

DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.1-62

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводяться науковцями ННЦ "Інститут біології та медицини" у галузях фізіології рослин і тварин, генетики, ботаніки, зоології, мікробіології, вірусології. Викладено також нові дані стосовно біохімічних і біофізичних основ регуляції у клітинах й органах у нормі та після впливу різноманітних фізико-хімічних факторів, наведено результати нових методичних розробок.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флоре и фауне Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" в областях физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные о биохимических и биофизических основах регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of biology and medicine" contains data on research in molecular biology, physiology, genetics, microbiology, virology, botanics, zoology concerning the structure, development and function of the plant and animal organisms, flora and fauna of Ukraine. Results of newly developed biophysical methods of biological research, biochemical data regarding metabolic regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); Шандор Макай, д-р біол. наук, проф. (м. Сомбатхей, Угорщина); Іван Бубряк, канд. мед. наук (Оксфорд, Велика Британія); В. Г. Хоперія, д-р мед. наук, проф.; Д. М. Говорун, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України (м. Київ, Україна); В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; Н. Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; В. В. Джаган, канд. біол. наук, доц.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. (м. Гродно, Білорусь), О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Брайон Каленгхем, д-р мед. наук, проф. (м. Кембридж, Велика Британія); Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, д-р біол. наук, проф. (м. Полтава, Україна); М. Є. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Скляр, д-р мед. наук, проф. (м. Львів, Україна); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія)
Адреса редколегії	ННЦ "Інститут біології та медицини"; просп. акад. Глушкова, 2 а, Київ, Україна, 03127 ☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини" 23.11.20 (протокол № 5)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Адреса видавця	Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02 ВПЦ "Київський університет" (кімн. 43), 6-р Т. Шевченка, 14, Київ, Україна, 01030 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28
Журнал входить до наукометричних баз:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (із 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (із 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (із 2014 р.); HINARI (із 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (із 2012 р.); The Knowledge Network (із 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (із 2012 р.); WorldCat (із 2013 р.).

DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.1-62

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of biology and medicine" contains data on research in molecular biology, physiology, genetics, microbiology, virology, botanics, zoology concerning the structure, development and function of the plant and animal organisms, flora and fauna of Ukraine. Results of newly developed biophysical methods of biological research, biochemical data regarding metabolic regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводяться науковцями ННЦ "Інститут біології та медицини" у галузях фізіології рослин і тварин, генетики, ботаніки, зоології, мікробіології, вірусології. Викладено також нові дані стосовно біохімічних і біофізичних основ регуляції у клітинах й органах у нормі та після впливу різноманітних фізико-хімічних факторів, наведено результати нових методичних розробок.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флоре и фауне Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" в областях физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные о биохимических и биофизических основах регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, Dr Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, PhD; Sergii Vakal, PhD (Tech. Editor); Sandor Makai, Prof. Dr Sci., Dr h. c. (Szombathely, Hungary); Ivan Boubriak, PhD (Oxford, United Kingdom); Kopperiay Viktoriay, Dr Sci.; Dmytro Hovorun, Dr Sci., Prof., Corresponding Member of the NASU, Deputy Director (Kyiv, Ukraine); Viktor Martynyuk, Dr Sci., Prof.; Mykola Makarchuk, Dr Sci., Prof. Head of the Chair; Nataliia Taran, Dr Sci., Prof., Head of the Chair of Plant Biology; Andrii Sivolob, Dr Sci., Prof.; Veronika Dzhagan, PhD, Associate Prof.; Andrei Moiseenok, Dr Sci., Prof., Corresponding Member of the NASB (Grodno, Belarus), Alexander Zholos, Dr Sci., Prof.; Brian Callingham, Dr Sci., M. D., Prof. (Cambridge, United Kingdom); Tetiana Berehova, Dr Sci., Prof.; Sergey Pilipenko, Dr Sci., Prof. (Poltava, Ukraine); Mykola Dzerzhynskyi, Dr Sci., Prof.; Olexandr Sklyarov, Dr Sci., M. D., Prof. (Lviv, Ukraine); Ludovico Abenavoli, PhD, M. D., Associate Prof. (Catanzaro, Italy)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 23.11.20 (Protokol № 5)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4525 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Taras Shevchenko National University of Kyiv, Publishing house "Kyiv University". Certificate included in the State Register ДК № 1103 від 31.10.02
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kyiv University" (off. 43), 14 Taras Shevchenko av., Kyiv, 01030, Ukraine ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; Fax: 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Academic Keys, CiteFactor, Directory of Open Access Journals (DOAJ), E-Library.ru, Hinari, Geneva Foundation for Medical Education and Research, DRJI, Open Academic Journal Index (OAJI), Quality Open Access Market (QOAM), ResearchBib, Ulrich's Periodicals, WorldCat, Ukrainian scientific journals

ЗМІСТ

Мартинюк В., Берегова Т., Цейслер Ю., Степанова Л., Кондратюк Т. Оптичні властивості сироватки крові щурів після інтрагастрального введення меланіну	6
Тарнопольська О., Котлярова А. Реєстрація іонних струмів крізь LCC-канали ядерної мембрани: хронобіологічний аспект	10
Калмикова О., Держинський М. Морфо-функціональний стан епіфіза та супрахіазматичного ядра гіпоталамуса щурів за різних режимів введення екзогенного мелатоніну	17
Тараріна В., Суха І., Лаврик Р., Артеменко О., Мороз О. Іонні канали в контексті пошуку молекулярних мішеней регуляції скоротливості міометрію	24
Петльована В., Чен МінЛей Очищення культур мікроводоростей колекції ACKU від грибних контамінантів	29
Гриник Є., Сінгаєвський Є. Павуки (ARACHNIDA, ARANEI) ландшафтного заказника "Яхнівський" (Київська область)	33
Пустовалов А., Ткаченко О., Матвієнко М., Держинський М. Морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів за умов розвитку ожиріння та при введенні наночастинок срібла	37
Хома Ю., Худолєєва Л., Куцоконь Н. Вплив сольового стресу на рослини тополі клону 'INRA 353-38' та верби клону 'Житомирська-1' в умовах культури <i>in vitro</i>	43
Коломійчук В., Баранський О. Флора та рослинність Ірпінського лісу	49
Романенко М., Курінний Д., Демченко О., Клименко С., Рушковський С. Вплив іонізуючого випромінювання <i>in vitro</i> на геном лімфоцитів периферичної крові безсимптомних носіїв мутації 5382insC у гені <i>BRCF1</i>	55

СОДЕРЖАНИЕ

Мартынюк В., Береговая Т., Цейслер Ю., Степанова Л., Кондратюк Т. Оптические свойства сыворотки крови крыс после интрагастрального введения меланина.....	6
Тарнопольская О., Котлярова А. Регистрация ионных токов сквозь LCC-каналы ядерной мембраны: хронобиологический аспект	10
Калмыкова О., Держинский Н. Морфо-функциональное состояние эпифиза и супрахиазматического ядра гипоталамуса крыс после разных режимов введения экзогенного мелатонина.....	17
Тарарина В., Суха И., Лаврик Р., Артеменко А., Мороз О. Ионные каналы в контексте поиска новых молекулярных мишеней регуляции сократительности миомерия	24
Петлевана В., Чен МинЛей Очистка культур микроводорослей коллекции ACKU от грибных контаминантов	29
Грынык Е., Сингаевский Е. Пауки (ARACHNIDA, ARANEI) ландшафтного заказника "Яхновский" (Киевская область).....	33
Пустовалов А., Ткаченко Е., Матвиенко М., Держинский Н. Морфофункциональное состояние висцеральной белой жировой ткани крыс при развитии ожирения и при введении наночастиц серебра	37
Хома Ю., Худолеева Л., Куцоконь Н. Влияние солевого стресса на растения тополя клона "INRA 353-38" и ивы клона 'Житомирская-1' в условиях культуры <i>in vitro</i>	43
Коломийчук В., Баранский А. Флора и растительность Ирпенского леса	49
Романенко М., Куринный Д., Демченко Е., Клименко С., Рушковский С. Влияние ионизирующего облучения <i>in vitro</i> на геном лимфоцитов периферической крови бессимптомных носителей мутации 5382insC в гене <i>BRCA1</i>	55

CONTENTS

Martyniuk V., Beregova T., Tseyslyer Yu., Stepanova L., Kondratiuk T. Optical properties of rat serum after intragastric administration of melanin	6
Tarnopolska O., Kotliarova A. Ion currents registration through LCC-channels of the nuclear membranes: chronobiological aspect	10
Kalmukova O., Dzerzhynsky M. Morpho-functional state of rats pineal gland and suprachiasmatic nucleus of hypothalamus after different regimes of exogenous melatonin administration	17
Tararina V., Sukha I., Lavryk R., Artemenko O., Moroz O. Ion channels in a context of the development of new molecular targets for regulation of uterine contractions	24
Petlyovana V., Chen Minglei Purification of microalgae crops of ACKU collection from mushroom contaminants	29
Grynok E., Singayevskiy E. The spiders (ARACHNIDA, ARANEI) in the landscape reserve "Yakhnivsky" (Kiev region)	33
Pustovalov A., Tkachenko O., Matvienko M., Dzerzhynsky M. Morphofunctional state of rat visceral white adipose tissue under obesity development and silver nanoparticles administration.....	37
Khoma Yu., Khudolieieva L., Kutsokon N. Influence of salt stress on plants of poplar clone 'INRA 353-38' and willow clone 'Zhytomyrska-1' in <i>in vitro</i> culture	43
Kolomiychuk V., Baransky A. Flora and vegetation of the Irpin forest	49
Romanenko M., Kurinnyi D., Demchenko O., Klymenko S., Rushkovsky S. The impact of ionizing irradiation <i>in vitro</i> on the genome of peripheral blood lymphocytes of the asymptomatic carriers of the 5382insC mutation in the <i>BRC1</i> gene.....	55

OPTICAL PROPERTIES OF RAT SERUM AFTER INTRAGASTRIC ADMINISTRATION OF MELANIN

Previous studies of the biological activity of melanin produced by the Antarctic black yeast Pseudonadsoniella brunnea have shown its antioxidant, stress-adaptogenic, dermatotropic, wound-healing and antibacterial effects. However, the primary physicochemical mechanisms of the system influence of melanins remain insufficiently studied. Therefore, the aim of the study was to determine effects of the intragastral administration of melanin produced by the Antarctic black yeast Pseudonadsoniella brunnea on the optical properties of a protein component and an aqueous phase of rat serum. White nonbreed adult male rats weighing 180–200 g were used in the experiments. The intragastric route of administration of melanin by means of soft gastric catheter at a dose of 3 mg/kg was used. Rats of the control group were administered the physiological solution in the same way. After 1 hour the animals were sacrificed by cervical dislocation and blood serum was obtained for further studies. The absorption spectra of blood serum samples were recorded using Shimadzu Biospec-Mini spectrophotometer in the range of 190–1100 nm. Analysis of the absorption spectra of blood serum in a wide range from UV to near IR indicated that one hour after intragastral administration of melanin to rats at the dose of 3 mg/kg the optical properties of protein component were not changed, but the properties of the aqueous phase of the blood serum were changed due to statistically significant decrease of an amount of hydrogen bonds. Authors hypothesized that the appearance of substances that destruct the hydrogen bond network in the blood is one of the reasons for such changes. Changes of properties of water as the solvent and the structure-forming factor can have further systemic consequences due to changes in the hydration of biological polymers and low molecular weight metabolites, their solubility and intermolecular interactions, cell membrane permeability, molecular dynamics and functional activity of biomacromolecules, etc.

Keywords: melanin, blood serum, serum proteins, water.

Introduction. Melanins belong to the group of pigments synthesized in living organisms – both in pro- and eukaryotes. It is well known that melanins have a wide range of biological action: antioxidant, cytoprotective, photo- and radioprotective, etc., they can be used as sorbents of a number of radionuclides and heavy metals [1, 2].

Previous researches that we have conducted to determine the biological activity of melanin produced by the Antarctic black yeast *Pseudonadsoniella brunnea* showed antioxidant, stress-adaptogenic [3], dermatotropic, wound-healing, antibacterial [4, 5], antiphytopathogenic [6, 10] effects of melanin. This, in turn, allows us to consider melanin as a promising substance for numerous drugs with many useful properties that also makes it useful in medicine and veterinary medicine. The mechanism of action of melanins on biological processes is primarily associated with their antioxidant properties. However, the biological effects observed in the experiments are mainly systemic in nature. We must state that the primary physicochemical mechanisms of systemic influence of melanin on men and animals remain insufficient. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of intragastral administration of melanin on the optical properties of the protein component and the aqueous phase of the blood serum of rats.

Materials and methods. The white not breed adult male rats raised in the animal house of the Institute of Biology and Medicine of Taras Shevchenko National University of Kyiv and weighing 180–200 g were used in experiments. Animals were kept on a standard diet in an accredited animal house in accordance with standard rules for the organization, equipment and maintenance of experimental biological clinics (animal houses). Animals were divided on two groups: control ($n_c = 5$) and experimental ($n_e = 5$). The experimental procedures were conducted according to international recommendations for conducting biomedical research using animals in accordance with the European Convention. The intragastric route of administration of melanin by means of soft gastric catheter at a dose of 3 mg/kg was used. Rats of the control group were administered the physiological solution in the same way. After 1 hour the

animals were sacrificed by cervical dislocation and blood serum was obtained for further studies.

Melanin was obtained from a strain of black yeast-like fungi *Pseudonadsoniella brunnea* (Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Meripilaceae) 470 FCKU, isolated from Antarctic rock samples of Fr. Galindez. Strain *P. brunnea* 470 FCKU is stored in the Collection of Microscopic Fungi of Institute of Biology and Medicine of Taras Shevchenko National University of Kyiv (international acronym of the FCKU collection), registration number *P. brunnea* in the Depository of the State Research and Control of Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms is N 607 [6]. In order to obtain biomass and synthesis of melanin the cultivation of the strain *P. brunnea* 470 FCKU was carried out by means of deep method using liquid nutrient media. The composition of nutrient media was chosen according to results of our previous studies [7–9]. Malt extract broth and Saburo medium (manufactured by HiMedia Laboratories, India and Conda, Spain) were used for biomass accumulation. Isolation of melanin from the culture medium of *P. brunnea* 470 FCKU was carried out in accordance with the Regulation "Obtaining polyphenol-carbon complex from Antarctic black yeast-like fungi *Pseudonadsoniella brunnea*" Melanin "on the basis of Specification U 15.9-30034243-004: 2005 with changes in name stain and additions and changes in p. 2.2.1, 2.2.3, 5.9.3-2017". For the cultivation of *P. brunnea* 470 FCKU in order to obtain melanin we used barley-malt extract (YASE № 3, produced by "Starch Products of Ukraine", Specification U 15.8 – 32671885-001: 2011) (4.6 % by hydrometer-sugar meter AST-2) with the addition of 0.05 % L-tyrosine and 1 % enzymatic peptone.

The absorption spectra of blood serum samples from each animal were recorded using Shimadzu Biospec-Mini spectrophotometer in the range of 190–1100 nm. Light absorption by serum samples was measured in quartz cuvettes with an optical path length of 1 cm against air that allowed to investigate the optical properties of not only the protein component but also spectral features of water, which is the main component of blood serum and other biological tissues.

ANOVA statistic was used for analysis of experimental data using Origin Pro that licensed for Taras Shevchenko National University.

Results and discussion. The blood serum of the rats had a light pink color due to the presence of small impurities of hemoglobin which got into the serum due to the mechanical destruction of erythrocytes during preparation of blood samples. The absorption spectra clearly show the typical absorption bands of oxyhemoglobin (Soret band 350–450 nm, as well as two bands in the range 500–600 nm) (Fig. 1, line A).

The statistically significant differences in the absorption spectra in the range of 300–700 nm of serum samples in groups of control and experimental animals were not detected (Fig. 1, line A). Analysis of the optical properties of serum proteins in the range of 230–320 nm, that characterizes absorption of aromatic and sulfur-containing amino acids, was possible after diluting blood serum 1 : 100 and 1 : 1000 (Fig. 1, lines B and C). In this case there were also not statistically significant differences between the control and experimental groups for this spectral range.

