrichment sources (mainly hunting trophies). This part of the exhibition is mainly concerned with the local fauna.



Fig. 2. Dynamic mounts in the display of the Zoological Museum of ZNU: mouflon, European badger, and beech marten. All exhibits were prepared by local taxidermists

Рис. 2. Динамічні фігури в експозиції Зоологічного музею ЗНУ: муфлони, борсук європейський і куніця кам'яна. Всі експонати виготовлено місцевими таксидермістами

3) Exotics such as the red slender loris (*Loris tardigradus*, 1 specimen), Sunda slow loris (*Nycticebus coucang*, 3 specimens), common marmoset (*Callithrix jacchus*, 1 specimen), common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*, 5 specimens), moose (*Alces americanus*), and other species from outside the Palaearctic. Among the exotics are also species often kept in captivity in Ukraine: coypu (*Myocastor coypus*), long-tailed chinchilla (*Chinchilla lanigera*), raccoon (*Pro-*

*cyon lotor*), Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*), and Cameroon goat (small-sized form of *Capra hircus*) (see Table 1). Unique specimens also include the swift fruit bat (*Thoopterus nigrescens*, 2 specimens) and the nine-banded armadillo (*Dasyurus novemcinctus*, 1 specimen) (Fig. 4).

4) Species listed in the Red Data Book of Ukraine — 16 species, including 2 species of insectivores, 4 rodents, 4 bats, 5 carnivorans, and 1 seal (see Table 1). Among these rare species are the Russian desman (*Desmana moschata*), grey long-eared bat (*Plecotus austriacus*), and the great jerboa (*Allactaga major*). Details on the most valuable samples are given below.



Fig. 3. Collections of skulls displayed in showcases in the Zoological Museum of ZNU (mainly of small-sized carnivorans and rodents) an on stands (mainly of large ungulates)

Рис. 3. Колекція черепів в експозиції Зоологічного музею ЗНУ, розміщена у вітринах (дрібніші за розмірами види – переважно хижі та гризуни) та на стінних стендах (великорозмірні види – переважно копитні)

#### Unique specimens as evidence for valuable faunal information

The collection contains a number of unique specimens representing both of the local and foreign fauna. Specimens of local species have the highest faunal value, since they are the only proof of their presence in the modern fauna of Zaporizhia and other regions. A number of such specimens drew the authors' attention during the collection's investigation:

1) Russian desman, *Desmana moschata* (Linnaeus, 1758) – 1 specimen (1 skin-mount without skull and 1 skull separately), Sumy Oblast, 20.11.2018, collector and taxidermist O. Kravtsov. A description of 4 specimens of the Russian desman appeared recently with similar primary data published by colleagues from Belarus and Zaporizhia [17], which allows suggesting the transfer of these specimens to the collection of ZMZNU: 4 skulls of the desman collected on 20.11.2018 along the bank of the Vyr River (died in poacher nets) near Bilopillia, Sumy Oblast.

This record locality of the Russian desman is the last known in Ukraine and it was recently described in the literature [23].



Fig. 4. Several exotic mammal species in the exhibition of the Zoological Museum of ZNU: left – nine-banded armadillo *Dasyurus novemcinctus* as part of a composition; right – swift fruit bat *Thoopterus nigrescens*; below – moose *Alces americanus*

Рис. 4. Окремі екзотичні види ссавців у експозиції Зоологічного музею ЗНУ: ліворуч – броненосець *Dasyurus novemcinctus* у складі експозиційної композиції; праворуч – крилан *Thoopterus nigrescens*; внизу – лось американський *Alces americanus*

2) Grey long-eared bat, *Plecotus austriacus* (Fischer, 1829) – 1 specimen, skin-mount (photo in Fig. 56 c), nearby to Kushugum, Zaporizhia Oblast, December 2018, collector and taxidermist O. Kravtsov. The identification of the specimen is valid. Notably that this record comes from the left bank of the Dnipro River and is one of the few records from this area, among which the closest were reported in 1998 from Askania-Nova and Melitopol [26], and recently (02.11.2016) from the Kilchen River's valley near Spaske, Novomoskovsk Raion, Dnipropetrovsk Oblast [14]. The considered here specimen is the easternmost record of the species in Eastern Europe (Fig. 6).

3) The edible dormouse, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) – 1 specimen, skin-mount, come from Chernihiv Oblast, without details. The record is valuable because of the rarity of this species eastward of the Dnipro River, where only two records of this species were known from the adjacent Poltava Oblast (Podobaylo et al., 2017).

4) Great jerboa, *Allactaga major* (Kerr, 1792) – 1 specimen, skin-mount (photo in Fig. 5, a). Date is unknown; the specimen was transferred in 2011 by a student of Zaporizhia



University. The specimen was collected nearby to Prymorskyi Posad, Pryazovske Raion, Zaporizhia Oblast and it is one of the few specimens of the species stored in museums of Ukraine: in total, 31 specimens are deposited in the National Museum of Natural History NAS of Ukraine [21] and one in the Zoological Museum of Sumy University [15]. According to the collector's report, a stable jerboa population exists in the area where the specimen was recorded. This record coincides with the known range of the species in the Azov region [18]. The closest record of the species based on collection specimens is from Chaplyne, Vasylkivka Raion, Dnipropetrovsk Oblast (National Museum of Natural History NAS of Ukraine, fluid-preserved specimen, No. 168, leg. O. Brauner).

5) Greater mole-rat, *Spalax microphthalmus* Gueldenstaedt, 1770 – 1 specimen, No. 11111292, skin-mount (photo in Fig. 5, b); Lysa Hora tract near Vasylivka, Zaporizhia Oblast, collected in December 2013 by O. Kravtsov. Since the record from Vasylivka represents a marginal colony beyond the currently known ranges of *S. microphthalmus* and *S. arenarius* and because *S. zemni* was found on Khortytsia Island [24], the status of the population from Zaporizhia should be revised, which requires new materials. The considered here specimen is the only *Spalax* in the museum thus it cannot be prepared in order to investigate the skull, which is inside the skin-mount. Currently, this is the most distant record of mole-rats in the region and it might be related to the preservation of the whole complex of Lysa Hora.

Many specifications and re-identifications of collected specimens were made during the survey of the collection. Although the authors had no opportunity to revise all specimens, most of them were verified. Among the important re-identifications of valuable and common specimens were, for example, as follows: the black rat specimens (*Rattus rattus*) was identified as the brown rat *Rattus norvegicus*, and the horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) from Zaporizhia turned out to be the common serotine (*Eptesicus serotinus*). The latter has an undeveloped, but clearly visible post-calcarial lobe as in *Eptesicus lobatus* (sensu: [5]).



Fig. 5. Specimens providing unique data on the fauna of Ukraine and occurring rarely in zoological collections of Ukraine: a – great jerboa (*Allactaga major*), b – great mole-rat (*Spalax microphthalmus*), c – grey long-eared bat (*Plecotus austriacus*)

Рис. 5. Зразки, що дають унікальну фауністичну інформацію про фауну України та є нечастими в зоологічних колекціях України: a – тушкан великий (*Allactaga major*), b – сліпак східний (*Spalax microphthalmus*), c – вухань австрійський (*Plecotus austriacus*)

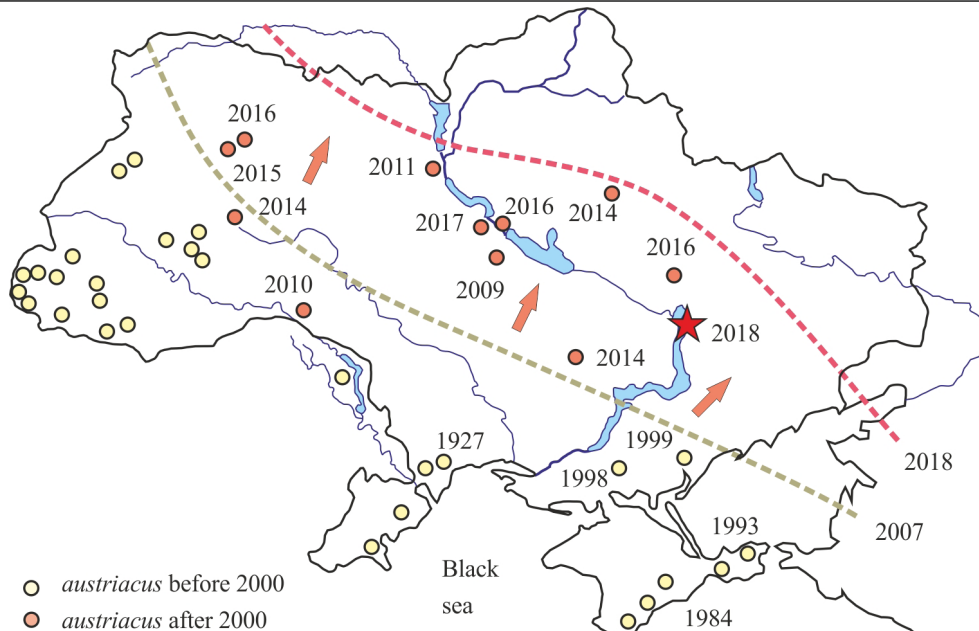


Fig. 6. Range dynamics of *Plecotus austriacus* in Ukraine (after [27 Zagorodniuk, 2019], with changes) and the location of the new record from Kushugum (asterisk)

Рис. 6. Динаміка ареалу вуханя *Plecotus austriacus* в Україні (за [27 Zagorodniuk, 2019], зі змінами) та розміщення нової знахідки виду в Кушугумі (зірочка)

### Discussion

Mammal collections of zoological or natural history museums of universities are fully described only for the Zoological Museum of Lviv University [28] and the Zoological Museum of Uzhhorod University [25]. Mammal collections are partly described in case of some other museums, e.g. Museum of Nature of Kharkiv University [9–10] and Zoological Museum of Luhansk University [19 and others]. Full catalogues are published only for the mammal collections stored in the Zoological Museum of Chernivtsi University [1] and Zoological Museum of Lviv University [8].

The collection exhibited in the Zoological Museum of Zaporizhia University is quite small including about 190 specimens of mammals (see above). This is related to the recent creation of the museum and short period of amassment of specimens. However, it fully corresponds to the educational and enlightening functions of the museum. Regarding the osteological collection, the main part of which is stored at the Department of Forest Biology, Game Management, and Ichthyology, its volume is significant and comparable with other collections. The number of carnivoran specimens is especially relevant. This is mainly because of the department's specialisation, which is and remains also the main feature of the collection: only few zoological collections have such large series of carnivorans, including recently collected specimens, which allows analysing changes of characters in time, especially in the process of fauna synanthropisation.

The osteological collections became bases for a number of studies, in particular for the description of craniological features of the muskrat (*Ondatra zibethicus*) in Zaporizhia region [11], on the specifics of age determination in foxes (*Vulpes vulpes*) by layers of teeth structures [12], on craniological features of the wolf (*Canis lupus*) in the south-east of Ukraine [13] and other works.

Considering the current volumes and specialisation, as well as the halls accessible to zoologists, further development of the scientific collections may take place not in the exhibition building, but at the Department of Forest Biology, where the main part of the osteological collection is stored. The Zoological Museum of Zaporizhzhia University develops dynamically enriching its exhibitions and scientific collections with new specimens that have not only educational but also scientific significance. Therefore, there is a need for creation of a museum depository providing favourable conditions (humidity, temperature) for permanent storage of the collections and allowing proper care for the specimens.

## REFERENCES

1. Андрющенко Т. Г., Ліка Р. В., Хлус Л. М. Каталог теріологічних колекцій Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Чернівці: Рута, 2002. С. 1–52.  
*Andriushchenko T. G., Liika R. V., Khlus L. M.* The Catalogue of the Theriological Collections of the Chernivtsi National University of Yuriy Fedkovich. Chernivtsi: Ruta, 2002. P. 1–52. (In Ukrainian)
2. Брусенцова Н. Борсук (*Meles* sp.) у колекціях музеїв України: аналіз етикетних відомостей засобами ГІС // *Theriologia Ukrainica*. 2019. Т. 17. С. 3–7.  
*Brusentsova N.* The badger (*Meles* sp.) in museum collections of Ukraine: analysis of label data using GIS // *Theriologia Ukrainica*. 2019. Vol. 17. P. 3–7. (In Ukrainian)
3. Біологічний факультет – 20 років потому. Ювілейна книга до 20-річчя Біологічного факультету ЗНУ. Запоріжжя, 2007. С. 1–138.  
*Faculty of Biology – 20 years later.* Anniversary book for the 20th anniversary of the Faculty of Biology of Zaporizhzhia National University. Zaporizhzhia, 2007. P. 1–138. (In Ukrainian)
4. Вайдакхер Ф. Загальна музеологія: посібник / перекл. з нім. В. Лозинський. Львів: Літопис, 2005. С. 1–632.  
*Vaidakher F.* General Museology. Handbook. Lviv: Litopys, 2005. P. 1–632. (In Ukrainian)
5. Загороднюк І. Морфологія епіблеми у кажанів та її мінливість у *Eptesicus "serotinus"* (Mammalia) // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 51. С. 157–175.  
*Zagorodniuk I.* Morphology of post-calcarial lobe in bats and its variation in *Eptesicus "serotinus"* (Mammalia) // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. 2009. Is. 51. P. 157–175. (In Ukrainian)
6. Загороднюк І., Ємельянов І., Червоненко О. Зоологічні колекції та музеї як осередки дослідження біорізноманіття // Зоологічні колекції та музеї / за ред. І. Загороднюка; ННПМ НАН України. К., 2014. С. 6–9.  
*Zagorodniuk I., Emelianov I., Chervonenko O.* Zoological collections and museums as centres of biodiversity investigations // *Zagorodniuk I. (ed.). Zoological Collections and Museums. National Museum of Natural History, NAS of Ukraine. Kyiv, 2014. P. 6–9. (In Ukrainian)*
7. Загороднюк І., Шидловський І. Акроніми зоологічних колекцій України // Зоологічні колекції та музеї / за ред. І. Загороднюка; Національний науково-природничий музей НАН України. К., 2014. С. 33–43.  
*Zagorodniuk I., Shydlovskyy I.* Acronyms for zoological collections of Ukraine // *Zagorodniuk I. (ed.). Zoological Collections and Museums. National Museum of Natural History, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2014. P. 33–43. (In Ukrainian)*
8. Затушевський А. Т., Шидловський І. В., Закала О. С. та ін. Каталог колекцій ссавців Зоологічного музею Львівського національного університету імені Івана Франка. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2010. С. 1–442.

- Zatushevskyy A., Shydlovskyy I., Tymkiv I.* Representativeness of the Mammalian Collection of the Zoological Museum of Lviv University // Proceedings of the Theriological School. 2016. Vol. 14. P. 41–48.
9. *Льохін Ю.* Представники надряду Ungulata в колекції проф. О. Браунера в Музеї природи Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна // Theriologia Ukrainica. 2016. Т. 14. С. 44–55.
- Ilyukhin Yu.* Representatives of the superorder Ungulata in Prof. O. Brauner's craniological collection in the Museum of Nature at V. N. Karazin Kharkiv National University // Theriologia Ukrainica. 2016. Vol. 14. P. 44–55. (In Ukrainian)
10. *Льохін Ю.* Представники ряду Chiroptera в колекції Музею природи Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна // Theriologia Ukrainica. 2018. Т. 16. С. 77–84.
- Iliukhin Y.* Representatives of the order Chiroptera in the collection of the Museum of Nature at V. Karazin Kharkiv National University // Theriologia Ukrainica. 2018. Vol. 16. P. 77–84. (In Ukrainian)
11. *Лебедева Н. І.* Морфокраніологічна характеристика ондатри (*Ondatra zibethicus* L., 1766) Запорізького регіону // Вісн. Запорізьк. ун-ту. Біол. науки. 2008. № 1. С. 139–145.
- Lebedeva N. I.* Morphocraniological characteristics of the muskrat (*Ondatra zibethicus* L., 1766) from the Zaporizhia region // Bulletin of Zaporizhzhia National University. Biological Sciences. 2008. No. 1. P. 139–145. (In Ukrainian)
12. *Лебедева Н., Домніч В.* Визначення віку лисиці звичайної (*Vulpes vulpes* L., 1758) за шаруватими структурами зубів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 48. С. 103–108.
- Lebedeva N., Domnich V.* Determinations of red fox age on the stratified structures of teeth // Visnyk Lviv University. Biological series. 2008. Is. 48. P. 103–108. (In Ukrainian)
13. *Лебедева Н. І., Домніч В. І., Замура А. С.* Краніологічний профіль вовка звичайного *Canis lupus* L., 1758 (Canidae) південного сходу України // Вісн. Запорізьк. ун-ту. Біол. науки. 2017. № 2. С. 27–33.
- Lebedeva N. I., Domnich V. I., Zamura A. S.* Craniological profile of the common wolf *Canis lupus* L., 1758 (Canidae) in southeastern Ukraine // Bulletin of Zaporizhzhia National University. Biological Sciences. 2017. No. 2. P. 27–33. (In Ukrainian)
14. *Манюк В., Лагута А.* Вухань *Plecotus austriacus* у пониззі річки Кільчень (Лівобережне Подніпров'я): новий етап експансії на схід // Theriologia Ukrainica. 2018. Т. 16. С. 149–151.
- Manyuk V., Lahuta A.* *Plecotus austriacus* in the valley of the Kilchen river (left bank of the Dniro), a new stage of expansion to the East // Theriologia Ukrainica. 2018. Vol. 16. P. 149–151. (In Ukrainian)
15. *Мерзликін І.* Ссавці у колекції Зоологічного музею Сумського державного педагогічного університету // Природничі музеологія / за ред. І. Загороднюка. Національний науково-природничий музей НАН України. К., 2019. Т. 5. С. 199–204.
- Merzlikin I.* Mammals in the collection of the Zoological Museum of Sumy State Pedagogical University // Natural History Museology. Ed. by I. Zagorodniuk. National Museum of Natural History, NAS of Ukraine. Kyiv, 2019. Vol. 5. P. 199–204. (In Ukrainian)
16. *Подобайло А., Миленко Н., Шевченко С., Севідов В.* Знахідки вовчка сірого (*Glis glis*) в Полтавській області // Праці Теріологічної школи. 2017. Т. 15. С. 156–158.
- Podobaylo A., Mylenko N., Shevchenko S., Sevidov V.* Records of the fat dormouse (*Glis glis*) in Poltava region // Proceedings of the Theriological School. 2017. Vol. 15. P. 156–158. (In Ukrainian)

17. Саварін О. О., Кравцов О. А. Про деякі патології черепа хохулі (*Desmana moschata*) // Природничча музеологія / за ред. І. Загороднюка; Національний науково-природничий музей НАН України. К., 2019. Т. 5. С. 223–224.  
*Savarin A. A., Kravtsov A. A.* On some skull pathologies of the desman (*Desmana moschata*) // Natural History Museology. Ed. by I. Zagorodniuk. National Museum of Natural History, NAS of Ukraine. Kyiv, 2019. Vol. 5. P. 223–224. (In Ukrainian)
18. Тимошенко В., Бронсков А. Тушканчик большой (*Allactaga major*) в Северном Приазовье (Украина): распространение и численность // Праці Теріологічної Школи. 2015. Т. 13. С. 49–56.  
*Timoshenkov V., Bronskov A.* The great jerboa (*Allactaga major*) in the North Azov Region (Ukraine): distribution and abundance // Proceedings of the Theriological School. 2015. Vol. 13. P. 49–56. (In Ukrainian)
19. Філіпенко С. Ссавці ряду Carnivora в остеологічній колекції Зоологічного музею Луганського національного університету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2017. Вип. 75. С. 107–118.  
*Filipenko S.* Carnivore mammals in the osteological collection of the Zoological museum of Luhansk National University // Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2017. Is. 75. P. 107–118. (In Ukrainian)
20. Червоненко О. В. Сьогодення та перспективи природничих музеїв як наукових і освітніх закладів в Україні // Вісн. Нац. науково-природничого музею. 2015. Т. 13. С. 139–141.  
*Chervonenko O. V.* The Current state and perspectives of natural history museums as research and educational centers in Ukraine // Proceedings of the National Museum of Natural History. 2015. Vol. 13. P. 139–141. (In Ukrainian)
21. Шевченко Л. С., Золотухина С. І. Млекопитающие. Вып. 2. Насекомоядные, рукокрылые, зайцеобразные, грызуны. К.: ННПМ НАН Украины, 2005. С. 1–238.  
*Shevchenko L. S., Zolotukhina S. I.* Mammals. Is. 2. Insectivores, Bats, Lagomorphs. Kyiv: National Museum of Natural History of Ukraine, 2005. P. 1–238. (In Ukrainian)
22. Шидловський І. Історія музейної справи та зоологічних музеїв університетів України. Ред. Й. Царик. Львів: ЛНУ ім. І. Франка, 2012. С. 1–112.  
*Shydlovskyy I. V.* History of Museum Work and Zoological Museums of Universities of Ukraine. Ed. by J. Tsaryk. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv. 2012, P. 1–112. (In Ukrainian)
23. Цюпка В. Нові знахідки хохулі руської (*Desmana moschata*) у басейні річки Сейм // Праці Теріологічної Школи. 2012. Т. 11. С. 145–147.  
*Tsiupka V.* New finds of the Russian desman (*Desmana moschata*) in the basin of Seim river // Proceedings of the Theriological School. 2012. Vol. 11. P. 145–147. (In Ukrainian)
24. Коробченко М., Загороднюк І. Mole-rat from Khortytsia in the light of morphological and geographical relations between *Spalax zemni* and *S. microphthalmus* // Proceedings of the Theriological School. 2016. Vol. 14. P. 84–94.
25. Kron A., Lugovoy O., Roshko Vc. et al. The mammal collection (Mammalia) of the Zoological Museum of Uzhhorod National University // Theriologia Ukrainica. 2019. Vol. 18. P. 57–64.
26. Zagorodniuk I. Species of the genus *Plecotus* in the Crimea and neighbouring areas in the Northern Black Sea Region // Woloszyn, B. W. (ed.). Proceedings of the VIII ERBS. Vol. 2: Distribution, Ecology, Paleontology and Systematics of Bats. Krakow: Platan Publ. House. 2001. P. 159–173.
27. Zagorodniuk I. Range dynamics in sibling species: facts and reconstructions for the mammal fauna of Eastern Europe // Theriologia Ukrainica. 2019. Vol. 18. P. 20–39.