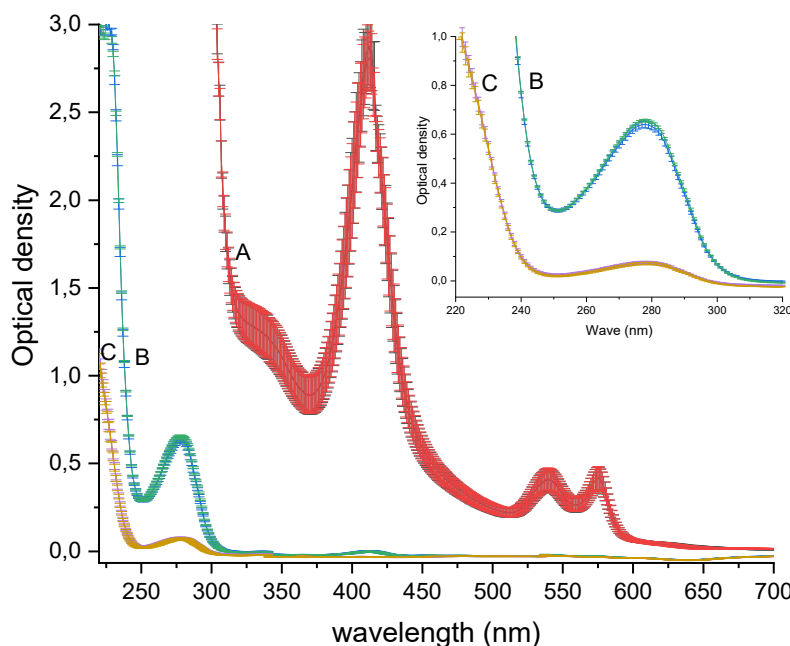


Fig. 1. Absorption spectra of whole blood serum samples in groups of control and experimental rats (line A) and diluted serum 1 : 100 and 1 : 1000 (lines B and C). The mean error of the average value ($D \pm d$) is given for each value of optical density. The averaged absorption spectra for the control and experimental samples actually coincide

The absorption band corresponding to the vibronic overtones of water molecules ($2\nu_1 + \nu_2 = 951.5$ nm; $\nu_1 + 2\nu_2 = 936.3$ nm; $2\nu_1 + 2\nu_3 = 982.1$ nm; $2\nu_2 + 2\nu_3 = 951.5$) was observed in the near infrared (IR) range of 900–1070 nm. In order to eliminate the effects of nonspecific light scattering in the different samples of blood serum, the

absorption spectrum of each sample for the specified range was normalized relative to the baseline calculated by using procedure "Peak and Baseline" in Origin Pro. Then statistical processing was performed and spectral lines were averaged over animal groups taking into account the mean error for every average value of optical density (Fig. 2).

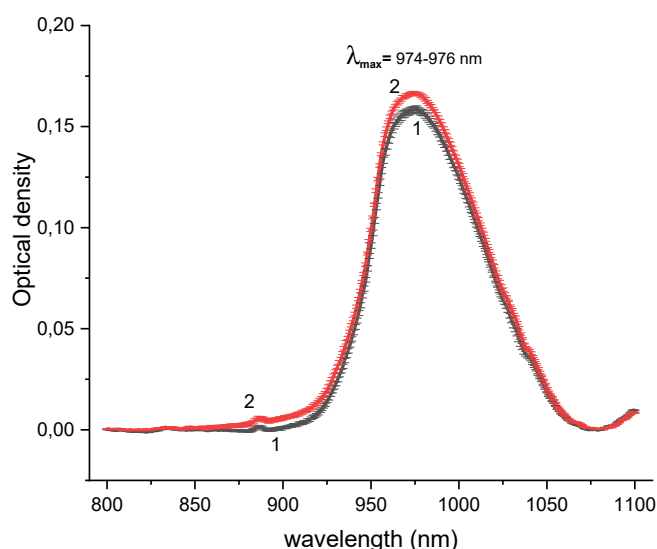


Fig. 2. The normalized absorption spectrum in the near IR range of vibronic overtones of water molecules 900–1070 nm ($2\nu_1 + \nu_2 = 951.5$ nm; $\nu_1 + 2\nu_2 = 936.3$ nm; $2\nu_1 + 2\nu_3 = 982.1$ nm; $2\nu_2 + 2\nu_3 = 951.5$ nm) for undiluted blood serum (1 – control group of rats, 2 – group of rats with the administration of melanin). The mean error of the average value ($D \pm d$) is given for each value of optical density

The analysis of absorption spectra in the range of 900–1070 nm shown the statistically significant ($p < 0.05$) increase in optical density by 6 % at $\lambda_{\max} = 974\text{--}976\text{ nm}$ in serum samples of rats administered with melanin, compared to samples of control animals. This indicates that despite the absence of spectral changes of the protein component, the state of the aqueous phase of blood serum was changed in some way. An additional confirmation of the real changes in the water state is the statistically significant increase of light absorption of near-IR light in the range of higher-order vibronic overtones on 885–895 nm ($2\nu_1 + 2\nu_3$). In addition, the absorption maximums of the spectral bands in the control and experimental serum samples are respectively 976 nm and 974 nm that indicates a spectral shift to the blue region of the water spectrum in serum samples of experimental group of animals. A natural question arises as to the nature and causes of such spectral changes.

Water is the main component of the blood serum, so the increase of its optical density in near IR range can be explained by an increasing its content in the biological samples. According to this assumption we should expect a decrease of the content of other components in blood serum, especially the proteins as the main component. The protein concentration for serum samples is easy to calculate using the Kalckar's formula $C\text{ (g/l)} = 1.45D_{280} - 0.74D_{260}$, where D_{280} and D_{260} are the optical density at the

respective wavelengths [15]. Using this formula, the serum protein concentration was calculated to be 64 and 66 g/l that corresponds to a protein concentration of 6.4 % and 6.6 %, respectively, for control and experimental groups of animals. These values are usual for the protein concentration indices in the blood serum of rats and the difference does not exceed 3 % compared to the serum samples of control animals and it is not statistically significant value, which is clearly seen in Fig. 1. Even if we take this value as an extremely weak tendency to increase the concentration of protein in the blood serum of experimental rats, it contradicts the accepted assumption of increasing the water content in the blood serum samples. Thus, the most plausible explanation for the detected spectral shifts is the changes in the state of the aqueous phase in the serum samples of experimental animals.

Fig. 3 shows the generalized absorption spectra of liquid and solid phases of water. It is clear that when freezing water, when it is structured by the formation and stabilization of hydrogen bonds, there is a red shift (shift of absorption maxima in the region of greater wavelengths) and hypochromism (decrease in optical density) in the spectral range corresponding to higher overtones of water. In our case, the opposite effect was detected, namely the increase of optical density and the shift of the absorption maximum to the blue region.

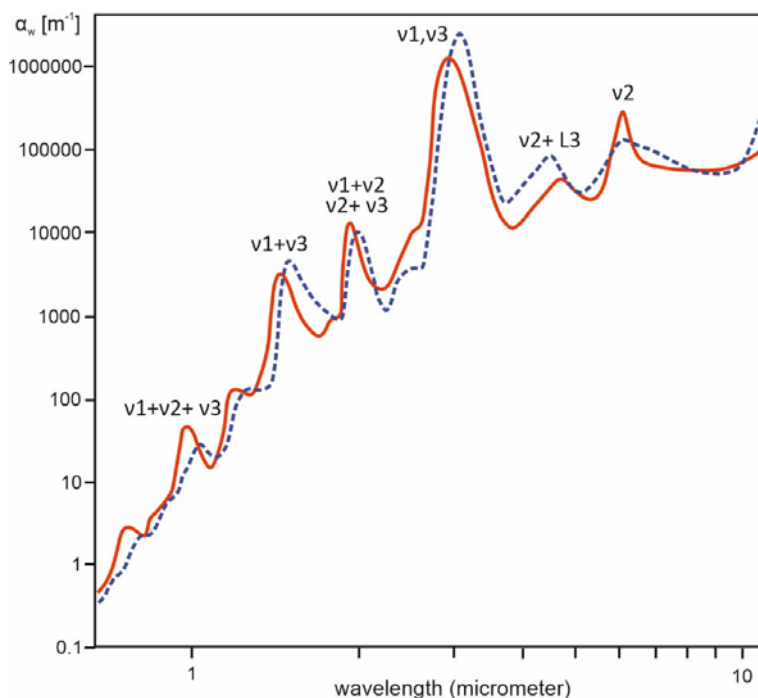


Fig. 3. Generalized light absorption spectra for liquid water (1, red solid) and ice (2, blue dotted line) [11–14]

Thus, based on data on the optical properties of water and ice (Fig. 3), we can conclude that increase of optical density of water and the shift of the spectrum to the blue region in the near IR range indicates an increase of free molecules of water due to destruction of hydrogen bond network. This fact, in turn, allow us to suggests the changes of ratio of low molecular weight substances and electrolytes, which are structurants or destructors of the hydrogen bond network and affect the thermal motion of water molecules [16, 17] in the blood of experimental animals administered with melanin, that, in turn, should affect the solubility of substances of different nature in the blood and the hydration of biological molecules. The nature of such substances in blood serum and their properties require separate verification.

The authors draw attention to the fact that the antitumor effect of cisplatin-based drugs is accompanied by an increase in the self-diffusion rate of water molecules in both sensitive and cisplatin-resistant tumors of Guerin's carcinoma, which generally indicates an increase in motility of water molecules under the influence of this drug [18]. Possibly, radioprotective and anticancer effects of melanin drugs are associated not only with their high antioxidant activity [19, 20], but also with influence on the physicochemical properties of the aqueous phase that primarily depend on the dynamics of the hydrogen bond network.

Conclusions. Analysis of the absorption spectra of blood serum in a wide range from UV to near IR indicated that one hour after intragastral administration of melanin to rats at the dose of 3 mg/kg the optical properties of

protein component were not changed, but the properties of the aqueous phase of the blood serum were changed due to statistically significant decrease of an amount of hydrogen bonds.

Authors hypothesized that the appearance of substances that destruct the hydrogen bond network in the blood is one of the reasons for such changes. Changes of properties of water as the solvent and the structure-forming factor can have further systemic consequences due to changes in the hydration of biological polymers and low molecular weight metabolites, their solubility and intermolecular interactions, cell membrane permeability, molecular dynamics and functional activity of biomacromolecules, etc.

References

1. Solano Melanins F. Skin Pigments, Much More-Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes / Solano Melanins F. // New Journal of Science. 2014:28.
2. Castelvetti D. Dark Power: Pigment seems to put radiation to good use / Castelvetti D. // Science News. 2007. 171 (21): 325.
3. Falalyeyeva T.M. The influence of melanin isolated from Antarctic yeasts on cortisol blood level of rats in conditions of stress action / T.M. Falalyeyeva, O.I. Tsyryuk, N.V. Chyzyhanska, V.P. Zharova // Ukr. Antarctic J. – 2009. – 8. – P. 391-394.
4. Taburets O.V. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing / O.V. Taburets, O.O. Morgaienko, T.O. Kondratiuk, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2016. – 7 (3). – P. 2031-2038.
5. Dranitsina A.S. Tgf1, Ptg2 Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin / A.S. Dranitsina, O.V. Taburets, K.O. Dvorshchenko, D.M. Grebinyk, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2017 – 8 (1). – P. 2014-2023.
6. Kondratiuk T. Microorganisms, perspective for biotechnology, medicine, environmental technologies, in the collection of microscopic fungi ESC "Institute of biology and medicine", Taras Shevchenko national university of Kyiv / T. Kondratiuk, T. Akulenko, T. Beregova, L. Ostapchenko // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology. – 2017. – 73. – P. 22-30.
7. Kondratiuk T. Dependence of biomass accumulation by melanin producer *Pseudonadsoniellabrunnea* (Meripilaceae, Agaricomycotina) on the cultural media content / Kondratiuk T., Akulenko T., Torgalo E., Beregova T., Ostapchenko L. // Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv: Biology. 2019.1 (77):83-86.
8. Kondratiuk T. Synthesis of melanin by black yeast *Pseudonadsoniellabrunnea*: dependence on the amount of L-tyrosine in the culture medium / Kondratiuk T., Akulenko T., Torgalo E., Beregova T., Vereshaka L. // Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv: The Problem of Regulation of Physiological Functions. 2019. 1(26): 41-46.
9. Kondratiuk T. Dependence of melanin synthesis by black yeast *Pseudonadsoniellabrunnea* on the amount of carbon source in the culture medium / Kondratiuk T., Akulenko T., Torgalo E., Beregova T., Vereshaka L. // ScienceRise: Biological Science. 2019. 18(3):38-40.
10. Kondratiuk T. Antibacterial and antifungal influence of a melanin producer *Pseudonadsoniella brunnea* culture fluid / Kondratiuk T., Beregova T., Ostapchenko L. // JB Books. Poznań, Poland. 2017:2-19.
11. Bertie J. E.; Lan Z. Infrared Intensities of Liquids XX: The Intensity of the OH Stretching Band of Liquid Water Revisited, and the Best Current Values of the Optical Constants of H₂O(l) at 25°C between 15,000 and 1 cm⁻¹. // *Applied Spectroscopy*. 1996.50(8):1047–1057. doi:10.1366/0003702963905385
12. Warren S. G. Optical constants of ice from the ultraviolet to the microwave. // *Warren S. G. // Applied Optics*. 1984 23 (8): 1206. doi:10.1364/AO.23.001206
13. Warren S. G. Optical constants of ice from the ultraviolet to the microwave: A revised compilation. // *J. Geophys. Res.* 2008. 113 : D14220. doi:10.1029/2007JD009744
14. Pope R. M.; Fry E. S. Absorption spectrum (380–700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements. // *Applied Optics*. (1997).36 (33): 8710–8723. doi:10.1364/AO.36.008710
15. Kalckar H. M. Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by Means of Specific Enzymes. III. Studies of the Enzymes of Purine Metabolism. // *J. biol. Chem.* 1947. 167:461-75.
16. Bulavin L.A., Malomuzh M.P., Pankratov K.M. Influence of electrolyte impurities on the nature of thermal motion of water molecules / Bulavin L.A., Malomuzh M.P., Pankratov K.M. // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2018. (8): 52-57.
17. Vasylykevych O.F. Neutron studies of the processes of self-diffusion of molecules in the heavy water-glycerol system depending on temperature and concentration / Vasylykevych O. F., Slysenko B.I. // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2009. (8): 70-76.
18. Bulavin L.A. Neutron studies of self-diffusion of water molecules in plasma membranes / Bulavin L.A., Chekhun V.F., Vasylykevych O.A. etc. // *Journal of Physical Research*. 2004. 8(4): 334-337.
19. Noura El-Ahmady El-Naggar. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. // *Scientific Reports*. 2017. 7. Article number: 42129. doi:10.1038/srep42129
20. Adila Salih ElObeid, Afaf Kamal-Eldin, Mohamed Anwar K. Abdelhalim, Adil M. Haseeb. Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health. // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017. 120: 515–522.

Надійшла до редколегії 1.10.2020

Отримано виправлений варіант 2.11.2020

Підписано до друку 2.11.2020

Received in the editorial 1.10.2020

Received a revised version on 2.11.2020

Signed in the press on 2.11.2020

В. Мартинюк, д-р біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук,
Ю. Цейслер, канд. біол. наук,
Л. Степанова, канд. біол. наук,
Т. Кондратюк, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОПТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНТРАГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУ

Попередні дослідження біологічної активності меланіну, продуцентами якого є антарктичні чорні дріжджоподібні гриби *Pseudonadsoniella brupnea*, показали, що меланін виявляє антиоксидантну, стрес-адаптогенну, дерматотропну, ранозагоювальну та антибактеріальну дію. Однак первинні фізико-хімічні механізми системної дії меланіну залишаються недостатньо дослідженими. У зв'язку із цим метою дослідження було з'ясування ефектів інтрагастрального введення меланіну на оптичні властивості білкової компоненти у водної фази сироватки крові щурів. У досліді використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців із масою 180–200 г. Застосовували інтрагастральний шлях уведення препарату меланіну катетером м'яким шлунковим у дозі 3 мг/кг (10-кратна терапевтична). Щурам контрольної групи таким саме чином вводили дистильовану воду. За 1 год тварин умертвляли методом цервікальної дислокації та отримували сироватку крові, яку використовували для подальших досліджень. Реєстрацію спектрів поглинання зразків сироватки крові проводили на спектрофотометрі "Shimadzu Biospec-mini" в діапазоні 190–1100 нм. Аналіз спектрів поглинання сироватки крові у широкому діапазоні від УФ до ближнього ІЧ свідчить про те, що за годину після підшкірного введення щурам меланіну в дозі 3 мг/кг оптичні властивості білків у крові не змінюються, однак достовірно змінюються властивості водної фази крові в бік зменшення кількості водневих зв'язків. Автори припустили, що поява речовин, які руйнують мережу водневих зв'язків у крові, є однією із причин таких змін. Зміни властивостей води як розчинника і структуроутворюючого фактора можуть мати подальші системні наслідки через зміни гідратації біологічних полімерів і низькомолекулярних метаболітів, їхньої розчинності та міжмолекулярних взаємодій, проникності клітинних мембран, молекулярної динаміки та функціональної активності біомакромолекули тощо.