28. *Zatushevskyy A. T., Shydlovskyy I. V., Zakala O. S. et al. Catalogue of the Mammals Collection of the Zoological Museum of Ivan Franko National University of Lviv. Lviv: Publishing Center of the Ivan Franko National University of Lviv, 2010. P. 1–442. (In Ukrainian)*

*Стаття надійшла до редакції 13.04.20*

*доопрацьована 20.07.20*

*прийнята до друку 24.07.20*

## **ССАВЦІ В КОЛЕКЦІЇ ЗООЛОГІЧНОГО МУЗЕЮ ЗАПОРІЗЬКОГО УНІВЕРСИТЕТУ: ЗАГАЛЬНИЙ ОГЛЯД ТА УНІКАЛЬНІ ЗРАЗКИ**

**I. Загороднюк<sup>1</sup>, Н. Лебедєва<sup>2</sup>, З. Баркасі<sup>1</sup>, О. Коротя<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Національний науково-природничий музей НАН України  
вул. Богдана Хмельницького, 15, Київ 1030, Україна  
e-mail: igor.zagorodniuk@gmail.com; orcid: 0000-0002-0523-133X  
e-mail: zlbarkasi@ukr.net; orcid: 0000-0003-3155-6362*

<sup>2</sup>*Запорізький національний університет  
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя 69600, Україна  
e-mail: natalyredfox@gmail.com; orcid: 0000-0001-9831-6975*

Розглянуто історію формування та сучасний стан колекції ссавців Зоологічного музею при Запорізькому національному університеті. Нарис включає два основних розділи – «Загальний опис музею» та «Унікальні зразки». Перший із них містить історичні відомості й опис приміщення та Загальний опис колекції. Другий розділ присвячено опису унікальних зразків як елементу експозиції та опису й аналізу унікальних зразків як свідочств і джерел цінної фауністичної інформації. Музей створено 1997 року, проте період накопичення матеріалу й історія остеологічної колекції починаються з 1987 року, коли в Запорізькому університеті було створено біологічний факультет. Експозиційна частина містить як опудала ссавців, так і остеологічні матеріали (черепи), змонтовані у скляних шафах і на стендах. Ця частина експозиції оформлена як окрема зала музею («Зелена» зала), де представлені ссавці та птахи. Основна колекція черепів (понад 800 зразків) зберігається у фондовій колекції у шафах, що розміщені в робочих кімнатах кафедри біології лісу, мисливствознавства й іхтіології; це робочі матеріали, які збирають науковці та студенти кафедри. В остеологічній колекції є 240 черепів *Vulpes vulpes*, 89 *Canis lupus*, 77 *Ondatra zibethicus*, 77 *Lepus europaeus*, 57 *Nyctereutes procyonoides*, 27 *Martes foina*, 9 *Canis aureus*, 4 *Lutra lutra*; загалом цих видів – 580 зразків; натомість кількість копитних не облікована, але вона не менша за обсягом від колекції хижих. В експозиційній частині вирізняються 4 групи зразків – група динамічних фігур (усі з місцевої фауни з групи «мисливських» звірів), колекція черепів (по 1–2 зразки кожного з видів, переважно від розміру їжача чи ласки до розміру лося), екзоти (включно з мавпами, криланамі, броненосцями тощо), раритетні види місцевої фауни Приазов'я. Серед високоцінних з фауністичної точки зору зразків, зібраних на теренах України, вирізняються такі раритетні види: 1) тушкан *Allactaga major* (1 екз., опудало, 2011 р., окол. с. Приморський Посад Запорізької обл.); 2) сліпак *Spalax microphthalmus* (1 екз., уроч. Лиса гора, біля смт Василівка Запорізької обл., 12.2013); 3) кажан *Plecotus austriacus* (1 екз., окол. смт Кушугум Запорізької обл., 12.2018); 4) *Desmana moschata* (1 екз., Сумська обл., 20.11.2018).

*Ключові слова:* ссавці, теріологічні колекції, зоологічні музеї, університети України, національне надбання

## СОРОКОПУДИ РОДУ *LANIUS* У ЗАКАРПАТСЬКІЙ ОБЛАСТІ УКРАЇНИ

О. Станкевич-Волосянчук

Ужгородський національний університет  
вул. А. Волошина, 32, Ужгород 88000, Україна  
e-mail: oksana.stankiewicz-volosianchuk@uzhnu.edu.ua

Публікація стосується питання статусу й ареалу поширення сорокопудів тернового *Lanius collurio*, чорнолобого *Lanius minor* та сірого *Lanius excubitor* на теренах Закарпатської області України. Досі сучасний статус сорокопудів сірого та чорнолобого в області не було чітко визначено. У публікації подано детальний літературний огляд про чисельність, характер перебування та поширення цих видів сорокопудів на території Закарпаття упродовж століття. Представлено аналіз власних даних, зібраних під час досліджень території Закарпатської низовини та передгір'я внутрішнього краю Вигорлат-Гутинського хребта Українських Карпат протягом 1993–2000 та 2010–2018 років. У результаті аналізу зібраного матеріалу встановлено, що сорокопуд терновий є звичайним і численним видом будь-яких біотопів у межах області, окрім лісових, водно-болотних (акваторій і боліт) і селітебних. Сорокопуди чорнолобий і сірий є рідкісними гніздовими видами для Закарпаття, однак у межах придатних для них біотопів на території області вони є звичайними. Обидва види поширені, переважно, на території низинного Закарпаття. Трапляються у дібрових передгір'я Вигорлат-Гутинського хребта. Сорокопуд сірий у Закарпатті також зимує. Взимку цей вид залітає у прирічкові ліси гірських районів області. Обидва види обирають для себе подібні або одні й ті ж природі чи трансформовані зволожені біотопи: 1) заплавні чагарники; 2) чагарники, тополеві деревостани й узлісся дібров неподалік водойм – річок, каналів, водосховищ; 3) агроценози, пронизані меліоративними каналами, з вкрапленням фруктових дерев. Стратегія охорони цих видів має полягати у збереженні тих біотопів, які є важливими для їхнього гніздування та проживання: заплавні діброви й чагарники у межах РЛП «Притисянський», нижні течії річок Латориця, Боржава та Уж, а також біотопи меліоративних систем – Батарської та Берегівської – в долині р. Тиса. Для цього необхідно створювати нові природно-заповідні території та об'єкти Смарагдової мережі України й розробляти відповідні менеджмент-плани тих природоохоронних територій, у межах яких охороняються ці види.

*Ключові слова:* сорокопуди, Закарпаття, біотоп, водно-болотні угіддя, меліорація

На території Закарпатської обл. трапляються 3 види сорокопудів зі 7 відомих для фауни України [25]. Однак відомостей про ці види в умовах Закарпаття дуже мало, особливо стосовно сорокопуда сірого *Lanius excubitor* Linnaeus, 1758 та сорокопуда чорнолобого *Lanius minor* Gmelin, 1788: їхнього поширення, чисельності та статусу перебування на теренах області. Так, О.Є. Луговой [12] вважав, що сорокопуд сірий на Закарпатті трапляється переважно у позагніздовий час і дуже рідко гніздиться. Сорокопуда чорнолобого також визначав як дуже рідкісного на гніздівлі.

Перші згадки про сорокопудів на Закарпатті знаходимо у О. Грабаря [29]. Сорокопуда тернового *Lanius collurio* Linnaeus, 1758 він вважав звичайним для Закарпаття птахом, сорокопуда сірого – зимуючим видом, який трапляється також на весняному прольоті. А

сорокопуда чорнолобого – звичайним видом для «тополевих гаїв» низинного Закарпаття, який не трапляється високо в горах і повертається з зимівлі на гніздування пізньою весною.

Дослідження орнітофауни Закарпаття на зламі ХХ та ХХІ ст. підтверджують статус сорокопуда тернового як звичайного гніздового виду краю, поширеного в річкових долинах, на луках та узліссях низинних і передгірських районів області, а також рідкісного літучого у горах [1, 11, 14]. Однак ці дослідження дають нам дуже мало інформації про сорокопудів сірого та чорнолобого.

У середині ХХ ст. про сорокопудів сірого й чорнолобого згадують Л.А. Портенко [18] та Ф.І. Страутман [24] як про гніздові види в долинах передгір'я, а В.С. Талпош [26] трохи пізніше визначає ці види як дуже рідкісні гніздові на території Закарпатської низовини. У кількох публікаціях згадується про гніздову пару сорокопуда сірого в урочищі Чорний Мочар [13, 16]. Також цей вид є у списках дуже рідкісного гніздового виду Карпатського біосферного заповідника (КБЗ) у межах його філій – у «Долині нарцисів» [3]. Тут же зазначають, що на цих теренах сорокопуд сірий трапляється не щороку. В інших публікаціях сорокопуди сірий і чорнолобий на території КБЗ (імовірно, на території філії «Долина нарцисів») згадані як дуже рідкісні залітні птахи [2]. При цьому зазначено, що ще 10 років тому цих видів на теренах КБЗ не відмічали взагалі [6].

На деякі згадки про сорокопудів сірого та чорнолобого на території Закарпаття на зламі ХХ–ХХІ ст. ми також натрапляємо в публікаціях О.Є. Лугового щодо гніздової орнітофауни долини р. Тиса у межах РЛП «Притисянський» і природних заплав низинного Закарпаття [8, 10]. Знову-таки, тут ці види згадані як надзвичайно рідкісні для названих теренів. Однак немає жодних оцінок їхньої імовірної чисельності або щільності населення. Їхні знахідки відмічаються переважно в меліорованій заплаві р. Тиса, а саме в агроландшафтах зі садами та населеними пунктами, заболоченими місцевостями й на узліссях заплавлених дібров у районі найбільшого водно-болотного угіддя Закарпаття, меліорованого у ХХ ст., – Чорного Мочара (Серне). Щодо долини р. Уж, де у 1947 р. ці види фіксував Л.А. Портенко [18], то вже наприкінці ХХ ст. їх тут не спостерігали взагалі [15].

#### Матеріали та методи

Наші власні дані про чисельність, поширення та характер перебування усіх трьох видів сорокопудів на території Закарпатської обл. зібрано протягом майже двох десятиліть. Основні дані зібрано під час досліджень території Закарпатської низовини, яка з північного сходу обмежена Вигорлат-Гутинським хребтом Українських Карпат, і в передгір'ї цього хребта, яке межує з Закарпатською низовиною (рис. 1).

З 1993 по 2004 р. ми вели систематичні цілорічні, а з 2010 по 2017 р. – спорадичні дослідження орнітофауни і населення птахів м. Ужгорода [20–22]. Окрім селітебної частини міста, досліджували також «природні» біотопи, до яких належать парки, лісопарк і прирічковий біотоп, представлений набережними вздовж р. Уж. У 2014–2015 рр. ми досліджували орнітофауну та населення птахів долини р. Ботар і межиріччя річок Тиси-Туру, включно з наявними водосховищами та риборозплідниками у Виноградівському районі області [23]. Річка Ботар є низинною річкою і являє собою одамбований з обох боків головний канал Ботарської меліоративної системи. Лише в пониззі за 12 км від гирла річка меандрує та має природну заплаву, не обмежену дамбою з лівого боку. Цими дослідженнями не був охоплений тільки зимовий період. Протягом 2015–2018 рр. ми вели дослідження фауни і населення птахів долини річки Уж у середній течії (від с. Кам'яниця до с. Оноківці) та Оріхівського озера неподалік від Ужгорода. Також протягом 2015–2016 рр. було здійснено одноразові обліки гніздової орнітофауни Бобовищанського



та Пістрялівського водосховищ і їхніх околиць у Мукачівському р-ні та заплавних біотопів і агроландшафтів системи меліоративних каналів у низинній частині течії р. Латориця в Ужгородському р-ні в околицях м. Чоп і с. Руські Геєвці.

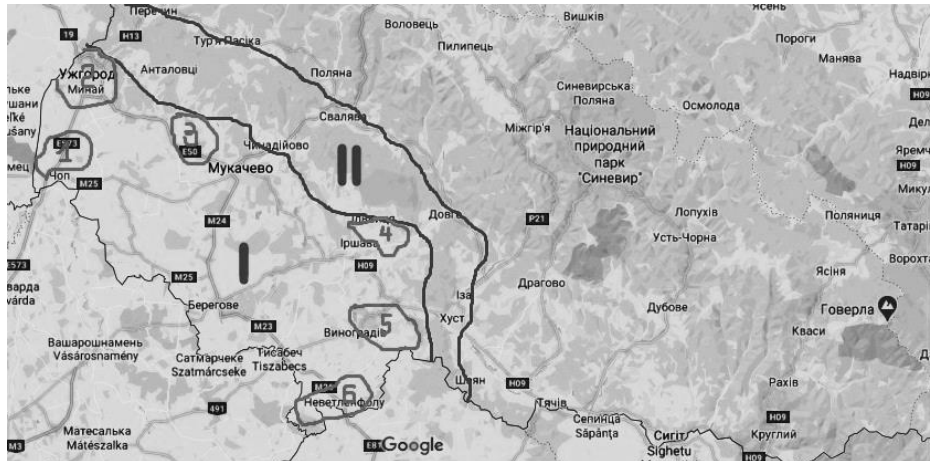


Рис. 1. Територія досліджень: I – Закарпатська низовина, II – Вигорлат-Гутинський хребет; 1–6 – досліджені ділянки

Для обліку птахів застосовували маршрутний метод [19]. Ширина облікової смуги становила 100 м (50 м по обидва боки). Обліки проводили за хорошої погоди зранку. Довжина пройдених маршрутів становила від 1 до 6 км. Всього пройдено 208 км облікового маршруту.

Поділ птахів за категоріями чисельності подано за О.П. Кузякіним [5]: чисельні – 10–100 ос./км<sup>2</sup>, звичайні – 1,0–10 ос./км<sup>2</sup>, рідкісні – 0,1–1,0 ос./км<sup>2</sup> та дуже рідкісні – 0,01–0,1 ос./км<sup>2</sup>.

### Результати і їхнє обговорення

**Сорокопуд терновий.** Звичайний гніздовий вид Закарпаття. Має сприятливий європейський охоронний статус (категорія SPEC 4). Його внесено до списку Резолюції № 6 Конвенції про охорону дикої флори та фауни і природних оселищ у Європі (Бернська конвенція), охороняється Директивою ЄС зі збереження диких птахів.

Сорокопуд терновий наявний всюди на узліссях, у лучно-чагарникових біотопах, у заплавах водойм із розрідженим чагарником, в агроценозах, на околицях населених пунктів сільського типу, у «природних» біотопах урболандшафтів (табл. 1).

Таблиця 1

Щільність *L. collurio* у гніздовий період на території Закарпатської низовини та передгір'я внутрішнього краю Вигорлат-Гутинського хребта Карпат (ос/км<sup>2</sup>)

Біотоп	Щільність
«Природні» біотопи м. Ужгорода	7,0
Прирічкові біотопи середньої течії р. Уж	18,0
Лучно-чагарниковий біотоп довкола Орхівського озера	20,0
Лучно-чагарниковий біотоп довкола ставка біля с. Руські Геєвці	15,0
Прибережна смуга Пістрялівського водосховища	23,3
Лучно-чагарниковий біотоп довкола Бобовищанського водосховища	99,0
Риборозплідні ставки на р. Млиновиця (басейн р. Ботар)	17,0
Лучно-чагарниковий біотоп довкола Гудянського водосховища	16,2
Прирічкові біотопи р. Ботар	7,4

Сорокопуд терновий – переважно численний вид пташиних угруповань будь-яких біотопів, окрім лісових, водно-болотних (акваторій і боліт) та селітебних. На відкритих ділянках «природних» біотопів міста він звичайний. Для перебування сорокопуда тернового на території бажана наявність колючих чагарників. Наразі у Закарпатті, як і в Україні, цьому виду нічого не загрожує.

**Сорокопуд сірий** є гніздовим і зимуючим видом Закарпаття. Сорокопуда сірого внесено до Червоної книги України (2009), він має несприятливий європейський охоронний статус (категорія SPEC 3). Усі проаналізовані літературні дані про сорокопуда сірого у Закарпатті свідчать про те, що у гніздовий період цей вид трапляється найчастіше на території Закарпатської низовини, охоплюючи всю територію дуги Вигорлат-Гутинського хребта Карпат від південно-західного відрозу, який тягнеться зі Словаччини, зачіпаючи м. Ужгород, до найсхіднішої гряди Юліївських гір на кордоні з Румунією [27]. У середині ХХ ст. сорокопуда сірого нерідко відмічали у долинах Латориці, Боржави й Тересви на схилах, вкритих фруктовими садами [24]. З кінця ХХ ст. цей вид для гірських районів став дуже рідкісним залітним птахом. Зокрема, його реєстрували взимку, коли він активно кочує, вздовж р. Тиса в околицях Рахова [7] та в заплавному лісі р. Уж поблизу Ужгорода [9]. Сорокопуд сірий також наявний у списках птахів території Берегівської польдерної системи, яка охоплює суміжні частини Берегівського й Ужгородського р-нів [4]. Не рідкісним цей вид також є в агроландшафтах, болотах, алейних посадках уздовж доріг та на узліссях поблизу меліорованого Чорного Мочара, де він і гніздиться [17].

Поширення сорокопуда сірого у межах низинної частини області підтверджують результати наших досліджень. В Ужгороді цей вид є залітним, тобто трапляється протягом сезону з року в рік нерегулярно. Взимку сорокопуд сірий траплявся лише в лісопарковому біотопі міста, представленому природним дубово-грабовим лісовим масивом. Улітку цей вид у межах м. Ужгорода траплявся на відкритій місцині в парковому біотопі, представленому Боздоським парком, а також у лісопарковому біотопі (табл. 2). Тут птах сидів на верхівці дуба на краю лісу, що виходить на магістральну вулицю міста й окружну трасу Ужгорода. Гніздування сорокопуда сірого у природних біотопах м. Ужгорода не доведено – у гніздовий період спостерігали тільки одиничні особини цього виду. Для міського парку він є рідкісним видом (0,4 ос./км<sup>2</sup>), а у лісопарку – звичайним улітку (6,6 ос./км<sup>2</sup>) та дуже рідкісним взимку (0,01 ос./км<sup>2</sup>).

Таблиця 2

Щільність *L. excubitor* на території Закарпатської низовини та передгір'ї внутрішнього краю Вигорлат-Гутинського хребта Карпат (ос/км<sup>2</sup>)

Біотоп	Щільність	
	Гніздовий період	Кочовий період (осінь-зима)
«Природні» біотопи м. Ужгород	3,5	0,01
Прирічкові біотопи р. Ботар	2,7	–
Лучно-чагарниковий біотоп довкола Гудянського водосховища	1,25	–
Агроценоз у межиріччі річок Тиса-Тур	–	3,0

Втім, гніздування сорокопуда сірого нами встановлено для Виноградівського р-ну. Гніздові пари, а також гнізда сорокопуда сірого не є рідкісними у долині р. Ботар, розташованої у межиріччі річок Тиса й Тур.

Переважає частина території межиріччя Тиса-Тур рівнинна, географічно розміщена у межах Закарпатської низовини. Верхів'я басейну р. Ботар разом з притоками беруть свій початок на Авашських горах – південно-східній окраїні вулканічного Вигорлат-

Гутинського внутрішнього хребта. Окремо в рівнинному рельєфі виділяється невелика гряда куполоподібних пагорбів Юлівських гір. Ще 100 років тому ці території являли собою заливні заплавні ландшафти – ліси і луки, однак зараз це практично суцільні агроценози, пронизані системою меліоративних каналів, головним з яких є каналізована р. Ботар довжиною 53 км. Біля с. Гудя розташоване водосховище, пов'язане з Ботаром шлюзами. Біля смт Вилок р. Ботар впадає в р. Тиса. Втім, у пониззі, біля українсько-угорського кордону ділянка р. Ботар збережена в природному стані, з характерними меандрами русла та невеликою, обмеженою дамбами, заплавою. У заплаві збереглися мочарі, заплавні луки, невеликі водойми-стариці та водойми штучного походження – копанки.

Сорокопуд сірий відзначений нами на обліках у гніздовий період уздовж усієї долини р. Ботар, включно з лучно-чагарниковими біотопами довкола водосховищ і риборозплідників, пов'язаних із Ботаром.

У період осінніх міграцій сорокопуда сірого ми спостерігали не в межах заплави та придамбових територій, а в чагарниках, порослих уздовж меліоративних каналів серед агроценозів. Гнізда сорокопуда сірого ми знаходили на старих фруктових деревах, які ростуть рядами уздовж зовнішнього боку дамб і становлять умовну межу між дамбами та ріллею або пасовищем. Агроценози є хорошими кормовими угіддями для цього виду. Тут вони полюють на мишоподібних гризунів і ящірок.

За результатами наших досліджень, сорокопуд сірий у долині р. Ботар є звичайним видом. На основі літературних і зібраних нами даних можна визначити ареал поширення сорокопуда сірого у межах Закарпатської обл. й охарактеризувати біотопи, яким вони надають перевагу. Очевидно, що гніздова популяція цього виду локалізується у зволжених біотопах: природних і трансформованих. Це можуть бути 1) заплавні чагарники; 2) чагарники й узлісся дібров неподалік водойм – річок, каналів, водосховищ; 3) агроценози, пронизані меліоративними каналами, з вкрапленням фруктових дерев.

Узимку та під час осінньо-весняних кочівель одиничні особини цього виду можуть залітати по долинах річок у гірські райони. При цьому вони тримаються прирічкових біотопів, представлених прирусловими лісосмугами тополево-вербових і тополево-вільшаних заростей.

**Сорокопуд чорнолобий.** Вид внесений до переліку хребетних тварин, що підлягають особливій охороні на території Закарпатської області; має несприятливий європейський охоронний статус (категорія SPEC 2). Через скорочення чисельності у Європі внесений до Резолюції № 6 Бернської конвенції та захищений Директивою ЄС зі збереження диких птахів.

Згідно з відомими нам літературними даними про сорокопуда чорнолобого у Закарпатті, за останні пів століття його відмічали на гніздуванні у низинній частині області, і щоразу його знахідки були пов'язані з заплавними біотопами – луками, узліссями або трансформованими меліорацією системами каналів; також зі садами та виноградниками [28]. У садках і прирічкових гаях півстоліття тому також відмічали його на гніздівлі та в долинах річок Уж, Латориця й Тересва [24]. Цей вид також згадується як рідкісний у гніздовому населенні регулярно підтоплюваного лісу річкою Уж північніше адміністративної межі Ужгорода [9].

У рамках наших досліджень сорокопуд чорнолобий траплявся лише в долині р. Ботар. На цій території нам відомо кілька гніздових пар виду. Гнізда сорокопуда чорнолобого були розташовані у кроні тополі чорної та на фруктових деревах, які ростуть із зовнішнього боку насипних протипаводкових дамб у межах долини р. Ботар (табл. 3).

Таблиця 3

Щільність *L. minor* у гніздовий період у біотопах низинного Закарпаття (ос/км<sup>2</sup>)

Біотоп	Щільність
Прирічковий біотоп природної заплави р. Ботар	0,4
Прирічковий біотоп заплави каналізованої частини р. Ботар	6,1

У природній заплаві р. Ботар сорокопуд чорнолобий виявився рідкісним видом, але вздовж каналізованої частини річки він є звичайним.

Вважають, що сорокопуд чорнолобий більш численний чи більш поширений вид Закарпаття, ніж сорокопуд сірий. Наразі на основі зібраних нами даних ми не можемо ні підтвердити, ні спростувати цю думку. Очевидним є лише те, що його чисельність, а також ареал поширення помітно скоротилися з часів, коли вид згадували у літературі вперше [29].

Вочевидь, у першу чергу, через меліорацію та зарегулювання природних заплав річок Тиса, Латориця і Боржава, де й росли «тополеві гаї» – заливні заплавні та галерейні тополеві ліси. Сьогодні, з огляду на результати наших досліджень і літературні дані, стає зрозуміло, що обидва види – сорокопуд чорнолобий і сорокопуд сірий – обирають для себе подібні або одні й ті ж біотопи, а їхні гніздові ареали практично збігаються (рис. 2). Тож стратегія охорони цих видів має полягати у збереженні тих біотопів, які є важливими для їхнього гніздування та проживання.

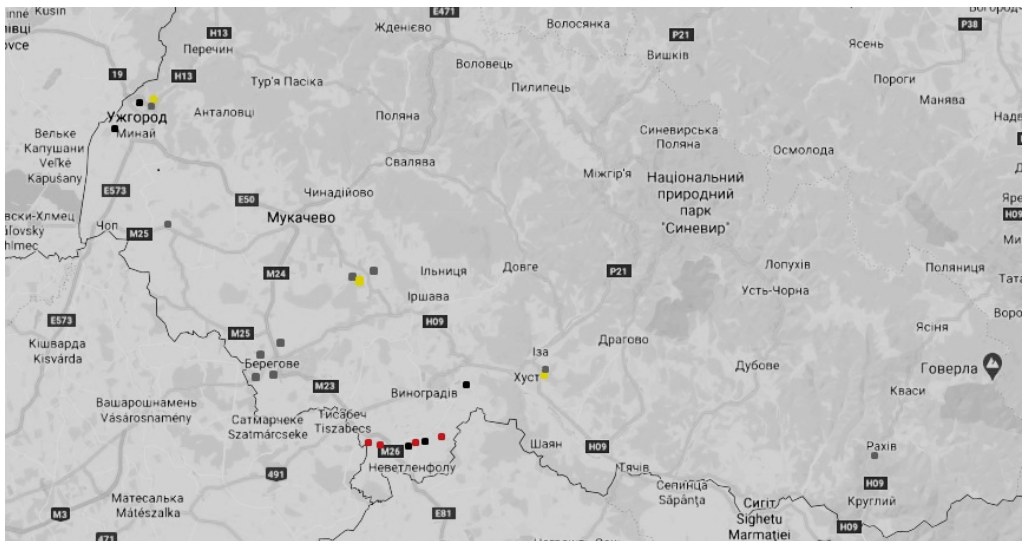


Рис. 2. Місця реєстрації сорокопудів у Закарпатській області протягом 1990–2018 рр.: *L. excubitor*: наші дані – чорний колір, літературні дані – сірий колір; *L. minor*: наші дані – червоний колір, літературні дані – жовтий колір

Проаналізовані літературні відомості щодо сорокопудів тернового, чорнолобого та сірого на території Закарпатської обл., а також зібрані нами дані в результаті власних досліджень, дають можливість стверджувати, що сорокопуд терновий є поширеним численним видом відкритих ландшафтів області. Проникає високо в гори по долинах річок. Сорокопуди сірий і чорнолобий є рідкісними видами Закарпаття через обмежений ареал поширення.

Сорокопуд сірий у гніздовий період відмічений лише у низинній частині Закарпаття та на межі з передгір'ям внутрішнього краю Вигорлат-Гутинського хребта Карпатських гір.

У зимовий і міграційний період по річкових долинах може проникати в гірську місцевість (430 м н. р. м.). У придатних біотопах він є звичайним або рідкісним видом. Відповідно, для всієї області є дуже рідкісним.

Така сама ситуація і для сорокопуда чорнолобого. Щоправда, відомостей про його проникнення у гори немає: він відлітає на зиму до Південної Африки й повертається у Закарпаття наприкінці квітня – на початку травня. Після масштабної меліорації заплавних територій і мочарів у низинному Закарпатті, будівництва дамб та регуляції річок сорокопуд чорнолобий трохи змінив біотопи свого перебування із заливних заплавних тополевих лісів на трансформовані людиною ландшафти – агроценози з лучно-чагарниковими біотопами зарегульованих заплав. Хоча досі трапляється і в заплавних лісах.

У статті про сорокопуда сірого Червоної книги України (2009) зазначено, що на теренах Закарпаття цей вид охороняється у Карпатському біосферному заповіднику. Однак, як вже нами з'ясовано, у межах КБЗ сорокопуд сірий є дуже рідкісним залітним видом, а випадки його спорадичного гніздування відомі лише в долині р. Хустець у філії «Долина нарцисів». Ефективніше було б охороняти цей вид на території РЛП «Притисянський», яка включає заплавні біотопи річок Тиса, Латориця, Боржава, а також на території Ботарської польдерної системи у межиріччі річок Тиси й Туру, яка включає агроландшафти, систему меліоративних каналів та одамбовану заплаву р. Ботар із лучною рослинністю й чагарниками.

У реальності до сьогодні РЛП «Притисянський» створено лише на папері: парк не має ні адміністрації, ні фінансування; його межі не винесено в природу, немає проекту організації території. Тобто, по суті, він не діє, і в межах парку не здійснюються ні охорона, ні менеджмент, ні будь-яка моніторингова чи просвітницька діяльність. У долині р. Ботар на площі 277,1 га в межах природної заплави річки у 2016 р. створено ботанічний заказник місцевого значення, де також охороняються й оселища сорокопудів сірого та чорнолобого. Однак для збереження цих видів варто забезпечити адекватний менеджмент території всієї долини р. Ботар, наприклад, через внесення долини річки об'єктом до Смарагдової мережі та через розробку чіткого плану управління цією природоохоронною територією.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Годованець Б. Й.* Сучасний стан фауни птахів Карпатського біосферного заповідника // Заповідна справа в Україні. 1996. Т. 2. С. 36–41.
2. *Годованець Б. Й.* Сучасний стан орнітофауни Карпатського біосферного заповідника // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. 2008. Вип. 23. С. 33–39.
3. *Годованець Б. Й., Луговой О. Є., Гузій А. І.* та ін. Фауна, населення та особливості гніздової біології птахів філіалу Карпатського заповідника “Долина нарцисів” і його околиць // Заповідна справа в Україні. 1995. Т. 1. С. 51–56.
4. *Комендар В. І., Мигаль А. В., Кіш Р. Я.* та ін. Природні цінності української частини регіону Берег: сучасний стан і відтворення. Ужгород: ІВА, 2010. 55 с.
5. *Кузякин А. П.* Зоогеография СССР // Учен. зап. МОПИ. 1962. Т. 109. С. 3–182.
6. *Луговой А. Е.* Птицы // Фауна Карпатского заповедника. М., 1988. С. 19–35.
7. *Луговой А. Е.* О зимнем населении птиц верховий р. Тиса начала 80-х годов // Екологічні аспекти охорони птахів. Івано-Франківськ, 1999. С. 61–62.
8. *Луговой А. Е.* Современное состояние популяций птиц естественных участков пойменно-заливных ландшафтов Закарпатья // Беркут. 2003. Т. 12 (1–2). С. 1–8.
9. *Луговой А. Е.* Сезонная динамика населения птиц уремы реки Уж (Закарпатская область) и ее русла // Беркут. 2005. Т. 14 (1). С. 24–27.

10. *Луговой А. Е.* Гнездовая фауна птиц долины р. Тисы в пределах проектируемого Припятского регионального ландшафтного парка и необходимые меры по его сохранению // Заповідна справа в Україні. 2005. Т. 11 (1). С. 31–39.
11. *Луговой А. Е., Боднар В. В., Геревич А. В.* и др. Гнездовая фауна течения р. Уж // Фауна Східних Карпат: сучасний стан і охорона. Ужгород, 1993. С. 133–135.
12. *Луговой О., Ковальчук А.* Раритетна фауна Закарпаття. Хребетні тварини. Ужгород, 1999–2000. 121 с.
13. *Луговой А. Е., Мателешко Ю. И.* Новые изменения в фауне и населении птиц урочища Черный Мочар (Закарпатская область) // Праці укр. орнітолог. тов-ва. К., 1996. Т. 1. С. 30–36.
14. *Луговой А. Е., Потіш Л. А.* Материалы инвентаризации орнитофауны регионального ландшафтного парка «Стужица» // Заповідна справа в Україні. 1998. Т. 4 (2). С. 24–32.
15. *Луговой А. Е., Потіш Л. А., Кузьма В. Ю., Геревич А. В.* Изменения в фауне птиц долины р. Уж (Закарпатье) во второй половине XX столетия // Беркут. 2001. Т.10 (1). С. 26–30.
16. *Луговой А. Е., Талнош В. С.* Птицы урочища Черный Мочар после его мелиорации (Закарпатская область) // Орнитология. 1968. Вып. 1. С. 76–79.
17. *Покритюк Л. Л.* Реєстрації «червонокнижних» птахів (Aves) в рівнинній частині Закарпаття // Матеріали до 4-го видання Червоної книги України. Тваринний світ. Серія: «Conservation Biology in Ukraine». 2019. Т. 3. Вип. 7. С. 258–262.
18. *Портенко Л. А.* Очерк фауны птиц Западного Закарпатья // Памяти академика П.П. Сушкина, 1950. С. 301–359.
19. *Равкин Е. С., Челинцев Н. Г.* Методические рекомендации по комплексному маршрутному учету птиц. М.: Изд-во ВНИИ Природа, 1990. 33 с.
20. *Станкевич О. І.* Видовий склад та населення птахів міста Ужгорода взимку // Вестн. зоологии. 2001. 35 (6). С. 33–38.
21. *Станкевич О. І.* Фауна та населення птахів міста Ужгорода у гніздовий період // Наук. вісн. УжНУ. Сер. біол. 2004. Вип. 15. С. 123–128.
22. *Станкевич-Волосянчук О. І.* Особливості орнітокомплексів долини р. Ботар на Затисянщині у гніздовий період // Troglodytes. 2016. Вип. 7. С. 86–94.
23. *Станкевич-Волосянчук О. І.* Орнітофауна міста Ужгорода // Наук. вісн. УжНУ. Сер. біол. 2017. Вип. 47. С. 31–39.
24. *Страутман Ф. И.* Птицы западных областей УССР. Т. 2. Львов: Изд-во Львов. ун-та, 1963. 182 с.
25. *Тайкова С. Ю.* Сорокопуди роду *Lanius* з України: огляд таксономії, історія досліджень та представленість у колекції Національного науково-природничого музею НАН України // Вісн. Нац. наук.-природнич. музею. 2016. Вип. 14. С. 64–72.
26. *Талнош В. С.* Изменения в орнитофауне Закарпатской низменности в XX столетии // Орнитология в СССР. 1969. Т. 2. С. 637–640.
27. *Талнош В. С.* Птицы населенных пунктов Закарпатской низменности // Вестн. зоологии. 1974. 4. С. 16–22.
28. *Талнош В. С.* Птицы садов и виноградников Закарпатья // Вестн. зоологии. 1976. 1. С. 20–27.
29. *Hrabar A.* Ptactvo na Podkarpatskй Rusi // Sbornik Zemskй muzejnn spoleinnosti v Uћhorode, 1938. S. 59–86.

---

**SHRIKES OF THE GENUS *LANIUS*  
IN THE ZAKARPATTIA REGION OF UKRAINE****O. Stankiewicz-Volosianchuk**

*Uzhhorod National University*  
32, A. Voloshyn St., Uzhhorod 88000, Ukraine  
e-mail: oksana.stankiewicz-volosianchuk@uzhnu.edu.ua

The publication presents status and distribution areas of *Lanius collurio*, *L. minor* and *L. excubitor* on the territory of the Zakarpattia region of Ukraine. By this time the status of *L. excubitor* and *L. minor* in Zakarpattia region not been determined. The publication presents a detailed literature review of the abundance, nature of the stay and distribution of these species of shrikes in the Zakarpattia region during the century. The analysis presents own data collected during the studies of the territory of the Zakarpattia lowland and the foothills of the inner edge of the Vyhorlat-Hutynskyi Range of the Ukrainian Carpathians for 1993–2000 and 2010–2018. As a result of the collected material, it was found that *L. collurio* is an ordinary and abundant species of any biotopes within the region, except for forest, wetland (water areas and wetlands) and settlements. *L. minor* and *L. excubitor* are rare nesting species for Zakarpattia, but within the limits of their habitats in the region they are usual. Both species are spread, mainly in the territory of lowland Zakarpattia. They also live in the oak and flood-plain forests of foothills Vygorlat-Hutynskyi Range. *L. excubitor* in Zakarpattia region is also wintering. This species flies into the flood-plain forests of mountainous areas of the region in winter. Both species choose for themselves the same or similar natural or transformed moist biotopes: 1) floodplain shrubs; 2) shrubs, poplar stands and edges of nemoral forests near water bodies – rivers, canals, reservoirs; 3) agrocenoses permeated with meliorative channels, with sparse fruit trees. The strategy for the conservation of these species should consist in preserving the biotopes that are important for their nesting and habitats: floodplain nemoral forests and shrubs within the RLP “Prytysiansky”, lower reaches of Latoritsa, Borzhava and Uzh rivers, as well as biotopes of melioration systems - Batarska and Berehivska - in the valley of the Tysa river. To do this, it is necessary to establish new nature-protected areas and units of the Emerald Network of Ukraine and to develop appropriate management plans for those protected areas, where these species are protected.