Ключові слова: меланін, сироватка крові, білки сироватки, вода.

В. Мартинюк, д-р біол. наук,
Т. Береговая, д-р биол. наук,
Ю. Цейслер, канд. биол. наук,
Л. Степанова, канд. биол. наук,
Т. Кондратюк, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ИНТРАГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЛАНИНА

Предыдущие исследования биологической активности меланина, продуцентами которого являются антарктические черные дрожжеподобные грибы *Pseudonadsoniella brupnea*, показали, что меланин проявляет антиоксидантное, стресс-адаптогенное, дерматотропное, ранозаживляющее и антибактериальное действие. Однако первичные физико-химические механизмы системного действия меланина остаются недостаточно исследованными. В связи с этим целью исследования было выявление эффектов интрагастрального введения меланина на оптические свойства белковой компоненты и водной фазы сыворотки крови крыс. В опытах использовали белых нелінійних половозрелых крыс-самцов с массой 180–200 г. Применяли интрагастральный путь введения препарата меланина катетером мягким желудочным в дозе 3 мг/кг (10-кратная терапевтическая). Крысам контрольной группы таким же образом вводили дистиллированную воду. Через 1 час животных умерщвляли методом цервикальной дислокации и получали сыворотку крови, которую использовали для дальнейших исследований. Регистрацию спектров поглощения образцов сыворотки крови проводили на спектрофотометре "Shimadzu Biospec-mini" в диапазоне 190–1100 нм. Анализ спектров поглощения сыворотки крови в широком диапазоне от УФ до ближнего ИК свидетельствует о том, что через час после подкожного введения крысам меланина в дозе 3 мг/кг оптические свойства белков в крови не изменяются, однако достоверно изменяются свойства водной фазы крови в сторону уменьшения количества водородных связей. Авторы предположили, что появление веществ, разрушающих сеть водородных связей в крови, является одной из причин таких изменений. Изменения свойств воды как растворителя и структурообразующего фактора могут иметь дальнейшие системные последствия в результате изменений гидратации биологических полимеров и низкомолекулярных метаболитов, их растворимости и межмолекулярных взаимодействий, проницаемости клеточных мембран, молекулярной динамики и функциональной активности биомакромолекул и др.

Ключевые слова: меланин, сыворотка крови, белки сыворотки, вода.

УДК 576.315.2; 577.352.522; 57.045
DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.10-17

^{1,2}О. Тарнопольська, студ.,

¹А. Котлярова, канд. біол. наук

¹Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

РЕЄСТРАЦІЯ ІОННИХ СТРУМІВ КРИЗЬ LCC-КАНАЛИ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ: ХРОНОБІОЛОГІЧНИЙ АСПЕКТ

Протягом семи років досліджень транспортних систем ядерних мембран із застосуванням методу patch-clamp спостерігали певну закономірність: узимку ефективність роботи цим методом значно знижувалась. Оскільки різні сезони/пори року характеризуються різними світловими і температурними показниками, то ми вирішили перевірити ймовірний вплив останніх на успішність виконання досліджень. Тому метою цієї роботи було перевірити вплив таких сезонних факторів, як зміна тривалості світлового дня, температура, атмосферний тиск, кількість опадів і хмарність на якість patch-clamp-реєстрацій іонних струмів кризь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів і нейронів Пуркінє мозочка. Ми припустили, що зі зменшенням тривалості світлового дня і зниженням температури зменшуються якісні та кількісні показники patch-clamp-реєстрацій. Для перевірки цього припущення застосовано кореляційний аналіз Пірсона із вихідними даними про тривалість світлового дня, метеорологічні умови та розрахованою успішністю реєстрацій (%) за конкретний день. На основі результатів такого аналізу встановлено, що існує пряма виражена лінійна залежність якості та кількості реєстрацій від тривалості світлового дня ($r = 0,6$) і температури ($r = 0,6$), а також слабка обернена залежність від хмарності ($r = 0,3$). На основі дисперсійного аналізу (ANOVA) підтверджено достовірно більшу успішність реєстрацій, виконаних у літній період, порівняно із зимовими того самого року. Отримані результати можуть стати основою для оптимізації дослідницької діяльності робочих груп, які вивчають функціонування внутрішньоклітинних транспортних систем електрофізіологічними методами, зокрема patch-clamp.

Ключові слова: біоритми, хронобіологія, метеорологічні умови, patch-clamp, ядерна мембрана, іонні канали, LCC-канали.

Вступ. Ядро є однією із ключових органел еукаріотичної клітини: воно зберігає, реалізує та передає генетичну інформацію, регулює синтетичні процеси у клітині

тощо. Від цитоплазми, у якій містяться решта органел, ядро відмежоване ядерною оболонкою, яка утворена зовнішньою і внутрішньою мембранами та перинуклео-

рним простором між ними. Ядерна оболонка містить транспортувальні системи, такі як ядерні порові комплекси [1–6], що забезпечують малоселективний транспорт між цитоплазмою та нуклеоплазмою, а також іонні канали, що розміщені як на зовнішній, так і на внутрішній мембрані та служать для високоселективного транспорту між перинуклеарним простором і нуклеоплазмою і/або цитоплазмою [3, 7–12]. Зовнішня мембрана каріолеми та, відповідно, перинуклеарний простір продовжуються в ендоплазматичний ретикулум (ЕПР) [13]. Просвіт ЕПР разом із перинуклеарним простором депонують іони кальцію [1, 13, 14]. Останні у клітині опосередковують чимало важливих процесів, зокрема регуляцію експресії генів, реплікацію ДНК, транскрипцію, участь у процесах екзоцитозу, апоптозу, синаптичної передачі, скорочення, транспортування білків, регуляції секреції тощо [10, 15–19]. Саме тому вивчення механізмів Ca^{2+} -сигналізації важливе для розуміння як багатьох фізіологічних процесів, так і патогенезу захворювань; дає змогу детальніше розібратися в механізмах впливу деяких лікарських засобів і відкриває поле для пошуку нових фармакологічних препаратів [15]. Із внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} вивільняється крізь іонні канали в мембранах. Станом на сьогоднішній день найкраще вивченим механізмом вивільнення внутрішньоклітинного Ca^{2+} є інозитол-1,4,5-трифосфатні (IP3R) та ріанодинові (RyRs) рецептори [1, 15, 16, 20–24].

Одним із сучасних методів дослідження властивостей іонних каналів є patch-clamp, суть якого полягає у вимірюванні струмів крізь іонні канали, що робить можливим отримання інформації про електрофізіологічні властивості цих каналів, дає змогу спостерігати за їх активністю в реальному часі, зокрема за зміною кінетичних властивостей, швидкістю проходження іонів крізь канал, забезпечує можливість дослідження чутливості каналу до заданих значень потенціалу, фармакологічних речовин тощо [25]. Цей метод широко застосовується для визначення характеристик транспортних систем плазматичної мембрани клітин, однак його можна застосувати і на внутрішньоклітинних мембранах. Виконання patch-clamp-реєстрації іонного струму крізь канали зовнішньої або внутрішньої ядерної мембрани схоже на таке на плазматичній мембрані ізольованих клітин, однак складніше, полягає у виділенні необхідного біоматеріалу та ізоляції конкретних мембран у такий спосіб, щоб вони були придатними для електрофізіологічних досліджень. Серед внутрішньоклітинних мембран найзручнішими для дослідження є саме ядерні, оскільки ядра зазвичай мають достатньо великий розмір для проведення patch-clamp-реєстрації іонного струму, завдяки чому можна досить точно ідентифікувати, чи маніпуляції проводяться саме на них, на відміну від спроб реєстрації від мембрани ЕПР або внутрішньоклітинних везикул.

Дослідження властивостей іонних каналів ядерної мембрани методом patch-clamp у нашій лабораторії розпочав у 2005 році Сергій Михайлович Марченко [10]. Тоді за допомогою цього методу було зареєстровано струми крізь катіонні канали великої провідності (LCC-канали – Large-Conductance Cation channels) у ядерній мембрані нейронів Пуркінє мозочка. Згодом канали з такими самими характеристиками було зареєстровано й у мембрані ядер кардіоміоцитів [26] та інших об'єктів.

За роки досліджень каналів методом patch-clamp ми звернули увагу, що в деякі дні особливо складно реєструвати струми крізь іонні канали, оскільки майже неможливо встановити гігаомний контакт між мікропіпеткою та ядерною мембраною. Якщо ж його вдавалося встановити, то на більшості ділянок мембрани струм крізь канали був відсутній. Така проблема виникала зазвичай

у холодну пору року (кінець листопада/грудень – лютий/початок березня) і повторювалася щороку із 2013 до 2020 року. Якість реєстрації іонного струму крізь канал методом patch-clamp може залежати від якості зразка біоматеріалу, на якому виконується дослідження, а також від властивостей боросилікатного скла, що використовується для patch-піпеток, і температури, за якої їх виготовлено. Крім того, може впливати людський фактор на будь-якому з етапів виконання експерименту, наприклад недотримання методики виготовлення піпеток або ж порушення протоколу виконання patch-clamp-реєстрації струму крізь іонний канал. Однак періодичне виникнення ускладнень при реєстраціях у холодну пору року спостерігали незалежно від вищеперерахованих чинників, і така проблема, звісно, значно сповільнювала дослідження.

Оскільки для кожної пори року характерні свої світлові й температурні показники, то ми вирішили звернути увагу саме на вплив зміни тривалості світлового дня і погодних умов, оскільки такі сезонні коливання впливають на біологічні ритми живих організмів [27–30]. Метою роботи стало перевірити, чи існує статистично достовірна залежність кількості та якості patch-clamp-реєстрацій іонних струмів крізь ядерні мембрани нейронів Пуркінє мозочка і кардіоміоцитів від тривалості світлового дня і метеорологічних умов.

Отримані результати матимуть важливе значення для оптимізації робочого процесу в лабораторії, побудови ефективнішої схеми експерименту, яка дозволить економити необхідні для проведення дослідження матеріали, не застосовуючи їх у несприятливі для реєстрацій дні.

Матеріали та методи. Дослідження виконано на ядрах кардіоміоцитів і нейронів Пуркінє мозочка 3–4-тижневих щурів ліній Wistar та Fisher відповідно до положень Європейської конвенції із захисту тварин, яких використовують у експериментах (Страсбург, 1986), а також положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Ізолювання ядер нейронів Пуркінє мозочка та кардіоміоцитів. Для виділення ядер щурів анестезували та декапітували, після чого виділяли серце або мозок (з нього відокремлювали мозочок) і виготовляли зрізи завтовшки до 400 мкм. Зразки серця заморожували в розчині (концентрації у ммоль/л): сахароза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2; доводили KOH), а зразки мозочка – у розчині (ммоль/л): калію глюконат – 150; EDTA – 1; HEPES – 10; HEPES-калієва сіль – 10 (pH 7,2; доводили KOH). До обох розчинів додавали суміш інгібіторів протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail tablets, "Roche", Німеччина) у концентрації 1,6 мг/мл. Безпосередньо перед виконанням електрофізіологічного дослідження зразки розморожували, частково гомогенізували пропусканням крізь голку для зразків мозочка або скляним гомогенізатором об'ємом 2 мл для зразків міокарда та центрифугували. Після центрифугування відбирали надосадову рідину та ресуспендували осад у розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EDTA – 1 (pH 7,2; доводили KOH); далі – робочий розчин. Наступним етапом було власне проведення patch-clamp-реєстрації струмів. Детально методику виділення ядер кардіоміоцитів [31] і ядер нейронів Пуркінє мозочка [10] описано раніше.

Реєстрація іонних струмів крізь ядерну мембрану. Струми крізь канали реєстрували методом patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patch у режимі фіксації потенціалу. Значення показників отримували за допомогою підсилювача Visual-Patch 500 ("Bio-Logic", Франція). Patch-піпетки з опором від 9 до 14 МОм виготовляли з боросилікатного скла ("Sutter

Instruments", США). Індиферентний електрод Ag-AgCl був сполучений із робочою камерою 0,3 %-м агаровим містком, заповненим робочим розчином.

Статистична обробка. Статистично-математичне опрацювання результатів досліджень, а саме кореляційний і дисперсійний аналізи, виконано з використанням програми "OriginPro 9.1" ("OriginLab Corporation", США) за вбудованими алгоритмами.

Для проведення аналізу взято оригінальні реєстрації іонних струмів крізь ядерні мембрани і ретельні нотатки з лабораторного протоколу про проведення відповідних досліджень за період із вересня 2015 по лютий 2020 року. Серед них було 449 днів, у які виконували patch-clamp-реєстрації іонних струмів від ядерних мембран нейронів Пуркінє та кардіоміоцитів. Для аналізу враховано 205 днів роботи на кардіоміоцитах і 89 – на нейронах Пуркінє, оскільки до уваги брали лише дні, у які реєстрували струми крізь LCC-канали саме на цих об'єктах за вже розробленим протоколом. Не враховано дні постановки методики чи оптимізації умов ізолювання біоматеріалу, дні, у які завданням було реєструвати ліганд-чутливі канали, дні з реєстраціями від ядер інших об'єктів (ядра гепатоцитів, кишечника тощо), а також реєстрації, виконані студентами з досвідом менше одного року роботи із цим методом. Успішність реєстрацій виражали у відсотках: для цього визначали кількість спроб, у яких було встановлено гігаомний контакт і наявні струми крізь канал, від усіх спроб встановлення контакту та виявлення іонних струмів під час досліджень у конкретний день.

Досліджуваними факторами були тривалість світлового дня (від сходу до заходу сонця, хв) і деякі метеорологічні впливи. Дані метеорологічних умов у дні проведення електрофізіологічних дослідів узяті з архіву метеостанції № 33345 (аеропорт Жуляни), оскільки саме ця станція з архівом відкритого доступу є найближчою до місця проведення експериментів. До аналізу враховано температурні показники (°C), показники тиску (мм рт. ст.), хмарності (%) – середні по годинах проведення дослідів, а також кількість опадів (мм). Температуру враховували середньодобову для виявлення ймовірного впливу на дослідних шурів, а також середньоденну за годинами для виявлення впливу саме на етапі електрофізіологічних досліджень. Зіставивши перераховані вище сезонні показники із показниками якості patch-clamp-реєстрацій, ми провели аналіз на перевірку статистичної залежності.

Для дослідження тісноти взаємозв'язку між сезонними впливами та якістю проведених електрофізіологічних реєстрацій проведено попарний кореляційний аналіз сезонних показників із відсотком успішних реєстрацій за

день. Розрахунок коефіцієнта кореляції Пірсона (лінійний коефіцієнт кореляції) здійснювали за формулою

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sqrt{\sum (x_i - M_x)^2 \cdot \sum (y_i - M_y)^2}}$$

де x_i, y_i – змінні; M_x – середнє за X ; M_y – середнє за Y .

Коефіцієнт кореляції Пірсона – це показник лінійної залежності між двома змінними x_i, y_i , який набуває значень від -1 на позначення негативної кореляції, тобто відображення зменшення y за зростання x , до +1 на позначення позитивної кореляції, тобто зростання y за зростання x . Якщо коефіцієнт кореляції Пірсона дорівнює 0, то лінійної кореляції між змінними немає. Достовірність розрахованого коефіцієнта кореляції (P) на рисунках умовно позначено зірочками (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

Для врахування можливого впливу набуття дослідниками досвіду із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) ми порівнювали успішність реєстрацій однакового (літнього/зимового) сезону із дворічним проміжком. ANOVA – це статистичний метод аналізу результатів, які залежать від якісних ознак, у нашому випадку – від досвіду дослідника, що виконував реєстрацію струму крізь канал. Щоб зробити висновок про наявність статистично достовірних змін між обома вибірками, ми розраховували значення критерію Фішера F на основі середніх квадратичних відхилень усередині групи та між ними, а також відповідної кількості ступенів свободи. Зміну вважали достовірною, якщо розраховане значення критерію F було більшим, ніж його критичне значення (F крит.), тобто розрахована дисперсія між групами робила більш вагомий внесок у суму дисперсій, ніж така всередині однієї вибірки.