*Keywords:* shrikes, Zakarpattia region, biotop, wetland, melioration

## РОЗПОДІЛ ГОЛИХ АМЕБ У ҐРУНТАХ СТЕПОВОЇ ЗОНИ УКРАЇНИ

М. Пацюк

Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. Пушкінська, 42, Житомир 10008, Україна  
e-mail: kostivna@ukr.net

У результаті проведеного дослідження в ґрунтах степової зони України (Одеська, Миколаївська, Кіровоградська обл.) ідентифіковано 12 видів голих амеб, які за сучасною системою Еукаріот належать до трьох молекулярних кластерів Tubulinea Smirnov et al., 2005, Discosea Cavalier-Smith et al., 2004, Discoba Simpson in Hampl et al., 2009. Це види: *Vahlkampfia* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (2), *Deuteramoeba mycophaga* Page, 1988, *Saccamoeba stagnicola* Page, 1974, *Vexillifera* sp., *Vannella* sp., *Ripella platypodia* Smirnov, Nasonova, Chao et Cavalier-Smith, 2007, *Cochliopodium* sp. (1), *Mayorella* sp., *Thecamoeba striata* (Penard, 1890) Schaeffer, 1926, *Stenamoeba stenopodia* (Page, 1969) Smirnov et al., 2007, *Acanthamoeba* sp. (1). У досліджуваних ґрунтах степу найпоширенішими виявились *Vahlkampfia* sp. (2), *S. stenopodia*, *Vahlkampfia* sp. (1), *Vexillifera* sp., *Cochliopodium* sp. (1); найменш поширеними – *R. platypodia*, *D. mycophaga*, *T. striata*, *Mayorella* sp. У результаті проведеного кластерного аналізу встановлено, що найбільшу частку спільних видів відзначено між Миколаївською та Кіровоградською обл. (0,71) й Одеською та Кіровоградською обл. (0,53); найменша – між Одеською та Миколаївською обл. (0,43). За результатами кластерного аналізу фауністичні комплекси ґрунтових видів амеб степового регіону України можна об'єднати у два кластери: в одному з них опинилися комплекси, характерні для Одеської обл., у другому – комплекси Миколаївської та Кіровоградської обл. За результатами непараметричного багатовимірного шкалювання встановлено, що видовий комплекс амеб ґрунтів Миколаївської та Кіровоградської обл. надає перевагу ґрунтам з підвищеною температурою і кислотністю (температура досліджуваних ґрунтів змінювалась у межах 17,3–18,2 °С, кислотність досліджуваних ґрунтів – від 7,0 до 7,2), порівняно з Одеською обл. (температура досліджуваних ґрунтів у середньому становила 16,5 °С, кислотність – 6,8). Що ж стосується вологості (яка змінювалась у межах 24,15–38,76 %), то цей фактор слабо впливає на видові комплекси амеб степового регіону України.

*Ключові слова:* голі амеби, ґрунт, степова зона, Україна

Голі амеби – поліфілетична група протистів, яка включає лобозних, гетеролобозних і філозних амеб. Ці найпростіші є постійними компонентами прісноводної, морської та ґрунтової фауни. Вони є хорошими біоіндикаторами в гідробіологічних, педологічних, токсикологічних дослідженнях, бо для них характерна швидка реакція на щонайменші впливи зовнішнього середовища [23, 24].

У літературі є матеріали зарубіжних дослідників щодо фауни та поширення голих амеб ґрунтів у різноманітних регіонах. Так, деякі види амеб відомі з данських лісових ґрунтів та з ґрунтів шведських соснових лісів [7], із ґрунтів Сухих долин Мак-Мердо (Антарктида) [6], з ґрунтів лук Південної Шотландії (Великобританія) [5], з мохів дубово-грабових лісів Малих Карпат Словаччини [9], з високогірних лугових ґрунтів Саурхопу (Шотландія) [22].

Вивчення амеб в Україні стосувалося лише прісноводної фауни [12–18]. Даних щодо поширення цих протистів у наземних біотопах практично немає [19, 20]. Нами вперше проведено дослідження поширення амеб у ґрунтах степової зони України.



Мета нашої роботи – з'ясувати видовий склад і особливості поширення голих амеб у ґрунтах степової зони України.

### Матеріал і методи

Дослідження проводили упродовж 2019 року. Ґрунтові проби відбирали в околицях Миколаївської, Одеської та Кіровоградської обл. Усього відібрано й проаналізовано 32 проби. Матеріал відбирали відповідно до ДСТУ 17-4.4-02-84 «Охорона природи. Ґрунти. Методи відбору і підготовки проб для хімічного, бактеріологічного, гельмінтологічного і протозоологічного дослідження» [2].

На досліджуваних ділянках були закладені ґрунтові зрізи для відбору проб на протозоологічний аналіз. Зразки відбирали з поверхневого шару ґрунту (до 5 см). На кожній ділянці було здійснено по три повтори, кожен із яких розглядали повторно. Сухий ґрунт відбирали у стерильні zip-lock пакети.

Кислотність ґрунту вимірювали лабораторним рН-метром 150–М. Кислотність досліджуваних ґрунтів змінювалась у межах від 6,8 до 7,2.

Температуру ґрунту вимірювали на глибині до 5 см за допомогою ґрунтового термометра. Збір матеріалу проводили переважно у теплий період року (травень–серпень 2019 р.). Температура досліджуваних ґрунтів змінювалась у межах 16,5–18,2 °С.

Вологість ґрунту визначали ваговим методом [1]. Вологість досліджуваних ґрунтів змінювалась у межах 24,15–38,76 %.

Для виявлення видового складу голих амеб 5 г досліджуваного ґрунту розміщували у закриті колбу на 150 мл, заливали довільною кількістю води та залишали на добу для розмокання ґрунтових часточок. Згодом суміш струшували упродовж 10 хв 5 мл відстояного розчину та рівномірно розподіляли в чашці Петрі з агар-агаром. Розмноження амеб і підтримання їх у культурах проводили згідно з методикою Пейджа [11] в лабораторних умовах за температури + 20 °С.

Ідентифікацію амеб здійснювали в 2 етапи – спочатку проводили визначення їхнього морфотипу за допомогою спеціальних праць [21, 23, 24], після цього (якщо дозволяли дані) використовували таксономічний визначник Пейджа [10, 11].

Оскільки сучасні методи не дають змоги отримати дані щодо чисельності амеб, то ми аналізували частоту трапляння амеб у ґрунтах степової зони України. Частоту трапляння видів визначали як відношення кількості проб, у яких ідентифіковано вид до загальної кількості проаналізованих проб.

Для порівняння фауністичних списків використано індекс Чекановського-Сьєренсена [8], побудову дендрограми та визначення її стабільності за допомогою Bootstrap-аналізу, а багатовимірний аналіз проводили з використанням програми PAST 1.18 [8].

### Результати і їхнє обговорення

Поширення голих амеб значною мірою обумовлене особливостями ґрунту. Ґрунти степової зони України в локалітетах дослідження недостатньо зволожені, на вологість ґрунтів впливає висока температура повітря влітку та низька вологість повітря. Концентрація гумусу у ґрунтах степової зони України становить приблизно 3,40 % [3].

Усього у ґрунтах степової зони України (Одеська, Миколаївська, Кіровоградська обл.) нами виявлено 12 видів голих амеб. Це види: *Vahlkampfia* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (2), *Deuteramoeba mycophaga* Page, 1988, *Saccamoeba stagnicola* Page, 1974, *Vexillifera* sp., *Vanella* sp., *Ripella platypodia* Smirnov, Nasonova, Chao et Cavalier-Smith, 2007, *Cochliopodium* sp. (1), *Mayorella* sp., *Thecamoeba striata* (Penard, 1890) Schaeffer, 1926, *Stenamoeba stenopodia* (Page, 1969) Smirnov et al., 2007, *Acanthamoeba* sp. (1) (табл. 1). Усі види за сучасною

системою Еукаріот належать до трьох кластерів Tubulinea Smirnov et al., 2005, Discosea Cavalier-Smith et al., 2004, Discoba Simpson in Hampl et al., 2009 [4]. Серед знайдених нами видів найпоширенішими виявились *Vahlkampfia* sp. (2) (частота трапляння 84 %), *S. stenopodia* (68,75 %), *Vahlkampfia* sp. (1) (62,5 %), *Vexillifera* sp. (59 %), *Cochliopodium* sp. (1) (53 %); найменш поширеними – *R. platypodia* (28 %), *D. mycophaga* (25 %), *T. striata* (12,5 %), *Mayorella* sp. (12,5 %); середнє положення за частотою трапляння займають *Vannella* sp. (46,9 %), *S. stagnicola* (37,5 %), *Acanthamoeba* sp. (1) (37,5 %).

Якщо ж розглядати частоту трапляння амеб у різних областях степової зони України, то у ґрунтах Миколаївської обл. (поблизу с. Братське та с. Снігурівка) найбільш поширеними виявились 7 видів амеб (*Vahlkampfia* sp. (2), *T. striata*, *Vannella* sp., *R. platypodia*, *S. stenopodia*, *Vexillifera* sp., *Cochliopodium* sp. (1)), найменш поширеними – вид *Mayorella* sp. (рис. 1).

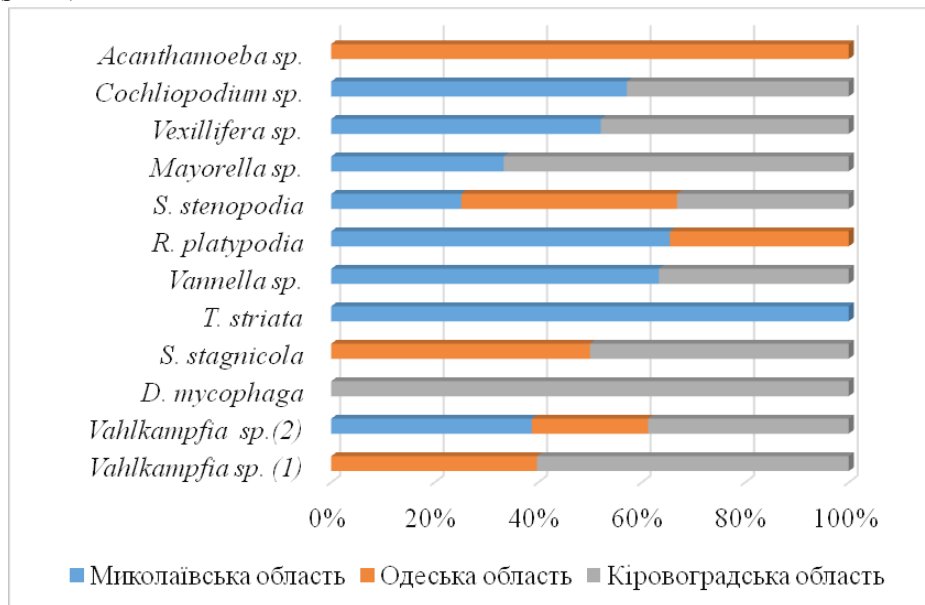


Рис. 1. Частота трапляння (%) голих амеб у ґрунтах степової зони України

У ґрунтах Одеської обл. (поблизу с. Іванівка, с. Миколаївка, с. Іллічевськ) за частотою трапляння найпоширенішими є амеби *Vahlkampfia* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (2), *S. stagnicola*, *S. stenopodia*, *Acanthamoeba* sp. (1), найменш поширеним – *R. platypodia* (рис. 1).

У ґрунтах Кіровоградської обл. (поблизу с. Ульянівка, с. Ольшанка, с. Олександрівка) частота трапляння *Vahlkampfia* sp. (1) та *Vahlkampfia* sp. (2) становить 100 %, *Vexillifera* sp. – 92 %, *Cochliopodium* sp. (1) – 75 %, *S. stenopodia* – 66 %, *D. mycophaga* – 66,6 %, *Vannella* sp. – 58 %, *S. stagnicola* – 50 %, *Mayorellasp.* – 25 % (рис. 1).

Найбільше видове багатство ґрунтових амеб характерне для ґрунтів Кіровоградської обл. (9 видів), найменше – для ґрунтів Одеської обл. (6 видів), у ґрунтах Миколаївської обл. ідентифіковано 8 видів амеб. Серед знайдених видів амеб три види траплялися лише у ґрунтах однієї області: *T. striata* (Миколаївська обл.), *D. mycophaga* (Кіровоградська обл.), *Acanthamoeba* sp. (1) (Одеська обл.); *Vahlkampfia* sp. (2) та *S. stenopodia* відзначено у ґрунтах усіх досліджуваних областей степової зони України. Усі інші види амеб траплялися у ґрунтах двох областей степової зони України (див. таблицю).

## Розподіл голих амеб у ґрунтах степової зони України

№ п/п	Таксон	Регіони дослідження		
		Одеська обл.	Миколаївська обл.	Кіровоградська обл.
1.	<i>Vahlkampfia</i> sp. (1)	+	-	+
2.	<i>Vahlkampfia</i> sp. (2)	+	+	+
3.	<i>Deuteramoeba mycophaga</i> Page, 1988	-	-	+
4.	<i>Saccamoeba stagnicola</i> Page, 1974	+	-	+
5.	<i>Thecamoeba striata</i> (Penard, 1890) Schaeffer, 1926	-	+	-
6.	<i>Vannella</i> sp.	-	+	+
7.	<i>Ripella platypodia</i> Smirnov, Nasonova, Chao et Cavalier-Smith, 2007	+	+	-
8.	<i>Stenamoeba stenopodia</i> (Page, 1969) Smirnov et al., 2007	+	+	+
9.	<i>Mayorella</i> sp.	-	+	+
10.	<i>Vexillifera</i> sp.	-	+	+
11.	<i>Cochliopodium</i> sp.	+	+	+
12.	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	-	-
<b>Всього</b>		<b>6</b>	<b>8</b>	<b>9</b>

**Примітка:** «+» – наявність виду, «-» – відсутність виду. Цифрами у дужках зазначено наявність таксонів одного роду, які не були ідентифіковані до рангу виду

Проведений кластерний аналіз із використанням індексів фауністичної подібності показав, що найбільшу частку спільних видів голих амеб спостерігали між ґрунтами Миколаївської та Кіровоградської обл. (0,71) (спільними видами є *Vahlkampfia* sp. (2), *Vannella* sp., *S. stenopodia*, *Mayorella* sp., *Vexillifera* sp., *Cochliopodium* sp.) й Одеської та Кіровоградської обл. (0,53) (це види: *Vahlkampfia* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (2), *S. stagnicola*, *S. stenopodia*). Частка спільних видів між ґрунтами Одеської та Миколаївської обл. становить 43 % (*Vahlkampfia* sp. (2), *R. platypodia*, *S. stenopodia*). На наш погляд, це вказує на те, що фактори середовища, котрі обумовлюють фауністичну структуру видового складу амеб, мають подібні характеристики. Показник, котрий характеризує кількість спільних видів, обумовлений також рівнем вивченості голих амеб ґрунтів.

За видовим складом голих амеб можна поділити на дві групи: першу групу формує видовий комплекс амеб, характерний для ґрунтів Одеської обл., другу групу – комплекс ґрунтових видів амеб, характерний для Миколаївської та Кіровоградської обл. Надійність дендрограми підтверджують результати Boot-strap аналізу, вірогідність існування двох вище зазначених кластерів становить 100 та 76 % (рис. 2). Специфічність видового комплексу ґрунтів Одеської обл. визначає *Acanthamoeba* sp. (1), яка не траплялась у ґрунтах інших регіонів степової зони України. Видовий склад голих амеб ґрунтів Одеської обл. відрізняється від видового складу амеб ґрунтів Миколаївської та Кіровоградської обл., частка спільних видів не перевищувала 53 %.

На формування видового складу голих амеб у ґрунтах степової зони України впливають абіотичні фактори середовища (температура, вологість, рН), а також вміст гумусу, котрий за даними літератури в регіоні досліджень становить 3,40 % [3]. Так, на рис. 3 показано, що видовий комплекс амеб ґрунтів Кіровоградської та Миколаївської обл. формується за підвищеної температури (18,2 і 17,3 °С відповідно) та кислотності ґрунтів (7,2 і 7,0 відповідно). У цьому комплексі зареєстровано рідкісний і нечисленний вид *Mayorella* sp., який визначає його специфічність і, за нашими припущеннями, може використовуватись

як біологічний індикатор стану ґрунту. Проте цей аспект потребує подальших ретельних досліджень щодо екологічних характеристик вказаного таксону.

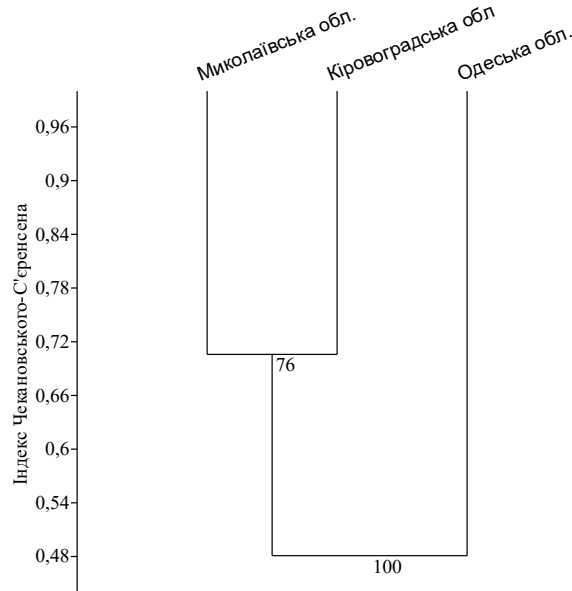


Рис. 2. Дендрограма подібності видового складу амеб степової зони України за індексом Чекановського-Сьєренсена (цифри у вузлах дендрограми – вірогідність у відсотках даних кластерів за результатами Bootstrap-аналізу)

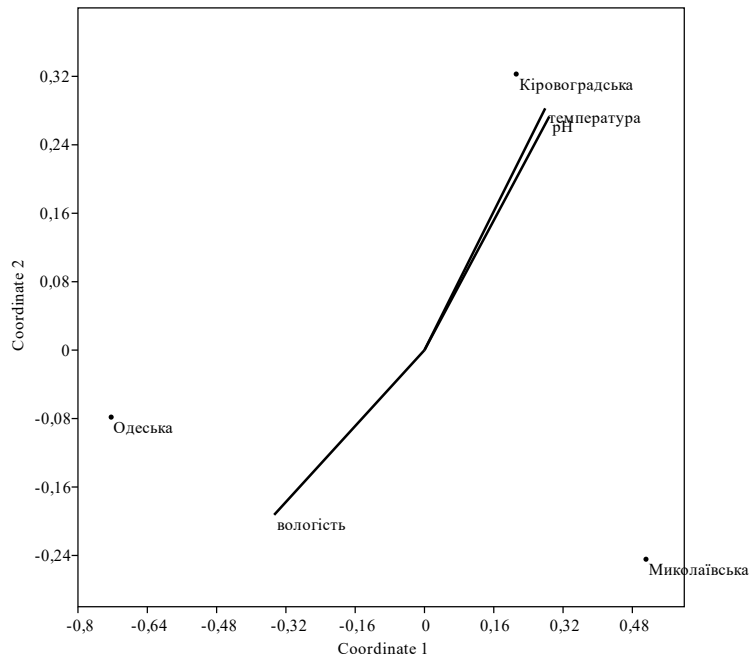


Рис. 3. Ординація видових комплексів амеб ґрунтів степової зони України за факторами середовища (результати непараметричного багатовимірного шкалювання, MDS)

Видовий склад голих амеб у ґрунтах Одеської обл. формується за низької температури (16,5 °С) та кислотності ґрунтів (6,8). Що ж стосується вологості, яка змінюється в межах від 24,15 до 38,76 %, то, за нашими даними, цей фактор слабо впливає на видові комплекси амеб Одеської, Кіровоградської та Миколаївської обл. Причиною цього може бути невелика кількість ідентифікованих нами видів і досліджуваних ґрунтів і, таким чином, мати випадковий характер.

Отже, у ґрунтах степової зони України (Одеська, Кіровоградська та Миколаївська обл.) нами ідентифіковано 12 видів голих амеб. Показники кислотності ґрунту, вологості й температури у регіоні досліджень становили відповідно 6,8–7,2; 24,15–38,76 %; 16,5–18,2 °С.

Найбільший видовий склад (9 видів) відзначено у ґрунтах Кіровоградської обл., найменший (6 видів) – у ґрунтах Одеської обл. У Миколаївській обл. зареєстровано 8 видів.

Більшість цих протистів знайдені у ґрунтах декількох регіонів досліджень, тому фауністичні списки ґрунтових амеб цих регіонів подібні між собою (індекс Чекановського-Сьєренсена варіює від 0,43 до 0,71).

Є види, які віддають перевагу ґрунтам певного регіону, що, ймовірно, залежить більшою мірою від температури та кислотності ґрунтів, меншою мірою – від вологості ґрунтів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Вадюнина А. Ф., Корчагина З. А.* Методы исследования физических свойств почв: учебники и учеб. пособия для студ. вузов. Изд. 3-е, перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1986. 416 с.: ил.
2. Охорона природи. ґрунти. Методи відбору і підготовки проб для хімічного, бактеріологічного, гельмінтологічного і протозоологічного дослідження : ДСТУ 17-4.4-02-84. [Чинний від 1984.01.01]. М.: Госстандарт, 1984. 28 с.
3. Періодична доповідь про стан ґрунтів на землях сільськогосподарського призначення України за результатами 9 туру (2006–2010 роки) агрохімічного обстеження земель / за ред. І.П. Яцука. К., 2015. 102 с.
4. *Adl S. M., Simpson A. G. B., Lane C. E. et al.* The Revised Classification of Eukaryotes // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2019. Vol. 59(5). P. 429–493.
5. *Brown S., Smirnov A. V.* Diversity of Gymnamoebae in Grassland Soil in Southern Scotland // *Protistology.* 2004. Vol. 3 (3). P. 191–195.
6. *Brown T. J., Cursons R. T. M., Keys E. A.* Notes Amoebae from Antarctic Soil and Water // *Appl. Environ. Microbiol.* 1982. Vol. 44 (2). P. 491–493.
7. *Clarholm M., Bonkowski M., Griffiths B. S.* Protozoa and other Protista in Soil // In: *Modern Soil Microbiology.* Editors: van Elsas J. D., Trevors J. T., Wellington E. M. H. Amsterdam: Marcel Dekker. 2007. P. 147–175.
8. *Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Paleontol. Electronica.* 2001. Vol. 4. Iss. 1. Art. 4. P. 1–9.
9. *Mrva M.* Diversity of Active Gymnamoebae (Rhizopoda, Gymnamoebia) in Mosses of the Malé Karpaty Mts (Slovakia) // *Ekologia Bratislava.* 2005. Vol. 24. P. 51–58.
10. *Page F. C.* A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae // *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK.* 1988. 122 p.
11. *Page F. C., Siemensma F. J.* Nackte Rhizopoda und Heliozoa (Protozoen fauna Band 2) // Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag. 1991. P. 3–170.
12. *Patcyuk M. K., Dovgal I. V.* Biotopic distribution of naked amoebes (Protista) in Ukrainian Polissya area // *Vestnik Zoologii.* 2012. Vol. 46 (4). P. 355–360.

13. Patsyuk M. K. Morphotypes in Naked Amoebas (Protista): Distribution in Water Bodies of Zhytomyr and Volyn Polissia (Ukraine) and Possible Ecological Significance // *Vestnik Zoologii*. 2014. Vol. 48 (6). P. 547–552.
14. Patsyuk M. K. Species of naked amoebae (Protista) new for the fauna of Ukraine // *Vestnik Zoologii*. 2015. Vol. 5 (49). P. 387–392.
15. Patsyuk M. K. New Finds of Naked Amoebae (Protista) in Water Reservoirs of Ukraine // *Vestnik Zoologii*. 2016. Vol. 50 (4). P. 291–300.
16. Patsyuk M. Parasitic amoebae found in water bodies of Ukraine // *Experimental Parasitology*. 2017. Vol. 183. P. 81–84.
17. Patsyuk M. K. Peculiarities of the Spatial Distribution of Naked Amoebas in Sandy Bottom Sediments of a Small River // *Hydrobiological Journal*. 2018. Vol. 54 (5). P. 102–111.
18. Patsyuk M. K., Onyshchuk I. P. Diversity and Distribution of Naked Amoebae in Water Bodies of Sumy Region (Ukraine) // *Vestnik Zoologii*. 2019. Vol. 53(3). P. 177–186.
19. Patsyuk M. Changed species composition of naked amoebae in soils of forest-and-steppe zone of Ukraine // *Acta Biologica*. 2019. Vol. 26. P. 57–64.
20. Patsyuk M. Diversity of Naked Amoebae in Soils of Forest Areas of Zhytomyr Region (Ukraine) // *Zootaxa*. 2020. Vol. 4743 (2). P. 257–265.
21. Smirnov A., Goodkov A. An illustrated list of basic morphotypes of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) // *Protistology*. 1999. Vol. 1. P. 20–29.
22. Smirnov A., Brown S. First isolation of a cyst-forming *Vannella* species, from soil – *Vannella persistens* n. sp. (Gymnamoebia, Vannellidae) // *Protistology*. 2000. Vol. 1 (3). P. 120–123.
23. Smirnov A. Amoebas, Lobose // *Encyclopedia of Microbiology*. M. Schaechter (ed.). Oxford: Elsevier. 2008. P. 558–577.
24. Smirnov A., Chao E., Nassonova E., Cavalier-Smit T. A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa) // *Protistology*. 2011. Vol. 162. P. 545–570.

Стаття надійшла до редакції 16.03.20

доопрацьована 12.07.20

прийнята до друку 16.07.20

## DISTRIBUTION OF NAKED AMOEBAE IN THE SOILS OF THE STEPPE ZONE OF UKRAINE

M. Patsyuk

*Zhytomyr Ivan Franko State University  
40, Velyka Berdychivska St., Zhytomyr 10008, Ukraine  
e-mail: kostivna@ukr.net*

As a result of the study, in the steppe zone of Ukraine (Odessa, Mykolaiv, Kirovohrad region), 12 species of naked amoebas were identified, which according to the modern Eukaryot system belong to three molecular clusters Tubulinea Smirnov et al., 2005, Discosea Cavalier-Smith, 2004., Discoba Simpson and Hampl et al., 2009. This species *Vahlkampfia* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (2), *Deuteramoeba mycophaga* Page, 1988, *Saccamoeba stagnicola* Page, 1974, *Vexillifera* sp., *Vannella* sp. *Ripellaplatypodia* Smirnov, Nassonova, Chao et Cavalier-Smith, 2007, *Cochliopodium* sp. (1), *Mayorella* sp., *Thecamoeba striata* Penard, 1890, *Stenamoeba stenopodia* (Page, 1969) Smirnov et al., 2007, *Acanthamoeba* sp. (1). In the studied steppe soils, the most common were *Vahlkampfia* sp. (2), *S. stenopodia*,

*Vahlkampfia* sp. (1), *Vexillifera* sp., *Cochliopodium* sp. (1); the least common – *R. platypodia*, *D. mycophaga*, *T. striata*, *Mayorella* sp. As a result of the cluster analysis, it was found that the largest share of common species is observed between Mykolaiv and Kirovograd regions (0.71) and Odessa and Kirovograd regions (0.53); the smallest is between the Odessa and Mykolaiv regions (0.43). According to the results of cluster analysis, the faunistic complexes of soil species of amoebae of the steppe region of Ukraine are united into two clusters: one of them being complexes characteristic of the Odessa region, and the other complexes of the Mykolaiv and Kirovograd regions. According to the results of nonparametric multidimensional scaling, it is established that the species complex of soil amoebae in the Kirovograd and Mykolaiv regions is determined by the increased soil temperature and acidity, compared to the Odessa region. As for moisture, this factor has little effect on the species complexes amoebae steppe region of Ukraine.

*Keywords:* naked amoebae, soil, steppe zone, Ukraine

## СТУПІНЬ ВИВЧЕНОСТІ Й СУЧАСНИЙ СТАН ГНІЗДОВИХ ПОСЕЛЕНЬ БАРАНЦЯ ВЕЛИКОГО *GALLINAGO MEDIA* НА ЗАХОДІ УКРАЇНИ

І. Шидловський<sup>1</sup>, Ю. Струс<sup>2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Державний природознавчий музей НАН України  
вул. Театральна, 18, Львів 79000, Україна

<sup>3</sup>Природний заповідник “Розточчя”  
сmt Івано-Франкове, Яворівський р-н, Львівська обл. 81080, Україна

У статті розглядається стан вивченості популяції баранця великого *Gallinago media* в межах заходу України починаючи з XIX ст. Майже до середини XX ст. вивченість цього виду і територію досліджень, особливо в межах Волинського Полісся, вважали недостатніми. Це пов’язане з рідкісністю або нечисленністю виду, а також із прихованим способом його життя й нічною активністю. Авторами статті опрацьовано значні орнітологічні ресурси щодо спостережень цього виду в межах західних областей України, які в історичному контексті вказують на спорадичне поширення баранця великого і відносно низьку чисельність у досліджуваному регіоні.

Згідно з літературними джерелами, дослідження баранця великого трохи детальніше проводили у середині XX ст. У той же час автори публікацій вказували на осушувально-меліоративні роботи на Поліссі як на негативний чинник, через який кількість гніздових баранців великих зменшується, а в окремих областях до 80-х років він узагалі зник. Основними місцями поширення цього виду птахів на заході України залишилися поліські райони Волині та Рівненщини, зокрема, долини річок Прип’ять, Турія, Цир і Льва. Наприкінці XX – на початку XXI ст. активні дослідження баранця великого проведено на території Шацького національного природного парку, де за період понад 10 років вдалося відзначити окремі роки збільшення чисельності виду, але в загальному – наголосити на її зменшенні та пропозиції включити баранця великого до списків Червоної книги України. Проведені цілеспрямовані дослідження виду протягом останнього десятиліття дали змогу виявити нові місця токування цих птахів. У статті наведено актуальні дані щодо сучасного поширення і чисельності виду в західному регіоні України. Крім токовищ, зазначено також і місця спорадичних спостережень представників цього виду, що доповнює інформативність статті про сучасне поширення баранця великого на заході країни. Сучасна кількість самців на основі відомих токовищ за період 2010–2020 рр. оцінена у 100 особин. Припускаємо, що реальна кількість самців може сягати 150–200 на весь регіон заходу України.

*Ключові слова:* захід України, баранець великий, чисельність, поширення

Поширення та біологія баранця великого (*Gallinago media* Lath. 1787) на заході України висвітлені у публікаціях досить коротко, часто з використанням усієї наявної в авторів інформації, що стосувалася фенології, біології гніздування, міграцій тощо. Проте спеціальних досліджень цього виду не проводили, тому наведені дані були неповними і не висвітлювали особливостей поширення виду в регіоні. Це пов’язано з рідкісністю виду, а також зі складністю його досліджень у зв’язку з прихованим способом життя і вираженою нічною активністю. Частково інформацію не публікували з метою нерозповсюдження



даних про локалітети гніздування, для уникнення можливого браконьєрства. Ця стаття має на меті узагальнити відому на сьогодні інформацію щодо поширення та чисельності виду на заході України та дати хоча би приблизну оцінку розміру популяції як початкову точку для подальших досліджень баранця великого.

#### Історичний огляд літератури

Володимир Дідушицький [36] у своїй праці, присвяченій опису колекцій родинного музею Muzeum imienia Dzieduszyckich we Lwowie (нині Державний природознавчий музей НАН України – далі ДПМ), пише: «У нас ще донедавна було багато боліт, на яких дупелі гніздилися. Ці гніздові болота щорічно зменшувались, і чисельність баранців великих загалом теж сильно зменшилася». Згадано два випадки, які можуть свідчити, що зразки баранця великого, зібрані у колекціях В. Дідушицького, здобуті на місцях гніздування: 19.04.1855 р. біля с. Поториця (нині Сокальський р-н Львівської обл.) – здобутий дорослий самець та 11 чи 13.07.1863 р. біля с. Ратиці (нині Зборівський р-н Тернопільської обл.) знайдено гніздо з кладкою із трьох яєць. Проте у фондах ДПМ зберігається ще одна неповна кладка баранця великого (одне яйце), знайдена на Пінських болотах 14.05.1851 р. [2, 3].

Стан локальних популяцій баранця великого у 1909 р. характеризує В. Герхнер [5], вказуючи, що «останніми роками цей вид птахів дуже порідшав, зменшив чисельність, хоч, напевно, ще гніздиться». Автор згадує спостереження лише однієї пари 11.04.1909 р. у Літинському повіті Подільської губернії (нині десь у межах Клопотовецької сільської ради Деражнянського р-ну Хмельницької обл.).

Згодом Ян Доманевський [35], готуючи звіт про орнітологічну подорож по Полісся 1913 р., зазначає, що баранець великий є досить звичайним птахом, хоч поступається чисельно баранцеві звичайному (*Gallinago gallinago* L. 1758).

Г. Зедліц [44], описуючи орнітологічні подорожі по долині Прип'яті протягом 1915–1918 рр., пише, що лише Графсманн міг виявити баранця великого на гніздуванні південніше Пінських боліт, а про власні спостереження цього виду так і не згадує. Але сам В. Графсманн [38] вказує, що баранець великий зовсім не рідкісний птах долини Прип'яті та гніздиться у цьому регіоні.

М. Шарлемань і Л. Портенко [32] зазначають, що орнітофауну Волині від початку ХХ ст. так мало вивчали, що підготована ними праця мала на меті узагальнити наявну інформацію і виявити прогалини. Свої спостереження автори публікації та деякі інші дослідники проводили у липні-серпні 1908 р. біля с. Щітина Ковельського повіту (на злитті річок Турії та Прип'яті – нині с. Щитинь Любешівського р-ну Волинської обл.), у липні-серпні 1909–1910 рр. – біля с. Любче Луцького повіту, 1912 р. – в околицях с. Свічів Володимир-Волинського повіту (нині с. Свійчів Володимир-Волинського р-ну) та у квітні 1914 р. в околицях колишнього маєтку Є. Свідерського «Смоляри» Ковельського повіту (нині, швидше за все, с. Смоляри Старовижівського р-ну Волинської обл.). Крім того, авторами використано спостереження препаратора колишнього Київського орнітологічного товариства ім. К. Кеслера – С. Лубкіна, а також Й. Пачоського. За узагальненими даними, баранця великого згадують лише у двох локалітетах: за свідченнями Й. Пачоського, цей вид в околицях Володимира-Волинського буває значно рідше, ніж баранець звичайний, а за С. Лубкиним – він гніздився у травні 1909 р. в Костопільському удільному лісництві (Костопіль – районний центр у Рівненській обл.).

У 1928 р. В. Храчевич [30] у своїй публікації, що характеризує орнітофауну західних округ (областей) України? коротко зазначає, що баранчик-лежень (баранець великий) досить звичайний перелітний і гніздовий птах.

У 30-х роках ХХ ст. А. Дунаєвський [37] також пише, що над вивченням авіфауни Волині працювали мало дослідників. Автор цитує лише згадки про птахів в околицях м. Ковель з публікації В. Тачановського [40] і результати фрагментарних спостережень інших орнітологів – О. Зедліца [44], М. Шарлеманя, Л. Портенка [32], В. Герхнера [5].

Під час досліджень орнітофауни Волині А. Дунаєвський [37] відзначає, що баранець великий є гніздовим видом, але в місцях його гніздування спільно з баранцем звичайним, на луках біля с. Дольськ (Ковельського повіту, нині Турійського р-ну Волинської обл.), його не виявив через нещодавнє осушення території.

У монографії «Птахи Подкарпатской Руси» А. Грабар [17] згадує баранця великого лише як мігруючий вид цієї території, на основі спостереження поодиноких особин.

Ф. Страутман [24] у своїй монографії про птахів західних областей УРСР вказує, що баранець великий є рідкіснішим та не численнішим видом, ніж баранець звичайний. Причому у Прикарпатті, Поділлі та на Поліссі він гніздиться спорадично на лісових болотах, вологих луках і в долинах річок. Щодо підтверджених випадків гніздування цього виду автор наводить інформацію про знайдені кладки в околицях с. Ратищі – 3 яйця 11.08.1863 р., біля с. Вороців (нині Яворівського р-ну Львівської обл.) – 4 яйця у травні 1937 р. та в межах с. Любельське на Поділлі (нинішній статус населеного пункту не встановлено) – 1 яйце 14.05.1851 р.

Опудала чотирьох дорослих баранців великих, здобутих у гніздовий період Н. Сребродольською на Волині, зберігаються у Зоологічному музеї Львівського Університету (ZMD). Зокрема, три птахи здобуті в околицях с. Тур і оз. Тур Ратнівського р-ну (10.05.1959, 31.06.1959, 10.06.1962) і один – 29.05.1959 р. біля оз. Велихово, північніше с. Тур на межі з Білоруссю [20]. Хоча, за літературними даними, таких тушок було аж 10 [23].

За даними орнітологів О. Кістяківського [21] і Ф. Страутмана [24], баранець великий до середини ХХ ст. гніздився в межах Західної України аж до передгір'їв Карпат. К. Татаринів [28] зазначає, що баранець великий у невеликій кількості гніздиться на луках заплави р. Вілії Тернопільської області, у Ратнівському, Ковельському та Любомльському р-нах Волинської обл., у Сарненському і Володимирецькому р-нах Рівненської обл. Гнізда дупелів виявлено в околицях оз. Тур, у районі с. Старої Гути. Гніздяться вони на вологих заболочених луках у річкових долинах.

Проте масштабні меліоративні роботи, проведені протягом 1960–1970 рр., призвели до зниження чисельності цих птахів не менш, ніж на 25 %. Продовження цих робіт і їхнє повторне виконання протягом 1980–1990 рр. викликало зниження чисельності баранця великого не менш, ніж на 50 %. Таким чином, з 1980-х років цей вид зник або майже зник на гніздуванні у Львівській, Тернопільській та Івано-Франківській областях. Його чисельність різко скоротилась і в долині Західного Бугу. Найкращими для гніздування біотопами залишилися тільки заливні луки у верхів'ї Прип'яті й болота у Рівненській обл. [16]. Таку ж тенденцію описують М. Черкащенко і Н. Сребродольська [31], зазначаючи, що внаслідок активної діяльності людини на Шацьких і Заболотських озерах у 70-х роках баранців великих і низку інших водно-болотних видів птахів не можна вже назвати численними, порівняно з 50-ми роками ХХ ст.

Колектив авторів на чолі з Т. Ардамацькою [1], аналізуючи стан куликів України на основі даних, отриманих протягом досліджень 1979–1988 рр., вказують, що баранець великий – рідкісний гніздовий вид західних і Сумської областей України, а також поодинокі трапляється у гніздовий період у Черкаській області. В окремій публікації щодо оцінки чисельності гніздових птахів України І. Горбань [8] вказує на 15–20 пар баранця великого

з тенденцією зменшення чисельності популяції виду на понад 50 %.