Побудову графіків і діаграм здійснено з використанням програми "Microsoft Excel 2010".

Результати та їх обговорення. Реєстрації іонних струмів крізь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє та кардіоміоцитів виконано методом patch-clamp. Раніше на основі таких реєстрацій нам вдалось встановити такі характеристики даних каналів: повільну кінетику, чітку потенціалозалежність, високу щільність і ймовірність перебування у відкритому стані, велику провідність (198 ± 27 і 209 ± 13 пСм у ядерних мембранах нейронів Пуркінє мозочка та кардіоміоцитів, відповідно) і спонтанну активність [10]. Типові фрагменти реєстрацій іонних струмів крізь LCC-канали ядерної мембрани клітин різного типу представлено на рис. 1.

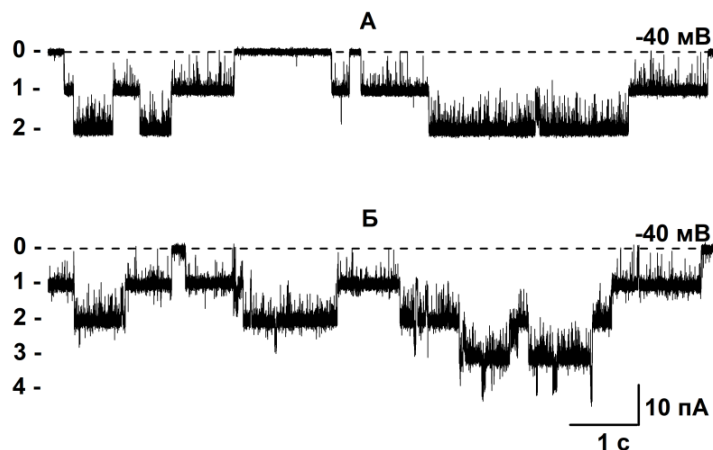


Рис. 1. Типова реєстрація струму крізь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка (а) та кардіоміоцитів (б) при потенціалі -40 мВ: 0 – нульовий рівень струму (усі канали закриті), 1–4 – відповідна кількість відкритих каналів

Досліджуючи канали ядерних мембран методом patch-clamp, ми виявили залежність якості реєстрацій іонних струмів від сезонності. Застосовувавши кореляційний аналіз, ми перевірили вплив тривалості світлового дня (від сходу до заходу сонця, хв), температури (середньоденної – за годинами виконання дослідів – і середньодобової, °C), тиску (мм рт. ст.), хмарності (%), опадів (мм).

За результатами кореляційного аналізу вищеперахованих факторів і якістю реєстрацій, здійснених від ядерної мембрани нейронів Пуркінє, було виявлено позитивну лінійну залежність між якістю реєстрацій

струмів, тривалістю світлового дня (коефіцієнт кореляції $r = 0,60$, $P = 4,98E-10$) і температурою ($r = 0,64$, $P = 1,09E-11$ для середньодобової та $r = 0,62$, $P = 7,05E-11$ для середньоденної), а також слабо виражену обернену кореляційну залежність від хмарності ($r = -0,34$, $P = 0,00123$). Атмосферний тиск ($r = -0,20$, $P = 0,06$) і кількість опадів ($r = -0,03$, $P = 0,79$), незалежно від їхньої інтенсивності, достовірно не впливали на досліджуваний показник (рис. 2 а, б).

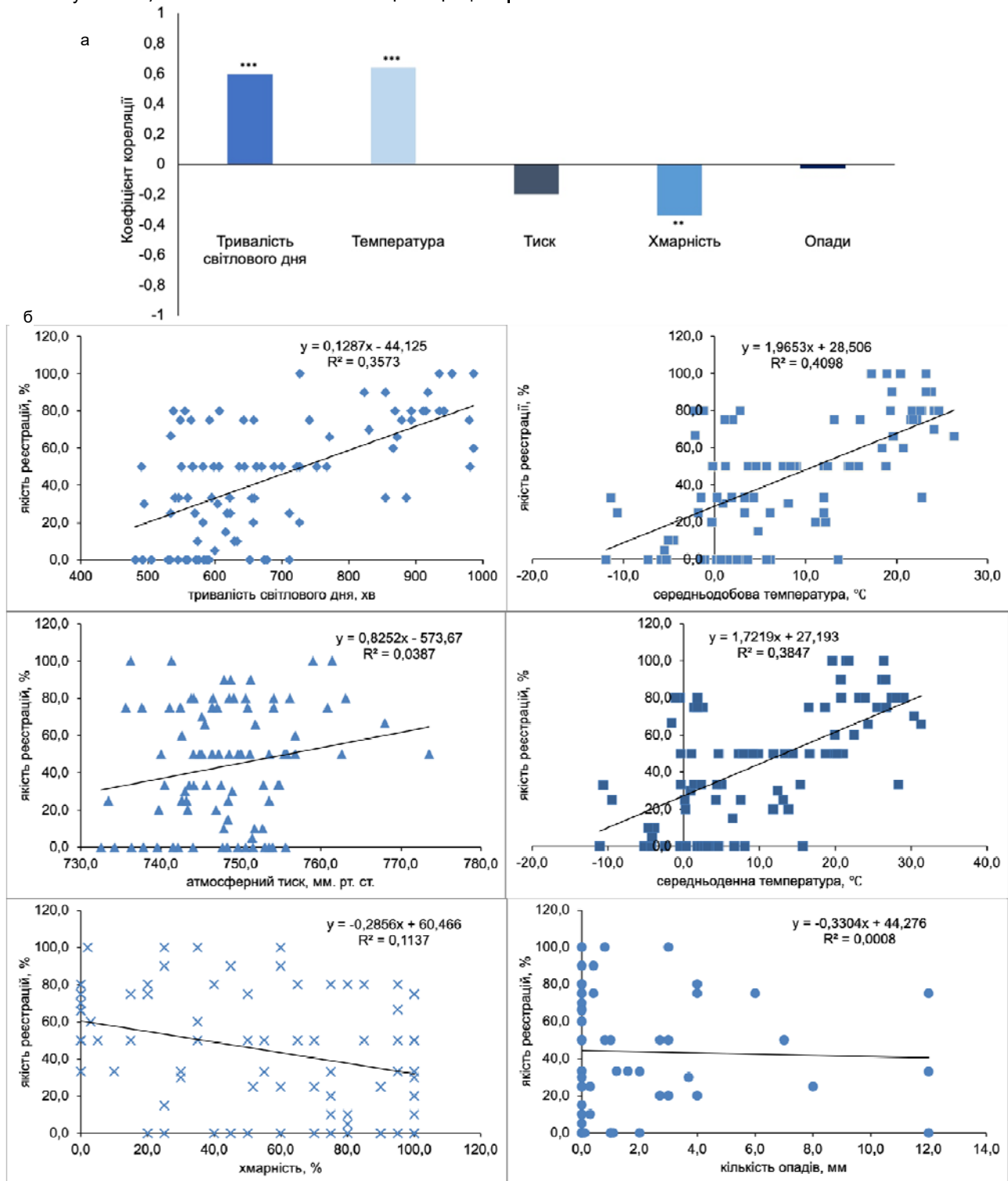


Рис. 2. Залежність якості patch-clamp-реєстрацій іонних струмів крізь ядерні мембрани нейронів Пуркінє мозочка від тривалості світлового дня і метеорологічних умов (а) (узагальнені дані за результатами кореляційного аналізу; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$) і графічне зображення сукупної вибірки залежності якості реєстрацій від кожного з показників (тривалість світлового дня, температура, атмосферний тиск, хмарність, кількість опадів) із зазначенням лінії тренда, рівняння, яке її описує, і середнього квадратичного відхилення (б)

Аналіз реєстрацій від ядерної мембрани кардіоміоцитів також виявив кореляцію із сезонними впливами, а саме тривалістю світлового дня (коефіцієнт кореляції $r = 0,55$, $P = 0$), температурою ($r = 0,56$, $P = 0$), хмарністю ($r = -0,26$, $P = 1,69E-4$); статистично значущої

кореляції з кількістю опадів не виявлено ($r = -0,07$, $P = 0,29345$), а для атмосферного тиску значення коефіцієнта кореляції було наближеним до достовірного ($r = -0,13$, $P = 0,055$) (рис. 3 а, б).

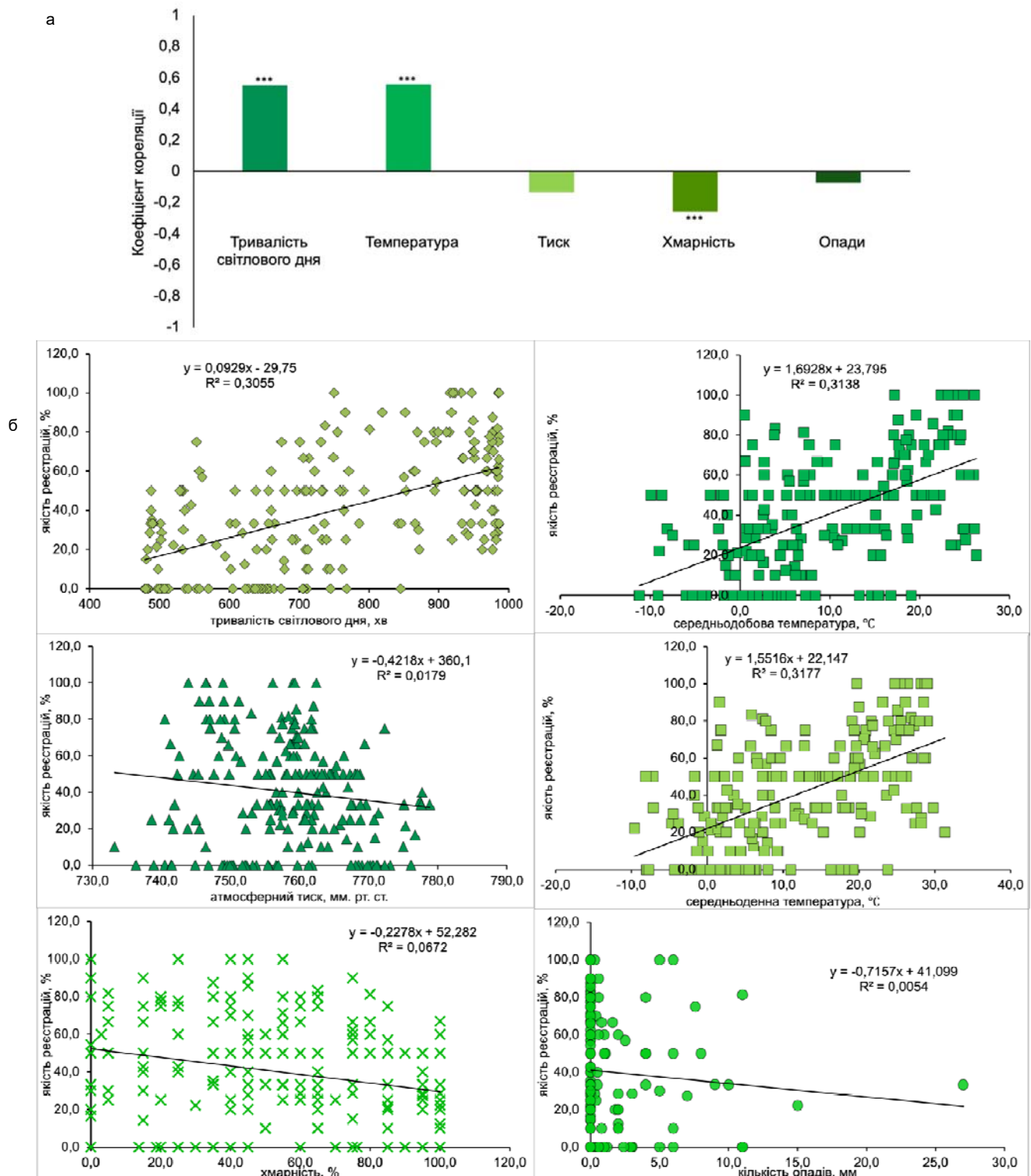


Рис. 3. Кореляційний аналіз залежності якості patch-clamp-реєстрацій іонних струмів крізь ядерні мембрани кардіоміоцитів від тривалості світлового дня і факторів середовища, $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ (а), і залежності якості реєстрацій від кожного з факторів (тривалість світлового дня, температура, атмосферний тиск, хмарність, кількість опадів) із зазначенням лінії тренда і рівняння, яке її описує (б)

Ми також проводили кореляційний аналіз на виявлення ступеня впливу різноманітних погодних явищ, таких як дощ, димка, туман, однак ступінь кореляції

кожного з них окремо із якістю реєстрацій був незначним – $r = -0,18$ – $+0,13$. Зважаючи на відносно невелику кількість днів, у які спостерігали туманні явища, для

аналізу ми об'єднали дані, отримані на обох об'єктах (ядрах кардіоміоцитів і нейронів Пуркінє мозочка), а сам фактор градували за інтенсивністю, присвоївши умовне значення інтенсивності фактору 1 у дні, у які спостерігали димку (або серпанок – легка туманна поволока), і значення 2, якщо виникав повноцінний туман. За таких умов спостерігали середню негативну кореляційну залежність ($r = -0,25$, $P = 1,64E-5$) між якістю отриманих реєстрацій та інтенсивністю туману.

Крім цього, із використанням дисперсійного аналізу ми порівнювали успішності реєстрацій між зимовим і літнім періодом 2016 та окремо такими самими періодами 2018 року. Можна стверджувати, що існує достовірна сезонна різниця успішності реєстрацій, при цьому розраховані значення F і $F_{кр.}$ для результатів, отриманих 2016 року становили 0,78 і 0,59, а для таких 2018 року – 0,71 і 0,69, відповідно.

Ураховуючи складність методу patch-clamp, особливо на субклітинних структурах, потрібно врахувати також вплив набуття досвіду експериментаторами. Для цього ми провели дисперсійний аналіз успішності експериментів за певний сезон і певним часовим проміжком і порівняли успішність реєстрацій за грудень 2015 – лютий 2016 року (зимові місяці) з таким самим періодом на межі 2017–2018 років, а також літні місяці: червень – серпень 2016 і відповідні у 2018 році. Встановлено, що patch-clamp-реєстрації, виконані влітку 2018 року, були достовірно більш успішними (середня успішність 69,53 %), ніж у 2016 (середня 50,35 %), оскільки $F > F_{кр.}$ ($F = 0,74$, $F_{кр.} = 0,68$). Це можна пояснити як набуттям дослідниками досвіду, так і метеорологічними умовами, оскільки температура влітку 2018 року була на 2,7 °C вищою, ніж у такий самий період 2016, а за нашими дослідженнями відсотковий вихід якісних реєстрацій зростає з підвищенням температури. Щодо аналізу успішності в зимові періоди, то у 2018 році (середня успішність 22,71 %) реєстрації виявилися достовірно менш успішними, ніж у 2016 (успішність 30,21 %), із $F = 0,74$, а $F_{кр.} = 0,69$. Таку зміну можна пояснити і неоднаковими умовами, оскільки середня температура (у дні досліджень) узимку 2016 року (+0,62 °C) була на 4 °C вищою, ніж у відповідний період 2018 року (-3,48 °C), що узгоджується із результатами аналізу впливу температури на якість реєстрацій.

Зіставивши дані про проведення експериментів із застосуванням методу patch-clamp і такими сезонними змінами, як тривалості довжини світлового дня метеорологічних умов, ми виявили, що якість утворення гігаомного контакту і реєстрацій крізь іонні канали справді має періодичність. Була виявлена значна пряма лінійна залежність якості реєстрацій від тривалості світлового дня і температури. Чим довша тривалість світлового дня і вища температура, тим краща якість patch-clamp-реєстрацій як від ядерних мембран кардіоміоцитів, так і від ядерних мембран нейронів Пуркінє.