У працях, присвячених рідкісним і зникаючим видам птахів Шацького національного природного парку (далі – Шацького НПП) І. Горбань [6, 9], І. Горбань, В. Матейчик [13], зазначено, що протягом 1982–1987 рр. на території парку гніздилися 5–7 пар баранця великого, а протягом 1997–2001 рр. – 3–7 пар. Після різкої деградації популяції баранця великого, що відбулася внаслідок осушувальних робіт з кінця 1960-х років, у середині 1990-х років і, особливо, після дощового літа 1997 р. його гніздування почали відновлюватися у властивих для виду біотопах і, зокрема, на торфовищах. Аналізуючи значення долини Верхньої Прип'яті для збереження хребетних тварин, І. Горбань оцінює чисельність баранця великого на згаданій території протягом 1981–1989 рр. у 10 гніздових пар, а протягом 1990–1999 рр. – 70–80 пар. Проте, незважаючи на деяке збільшення чисельності виду, автор пропонує ввести його у новий список національної Червоної книги зі статусом «зникаючий».

За даними Волиньводгоспу, станом на 1991 рік загальний меліоративний фонд Волинської області становив 845,2 тис. га, з яких у розробці перебували 407,0 тис. га. Зниження рівня води на віддалі 1–1,5 км від межі меліоративної системи усереднено становило 0,8–1,0 м, будучи мінімальним – 0,3–0,6 м у вологі роки та максимальним – 1,0–1,1 м – у сухі роки [29]. Хоч у цій же публікації автори стверджують, що осушувальні й осушувально-зволожувальні системи, які використовуються, здійснюють вплив на прилеглі території не більш ніж на 1–2 км від своїх меж.

Спостереження баранця великого у гніздовий період у 90-х роках є нечисленними і стосуються лише Волинської та Львівської областей. Зокрема, на Волині відомі вісім спостережень у межах Шацького НПП – 06.05.1987 р. та 09.05.1987 р. по одній особині й окол. смт Шацьк, 15.06.1987 р. – 1 ос. в ур. Гряда, с. Світязь, 04.05.1988 р. – 3 самці біля с. Мельники [43], 28.04.1989 р. – 2 ос., в околицях с. Мельники [41], 02.06.1992 р. – 8 ос. та 07.05.1993 р. – 1 ос. в ур. Уничі. 06.05.1993 р. одним із авторів статті знайдене гніздо з повною кладкою на болоті біля с. Омеляне. В інших місцях Волинської області птахи виявлені М. Химиним: 12.05.1991 р. – 1 ос. на торфовищах в ур. Стахор, між смт Голоби та с. Битень Ковельського р-ну (Troglodytes, 1995), 25.04.1993 р. – 1 ос., біля с. Струмівка, Луцького р-ну [42] та 08.05.1993 р. – 1 ос., а 21.05.1993 р. – 2 ос. та 22.05.1993 р. – 5 ос. – ур. Осове, р. Прип'ять, в околицях с. Хоцунь Любешівського р-ну [41].

Для Львівської обл. спостереження баранців здійснені Л. Матківською та Г. Бойко, зокрема: 09.05.1986 р. – 3 ос., в околицях смт Медениця (Меденичі), Дрогобицького р-ну (Каталог орнітофауни, 1991) і 10.05.1986 р. – 1 ос., біля с. Соколя Буського р-ну [19].

У публікації про орнітофауну Шацького НПП І. Горбань та В. Матейчик [11] зазначають, що цей вид є дуже рідкісним гніздовим птахом вологих лук. Такий же статус баранця великого вказаний у зведенні [16] про гніздових куликів Східної Європи, де автори публікації зазначають про гніздування до 1990 р. не більше 10 пар цих птахів у західних областях України, причому гнізд не було виявлено. Наприкінці ж 90-х років, з підняттям води на болотах, виявлено кілька токів і знайдено кілька гнізд баранця великого, з максимальною концентрацією в межах Верхньої Прип'яті, де протягом 1991–1997 років могли гніздитися до 70 пар. Проте тут же автори зазначають, що з 1998 р. чисельність баранців знову зменшилася.

#### **Сучасний стан популяції баранця великого на заході України**

У третьому виданні Червоної книги України [4] вказано, що ареал поширення баранця великого за останні 100 років змістився далеко на північ і що птахи перестали

гніздитися у Харківській, Полтавській, Львівській, Тернопільській і Вінницькій областях України. Уся гніздова популяція зосереджена головню на Поліссі в долинах Дніпра, Десни і Прип'яті. Щодо чисельності, наведено дані про 500-700 гніздових пар з найбільшою щільністю гніздування в заплаві середньої Десни (Сумська область).

На початку 2000-х років баранців великих у межах західних областей України спостерігали постійно лише на території Шацького НПП (21.06.2006 р. – 1 ос. в ур. Уничі). Окреме спостереження стосується вологих пасовищ у долині р. Турія (11.05.2007 р. – 1 ос.). Про чисельності птахів на торфових болотах Шацького НПП пишуть І. Горбань з В. Матейчиком [10, 12, 14]; Горбань, Царик, Матейчик [15]; Матейчик, Горбань [22]; Струс, Горбань [26], де зазначають три-чотири локалітети спостережень баранця великого у гніздовий період (див. таблицю).

Чисельність баранця великого на території  
Шацького національного природного парку у 2005–2016 рр.

Рік	Торфове болото “Уничі” (120 га)	Болото біля с. Мельники (105 га)	Торфове болото “Забородське” біля с. Омеляне (18 га)	Болото біля с. Пулемець (55 га)
2005	4	5	1	–
2006	1	–	–	–
2009	11	23	–	–
2010	6	19	4	1
2013	4	5	1	–
2015	3	4	–	1
2016	4	5	–	–

Також цей вид відмічений протягом досліджень, проведених у 1995–2008 рр. на території планованого Нобельського НПП [18]. У зв'язку зі зменшенням площ вологих і підмоклих територій Шацького НПП, значним висиханням площ ур. Уничі, великі баранці, які до кінця ХХ ст. гніздилися там, – зникли [15].

У 2010 р. на території Шацького НПП [25] продовжене дослідження токовища баранців великих, відомого ще з 80-х рр. ХХ ст., на торфовому болоті та пасовищі в ур. Став поблизу с. Мельники. Хоч токовище було відоме давно, інформація про нього раніше не публікувалась. З 2005 р. до 2019 р. на токовищі кожного року відмічали від 7 до 25 токуючих самців, залежно від водності року, а відтак – від рівня води на болоті й у прилеглих дрібних водоймах і каналах. Також на токовищі здійснювали відловлювання і кільцювання баранців великих у період між 6 і 13 червня у 2009–2012 рр. і сумарно за цей час помічено 16 особин. У 2012 р. під час відловлювання у червні на цій же території виявили трьох пташенят баранця великого 1-2-денного віку. У 2019 р. на токовищі додатково за кільцювано ще 2 дорослих птахів. Жодних зворотів від мічених птахів не отримано, але двічі були відловлені птахи, за кільцювані нами у попередні сезони.

У монографії «Шацьке поозер'я» в частині, присвяченій тваринному світу, автори нарисів про птахів зазначають, що на цій території гніздиться 15–20 пар баранця великого [33]. Очевидно, в основному ця оцінка включає в себе обліки птахів з описаного вище токовища, яке було відоме також І.М. Горбаню (усне повідомл.).

У травні 2012 р. знайдене токовище з 12 самців на луках, прилеглих до стариць Прип'яті біля с. Якушів Ратнівського р-ну Волинської обл. У травні 2013 та 2015 рр. на цій ділянці відмічено лише одного токуючого самця. У 2014, 2016 і в наступні роки аж до 2019 р. баранців на цій території не виявляли. Ймовірно, токовище змістилось, але нового локалітету поки що не вдалося знайти.

У 2015 р. баранців великих виявлено на торфових болотах в районі Любохинських озер, зокрема, оз. Бронець та оз. Пісочне – по 2 особини та на луках/пасовищах у долині р. Цир і поблизу с. Бірки Любешівського р-ну – 13 особин [26].

У 2016 р. під час експедиційних робіт з обліку куликів на болотах Рівненщини виявлено 9 самців баранця великого на вологих луках-пасовищах в околицях с. Вежиця, Рокитнівського р-ну Рівненської обл. При повторному обстеженні цієї ж території у 2019 р. токовище не виявлено, але це, ймовірно, пов'язано з аномальним затопленням північно-східної частини Західного Полісся в 2019 р., за якого територія токовища і прилеглі луки та болота були вкриті водою завглибшки 15–50 см.

Аналогічною є ситуація з токовищем, виявленим спільною експедицією Рівненського ПЗ і Львівського Університету у 2016 р., між с. Переходичі та Старе Село Рокитнівського р-ну. У період між 2016–2018 рр. на цьому токовищі кожного року відмічали близько 20 токуючих самців. У 2019 р. територія токовища і прилеглі болота були сильно затоплені, а відтак баранців тут не виявлено.

Ще одне, найбільше з відомих нам токовищ, розташоване поблизу с. Бірки Любешівського р-ну Волинської обл., у долині р. Цир на пасовищі, оточеному заболоченими ділянками. У 2015–2019 роках на цьому токовищі щорічно облікували 20–30 токуючих самців. Інколи токовище розпадається на два, розташованих на відстані 300–500 м одне від одного [27].

Нове токовище з 8 самців знайдене під час виконання білорусько-українського проекту «Полісся – дика природа без кордонів: збереження одного з найбільших природних регіонів Європи», 09.06.2019 р. на західному узбережжі оз. Волянське біля с. Воля-Щитинська Волинської обл. За словами мисливців, воно відоме вже не менше 2–3 років, тобто з 2017 р.

Нове угруповання баранців великих виявлене під час проведення денних ранньовесняних обліків на території ШНПП, зокрема, 20.04.2019 р. – 5 ос. на західній околиці смт Шацьк, неподалік оз. Довге. Під час нічних обліків на цій же ділянці ми не виявили токовища баранців, а тому стверджувати про ще одне місце токування не можемо [34].

Окрім стабільних токовищ, відомі також відносно численні спостереження поодиноких особин чи дрібних груп птахів на інших територіях, як у міграційний час, так і в період гніздування. В основному це спостереження з території Полісся. Наприклад, один птах 21.05.2018 р. у долині р. Турія, біля с. Датинь Ратнівського р-ну Волинської обл. Одного птаха сполохано на острові р. Прип'ять біля с. Люб'язь 23.05.2018 р. тощо. Оскільки походження таких особин невідоме, то подібні спостереження детально не аналізуємо. Відомі також випадки токування окремих самців під час міграції та за межами Полісся. Наприклад, 02.05.2011р. ми спостерігали токуючого самця в долині р. Верещиця біля с. Кам'янобрід, на межі Яворівського та Городоцького р-нів Львівської обл. Але у попередні роки і в подальшому тут птахів більше не виявляли.

Таким чином, на період між 2010 і 2020 рр. відомо лише 6 токовищ баранця великого на Західному Поліссі: 1) ур. Став, ШНПП (20 самців); 2) пасовище біля с. Якушів (12 самців); 3) долина р. Цир (30 самців); 4) пасовище біля оз. Волянське (8 самців); 5) пасовище біля боліт між с. Переходичі і Старе Село (20 самців); 6) пасовище біля с. Вежиця, Рокитнівського р-ну Рівненської обл. (9 самців). Сумарна чисельність токуючих самців на відомих токовищах у регіоні сягає близько 100 особин. Очевидно, що наявна інформація не повною мірою відображає сучасне поширення і чисельність локальної популяції виду

на Західному Поліссі. На підставі грубої експертної оцінки ми припускаємо, що у регіоні кількість токуючих самців баранця великого досягає 150–200 особин.

*Дякуємо усім учасникам експедицій з обліку куликів, у тому числі баранця великого, в басейні Прип'яті, а саме: М. В. Франчуку, М. В. Пограничному, М. А. Сенік, М. В. Скірпану, А. С. Роголі, П. М. Гринюку. Окремо висловлюємо подяку І. М. Горбаню за надання цінної інформації про розміщення окремих токовищ.*

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ардамацкая Т. Б., Горбань И. М., Жмуд М. Е. и др. Современное состояние куликов Украины (предварительная информация) // Информация Рабочей группы по куликам. Магадан, 1989. С. 21–23.
2. Бокотей А. А. Каталог оологічної колекції зоологічних фондів Державного природознавчого музею України. Львів, 1992. С. 24.
3. Бокотей А. А., Соколов Н. Ю. Каталог орнітологічної колекції Державного природознавчого музею. Львів, 2000. С. 55.
4. Гавриць Г. Г. Баранець великий (дупель) // Червона книга України. Тваринний світ / за ред. І. А. Акімова. К.: Глобалконсалтинг, 2009. С. 453.
5. Герхнер В. Ю. Матеріали до вичення птахів Поділля // 36. праць Зоол. музею. 1928. Ч. 5. № 5. С. 158–159.
6. Горбань І. М. Значення долини верхньої Прип'яті для збереження популяцій хребетних тварин // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002а. Вип. 31. С. 116–125.
7. Горбань И. М. Кулики – кандидаты в Красную книгу Украинской ССР // Информация Рабочей группы по куликам (РГК). Магадан, 1990. С. 36–37.
8. Горбань І. М. Оцінка чисельності гніздових птахів України // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2003. С. 147–158.
9. Горбань І. М. Рідкісні та зникаючі види птахів Шацького національного природного парку // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002. Вип. 29. С. 127–137.
10. Горбань І. М., Матейчик В. І. Гніздові птахи торфових боліт Шацького НПП // Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку: матеріали наук. конф. (Шацьк, 10–13 вересня 2009 р.). Львів: СПОЛОМ, 2009. С. 26–28.
11. Горбань І. М., Матейчик В. І. Про орнітофауну Шацького національного природного парку // Шацький національний природний парк. Наукові дослідження 1983–1993 рр. Світязь, 1994. С. 178–189.
12. Горбань І. М., Матейчик В. І. Скорочення чисельності гніздових куликів на болотах Шацького НПП // Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку: матеріали наук. конф. (Шацьк, 08–11 вересня 2016 р.). Львів: СПОЛОМ, 2016. С. 27–28.
13. Горбань І. М., Матейчик В. І. Стан орнітофауни торфових боліт у районі озера Кримно Шацького національного природного парку // Роль природно-заповідних територій у підтриманні біорізноманіття. Канів, 2003. С. 204–205.
14. Горбань І. М., Матейчик В. І. Чисельність птахів на торфових болотах Шацького національного природного парку // Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку (Шацьк, 16–18 вересня 2005 р.). Львів, 2005. С. 15–17.
15. Горбань І. М., Царик Й. В., Матейчик В. І. Гніздова орнітофауна торфових боліт Шацького національного природного парку // Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку: матеріали наук. конф. (2–5 вересня 2010 р.) Львів, 2010. С. 107–110.

16. Горбань І. М., Шидловський І. В. Численность гнездящихся куликов на западе Украины // Гнездящиеся кулики Восточной Европы – 2000. Т. 2. / под ред. П.С. Томкович, Е.А. Лебедева. М.: Союз охраны птиц России, 1999. С. 93–105.
17. Грабар А. Птаство Подкарпатської Русі (Avifauna Carpathorossica) // Подкарпатская Русь. Ужгород, 1931. Р. 8, Ч. 8. С. 185.
18. Журавчак Р. О., Шидловський І. В. До вивчення фауни проєктованого національного природного парку “Нобельський” // Заповідна справа в Україні. 2012. Т. 18. Вип. 1–2. С. 42–50.
19. Каталог орнітофауни західних областей України. Орнітологічні спостереження за 1989–1990 рр. Луцьк, 1991. № 2. С. 35.
20. Каталог орнітологічної колекції Н. І. Сребродольської Зоологічного музею Львівського національного університету імені Івана Франка. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка, 2018. С. 52–53. (Серія «Зоологічні надбання»)
21. Кістяківський О. Б. Фауна України. Птахи. К.: Вид-во АН УРСР, 1957. Т. IV. 432 с.
22. Матейчик В. І., Горбань І. М. Чисельність птахів на торфових болотах Шацького національного природного парку у 2013 році // Національні природні парки – минуле, сьогодення, майбутнє: міжнар. наук.-практ. конф. (23–25 квітня 2014 р.). К.: КОМПРИНТ, 2014. С. 285–289.
23. Сребродольська Є. Б. Орнітологічна колекція Н. І. Сребродольської // Орнітофауна західних областей України та проблеми її охорони: матеріали доп. 5-ї наради орнітологів та аматорів орнітологічного руху Західної України. Луцьк, 1990. С. 156–161.
24. Страутман Ф. И. Птицы западных областей УССР. Т. 1. Львов: Изд-во Львов. ун-та, 1963. С. 63.
25. Струс Ю. М. До біології баранця великого (*Gallinago media* Lath.) в Шацькому НПП // Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку: матеріали наук. конф. (8–11 вересня 2011 р., Шацьк). Львів : СПОЛОМ, 2011. С. 101–103.
26. Струс Ю. М., Горбань І. М. Чисельність лучних і болотних куликів на основних гніздових ділянках Волині у 2015 році // Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку: матеріали наук. конф. (10–13 вересня 2015 р., Шацьк). Львів : СПОЛОМ, 2015. С. 100–102.
27. Струс Ю. М., Шидловський І. В., Горбань І. М. Лучні кулики в басейні Верхньої Прип’яті: просторове розміщення і динаміка чисельності // Бранта: зб. наук. праць Азово-Чорноморської орнітологічної станції. 2018. Вип. 21. С. 51–69.
28. Татаринів К. А. Фауна хребетних заходу України. Львів: Вид-во Львів. ун-ту, 1973. 257 с.
29. Топольник Т. И., Цветова Е. В., Подзина Л. В.осушительные мелиорации в верхнем течении реки Припяти и их влияние на водный режим прилегающих территорий. Киев; Луцк, 1991. 83 с.
30. Храевич В. П. Матеріяли до орнітофауни західних округ України // Записки Кам’янець-Подільської науково-дослідчої катедри. К.: Держвидав України, 1929. Т. 1. С. 36.
31. Черкащенко М. І., Сребродольська Н. І. Про необхідність створення Волинського заповідника // Вісн. Львів. держ. ун-ту. ім. І. Франка. Сер. біол. 1974. Вип. 7. С. 70–73.
32. Шарлемань М., Портенко Л. Замітки про птахів Волині (матеріяли до орнітофауни України) // Труды фіз.-мат. відділу АН УРСР. 1926. Т. 2 (2). С. 131.
33. Шацьке поозер’я. Т. 8: Тваринний світ / за ред. П.Я. Кілочицького. Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки. Луцьк: Вежа-Друк, 2016. С. 467–468.

34. *Шидловський І. В., Струс Ю. М., Матейчик В. І.* Спостереження регіонально рідкісних та червонокнижних видів птахів на території Шацького НПП // Фауна України на межі XX-XXI ст. Стан і біорізноманіття екосистем природоохоронних територій: матеріали Міжнар. зоол. конф. (12–15 вересня 2019 р., Львів - Шацьк). Львів: Сполом, 2019. С. 185–187.
35. *Domaniewski J.* Sprawozdanie z wycieczki ornitologicznej odbytej na Polesie w r. 1913 // Pamiętnik Fizjogr. Warszawa, 1918. № 25. S.12.
36. *Dzieduszycki W.* Muzeum imienia Dzieduszyckich we Lwowie. Lwów: Z I Związkowej drukarni, 1880. S. 161.
37. *Dunajewski A.* Badania nad ptakami Wolynia // Acta ornitol. M. Polonici. 1938. 2 (17). P. 22 (356).
38. *Grafsmann W.* 1918. Zwei Jahre Feldornithologie in den Rokitno-Sumpfen // Journ. für Ornithol. 1918. T. 26 (11/12). S. 298.
39. *Grafsmann W.* Vogelleben in den Pripjet-Sümpfen im Frühling // Orn. Mon. Schr. 1919. S. 73.
40. *Taczanowski W.* Ptaki krajowe. T. 2. Krakow, 1882. S. 165–168.
41. Troglodytes. Західноукраїнський орнітофауністичний щорічник. 1994. № 4. С. 7, 19.
42. Troglodytes. Західноукраїнський орнітофауністичний щорічник. 1995. № 5. С. 12.
43. Troglodytes / Волове око. Каталог орнітофауни західних областей України. Орнітологічні спостереження за 1991–1992 рр. Луцьк, 1993. № 3. С. 10.
44. *Zedlitz Graf O.* Die Avifauna des westlichen Pripjet-Sumpfes im Lichte der Forschung deutscher Ornithologen in Jahren 1915-1918 // Journ. für Ornith. Leipzig, 1920. Jahr. 68. P. 205.

*Стаття надійшла до редакції 25.06.20*

*доопрацьована 19.08.20*

*прийнята до друку 27.08.20*

## **CURRENT STATE OF NESTING SETTLEMENTS AND STUDY OF GREAT SNIPE *GALLINAGO MEDIA* IN WESTERN UKRAINE**

**I. Shydlovskyy<sup>1</sup>, Yu. Strus<sup>2,3</sup>**

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

*<sup>2</sup>State Museum of Natural History, NAS of Ukraine  
18, Teatralna St., Lviv 79000, Ukraine*

*<sup>3</sup>Roztochchya Nature Reserve  
Ivano-Frankove township Yavorivskiy district, Lviv region 81080, Ukraine*

In the paper, we describe the state of knowledge of the Great Snipe population in Western Ukraine since 19 century. Almost to the middle of the XX century, the state of knowledge about this species and the size of the surveyed territory, especially within the borders of Western Polissia, were considered as insufficient. This was caused by the cryptic behavior of the species, its nocturnal activity, and generally by low population size and rarity. We analyzed a significant amount of ornithological resources devoted to observations of Great Snipe in Western Ukraine, which indicate historically low population size and scarcity of distribution of the species in the study area. According to the literature sources, studies of



Great snipe were somewhat intensified in the XX century. At the same time, different authors pointed out drainage works in the Polissia area, as a negative factor that drives the decrease in Great Snipe numbers in the area, or even caused complete extinction in some regions. The main range of the species in the area was still localized in the Polissian part of Volyn and Rivne regions, especially in valleys of Prypiat, Turia, Tsyra and Lva rivers.

At the end of XX and the beginning of XXI intensive studies of Great Snipe were conducted on the territory of Shatsk National Nature Park, where during 10 years of studies, seasons with an increase of local population were reported, but in general negative tendency was detected and the proposal to include the species into the national red list was published. Our recent studies focused on the species, allowed us to discover new lekking places of Great Snipe. Therefore, the actual information on current numbers and distribution of the species in the region of Western Ukraine is presented. Besides leks, places of occasional observations are also mentioned, which increases the information load of the paper regarding the current distribution of the species in the western part of the country. The current population size is estimated as 100 lekking males, based on the total sum from all known leks. We suppose, that the real population size in the region of Western Ukraine can reach 150–200 lekking males.

*Keywords:* Western Ukraine, Great Snipe, population size, distribution

## ЗАЛЕЖНІСТЬ АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ВІД СПОСОБУ ВИДІЛЕННЯ КЛІТИН

Г. Мазур, В. Мерлавський, Б.О. Манько, В.В. Манько

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: volodymyr.manko@lnu.edu.ua

Під час проведення досліджень на ізольованих гепатоцитах важливо отримати клітини, які зберігають функціональні властивості, характерні для цілісного органа. Підвищення у процесі перфузії печінки в'язкості крові, зменшення перфузійного тиску в судинах, а відтак і гіпоксія, належать до чинників, які можуть впливати на функціональний стан ізольованих гепатоцитів. Функціональний стан клітин можна оцінити за адаптаційною здатністю мітохондрій, індукуючи максимальну швидкість споживання кисню шляхом роз'єднання дихання і окисного фосфорилування внаслідок додавання FCCP. Метою роботи було дослідити адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів з використанням перфузії печінки *in situ* та *in vitro*.

Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена, перфузуючи печінку *in situ* чи *in vitro*. Ізольовані гепатоцити, після 15 хв інкубації у середовищах без додавання або з відповідним екзогенним субстратом окиснення – глутаміном, піруватом, сукцинатом, монометил-сукцинатом,  $\alpha$ -кетоглутаратом, диметил- $\alpha$ -кетоглутаратом (у концентрації 2 ммоль/л) або глюкозою (10 ммоль/л) – вносили у полярографічну комірку та додавали FCCP у наростаючих концентраціях.

Встановлено, що під час використання перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCCP) та оптимальні концентрації FCCP (за яких ці максимальні швидкості роз'єданого дихання були зареєстровані) є вищими, ніж за перфузії печінки *in vitro*. Унаслідок додавання до середовища екзогенних субстратів швидкості дихання гепатоцитів збільшувалися. За перфузії печінки *in vitro* максимальна швидкість роз'єданого дихання підвищувалась у всіх випадках, окрім використання глюкози, а у випадку перфузії *in situ* – лише коли застосовували диметил- $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат і монометил-сукцинат. Оптимальна концентрація FCCP за перфузії печінки *in vitro* зростала внаслідок додавання до середовища глутаміну, пірувату й монометил-сукцинату, а за перфузії *in situ* – лише за окиснення глюкози. За обох методів перфузії найвищу максимальну швидкість роз'єданого дихання спостерігали за використання монометил-сукцинату, а оптимальну концентрацію FCCP – за окиснення пірувату.

Отже, перфузія печінки *in situ* є кращим методом отримання стабільних і метаболічно активних гепатоцитів для підтримання дихальних процесів на високому рівні, ніж перфузія *in vitro*.

*Ключові слова:* адаптаційна здатність мітохондрій, перфузія печінки *in situ*, перфузія печінки *in vitro*, гепатоцити, FCCP

Печінка бере участь у детоксикації та обміні речовин в організмі. Зважаючи на роль печінки у забезпеченні життєдіяльності цілого організму, її використовують на різних рівнях організації (від молекулярного до тканинного) у фармакологічних, токсикологічних

і метаболічних дослідженнях для вивчення функціонального стану цього органа.

Що вищий рівень організації досліджуваного об'єкта, то важчим є проведення експериментів, але більш достовірним трактування результатів. Для дослідження впливу медичних препаратів і патогенезу хвороб печінки часто використовують ізольовані гепатоцити, які зберігають функціональні властивості, характерні для цілісного органа [8, 17]. Такі дослідження здійснюють на гепатоцитах, які виділили неперфузійним методом, методом перфузії печінки *in vitro* та *in situ* або на культурі гепатоцитів.

Для проведення досліджень на клітинах і правильного трактування результатів важливо отримати непошкоджені життєздатні клітини. Оскільки під час виділення гепатоцити забирають з їхнього природного середовища, то не виключено, що за цих умов можуть виникнути певні зміни метаболізму. Наприклад, антиоксидантний статус гомогенату печінки шурів і гомогенату з гепатоцитів, отриманого одразу після ізолювання, не відрізнявся, але активність каталази у культурі гепатоцитів була значно нижчою [13]. Також у культурі гепатоцитів спостерігали зниження рівня антиоксидантних метаболітів, зниження активності циклу трикарбонових кислот і значне зменшення дихальної здатності, порівняно з гепатоцитами, виділеними *in situ* [3].

Оскільки життєздатність і функціональний стан клітин може залежати від способу їхнього виділення (у т.ч. від складу розчинів), дослідники часто модифікують ці методи виділення, емпірично підбираючи, на їхню думку, оптимальні умови [1, 5, 8]. Причому в багатьох випадках залишається незрозумілим, за рахунок якої модифікації методів виділення збільшується життєздатність клітин. Нас зацікавило, чи впливає на функціональний стан гепатоцитів спосіб перфузії печінки (*in situ* та *in vitro*).

Функціональний стан клітин можна оцінити за адаптаційною здатністю мітохондрій, яку визначають, індукуючи максимальну швидкість споживання кисню шляхом роз'єднання дихання й окисного фосфорилування внаслідок додавання FCCP. Тому метою роботи було порівняти адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів за перфузії печінки *in situ* та *in vitro*.

#### Матеріали та методи

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Досліди були виконані на білих нелінійних щурах масою 220–300 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію на основному раціоні (перед експериментом тварини голодували впродовж 18 год з вільним доступом до води). Перед декапітацією (за використання перфузії *in vitro*) або перед проведенням розтину черевної порожнини (за використання перфузії *in situ*) тварин наркотизували з використанням хлороформу або тіопенталу натрію (40 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно).

Коли перфузували печінку *in vitro*, відразу після наркозу тварину декапітували, розтинали черевну порожнину, вирізали ліву присередню частку печінки, перенесли її на предметне скельце (за кімнатної температури) і вводили перфузійну голку в кровоносні судини (судини другого порядку, на які розгалужуються печінкова артерія чи вена). У цьому випадку потреби використовувати гепарин не було.

За перфузії печінки *in situ* після наркозу розтинали черевну порожнину. Щоб запобігти зсіданню крові, вводили гепарин 5000 МО/мл (0,3 мл) у черевну нижню порожнисту вену. Перфузійні розчини надходили у печінку через катетер (18 G, 1,3 × 45 мм), який вводили у ворітну вену. Для відтоку розчину робили надріз нижньої порожнистої вени.

Далі в обох випадках – за використання перфузії печінки *in vitro* або *in situ* – гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [15]. Спочатку, щоб відмити від крові, печінку перфузували безкальцієвим ЕГТА-вмісним розчином (37 °С) (у ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0, ЕГТА – 1; рН 7,4. Швидкість потоку розчинів, яку регулювали за допомогою перистальтичної помпи, була однаковою і становила приблизно 20 мл/хв.

Наступним етапом була рециркуляторна перфузія печінки Ca<sup>2+</sup>-вмісним розчином з колагеназою (108 од./мл) протягом 10–12 хв (37 °С). Після перфузії печінку поміщали у базовий розчин, що містив (у ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1,3, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0; рН 7,4. Далі ізолювані гепатоцити диспергували легким піпетуванням. Для вилучення клітин, з'єднаних між собою, суспензію пропускали крізь нейлоновий фільтр (розмір пор 0,1 мм × 0,1 мм). Щоб вилучити метаболіти, залишки позаклітинного матриксу та пошкоджені гепатоцити, суспензію тричі центрифугували (50 g). Підрахунок гепатоцитів здійснювали з використанням камери Горяєва. Цілісність плазматичних мембран гепатоцитів оцінювали фарбуванням клітин 0,1 %-ним розчином трипанового синього. Відсоток незафарбованих клітин за перфузії печінки *in vitro* та *in situ* був практично однаковий і становив 83,40±0,78 та 82,29±1,79 % відповідно.

Для дослідження адаптаційної здатності мітохондрій використовували базовий розчин без субстратів окиснення або розчин, який містив глютамін, піруват, сукцинат, монометил-сукцинат, α-кетоглутарат, диметил-α-кетоглутарат (по 2 ммоль/л) чи глюкозу (10 ммоль/л), і попередньо інкубували у ньому ізолювані гепатоцити впродовж 15 хв. Далі гепатоцити вносили у полярографічну комірку (приблизно 1,6 млн клітин на 1,6 мл того самого розчину, в якому здійснювали інкубацію) та додавали FCCP у наростаючих концентраціях.

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали, використовуючи t-критерій Стьюдента і дисперсійний аналіз ANOVA. За статистично достовірні приймали зміни з P≤0,05. Адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів характеризували максимальною швидкістю роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCCP) і оптимальною концентрацією FCCP (концентрацією, за якої ця швидкість зареєстрована).

### Результати і їхнє обговорення

Адаптаційна здатність мітохондрій, яка є різною за різних функціональних станів клітин, – це важливий чинник, що визначає життєздатність цих клітин [9]. Щоб охарактеризувати адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, отриманих різними способами, визначали максимальну швидкість роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій протонофора FCCP) та оптимальну концентрацію FCCP (за якої ця швидкість зареєстрована).

За окиснення ендогенних субстратів швидкість базального дихання гепатоцитів, виділених методом перфузії печінки *in vitro* (рис. 1, А), становила 0,08±0,01 нмоль O<sub>2</sub> / (с × млн клітин). Якщо печінку перфузували *in situ* (рис. 1, Б), цей показник був трохи вищим і становив 0,12±0,02 нмоль O<sub>2</sub> / (с × млн клітин). Але різниця між швидкостями базального дихання за використання двох вказаних методів статистично невірогідна (P > 0,05).

В обох випадках швидкість споживання кисню гепатоцитами внаслідок додавання до полярографічної комірки FCCP у низьких концентраціях збільшувалась, а у високих концентраціях – зменшувалась. Тим не менше, чутливість до FCCP у випадку перфузії печінки *in vitro* була підвищеною.

Як описано нами раніше [10], максимальна швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів за перфузії печінки *in situ* становила  $0,22 \pm 0,03$  нмоль  $O_2$  / (с  $\times$  млн клітин). Коли ж печінку перфузували *in vitro*, максимальна швидкість роз'єданого дихання виявилася нижчою ( $P=0,04$ ) і становила  $0,15 \pm 0,01$  нмоль  $O_2$  / (с  $\times$  млн клітин). Подальше збільшення концентрації FCCP за перфузії печінки *in vitro* спричинило суттєвіше зменшення швидкості роз'єданого дихання, ніж за перфузії *in situ* (див. рис. 1, А і Б).

Швидкість роз'єданого дихання досягала свого максимального значення за різної концентрації FCCP – 0,09 мкмоль/л у випадку перфузії печінки *in vitro* та 0,6 мкмоль/л у випадку перфузії печінки *in situ*. Отже, залежність швидкості роз'єданого дихання гепатоцитів від концентрації FCCP у випадку використання перфузії печінки *in vitro* є виражено зміщеною вліво.

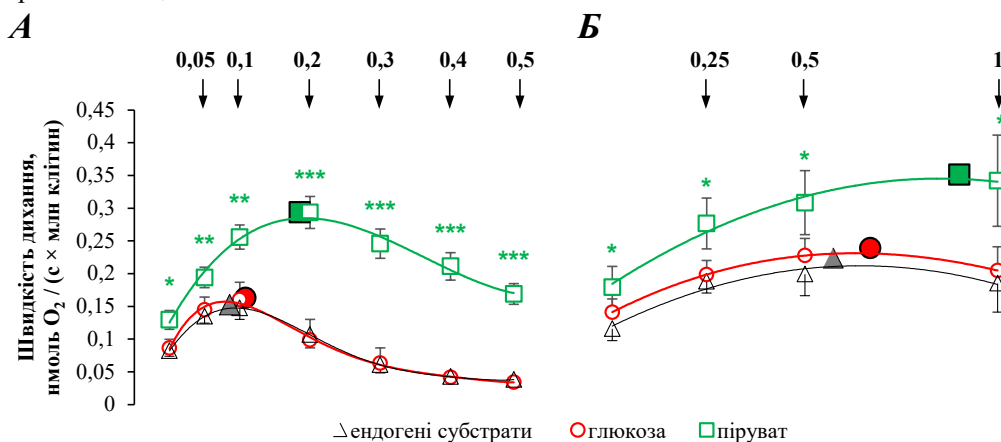


Рис. 1. FCCP-стимульоване дихання інтактних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), за окиснення ендогенних субстратів, глюкози та пірувату. Тут і далі: ●, ■ та ▲ – значення максимальної швидкості роз'єданого дихання за оптимальної концентрації FCCP; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP; [глюкоза] = 10 ммоль/л, концентрація всіх інших екзогенних субстратів 2 ммоль/л; \* – статистично вірогідна різниця щодо швидкості дихання за окиснення лише ендогенних субстратів з  $P < 0,05$ ,  $n = 6$

Додавання до середовища глюкози не спричинило суттєвого збільшення швидкості базального і FCCP-стимульованого дихання гепатоцитів за перфузії печінки як *in vitro*, так і *in situ* (рис. 1, А і Б). Характер залежності швидкості від концентрації протонофора і максимальна швидкість роз'єданого дихання в обох випадках теж не змінювалися.

Продуктом окиснення глюкози у процесі гліколізу є піруват. Крім того, джерелом пірувату є лактат, який надходить у печінку зі скелетних м'язів [16]. Тому ми перевірили, як впливає наявність цього субстрату на максимальну швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів у випадку перфузії печінки *in vitro* та *in situ*.

Встановлено, що внаслідок додавання до середовища пірувату швидкості базального та FCCP-стимульованого дихання в обох випадках суттєво збільшувалися (рис. 1). Правда, максимальна швидкість роз'єданого дихання за перфузії печінки *in vitro* збільшувалася в 1,9 рази ( $P=0,0009$ ), а за перфузії печінки *in situ* – в 1,6 рази, але ця різниця виявилася недостовірною ( $P=0,056$ ). В обох випадках оптимальна концентрація FCCP у разі окиснення екзогенного пірувату була зміщена вправо, що свідчить про вищу адаптаційну здатність мітохондрій (рис. 1).

Окрім пірувату, глутамін є ще одною молекулою, яка забезпечує включення енергетичних субстратів у цикл трикарбонових кислот через почергове перетворення на глутамат і  $\alpha$ -кетоглутарат [4]. Швидкості FCCP-стимульованого дихання, коли субстратом окиснення був глутамін або  $\alpha$ -кетоглутарат, а печінку перфузували *in vitro*, були вищими, ніж за окиснення ендогенних субстратів, і практично не відрізнялися між собою (рис. 2). У випадку перфузії *in situ*  $\alpha$ -кетоглутарат виявився ефективнішим субстратом за низьких концентрацій FCCP, а глутамін – за високих, про що свідчить значення оптимальної концентрації FCCP.

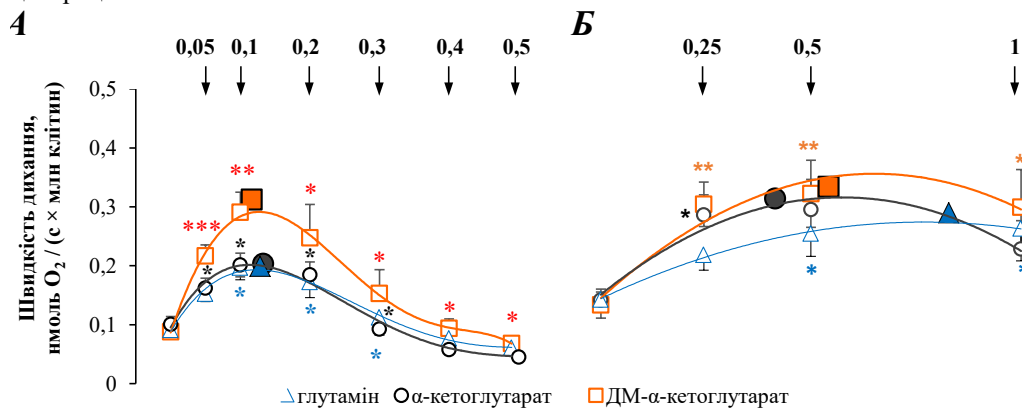


Рис. 2. Залежність дихання інтактних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), від концентрації FCCP за окиснення глутаміну,  $\alpha$ -кетоглутарату і диметил- $\alpha$ -кетоглутарату

Сам по собі сукцинат забезпечує високу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів. Він підтримує окисні процеси у мітохондріях інтактних гепатоцитів краще, ніж  $\alpha$ -кетоглутарат, що корелює із вищим потоком електронів у результаті окиснення сукцинату і вищою спорідненістю транспортерів до нього [18]. На відмінну від окиснення глутаміну й  $\alpha$ -кетоглутарату, максимальна швидкість роз'єданого дихання за окиснення сукцинату (рис. 3) в обох випадках була більша ( $P < 0,05-0,01$ ), ніж за окиснення ендогенних субстратів.