Такий ефект можна пояснити фотоперіодизмом – здатністю рослин і тварин реагувати на зміни тривалості світлового дня в навколишньому середовищі. Тваринам це потрібно для раціонального розподілу енергетичних ресурсів протягом року, необхідних для репродукції та реалізації сезонних стратегій виживання [27, 30, 32]. У ссавців секреція мелатоніну епіфізом зворотно пропорційна до довжини світлового дня. Таким чином, секреція мелатоніну влітку менша, аніж узимку. Мелатонін чинить значний вплив на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову і гіпоталамо-гіпофізарно-гонаду ось, вісь мозок – кишечник, діяльність автономної нервової та імунної систем [28, 29, 33, 34]. Варто зазначити, що узимку обмінні процеси сповільнюються, змінюється

плинність мембрани та її ліпідний склад. Зокрема, адаптація тварин до холодних умов існування пов'язана зі збільшенням вмісту ненасичених жирних кислот [35], що, у свою чергу, збільшує плинність мембрани і може впливати на якість утворення гігаомного контакту. Імовірно, також відбуваються певні зміни в експресії рецепторів і каналів різного типу на поверхні мембран залежно від кількості секретованого мелатоніну і/або змін у будові біологічних мембран, що пов'язані із сезонними змінами температури.

Висновки. На основі кореляційного та дисперсійного аналізів підтверджено закономірність, що взимку значно складніше, ніж улітку, встановлювати гігаомний контакт між patch-піпеткою і ядерною мембраною та проводити реєстрацію струмів крізь іонні канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка/кардіоміоцитів. Установлено кореляцію між якістю реєстрацій струмів крізь іонні канали і тривалістю світлового дня (коефіцієнт кореляції $r = 0,6$, $P = 4,98E-10$ для реєстрацій на ядрах нейронів Пуркінє та $r = 0,55$, $P = 0$ для реєстрацій на ядрах кардіоміоцитів), а також температурою ($r = 0,6$, $P = 7,05E-11$ та $r = 0,56$, $P = 0$). Менш значного впливу завдають зміни хмарності: для нейронів Пуркінє $r = -0,34$, $P = 0,00123$ та для кардіоміоцитів $r = -0,26$, $P = 1,69E-4$ відповідно.

Отже, виконувати такі електрофізіологічні дослідження за теплої пори року і тривалішого світлового дня є ефективнішим із погляду як кількості можливих реєстрацій, так і їхньої якості. Це має важливе значення для оптимізації досліджень, що проводяться із застосуванням електрофізіологічних методів, зокрема методом patch-clamp, на внутрішньоклітинних біологічних мембранах. Володіючи інформацією про статистично достовірне погіршення якості та кількості реєстрацій зі скороченням світлового дня, що, імовірно, пов'язано зі зменшенням рівня секреції мелатоніну, а також зниженням температури і змінами у складі біологічних мембран, робочі групи електрофізіологічних лабораторій зможуть скласти план дослідження із максимально можливим коефіцієнтом корисної дії та мінімальними витратами необхідних для досліджень матеріалів.

Список використаних джерел

1. Mauger J. P. Role of the nuclear envelope in calcium signalling / J. P. Mauger // *Biol. Cell.* – 2012. – Vol. 104, № 2. – P. 70–83.
2. Zuleger N. Inner nuclear membrane protein transport is mediated by multiple mechanisms / N. Zuleger, N. Korfali, E. C. Schirmer // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36, № 6. – P. 1373–1377.
3. Mazzanti M. Electrical dimension of the nuclear envelope / M. Mazzanti, J. O. Bustamante, H. Oberleithner // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81, № 1. – P. 1–19.
4. Grossman E. Functional Architecture of the Nuclear Pore Complex / E. Grossman, O. Medalia, M. Zwergler // *Annu. Rev. Biophys. Annual Reviews.* – 2012. – Vol. 41, № 1. – P. 557–584.
5. Kabachinski G. The nuclear pore complex – Structure and function at a glance / G. Kabachinski, T. U. Schwartz // *J. Cell Sci.* – 2015. – Vol. 128, № 3. – P. 423–429.
6. Beck M. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight / M. Beck, E. Hurt // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group. – 2017. – Vol. 18, № 2. – P. 73–89.
7. Ion channels in the nuclear envelope / M. Mazzanti et al. // *Nature.* – 1990. – Vol. 343, № 6260. – P. 764–767.
8. Matzke A. J. M. Ion channels at the nucleus: Electrophysiology meets the genome / A. J. M. Matzke, T. M. Weiger, M. Matzke // *Mol. Plant. The Authors.* All rights reserved. – 2010. – Vol. 3, № 4. – P. 642–652.
9. Marchenko S. Nuclear Ca^{2+} signalling in cerebellar Purkinje neurons / S. Marchenko, R. Thomas // *Cerebellum.* – 2006. – Vol. 5, № 1. – P. 36–42.
10. Spontaneously active and $InsP_3$ -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones / S. M. Marchenko et al. // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 565, № 3. – P. 897–910.
11. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes / A. B. Kotliarova et al. // *The Animal Biology.* – 2016. – Vol. 18, № 4. – P. 157.
12. Fedorenko O. A. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons / O. A. Fedorenko, S. M. Marchenko // *Hippocampus.* – 2014. – Vol. 24, № 7. – P. 869–876.

13. Subramanian K. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores / K. Subramanian, T. Meyer // *Cell. Cell Press.* – 1997. – Vol. 89, № 6. – P. 963–971.
14. Gerasimenko O. New aspects of nuclear calcium signalling / O. Gerasimenko, J. Gerasimenko // *Journal of Cell Science.* – 2004. – Vol. 117, № 15. – P. 3087–3094.
15. Islam M. S. Calcium Signaling: From Basic to Bedside / M. S. Islam // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC. – 2020. – Vol. 1131. – P. 1–6.
16. Martin N. Calcium signaling and cellular senescence / N. Martin, D. Bernard // *Cell Calcium.* Elsevier Ltd. – 2018. – Vol. 70. – P. 16–23.
17. Zheng J. Calcium ion as cellular messenger / J. Zheng, X. H. Zeng, S. Q. Wang // *Sci. China Life Sci.* – 2015. – Vol. 58, № 1. – P. 1–5.
18. Carafoli E. Why calcium? How calcium became the best communicator / E. Carafoli, J. Krebs // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291, № 40. – P. 20849–20857.
19. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum / P. Marius et al. // *Cell Calcium.* – 2006. – Vol. 39, № 1. – P. 65–73.
20. Kotliarova A. B. IP3-sensitive Ca(2+)-channels of endoplasmic reticulum in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland / A. B. Kotliarova, V. V. Man'ko // *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal.* – 2013. – Vol. 85, № 5. – P. 27–36.
21. Intracellular calcium release channels: an update / G. Santulli et al. // *J. Physiol.* – 2017. – Vol. 595, № 10. – P. 3041–3051.
22. Berridge M. J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease / M. J. Berridge // *Physiol. Rev.* – 2016. – Vol. 96, № 4. – P. 1261–1296.
23. Voolstra O. Ca2+ Signaling in Drosophila Photoreceptor Cells / O. Voolstra, A. Huber // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2020. – Vol. 1131. – P. 1–1110.
24. An update on nuclear calcium signalling / M. D. Bootman et al. // *J. Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122, № 14. – P. 2337–2350.
25. Conforti L. Patch-clamp techniques / L. Conforti // *Cell Physiology Source Book.* Fourth Ed. Elsevier Inc. – 2012. – P. 369–381.
26. Single-Channel Ion Currents in the Nuclear Envelope of Rat Cardiomyocytes / O. A. Kotyk et al. // *Fiziol. Zh.* – 2016. – Vol. 62, № 6. – P. 3–8.
27. Hazlerigg D. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates / D. Hazlerigg // *Progress in Brain Research.* – 1st ed. B. V. Elsevier – 2012. – Vol. 199. – P. 413–422.
28. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin / B. Malpaux et al. // *J. Biol. Rhythms.* – 2001. – Vol. 16, № 4. – P. 336–347.
29. Goldman B. D. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement / B. D. Goldman // *Journal of Biological Rhythms.* – 2001. – Vol. 16, № 4. – P. 283–301.
30. Walton J. C. Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function / J. C. Walton, Z. M. Weil, R. J. Nelson // *Frontiers in Neuroendocrinology.* NIH Public Access. – 2011. – Vol. 32, № 3. – P. 303–319.
31. Котик О. А. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура / О. А. Котик, А. Б. Котлярова, С. М. Марченко. – 2018.
32. Tahara Y. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise / Y. Tahara, S. Aoyama, S. Shibata // *Journal of Physiological Sciences.* Springer Tokyo. – 2017. – Vol. 67, № 1.
33. Claustat B. Melatonin: Physiological effects in humans / B. Claustat, J. Leston // *Neurochirurgie.* Elsevier Masson SAS. – 2015. – Vol. 61, № 2–3. – P. 77–84.
34. From implantation to birth: Insight into molecular melatonin functions / G. Carlomagno et al. // *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG. – 2018. – Vol. 19, № 9.
35. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure / J. A. Logue et al. // *J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 203, № 14. – P. 2105–2115.
8. Matzke, A.J.M., Weiger, T.M., Matzke, M. Ion channels at the nucleus: Electrophysiology meets the genome. *Mol. Plant* 2010, 3(4), 642–652, doi:10.1093/mp/ssq013.
9. Marchenko, S., Thomas, R. Nuclear Ca2+ signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Cerebellum* 2006, 5(1), 36–42, doi:10.1080/14734220600554438.
10. Marchenko, S.M., Yarotsky, V. V., Kovalenko, T.N., Kostyuk, P.G., Thomas, R.C. Spontaneously active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J. Physiol.* 2005, 565(3), 897–910, doi:10.1113/jphysiol.2004.081299.
11. Kotliarova, A.B., Kotyk, O.A., Polishchuk, A.O., Pavlova, N.I., Marchenko, S.M. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. *The Animal Biology* 2016, 18(4), 157.
12. Fedorenko, O.A., Marchenko, S.M. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus* 2014, 24(7), 869–876, doi:10.1002/hipo.22276.
13. Subramanian, K., Meyer, T. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 1997, 89(6), 963–971, doi:10.1016/S0092-8674(00)80281-0.
14. Gerasimenko, O., Gerasimenko, J. New aspects of nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* 2004, 117, 3087–3094.
15. Islam, M.S. Calcium Signaling: From Basic to Bedside. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC, 2020; Vol. 1131, pp. 1–6.
16. Martin, N., Bernard, D. Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium* 2018, 70 16–23, doi:10.1016/j.ceca.2017.04.001.
17. Zheng, J., Zeng, X.H., Wang, S.Q. Calcium ion as cellular messenger. *Sci. China Life Sci.* 2015, 58(1), 1–5, doi:10.1007/s11427-014-4795-y.
18. Carafoli, E., Krebs, J. Why calcium? How calcium became the best communicator. *J. Biol. Chem.* 2016, 291(40), 20849–20857, doi:10.1074/jbc.R116.735894.
19. Marius, P., Guerra, M.T., Nathanson, M.H., Ehrlich, B.E., Leite, M.F. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 2006, 39(1), 65–73, doi:10.1016/j.ceca.2005.09.010.
20. Kotliarova, A. B., Man'ko, V. V. IP3-sensitive Ca(2+)-channels of endoplasmic reticulum in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal* 2013, 85(5), 27–36. <https://doi.org/10.15407/ubj85.05.027>.
21. Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., Marks, A.R. Intracellular calcium release channels: an update. *J. Physiol.* 2017, 595(10), 3041–3051, doi:10.1113/JP272781.
22. Berridge, M.J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* 2016, 96(4), 1261–1296, doi:10.1152/physrev.00006.2016.
23. Voolstra, O., Huber, A. Ca2+ Signaling in Drosophila Photoreceptor Cells; 2020; Vol. 1131; ISBN 9783030124564.
24. Bootman, M.D., Fearnley, C., Smyrniak, I., MacDonald, F., Roderick, H.L. An update on nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* 2009, 122(14), 2337–2350, doi:10.1242/jcs.028100.
25. Conforti, L. Patch-clamp techniques; Fourth Ed.; Elsevier Inc., 2012; ISBN 9780123877383.
26. Kotyk, O.A., Kotliarova, A.B., Polishchuk, A.O., Marchenko, S.M. Single-Channel Ion Currents in the Nuclear Envelope of Rat Cardiomyocytes. *Fiziol. Zh.* 2016, 62(6), 3–8, doi:10.1615/intjphysiopathophys.v8.i4.70.
27. Hazlerigg, D. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates; 1st ed.; Elsevier B.V., 2012; Vol. 199; ISBN 9780444594273.
28. Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H., Chemineau, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J. Biol. Rhythms* 2001, 16(4), 336–347, doi:10.1177/074873001129002051.
29. Goldman, B.D. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J. Biol. Rhythms* 2001, 16, 283–301.
30. Walton, J.C., Weil, Z.M., Nelson, R.J. Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function. *Front. Neuroendocrinol.* 2011, 32, 303–319.
31. Котик, О.А., Котлярова, А.Б., Марченко, С.М. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. 2018.
32. Tahara, Y., Aoyama, S., Shibata, S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *J. Physiol. Sci.* 2017, 67.
33. Claustat, B., Leston, J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 2015, 61(2–3), 77–84, doi:10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
34. Carlomagno, G., Minini, M., Tilotta, M., Unfer, V. From implantation to birth: Insight into molecular melatonin functions. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19.
35. Logue, J.A., De Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J. Exp. Biol.* 2000, 203(14), 2105–2115.

Reference

1. Mauger, J.P. Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biol. Cell* 2012, 104(2), 70–83, doi:10.1111/boc.201100103.
2. Zuleger, N., Korfali, N., Schirmer, E.C. Inner nuclear membrane protein transport is mediated by multiple mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 2008, 36(6), 1373–1377, doi:10.1042/BST0361373.
3. Mazzanti, M., Bustamante, J.O., Oberleithner, H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol. Rev.* 2001, 81(1), 1–19, doi:10.1152/physrev.2001.81.1.1.
4. Grossman, E., Medalia, O., Zwerger, M. Functional Architecture of the Nuclear Pore Complex. *Annu. Rev. Biophys.* 2012, 41(1), 557–584, doi:10.1146/annurev-biophys-050511-102328.
5. Kabachinski, G., Schwartz, T.U. The nuclear pore complex – Structure and function at a glance. *J. Cell Sci.* 2015, 128(3), 423–429, doi:10.1242/jcs.083246.
6. Beck, M., Hurt, E. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017, 18(2), 73–89, doi:10.1038/nrm.2016.147.
7. Mazzanti, M., DeFelice, L.J., Cohen, J., Malter, H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature* 1990, 343(6260), 764–767, doi:10.1038/343764a0.

Надійшла до редколегії 1.10.2020
Отримано виправлений варіант 2.11.2020
Підписано до друку 2.11.2020

Received in the editorial 1.10.2020
Received a revised version on 2.11.2020
Signed in the press on 2.11.2020

^{1,2}О. Тарнопольская, студ.,¹А. Котлярова, канд. биол. наук¹Институт физиологии имени О. О. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина,²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

РЕГИСТРАЦИЯ ИОННЫХ ТОКОВ СКВОЗЬ ЛСС-КАНАЛЫ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ: ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

На протяжении семи лет исследований транспортных систем ядерных мембран с применением метода patch-clamp наблюдалась определенная закономерность: зимой эффективность работы этим методом значительно снижалась. Поскольку разные сезоны/времена года характеризуются различными световыми и температурными показателями, мы решили обратить внимание на возможное воздействие последних на успешность выполнения исследований. Целью этой работы стала проверка влияния таких сезонных факторов, как изменение продолжительности светового дня, температура, атмосферное давление, количество осадков и облачность на качество patch-clamp-регистраций ионных токов через ЛСС-каналы ядерной мембраны кардиомиоцитов и нейронов Пуркинье мозжечка. Было выдвинуто предположение, что с уменьшением продолжительности светового дня и понижением температуры уменьшаются качественные и количественные показатели patch-clamp-регистраций. Для проверки этого предположения был применен корреляционный анализ Пирсона с исходными данными о продолжительности светового дня, метеорологических условиях и рассчитанной успеваемостью регистраций (%) за конкретный день. На основе результатов такого анализа было установлено, что существует прямая выраженная линейная зависимость качества и количества регистраций от продолжительности светового дня ($r = 0,6$) и температуры ($r = 0,6$), а также слабая обратная зависимость от облачности ($r = 0,3$). На основе дисперсионного анализа (ANOVA) подтверждено достоверно большую успешность регистраций, выполненных в летний период, по сравнению с зимними того же года. Полученные результаты могут стать основой для оптимизации исследовательской деятельности рабочих групп, изучающих функционирование внутриклеточных транспортных систем электрофизиологическими методами, в частности patch-clamp.

Ключевые слова: биоритмы, хронобиология, метеорологические условия, patch-clamp, ядерная мембрана, ионные каналы, ЛСС-каналы.

^{1,2} O. Tarnopolska, stud.,¹ A. Kotliarova, PhD¹ Bogomolets Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine,² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ION CURRENTS REGISTRATION THROUGH LCC-CHANNELS OF THE NUCLEAR MEMBRANES: CHRONOBIOLOGICAL ASPECT

For seven years of researching the transport systems of nuclear membranes using the patch-clamp method, we observed a certain pattern: in winter, this method's efficiency significantly decreased. Since different seasons are characterized by different light and temperature indicators, we decided to pay attention to the latter's possible impact on the success of the research. Therefore, the purpose of this work was to test the influence of seasonal factors such as changes in daylight hours, temperature, atmospheric pressure, precipitation, and cloudiness on the quality of patch-clamp recordings of ion currents through the LCC channels of the nuclear membrane of cardiomyocytes and cerebellar Purkinje neurons. We assumed that with decreasing daylength and decreasing temperature, the patch-clamp registrations' qualitative and quantitative indicators also decrease. We applied Pearson's correlation analysis with initial data on daylight hours, meteorological conditions, and calculated progress of registrations (%) for a specific day to test this assumption. Based on the results of this analysis, we found out that there is a direct pronounced linear dependence of the quality and number of registrations on the length of daylight hours ($r = 0.6$) and temperature ($r = 0.6$), as well as a weak inverse dependence on cloudiness ($r = 0.3$). Analysis of variance (ANOVA) also confirmed a significantly greater success of registrations performed in the summer compared to the winter of the same year. The obtained results can become the basis for optimizing the research activities of working groups studying intracellular transport systems' functioning by electrophysiological methods, in particular, patch-clamp.

Keywords: biorhythms, chronobiology, meteorological conditions, patch-clamp, nuclear membrane, ion channels, LCC channels.

UDK 57.084.1:615.357:616-091.83:591.881

DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.17-23

O. Kalmukova, PhD,

M. Dzerzhynsky, Dr. Sci.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF RATS PINEAL GLAND AND SUPRACHIASMATIC NUCLEUS OF HYPOTHALAMUS AFTER DIFFERENT REGIMES OF EXOGENOUS MELATONIN ADMINISTRATION

In modern society increase of digitalization associated with grown exceed level of light at night – a new type of pollution. Presence of light at night inhibited endogenous melatonin synthesis by pineal gland, that influence on circadian system work cycles, so organism often broken regime of wake/sleep, meals, physical activity. Also, a lack of melatonin in some certain time of day and low melatonin concentration both, were shown take some intervention in diseases development through incorrect regulation of clock-dependent genes expression. In connect with this, some latest clinical protocol in therapy or clinical trials of many different pathologies (for example, insomnia, metabolic syndrome, cardiovascular diseases, central nervous and immune system trouble, cancer, viral infection, etc.) include exogenous melatonin usage. As melatonin perform his function via endocrine and paracrine ways in variety types of cell, his application take place in wide range of doses and in different time of day (chronotherapeutic approach). Therefore, important to control state of circadian system central elements – pineal gland (main producer of endogenous melatonin) and suprachiasmatic nucleus (SCN) of hypothalamus (central pacemaker of circadian rhythm) in conditions of exogenous melatonin treatment. Thus, the main goal of our research were analysis of rats pineal gland and hypothalamic SCN morpho-functional state after different time (morning, evening and continuously with drinking water) melatonin daily administration. Melatonin was administered by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg 1 h before lights-off (M ZT11, evening), or 1 h after lights-on (M ZT01, morning), or continuously with drinking water during day-night period (MW). After melatonin use only in MW group pineal gland demonstrates changes in morphology (pinealocytes nucleus had mild basophilic color) and morphometric (increased cross-sectional area of the pinealocytes nucleus in compare with control group) analysis data. Besides, some similar changes were observed in SCN: the cross-sectional area of the SCN neurons nucleus grown in case of usage each of regime melatonin administration, while morphology characteristic remains without any alteration. In general, it suggesting about having by melatonin non-inhibiting features in context of circadian system feedback loop and supposing wide potential for melatonin use with absent huge side effect on central elements of above mentioned system.

Keywords: melatonin, feedback loop, chronobiology, pinealocytes, neuron, histology, circadian system, side effect.

Introduction. Melatonin – the main signal molecule of circadian system, pineal gland hormone, that has pleiotropic effect on organism insofar as may influence at most

different cells in tissue [1]. This action mediated by both: 1) presentation in many cells melatonin's receptors (through membrane receptors 1 MT₁ and 2 types MT₂ [2],

© Kalmukova O., Dzerzhynsky M., 2020

cytosolic receptors 3 MT₃[3]); and 2) orchestration of circadian molecular clock machinery work in each individual cell (through activation ROR α 1 (retinoid-related orphan receptors), ROR α 2 and RZR α [4]). Also melatonin and its derivatives may act directly as antioxidant by bounding active form of oxygen radicals [5]. In addition, perform a huge role in sensing and transform signal to organism about seasonal changing during year; thereby regulating seasonal reproduction, migration, metabolic rebuilding etc. [6].

Nowadays had been approved clinical application of melatonin for cure the delayed sleep phase disorder (including in totally blind or sighted patients), jet-lag in case of circadian system dysfunction (wake-sleep regimes) [7]. Intriguing, melatonin enter in some critical care COVID-19 management protocol as one of necessary component in "cocktail" for prophylaxis and mitigation mildly symptomatic patient [8] (at home and in hospital too, for example, in Eastern Virginia Medical School).

Due to one of the environment features of modern society, characterized by urbanization and infrastructure development; there is the appearance of excessive light at night – the latest type of pollution; most of human had decreased endogenous melatonin level [9]. Also violation of the time regime of meals, wake/sleep, physical activity, circadian rhythms of the body leads to the destruction of melatonin synthesis time-pattern $\rightarrow$ cyclic expression of temporal genes and, accordingly, genes that are regulated by them – receptors, enzymes, transcription factors, hormones, cytokines [10]. In this connection these factors contribute to the etiology of development many different pathologies. Therefore now, melatonin action study in clinical trials and in experimental models for treat obesity and obesity-related disorders [11], mood deviation (depression, suicide, autism etc.) [12], diabetes [13], cancers [14], cardio-vascular diseases [15], central nervous system pathologies (bipolar disorders, Parkinson disease, Huntington disease, and Alzheimer's disease) [16], pathologies with inflammation process [17].

World FDA organization (Food & Drug Administration) categorized melatonin as dietary supplements, not drugs, since melatonin can be found in many food products (especially plants – phytemelatonin), though melatonin usage FDA does not regulate [18, 19]. Many researches supported that melatonin had not any side effects in case of usage wide range of dose (0,1 mg/kg – 100 mg/kg) [20, 21]. Moreover, in case of melatonin use, it's necessary to take account of melatonin intervention time, because there are different sensitivity (density, affinity) of melatonin receptors during the day – chronobiological approach an integral part in melatonin therapy [22].

The circadian system for the most part consists of hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) and pineal gland [23]. Pineal gland is the main source of melatonin synthesis, also enterochromaffin cells of intestine contribute to basal melatonin level [24]. The SCN coordinate inputs of environment into outputs to organism – central pacemaker [25].

So, the main aim of research were analysis of rats pineal gland and hypothalamic SCN morpho-functional state after different time (morning, evening and continuously with drinking water) melatonin daily administration in dose 30 mg/kg during 7 weeks.

Materials and methods. White nonlinear male rats weighing 100 ± 10 g were used in this study. The light cycle was 12-h light and 12-h darkness, with lights-on at 07:00 h (Zeitgeber time, ZT: ZT00) and lights-off at 19:00 h (ZT12). All experiments on animals were carried out in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (Euro-

pean Convention, Strasburg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (№ 3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

All animals received standard rodent chow ($15,27 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$). Food and water were available *ad libitum*. Animals kept under standard vivarium conditions with constant temperature and humidity. Rats were divided into four groups:

1. Control group without any inductions of melatonin.
2. Group M ZT01 received melatonin in the morning 1 hour after light-on.
3. Group M ZT11 obtained melatonin administrations 1 h before light-off.
4. Group MW (Melatonin Water) consumed melatonin solutions continuously with drinking water during all period of experiment.

Thus, the experimental groups are indicated below as: control, M ZT01, M ZT11 and MW.

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was administered daily by single peroral by gavage introductions 2 mL as a solution (group M ZT01 and M ZT11) or constantly with drinking water (the dose required was dissolved in 25–30 mL according to the calculated daily average volume of drinking water consumption per animal [26]) for 7 week (30 mg/kg).

For the treatment of many experimental diseases models [27] and also in case of clinical trials [28], the use of different doses, methods and times of melatonin administration is shown. For the melatonin adverse effects testing was chosen the lowest dose of melatonin at the use of which observed both a simultaneous decrease obese rat's weight gain and the appearance of beige adipocytes, as we are interested in obesity therapy through beige adipocyte activation.

On the last day of the experiment, the animals were sacrificed by carbon dioxide asphyxiation and decapitated, and then the pineal gland and hypothalamus was isolated.

Histological examination was performed to characterize the morphology and functional status of pineal gland and suprachiasmatic nucleus of hypothalamus (SCN). Pineal gland were fixed entirely, while whole brain had been collected and previously sectioned in lateral sites three third ventricles (for rapid fixation process) to obtain fragments in the size of 10×10 mm. Tissues were fixed in 4 % of paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 72 hours, after which they were dehydrated and embedded into paraffin according to a standard procedure. From the paraffin blocks, 5 μm sections were performed and stained with Bemer's hematoxylin and eosin (H&E). Five- μm -thick slices were prepared from such blocks; these slices included the SCN, borders of which were identified according to the stereotaxic atlas [29]. Further examination of sections was performed using a light microscope BX41 (Olympus, Japan). Microphotographs were taken using the DP20 (Olympus, Japan) digital camera and the QuickPHOTO MICRO software (Promicra, Czech Republic).

The cross-sectional area of the pinealocytes nucleus were used as criteria for assessing the morphology and functional status of the pineal gland; and the cross-sectional area of the SCN neurons nucleus was used to evaluate the state of the hypothalamus SCN. All parameters were measured using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Statistical data analysis was performed using the Statistica 6.0 (StatSoft, USA) and Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA). The obtained data was presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). The distribution of values was estimated using Shapiro-Wilk normality W-test. Since the deviation of these values distribution of

from the normality was minor, to evaluate the differences between the values was used by one way ANOVA (analysis of variance) and tested by Dunnet's multiple range test with control as post hoc test. The differences with probability of the null hypothesis $p < 0.05$ were considered significant.

Results and discussion. In order to create a complete picture of the exogenous melatonin action at a dose of 30 mg/kg in different regimes of daily administration to important targets onto circadian rhythms regulation systems of body, the morpho-functional state of the pineal gland was studied.

The pineal gland consists of 2 types of cells: pinealocytes (synthesizing melatonin) and neuroglial supporting cells (**Fig. 1**). Pinealocytes differ from neuroglial cells by larger size (**Fig. 1, red arrow**), the presence of long cytoplasmic processes reaching the capillaries (**Fig. 1, green arrow**). Neuroglial cells have a small dark-colored nucleus (**Fig. 1, triangle**), unlike pinealocytes. Pinealocytes are modified neurons that have rounded or ovoid nuclei with a pale cytoplasm that contain granules filled with melatonin. With the melatonin introduction under the conditions of all 3 regimes (M ZT01, M ZT11 and MW) the shape of the nucleus did not change, there was a constant presence of the nucleolus and moderate basophilia (**Fig. 2**). Cytoplasm conserved brightacidophilic color in M ZT01, M ZT11 and MWgroup that similar to control group. Extracellular accumulations of calci-

fied sediment (brain sand) in the form of conglomerates were not detected in all experimental groups. In some cases, were observed difference in pinealocytes nucleus color between control and MW group: lighter basophilic nucleuses were commonly found in MW group, while in control there had frequently medium shade of color. Both population light and dark pinealocytes had classic morphology and did not demonstrate marked deviation [30].

Morphometric analysis of the cross-sectional area of pinealocytes nucleus showed no effect after melatonin administration in groups M ZT01 and M ZT11, but in group MW this parameter increase by 13,5 % in compare with control group, which indicates about mild stimulating effect of consume melatonin continuously with drinking water (**Fig. 3**).

Pinealocytes have autocrine mechanisms activation by melatonin, as was shown presence MT_1 and MT_2 in their own membrane [31]. Weak blocking of morpho-functional activity by exogenous melatonin is connecting with specific regulation of melatonin synthesis, which mediated thought removal of the light blocking action at night [32].

Also, there are no unique data about endogenous melatonin blood concentration after use exogenous melatonin during short or long administration. Ambiguous data presented about melatonin maximal plasma/serum concentration after pharmacokinetics analysis due to different melatonin dose/administration route [33].

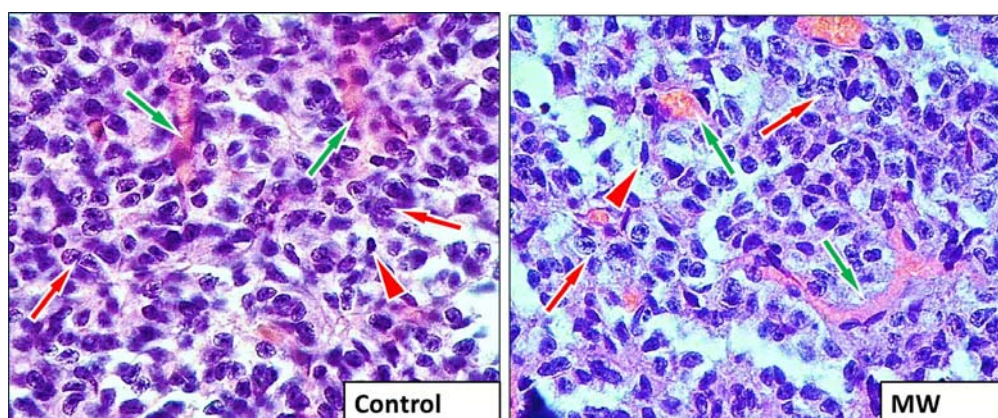


Fig. 1. Microphotographs of rats' pineal gland sections: H&E staining; $\times 900$ magnifications.
Notes: red arrow – pinealocytes nucleus, triangle – nucleus of neuroglial cells, green arrow – blood vessel

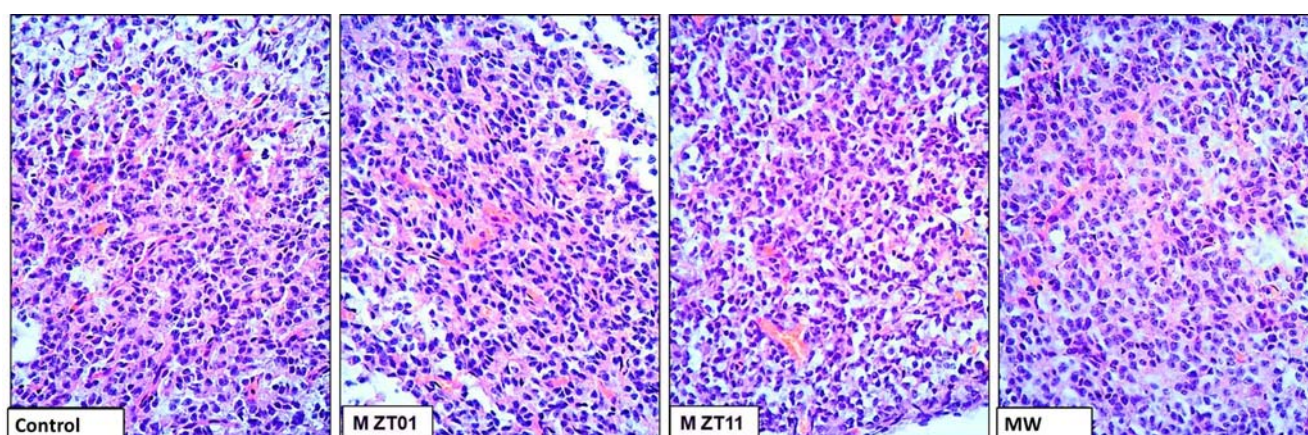


Fig. 2. Microphotographs of rats' pineal gland sections: H&E staining; $\times 400$ magnifications

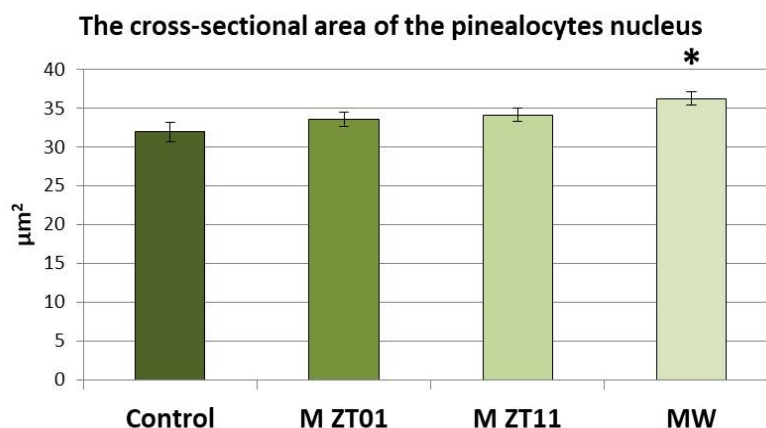


Fig. 3. The morphometric analysis data of the rats' pineal gland.