Проникність екзогенного  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату крізь плазматичну мембрану, незважаючи на наявність  $\text{Na}^+$ -дикарбоксилатних котранспортерів ( $\text{NaDC}$ ), трохи обмежена [12]. Рогстад виявив, що ліпофільні естери дво- і трикарбонових кислот краще проникають крізь плазматичну мембрану клітин [14], а оскільки тканина печінки характеризується значною естеразною активністю [2, 6, 11], ці субстрати розщеплюються у цитоплазмі гепатоцитів. Тому ми використали метильовані похідні  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату для оцінювання процесів дихання за використання двох методів перфузії.

Порівняно з окисненням  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату, використання їхніх метильованих похідних не змінює швидкості базального дихання гепатоцитів за обох способів перфузії печінки. Якщо перфузували печінку *in vitro*, то диметил- $\alpha$ -кетоглутарат і монометил-сукцинат спричинювали суттєве збільшення максимальної швидкості роз'єданого дихання, але не характер залежності швидкостей дихання від концентрації FCCP (див. рис. 2 і 3). Коли ж використовували перфузію *in situ*, використання метильованих похідних зміщувало оптимальну концентрацію FCCP вправо, що свідчить про вищу стійкість окисних процесів.

Загалом, унаслідок додавання до середовища екзогенних субстратів швидкості дихання гепатоцитів збільшувалися. Але якщо максимальна швидкість роз'єданого дихання за перфузії печінки *in vitro* зростала майже завжди (за винятком глюкози), то

у випадку перфузії *in situ* – лише тоді, коли використовували диметил- $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат і монометил-сукцинат. Не менш важливим показником є, очевидно, оптимальна концентрація FCCP, яка суттєвіше змінювалася у випадку перфузії *in situ*.

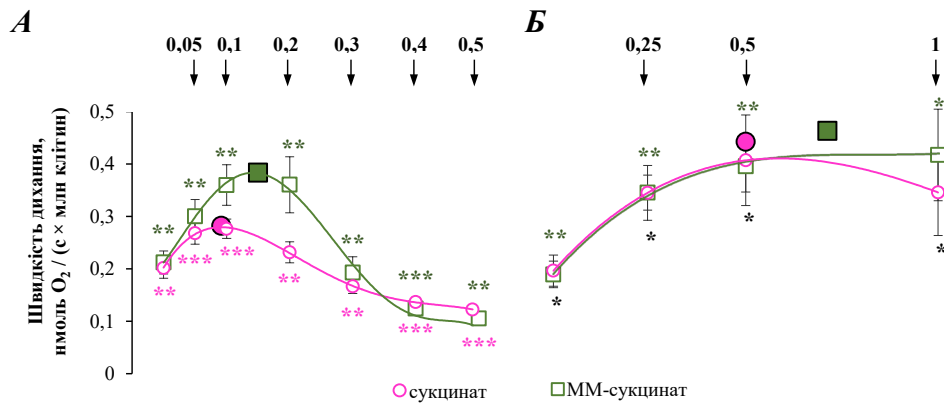


Рис. 3. Дихання інтактних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), залежно від концентрації FCCP за окиснення сукцинату і монометил-сукцинату

Щоби встановити ступінь впливу способу перфузії печінки та субстратів на максимальну швидкість роз'єданого дихання, провели дисперсійний аналіз. Встановлено, що на максимальну швидкість роз'єданого дихання 34 % впливу має спосіб перфузії печінки ( $P=5,8 \times 10^{-7}$ ), а 10 % впливу мають субстрати окиснення ( $P=1,6 \times 10^{-4}$ ). Взаємодії між цими двома факторами немає.

Вплив способу виділення клітин на адаптаційну здатність гепатоцитів ми зобразили залежністю максимальної швидкості роз'єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP (рис. 4).

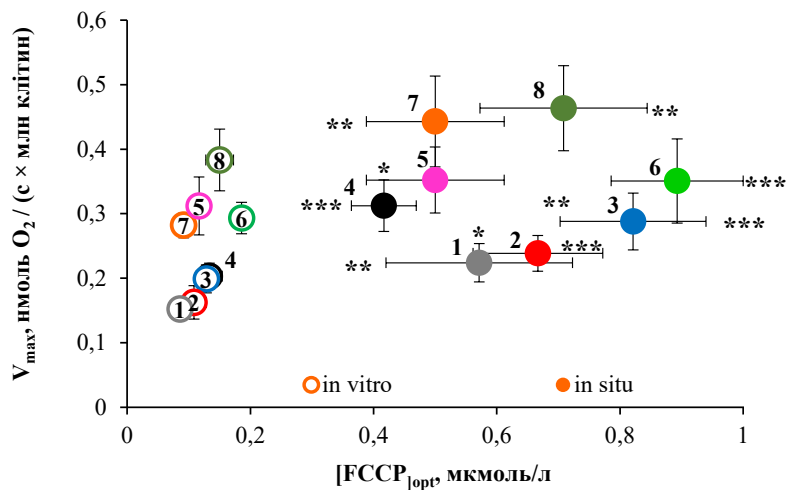


Рис. 4. Залежність максимальної швидкості роз'єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP: 1 – ендогенні субстрати, 2 – глюкоза, 3 – глутамін, 4 –  $\alpha$ -кетоглутарат, 5 – диметил- $\alpha$ -кетоглутарат, 6 – піруват, 7 – сукцинат, 8 – монометил-сукцинат; первинні дані представлені на рис. 1 і 2; \* – статистично вірогідна різниця щодо використання перфузії *in vitro* з  $P < 0,05$ ,  $n=6$

Спектр адаптаційної відповіді дихання мітохондрій суттєво залежить від способу перфузії. У випадку перфузії печінки *in vitro* спостерігається значно щільніше скупчення множини точок у лівій частині графіка (рис. 4), що свідчить про суттєво вужчий спектр адаптаційної відповіді мітохондрій. Окрім того, після перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання є підвищеними, а оптимальні концентрації FCCP – суттєво вищими, ніж після перфузії *in vitro*.

Отже, функціональний стан ізольованих гепатоцитів, а відтак і результати експериментів, проведених на цих клітинах, залежать від використаних методів перфузії печінки під час ізолювання гепатоцитів. Під час перфузії печінки (*in vitro* чи *in situ*) можуть виникнути негативні явища – підвищення в'язкості крові, зменшення перфузійного тиску в судинах органа, гіпоксія. Ці явища, на нашу думку, і зумовлюють основний вплив на життєздатність гепатоцитів і їхню метаболічну активність [7]. Очевидно, за використання перфузії *in vitro*, а саме під час перенесення частки печінки на скельце, гепатоцити піддаються впливу гіпоксії, що в подальшому і впливає на метаболічну активність та здатність (чи нездатність) адекватно відповідати на екзогенні чинники під час експерименту.

Описані вище результати підтверджують, що перфузія печінки *in situ* дає змогу отримати метаболічно повноцінні клітини для проведення експериментів. Окрім того, що за використання перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання й оптимальні концентрації FCCP є вищими, найбільш показово різницю спостерігали між використанням сукцинату,  $\alpha$ -кетоглутарату і їхніх метильованих естерів. Адже метилові естери сукцинату за використання перфузії печінки *in situ* підтримують дихання гепатоцитів на тому ж рівні, що і сукцинат. За перфузії печінки *in vitro* швидкість дихання гепатоцитів за окиснення сукцинату є нижчою, ніж за використання монометил-сукцинату (рис. 3). Ймовірно, причиною цього може бути пошкодження NaDC або II комплексу дихального ланцюга в ході перфузії. Подібний вплив методу перфузії печінки на швидкість дихання гепатоцитів спостерігається і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.

Наведені вище дані переконливо свідчать, що для ізолювання стабільних, метаболічно активних гепатоцитів, які здатні підтримувати дихальні процеси на високому рівні, необхідно використовувати перфузію печінки *in situ*.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bellemann P., Gebhardt R., Mecke D. An improved method for the isolation of hepatocytes from liver slices. Selective removal of Trypan blue-dyeable cells // *Anal. Biochem.* 1977. Vol. 81. N 2. P. 408–415.
2. Berry M., Wollenberg L., Zhao Z. Esterase activities in the blood, liver and intestine of several preclinical species and humans // *Drug Metab. Lett.* 2009. Vol. 3. N 2. P. 70–77.
3. Cassim S., Raymond V., Lapierre P., Bilodeau M. From *in vivo* to *in vitro*: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation // *PLoS One.* 2017. Vol. 12. N 12. P. e0190366.
4. Egnatchik R., Leamy A., Sacco S. et al. Glutamate-oxaloacetate transaminase activity promotes palmitate lipotoxicity in rat hepatocytes by enhancing anaplerosis and citric acid cycle flux // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294. N 9. P. 3081–3090.
5. Gonçalves L., Vigário A., Penha-Gonçalves C. Improved isolation of murine hepatocytes for *in vitro* malaria liver stage studies // *Malar J.* 2007. Vol. 6. P. 169.
6. Hayase K., Tappel A. Microsomal esterase of rat liver // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. N 9. P. 2269–2274.



7. Kon S., Imai M., Inaba H. Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats // *Anesthesiology*. 1997. Vol. 86. N 1. P. 128–136.
8. Lee D. H., Lee K. W. Hepatocyte isolation, culture, and its clinical applications // *Hanyang Med Rev*. 2014. Vol. 34. N 4. P. 165–172.
9. Manko B., Bilonoha O., Manko V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization // *Ukr. Biochem. J*. 2019. Vol. 91. N 3. P. 34–45.
10. Mazur H., Merlavsky V., Manko B., Manko V. Dependence of the mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes on the oxidative substrates availability // *Ukr. Biochem. J*. 2019. Vol. 91. N 6. P. 5–14.
11. Morgan E., Yan B., Greenway D. et al. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B) // *Arch. Biochem. Biophys*. 1994. Vol. 315. Iss. 2. P. 495–512.
12. Moseley R., Jarose S., Permod P. Hepatic Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransport: identification, characterization, and acinar localization // *Am. J. Physiol*. 1992. Vol. 263. N 6. P. 871–879.
13. Richert L., Binda D., Hamilton G. et al. Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes // *Toxicol In Vitro*. 2002. Vol. 16. N 1. P. 89–99.
14. Rognstad R. Gluconeogenesis in rat hepatocytes from monomethyl succinate and other esters // *Arch. Biochem. Biophys*. 1984. Vol. 230. N 2. P. 605–609.
15. Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells // *Methods Cell Biol*. 1976. Vol. 13. P. 29–83.
16. Summermatter S., Santos G., Pérez-Schindler J., Handschin C. Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor  $\alpha$ -dependent activation of LDH B and repression of LDH A // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013. Vol. 110. N 21. P. 8738–8743.
17. Underhill G., Khetani S. Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies // *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol*. 2017. Vol. 5. N 3. P. 426–439.
18. Zimmerli B., O'Neill B., Meier P. J. Identification of sodium-dependent and sodium-independent dicarboxylate transport systems in rat liver basolateral membrane vesicles // *Pflugers Arch*. 1992. Vol. 421. N 4. P. 329–335.

*Стаття надійшла до редакції 14.07.20*

*доопрацьована 14.07.20*

*прийнята до друку 27.08.20*

## **DEPENDENCE OF THE ADAPTIVE CAPACITY OF LIVER MITOCHONDRIA ON PREPARATION METHOD**

**H. Mazur, V. Merlavsky, B.O. Manko, V.V. Manko**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: volodymyr.manko@lnu.edu.ua*

When conducting studies on isolated hepatocytes, it is important to obtain cells that retain the functional properties that are characteristic of the whole organ. Increased blood viscosity during liver perfusion, decreased perfusion pressure in blood vessels, and hence hypoxia, are among the factors that may affect the functional state of isolated hepatocytes.

The functional state of cells can be estimated by the adaptive capacity of mitochondria, by inducing maximal respiration rate by uncoupling respiration and oxidative phosphorylation due to the addition of FCCP. The research aimed to investigate the adaptive capacity of mitochondria of isolated hepatocytes using *in situ* and *in vitro* liver perfusion.

Hepatocytes were isolated by the two-staged Seglen method by *in situ* and *in vitro* liver perfusion. Isolated hepatocytes, after 15-minute incubation in the medium without addition or with respective oxidative substrate – glutamine, pyruvate, succinate, monomethyl succinate,  $\alpha$ -ketoglutarate, dimethyl- $\alpha$ -ketoglutarate (at a concentration of 2 mM) or glucose (10 mM) – were added into the respiratory chamber and FCCP was added in increasing concentrations.

It was established that at *in situ* liver perfusion maximal rate of uncoupled respiration and the optimal concentration of FCCP was higher than at *in vitro* liver perfusion. Addition of exogenous substrates to a medium increased the respiration rate of hepatocytes. Upon *in situ* liver perfusion maximal uncoupled respiration rate increased at all causes except glucose, and at *in vitro* liver perfusion – only when dimethyl- $\alpha$ -ketoglutarate, succinate and monomethyl succinate were used. The optimal concentration of FCCP at *in vitro* liver perfusion increased due to the addition of glutamine, pyruvate and monomethyl succinate to the medium, and at *in situ* liver perfusion – only upon glucose oxidation. In both perfusion methods, the highest maximal rate of uncoupled respiration is with the use of monomethyl succinate and the optimal FCCP concentration – upon pyruvate oxidation.

Therefore, *in situ* liver perfusion is better method to obtain stable and metabolically active hepatocytes in support respiratory processes at a high level than *in vitro* perfusion.

*Keywords:* the adaptive capacity of mitochondria, *in situ* liver perfusion, *in vitro* liver perfusion, hepatocytes, FCCP

## ЗМІСТ ОГЛЯДИ

<i>О. Охримович, С. Чеботар, Г. Чеботар, Д. Жарікова</i> Молекулярна будова <i>E</i> -генів сої та їхні функціональні мутації .....	3
<i>Т. Король</i> Клітинні механізми еритродієрезу .....	14

### БІОФІЗИКА

<i>Н. Гарасим, М. Вербещук, Н. Боднарчук, М. Галан, Д. Санагурський</i> Інтенсивність вільнорадикальних процесів у плазмі крові щурів за впливу гістаміну і кверцетину .....	36
--	----

### БІОХІМІЯ

<i>Д. Пилипенко</i> Дослідження токсичності й антиоксидантної активності ліпосомальних антиоксидантів на моделі <i>Paramecium caudatum</i> .....	53
--	----

### ГЕНЕТИКА

<i>С. Пикало, О. Демидов, Т. Юрченко, С. Хоменко, О. Гуменюк, М. Харченко, Н. Прокопик</i> Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці .....	63
<i>Н. Васильєва, Т. Бродяженко, Т. Васильєва, Н. Лиманська, І. Марінова, І. Блайда</i> Поліморфізм штамів <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , ізольованих із відходів вугільної та енергетичної промисловості України .....	80

### ЕКОЛОГІЯ

<i>А. Гірна, Ю. Канарський, В. Яворницький</i> Павуки і журуни як складові різноманіття членистоногих (Arthropoda) екосистем Льва-Ствизького межиріччя (Рівненська область).....	89
<i>О. Поліщук, М. Лесів, Г. Антоняк</i> Вплив транспортного навантаження на акумуляцію металів у рослинах на території м. Львова .....	101
<i>Z. Matchur, Yu. Drach, S. Prytula</i> Sphagnum mosses of the Male Polissya (Lviv region) .....	110
<i>У. Семак, М. Миленка</i> Морфологічна мінливість фоліарних показників <i>Populus tremula</i> L. в умовах техногенного навантаження .....	121
<i>А. Стадниченко, О. Уваєва, А. Вискушенко</i> Комплексний вплив нітратів і біотичних чинників на активність <i>in vitro</i> війок фронтального миготливого епітелію зябрового апарату <i>Sinanodonta woodiana</i> (Mollusca, Bivalvia, Unionidae) .....	129

### ЗООЛОГІЯ

<i>І. Zagorodniuk, N. Lebedieva, Z. Barkaszi, O. Korotia</i> Mammals in the collection of the Zoological Museum of Zaporizhia University: overview and unique specimens .....	136
<i>О. Станкевич-Волосянчук</i> Сорокопуди роду <i>Lanius</i> у Закарпатській області України .....	150
<i>М. Пацюк</i> Розподіл голих амеб у ґрунтах степової зони України .....	159
<i>І. Шидловський, Ю. Струс</i> Ступінь вивченості й сучасний стан гніздових поселень баранця великого <i>Gallinago media</i> на заході України .....	167

### ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

<i>Г. Мазур, В. Мерлавський, Б.О. Манько, В.В. Манько</i> Залежність адаптаційної здатності мітохондрій печінки від способу виділення клітин .....	177
--	-----

## CONTENS

### REVIEWS

- O. Okhrymovych, S. Chebotar, G. Chebotar, D. Zharikova*  
Molecular structure of soybean *E*-genes and their functional mutations ..... 3  
*T. Korol*  
Cellular mechanisms of erythrodiuresis ..... 14

### BIOPHYSICS

- N. Harasym, M. Verbeschuk, N. Bodnarchuk, M. Galan, D. Sanagursky*  
Intensity of free-radical processes in plasma of rat blood due to histamine and quercetin ..... 36

### BIOCHEMISTRY

- D. Pylypenko*  
Study of toxicity and antioxidant activity of liposomal antioxidants using  
*Paramecium caudatum* model ..... 53

### GENETICS

- S. Pykalo, O. Demydov, T. Yurchenko, S. Khomenko, O. Humeniuk,*  
*M. Kharchenko, N. Prokopik*  
Methods for evaluation of wheat breeding material for drought tolerance ..... 63  
*N. Vasylieva, T. Brodiazhenko, T. Vasylieva, N. Limanska, I. Marinova, I. Blayda*  
Definition of genetic polymorphism of strains *Acidithiobacillus ferrooxidans*  
that were isolated from waste of coal and energy industry of Ukraine ..... 80

### ECOLOGY

- A. Hirna, Yu. Kanarsky, V. Yavornytsky*  
Spiders and Carabid beetles as the elements of arthropod's diversity  
in ecosystems of Lva-Stvyga inter-river area (Rivne province, Ukraine) ..... 89  
*A. Polishchuk, M. Lesiv, H. Antonyak*  
Impact of vehicular traffic on the accumulation of metals by plants in the territory of Lviv .. 101  
*Z. Mamchur, Yu. Drach, S. Prytula*  
Sphagnum mosses of the Male Polissya (Lviv region) ..... 110  
*U. Semak, M. Mylen'ka*  
Variation in leaf morphological traits of *Populus tremula* L.  
under the conditions of technogenic load ..... 121  
*A. Stadnychenko, O. Uvayeva, A. Vyskushenko*  
Compound effect of nitrates and biotic factors on the *in vitro*  
activity of epithelial cilia of outer demibranchs of *Sinanodonta woodiana*  
(Mollusca, Bivalvia, Unionidae) ..... 129

### ZOOLOGY

- I. Zagorodniuk, N. Lebedieva, Z. Barkaszi, O. Korotia*  
Mammals in the collection of the Zoological Museum of Zaporizhia University:  
overview and unique specimens ..... 136  
*O. Stankiewicz-Volosianchuk*  
Shrikes of the genus *Lanius* in the Zakarpattia region of Ukraine ..... 150  
*M. Patsyuk*  
Distribution of naked amoebae in the soils of the steppe zone of Ukraine ..... 159  
*I. Shydlovskyy, Yu. Strus*  
Current state of nesting settlements and study of great snipe  
*Gallinago media* in Western Ukraine ..... 167

### HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY

- H. Mazur, V. Merlavsky, B.O. Manko, V.V. Manko*  
Dependence of the adaptive capacity of liver mitochondria on preparation method ..... 177