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

The morpho-functional state of SCN neurons of the hypothalamus under the conditions of exogenous melatonin administration was also analyzed (Fig. 4). The study of the SCN neurons morphology of the hypothalamus shown that in all groups M ZT01, M ZT11 and MW, the shape of the nuclei remained unchanged – rounded with clear boundaries, the present nucleolus and moderate slightly light basophilia. The perikaryonscytoplasm of neurons in these groups showed weakly acidophilic properties in comparison with the surrounding nerve fibers and glial cells as in control group.

Morphometric calculation of the cross-sectional area of the SCN neurons nucleus (Fig. 5) revealed an increase in this parameter after the use of melatonin in M ZT01 by 57 %, in M ZT11 by 21,5 % and in MW by 18,5 % in compare with control group. Also was shown difference between effects after different mode of administration: in compare with MW group the cross-sectional area of the SCN neurons nucleus rise in M ZT01 group by 33 %, while in M ZT11 this parameter did not differ. Taking into account the data of morphological observations and morphometric analysis shows the activating effect of melatonin on the SCN neurons of the hypothalamus.

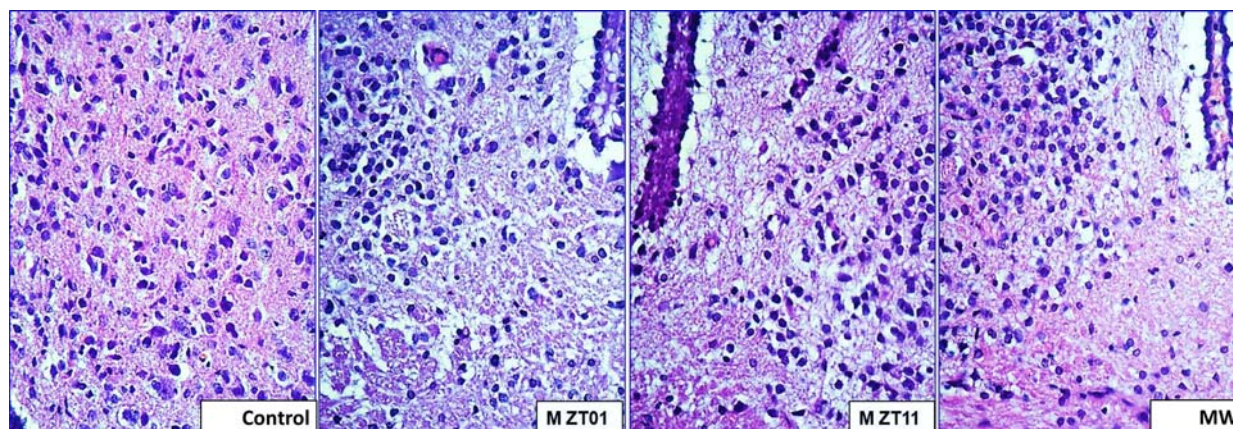


Fig. 4. Microphotographs of rats' hypothalamus SCN sections: H&E staining; $\times 400$ magnifications

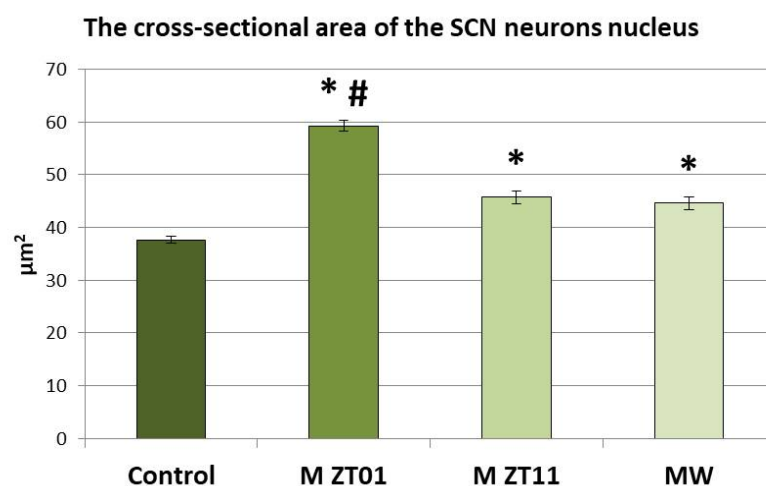


Fig. 5. The morphometric analysis data of the rats' SCN neurons of hypothalamus.

Notes: * – a significant difference between the control and experimental groups, $p \leq 0.05$;
– a significant difference between the MW group and M ZT01, M ZT11, $p \leq 0.05$

Obtained data are according with SCN-melatonin feedback loop mechanism, as SCN has high concentration of melatonin receptors for entrained and phase-shifting setting own pacemaker working rhythm [34, 35]. Thus, melatonin administrations in dose 30 mg/kg can activate nuclear synthesis, that manifested in grow cross-sectional area of the SCN neurons nucleus. Moreover, in group M ZT11 and MW changes of these parameters did not differ, insofar as rats are nocturnal animals, which consume water mostly at night – MW group – and time of exogenous melatonin peak is approximately similar like in M ZT11 group. While in M ZT01 group striking increase of cross-sectional area of the SCN neurons nucleus can be explained by the time of animal's slaughter: they were held in the first half of the day – shortly after the melatonin introduction. Morphology variation during the day of the SCN neuron happen not only with nucleus, also was shown changes in total protrusion and simple dendritic spine density [36]. In the other hand, rise can be provoked by continuation of the night melatonin peak through morning administration [37]. In some cases, out of time chronotherapy can lead to desynchrony and circadian disruption [38], but in human occur a few chronotypes: early and late, taking into account is necessary during treatment [39, 40]. In according of this, morning administration takes place to be in patient with early chronotype.

Conclusions. Daily administration of exogenous melatonin (30 mg/kg, 7 weeks) in different time of day did not inhibit the activity of such links of the circadian system as pineal gland and suprachiasmatic nucleus of hypothalamus. Furthermore, application melatonin solutions continuously with drinking water during all period of experiment (group MW) lead to mild activation of morpho-functional state of pineal gland (pinealocytes nucleus had lighter basophilic color and cross-sectional area of nucleus increase) and of suprachiasmatic nucleus of hypothalamus (cross-sectional area of SNC neurons nucleus also grown). In addition, morning (1 hour after light-on, group M ZT01) and evening (1 hour before light-off, group M ZT11) regimes of melatonin administrations conduct in enhance the cross-sectional area of SNC neurons nucleus too, but not of pinealocytes nucleus. Thereby, different modes of exogenous melatonin applications rats in dose 30 mg/kg during 7 weeks did not demonstrate negative feedback loop manifestation on morpho-function state of pineal gland and suprachiasmatic nucleus of hypothalamus.

Reference

- Hardeland R. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule / R. Hardeland, DP Cardinali, V. Srinivasan [et al.] // *Progress in neurobiology*. – 2011. – Vol. 93, № 3. – P. 350-384.
- Dubocovich M. L. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors / ML Dubocovich, P. Delagrange, DN Krause [et al.] // *Pharmacological reviews*. – 2010. – Vol. 62, № 3. – P. 343-380.
- Nosjean O. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2 / O. Nosjean, JP. Nicolas, F. Klupsch [et al.] // *Biochemical pharmacology*. – 2001. – Vol. 61, № 11. – P. 1369-1379.
- Jetten A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism / A. M. Jetten // *Nuclear receptor signaling*. – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. nrs. 07003.
- Zhang H. M., Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions / H. M. Zhang, Y. Zhang // *Journal of pineal research*. – 2014. – Vol. 57, № 2. – P. 131-146.
- Baekelandt S. Seasonal simulated photoperiods influence melatonin release and immune markers of pike perch *Sander lucioperca* / S. Baekelandt, S. Milla, V. Cornet [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1-10.
- Cipolla-Neto J., Amaral F. G. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights / J. Cipolla-Neto, F. G. Amaral // *Endocrine Reviews*. – 2018. – Vol. 39, №6. – P. 990-1028.
- Romero A. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and its neuroinvasive capacity: Is it time for melatonin? / A. Romero, E. Ramos, F. López-Muñoz [et al.] // *Cellular and molecular neurobiology*. – 2020. – P. 1-12.
- Russart K. L. G., Nelson R. J. Light at night as an environmental endocrine disruptor / K. L. G. Russart, R. J. Nelson // *Physiology & behavior*. – 2018. – Vol. 190. – P. 82-89.
- Tahara Y., Shibata S. Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence / Y. Tahara, S. Shibata // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. – 2016. – Vol. 13, №4. – P. 217.
- Genario R. Melatonin supplementation in the management of obesity and obesity-associated disorders: a review of physiological mechanisms and clinical applications / R. Genario, J. Cipolla-Neto, AA Bueno [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2020. – P. 105254.
- De Crescenzo F. Melatonin as a treatment for mood disorders: a systematic review / F. De Crescenzo, A. Lennox, JC Gibson [et al.] // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. – 2017. – Vol. 136, №6. – P. 549-558.
- Karamitri A., Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity / A. Karamitri, R. Jockers // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2019. – Vol. 15, №2. – P. 105-125.
- Li Y. Melatonin for the prevention and treatment of cancer / Y. Li, S. Li, Y. Zhou [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 24. – P. 39896.
- Pourhanifeh M. H. Clinical Application of Melatonin in the Treatment of Cardiovascular Diseases: Current Evidence and New Insights into the Cardioprotective and Cardiotherapeutic Properties / MH Pourhanifeh, E. Dehdashtian, A. Hosseinzadeh [et al.] // *Cardiovascular Drugs and Therapy*. – 2020. – P. 1-25.
- Chen D., Zhang T., Lee T. H. Cellular Mechanisms of Melatonin: Insight from Neurodegenerative Diseases / D. Chen, T. Zhang, T. H. Lee // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, №8. – P. 1158.
- Bondy S. C., Campbell A. Melatonin and Regulation of Immune Function: Impact on Numerous Diseases. – / S. C. Bondy, A. Campbell // *Curr Aging Sci*. – 2020.
- Savage RA, Zafar N, Yohannan S, Miller JMM. Melatonin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 21, 2020.
- Cerezo A. B. Quality control and determination of melatonin in food supplements / A. B. Cerezo, Á. Leal, M. A. Álvarez-Fernández [et al.] // *Journal of food composition and Analysis*. – 2016. – Vol. 45. – P. 80-86.
- Soni S. K., Kumar D., Singaravel M. Melatonin-induced phase and dose responses in a diurnal mammal, *Funambulus pennanti* / S. K. Soni, D. Kumar, M. Singaravel // *Chronobiology International*. – 2020. – Vol. 37, №5. – P. 641-651.
- Valizadeh M. Expression levels of two dna repair-related genes under 8 Gy ionizing radiation and 100 mg/kg melatonin delivery in rat peripheral blood / M. Valizadeh, A. Shirazi, P. Izadi [et al.] // *Journal of biomedical physics & engineering*. – 2017. – Vol. 7, №1. – P. 27-36.
- Pinato L. Day/night expression of MT1 and MT2 receptors in hypothalamic nuclei of the primate *Sapajus apella* / L. Pinato, D. Ramos, A. Hataka [et al.] // *Journal of chemical neuroanatomy*. – 2017. – Vol. 81. – P. 10-17.
- Dijk D. J., Duffy J. F. Novel approaches for assessing circadian rhythmicity in humans: A review / D. J. Dijk, J. F. Duffy // *Journal of Biological Rhythms*. – 2020. – Vol. 35, № 5. – P. 421-438.
- Tan D. X., Manchester L. C., Reiter R. J. CSF generation by pineal gland results in a robust melatonin circadian rhythm in the third ventricle as an unique light/dark signal / D. X. Tan, L. C. Manchester, R. J. Reiter // *Medical hypotheses*. – 2016. – Vol. 86. – P. 3-9.
- Herzog E. D. Regulating the suprachiasmatic nucleus (SCN) circadian clockwork: interplay between cell-autonomous and circuit-level mechanisms / ED Herzog, T. Hermansteyne, NJ Smylie [et al.] // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2017. – Vol. 9, №1. – P. a027706.
- Kalmukova O. Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats / O. Kalmukova, A. Pustovalov, I. Varenuk [et al.] // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. – 2018. – Vol. 23, № 2. – P. 20-27.
- Szewczyk-Golec K., Woźniak A., Reiter R. J. Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity / K. Szewczyk-Golec, A. Woźniak, R. J. Reiter // *Journal of pineal research*. – 2015. – Vol. 59, № 3. – P. 277-291.
- Foley H. M., Steel A. E. Adverse events associated with oral administration of melatonin: A critical systematic review of clinical evidence / H. M. Foley, A. E. Steel // *Complementary therapies in medicine*. – 2019. – Vol. 42. – P. 65-81.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. – Elsevier, 2006.
- Manno F. A. M., Lau C. The pineal gland of the shrew (*Blarinabrevicauda* and *Blarinacarolinensis*): a light and electron microscopic study of pinealocytes / F. A. M. Manno, C. Lau // *Cell and tissue research*. – 2018. – Vol. 374, №3. – P. 595-605.
- Brunner P. Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease / P. Brunner, N. Sözer-Topcular, R. Jockers [et al.] // *European Journal of Histochemistry*. – 2006. – Vol. 50, №4. – P. 311-316.
- Gorman M. R. Temporal organization of pineal melatonin signaling in mammals / M. R. Gorman // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2020. – Vol. 503. – P. 110687.

33. Harpsøe N. G. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review // *NGHarpsøe, LPAndersen, IGögenur[et al.]//European journal of clinical pharmacology*. – 2015. – Vol. 71, №8. – P. 901-909.

34. Liu C. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock / C. Liu, DR Weaver, X. Jin [et al.] // *Neuron*. – 1997. – Vol. 19, №1. – P. 91-102.

35. Kandalepas P. C., Mitchell J. W., Gillette M. U. Melatonin signal transduction pathways require E-box-mediated transcription of Per1 and Per2 to reset the SCN clock at dusk / P. C. Kandalepas, J. W. Mitchell, M. U. Gillette // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, №6. – P. e0157824.

36. Mendoza-Viveros L. miR-132/212 modulates seasonal adaptation and dendritic morphology of the central circadian clock / L. Mendoza-Viveros, CK Chiang, JKL Ong[et al.]//*Cell reports*. – 2017. – Vol. 19, №3. – P. 505-520.

37. Reiter R. J., Rosales-Corral S., Sharma R. Circadian disruption, melatonin rhythm perturbations and their contributions to chaotic physiology / R. J. Reiter, S. Rosales-Corral, R. Sharma // *Advances in medical sciences*. – 2020. – Vol. 65, №2. – P. 394-402.

38. Abbott S. M., Malkani R. G., Zee P. C. Circadian disruption and human health: A bidirectional relationship / S. M. Abbott, R. G. Malkani, P. C. Zee // *European Journal of Neuroscience*. – 2020. – Vol. 51, №. 1. – P. 567-583.

39. Dallaspezia S. Chronotype influences response to antidepressant chronotherapeutics in bipolar patients // *Dallaspezia S, Suzuki M, Clara L [et al.]//Chronobiology International*. – 2018. – Vol. 35, №9. – P. 1319-1325.

40. Aulinas A. Physiology of the Pineal Gland and Melatonin // *Endotext [Internet]*. – MDText. com, Inc., 2019.

Reference (Scopus)

1. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin—a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *ProgNeurobiol*. 2011 Mar;93(3):350-84. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.12.004. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21193011.

2. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):343-80.

3. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *BiochemPharmacol*. 2001 Jun 1;61(11):1369-79.

4. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *NuclRecept Signal*. 2009;7:e003.

5. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J PinealRes*. 2014 Sep;57(2):131-46.

6. Baekelandt S, Milla S, Cornet V, Flamion E, Ledoré Y, Redivo B, Antipine S, Mandiki SNM, Houndji A, El Kertaoui N, Kestemont P. Seasonal simulated photoperiods influence melatonin release and immune markers of pike perch *Sander lucioperca*. *Sci Rep*. 2020 Feb 14;10(1):2650. doi: 10.1038/s41598-020-59568-1. PMID: 32060347; PMCID: PMC7021833.

7. Cipolla-Neto J, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev*. 2018 Dec 1;39(6):990-1028. doi: 10.1210/er.2018-00084. PMID: 30215696.

8. Romero A, Ramos E, López-Muñoz F, Gil-Martín E, Escames G, Reiter RJ. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Its Neuroinvasive Capacity: Is It Time for Melatonin? *Cell MolNeurobiol*. 2020 Aug 9:1–12. doi: 10.1007/s10571-020-00938-8. Epub ahead of print. PMID: 32772307; PMCID: PMC7415199.

9. Russart KLG, Nelson RJ. Light at night as an environmental endocrine disruptor. *PhysiolBehav*. 2018 Jun 1;190:82-89. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.08.029. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28870443; PMCID: PMC5839924.

10. Tahara Y, Shibata S. Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nat Rev GastroenterolHepatol*. 2016 Apr;13(4):217-26. doi: 10.1038/nrgastro.2016.8. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26907879.

11. Genario R, Cipolla-Neto J, Bueno AA, Santos HO. Melatonin supplementation in the management of obesity and obesity-associated disorders: A review of physiological mechanisms and clinical applications. *Pharmacol Res*. 2020 Oct 17:105254. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105254. Epub ahead of print. PMID: 33080320.

12. De Crescenzo F, Lennox A, Gibson JC, Cordey JH, Stockton S, Cowen PJ, Quested DJ. Melatonin as a treatment for mood disorders: a systematic review. *ActaPsychiatr Scand*. 2017 Dec;136(6):549-558. doi: 10.1111/acps.12755. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28612993.

13. Karamitri A, Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Feb;15(2):105-125. doi: 10.1038/s41574-018-0130-1. PMID: 30531911.

14. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*. 2017 Jun 13;8(24):39896-39921. doi: 10.18632/oncotarget.16379. PMID: 28415828; PMCID: PMC5503661.

15. Pourhanifeh MH, Dehdashtian E, Hosseinzadeh A, Sezavar SH, Mehrzadi S. Clinical Application of Melatonin in the Treatment of Cardiovas-

cular Diseases: Current Evidence and New Insights into the Cardioprotective and Cardiotherapeutic Properties. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020 Sep 14. doi: 10.1007/s10557-020-07052-3. Epub ahead of print. PMID: 32926271.

16. Chen D, Zhang T, Lee TH. Cellular Mechanisms of Melatonin: Insight from Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules*. 2020 Aug 7;10(8):1158. doi: 10.3390/biom10081158. PMID: 32784556; PMCID: PMC7464852.

17. Bondy SC, Campbell A. Melatonin and Regulation of Immune Function: Impact on Numerous Diseases. *Curr Aging Sci*. 2020 Jul 11. doi: 10.2174/1874609813666200711153223. Epub ahead of print. PMID: 32651969.

18. Savage RA, Zafar N, Yohannan S, Miller JMM. Melatonin. 2020 Aug 21. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 30521244.

19. Cerezo, A. B., Leal, Á., Álvarez-Fernández, M. A., Hornedo-Ortega, R., Troncoso, A. M., & García-Parilla, M. C. (2016). Quality control and determination of melatonin in food supplements. *Journal of food composition and Analysis*, 45, 80-86.

20. Soni SK, Kumar D, Singaravel M. Melatonin-induced phase and dose responses in a diurnal mammal, *Funambulus pennanti*. *Chronobiol Int*. 2020 May;37(5):641-651. doi: 10.1080/07420528.2020.1758127. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32349560.

21. Valizadeh M, Shirazi A, Izadi P, TavakkolyBazzaz J, Rezaeejam H. Expression Levels of Two DNA Repair-related Genes under 8 Gy Ionizing Radiation and 100 Mg/Kg Melatonin Delivery In Rat Peripheral Blood. *J Biomed Phys Eng*. 2017 Mar 1;7(1):27-36. PMID: 28451577; PMCID: PMC5401131.

22. Pinato L, Ramos D, Hataka A, Rossignoli PS, Granado MD Junior, Mazzetto MC, Campos LMG. Day/night expression of MT1 and MT2 receptors in hypothalamic nuclei of the primate *Sapajus apella*. *J ChemNeuroanat*. 2017 Apr;81:10-17. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.01.005. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28159659.

23. Dijk DJ, Duffy JF. Novel Approaches for Assessing Circadian Rhythmicity in Humans: A Review. *J Biol Rhythms*. 2020 Oct;35(5):421-438. doi: 10.1177/0748730420940483. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32700634; PMCID: PMC7543025.

24. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ. CSF generation by pineal gland results in a robust melatonin circadian rhythm in the third ventricle as an unique light/dark signal. *Med Hypotheses*. 2016 Jan;86:3-9. doi: 10.1016/j.mehy.2015.11.018. Epub 2015 Nov 26. PMID: 26804589.

25. Herzog ED, Hermansteyne T, Smylie NJ, Hastings MH. Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Jan 3;9(1):a027706. doi: 10.1101/cshperspect.a027706. PMID: 28049647; PMCID: PMC5204321.

26. Kalmukova, O., Pustovalov, A., Vareniuk, I., and Dzerzhynsky, M., Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats, *Bull. Taras Shevchenko Nat. Univ. Kyi – Probl. Physiol. Func. Regul.*, 2018, vol. 23, no. 2, pp. 20–27.

27. Szewczyk-Golec K, Woźniak A, Reiter RJ. Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity. *J Pineal Res*. 2015 Oct;59(3):277-91. doi: 10.1111/jpi.12257. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26103557.

28. Foley HM, Steel AE. Adverse events associated with oral administration of melatonin: A critical systematic review of clinical evidence. *Complement Ther Med*. 2019 Feb;42:65-81. doi: 10.1016/j.ctim.2018.11.003. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30670284.

29. Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.

30. Manno FAM, Lau C. The pineal gland of the shrew (*Blarinabrevicauda* and *Blarinacarolinensis*): a light and electron microscopic study of pinealocytes. *Cell Tissue Res*. 2018 Dec;374(3):595-605. doi: 10.1007/s00441-018-2897-8. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30088080.

31. Brunner P, Sözer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Eckert A, Müller-Spahn F, Savaskan E. Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem*. 2006 Oct-Dec;50(4):311-6. PMID: 17213040.

32. Gorman MR. Temporal organization of pineal melatonin signaling in mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 2020 Mar 1;503:110687. doi: 10.1016/j.mce.2019.110687. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31866317.

33. Harpsøe NG, Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J ClinPharmacol*. 2015 Aug;71(8):901-9. doi: 10.1007/s00228-015-1873-4. Epub 2015 May 27. PMID: 26008214.

34. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*. 1997 Jul;19(1):91-102. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80350-5. PMID: 9247266.

35. Kandalepas PC, Mitchell JW, Gillette MU. Melatonin Signal Transduction Pathways Require E-Box-Mediated Transcription of Per1 and Per2 to Reset the SCN Clock at Dusk. *PLoS One*. 2016 Jun 30;11(6):e0157824. doi: 10.1371/journal.pone.0157824. PMID: 27362940; PMCID: PMC4928778.

36. Mendoza-Viveros L, Chiang CK, Ong JKL, Hegazi S, Cheng AH, Bouchard-Cannon P, Fana M, Lowden C, Zhang P, Bothorel B, Michniewicz

MG, Magill ST, Holmes MM, Goodman RH, Simonneaux V, Figeys D, Cheng HM. miR-132/212 Modulates Seasonal Adaptation and Dendritic Morphology of the Central Circadian Clock. *Cell Rep.* 2017 Apr 18;19(3):505-520. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.057. PMID: 28423315; PMCID: PMC5864111.

37. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Sharma R. Circadian disruption, melatonin rhythm perturbations and their contributions to chaotic physiology. *Adv Med Sci.* 2020 Sep;65(2):394-402. doi: 10.1016/j.advms.2020.07.001. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32763813.

38. Abbott SM, Malkani RG, Zee PC. Circadian disruption and human health: A bidirectional relationship. *Eur J Neurosci.* 2020 Jan;51(1):567-583. doi: 10.1111/ejn.14298. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30549337; PMCID: PMC7261021.

39. Dall'aspezia S, Suzuki M, Clara L, Colombo C, Benedetti F. Chronotype influences response to antidepressant chronotherapeutics in bipolar patients. *Chronobiol Int.* 2018 Sep;35(9):1319-1325. doi: 10.1080/07420528.2018.1469034. Epub 2018 May 15. PMID: 29764214.

40. Aulinas A. Physiology of the Pineal Gland and Melatonin. 2019 Dec 10. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hoffland HJ, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trence DL, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–2019. PMID: 31841296.

Надійшла до редколегії 2.10.2020
Отримано виправлений варіант 2.11.2020
Підписано до друку 2.11.2020

Received in the editorial 2.10.2020
Received a revised version on 2.11.2020
Signed in the press on 2.11.2020

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

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕПІФІЗА ТА СУПРАХІАЗМАТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ РЕЖИМІВ УВЕДЕННЯ ЕКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНІНУ

У сучасному суспільстві зростання цифрових технологій пов'язане з перевищенням рівня освітленості в нічну пору – новим типом забруднення. Світло вночі пригнічує синтез ендогенного мелатоніну епіфізом, що впливає на цикли роботи циркадної системи, тому в організмі часто порушуються режими неспання/сну, прийому їжі, фізичної активності. Крім того, показано, що нестача мелатоніну в певний час доби так само, як і його низька концентрація, зумовлює розвиток захворювань шляхом порушення правильної регуляції експресії годинних генів. У зв'язку із цим деякі останні клінічні протоколи або клінічні випробування для терапії багатьох патологій (напр. безсоння, метаболічного синдрому, серцево-судинних захворювань, проблем центральної нервової та імунної систем, раку, вірусних інфекцій) включають використання екзогенного мелатоніну. Оскільки мелатонін виконує свою функцію ендокринними і паракринними шляхами в різних типах клітин, то його застосування відбувається в широкому діапазоні доз і різний час доби (хронотерапевтичний підхід). Тому важливим є контроль стану центральних елементів циркадної системи – епіфіза (основного продуцента ендогенного мелатоніну) і супрахіазматичного ядра (СХЯ) гіпоталамуса (центрального водія ритму циркадної системи) – в умовах лікування екзогенним мелатоніном. Отже, метою нашого дослідження став аналіз морфо-функціонального стану епіфіза і СХЯ гіпоталамуса щурів після щоденного введення мелатоніну в різний час доби (уранці, увечері і безперервно з питною водою). Мелатонін вводили перорально крізь зонд протягом 7 тижнів у дозі 30 мг/кг за 1 год до вимкнення світла (М ZT11, вечірнє введення) або 1 год після його увімкнення (М ZT01, ранкове), або безперервно з питною водою протягом дня і ночі (МВ). Після застосування мелатоніну тільки у групі МВ епіфіз демонстрував зміни морфології (ядра пінеалоцитів мали слабке базofilне забарвлення) і даних морфометричного аналізу (збільшення площі поперечного перерізу ядра пінеалоцитів порівняно з контрольною групою). Крім того, аналогічні зміни спостерігалися й у СХЯ: площа поперечного перерізу ядер нейронів СХЯ зросла при використанні кожного окремого режиму введення мелатоніну, а морфологічна характеристика залишилася без змін. Із цього можна припустити наявність у мелатоніну неінгібуючих властивостей у контексті петлі зворотного зв'язку циркадної системи, що передбачає широкий потенціал його використання за відсутності значного побічного ефекту на центральні елементи вищезгаданої системи.

Ключові слова: мелатонін, петля зворотного зв'язку, хронобіологія, пінеалоцити, нейрон, гістологія, циркадна система, побічна дія.

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

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭПИФИЗА И СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПОСЛЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ВВЕДЕНИЯ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА

В современном обществе рост цифровых технологий связан с превышением уровня освещенности в ночное время – новым типом загрязнения. Свет ночью подавляет синтез эндогенного мелатонина эпифизом, что влияет на циклы работы циркадной системы, поэтому в организме часто нарушаются режимы бодрствования/сна, приема пищи, физической активности. Недостаток мелатонина в определенное время суток, равно как и низкая его концентрация, влияют на развитие заболеваний путем неправильной регуляции экспрессии часовых генов. В связи с этим некоторые последние клинические протоколы или клинические испытания для терапии различных патологий (напр. бессонницы, метаболического синдрома, сердечно-сосудистых заболеваний, проблем центральной нервной и иммунной систем, рака, вирусных инфекций) включают использование экзогенного мелатонина. Поскольку мелатонин выполняет свою функцию эндокринным и паракринным путями в различных типах клеток, его применяют в широком диапазоне доз и в разное время суток (хронотерапевтический подход). Поэтому важен контроль состояния центральных элементов циркадной системы – эпифиза (основного продуцента эндогенного мелатонина) и супрахиазматического ядра (СХЯ) гипоталамуса (центрального водителя ритма циркадной системы) в условиях лечения экзогенным мелатонином. Исходя из вышесказанного, основной целью нашего исследования стал анализ морфо-функционального состояния эпифиза и СХЯ гипоталамуса крыс после ежедневного введения мелатонина в разное время (утром, вечером и непрерывно с питьевой водой). Мелатонин вводили перорально через зонд в течение 7 недель в дозе 30 мг/кг за 1 час до выключения света (М ZT11, вечер) или через 1 час после его включения (М ZT01, утро), или непрерывно с питьевой водой в течение дня и ночи (МВ). После применения мелатонина только в группе МВ эпифиз демонстрировал изменения морфологии (ядро пинеалоцитов имело слабую базофильную окраску) и данных морфометрического анализа (увеличение площади поперечного сечения ядра пинеалоцитов по сравнению с контрольной группой). Кроме того, аналогичные изменения наблюдались и в СХЯ: площадь поперечного сечения ядра нейронов СХЯ увеличилась при использовании каждого отдельного режима введения мелатонина, а морфологическая характеристика осталась без изменений. В целом это предполагает наличие у мелатонина неингибирующих свойств в контексте петли обратной связи циркадной системы и широкий потенциал его использования при отсутствии значительного побочного эффекта на центральные элементы вышеупомянутой системы.

Ключевые слова: мелатонин, петля обратной связи, хронобиология, пинеалоциты, нейрон, гистология, циркадная система, побочный эффект.

УДК: 577+618
DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.24-28

В. Тараріна, студ.,
І. Суха, студ.,
Р. Лаврик, студ.,
О. Артеменко, канд. біол. наук,
О. Мороз, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ІОННІ КАНАЛИ В КОНТЕКСТІ ПОШУКУ МОЛЕКУЛЯРНИХ МІШЕНЕЙ РЕГУЛЯЦІЇ СКОРОТЛИВОСТІ МІОМЕТРІЮ

Нині багато жінок мають ускладнення пологів через слабку пологову діяльність, що часто загрожує як матері, так і дитині. З іншого боку, нерозв'язаною є проблема запобігання і терапії передчасних скорочень матки. У пропонуваній роботі розглянуто вплив іонних каналів як кінцевих ефекторів регуляторних каскадів на скоротливість міометрію. Досліджено участь TRPC4, TRPV4 та BKCa іонних каналів у скороченні міометрію з урахуванням того, що зміна іонних провідностей у плазматичній мембрані регулює спонтанні та агоніст-індуковані скорочення. На препаратах міометрію вагітних щурів із застосуванням тензометричного методу реєстрували амплітуду сили скорочень за умов активації вказаних іонних каналів їхніми селективними агоністами. Отримані результати дозволили розглядати (-)-енглерін А як стимулятор скорочень матки за недостатньої відповіді на окситоцин, оскільки він у концентрації 1 нМ зумовлює значуще збільшення сили скорочень, які статистично не відрізнялися від показників за дії окситоцину чи карбахоліну. Застосування агоніста в концентраціях 30–100 нМ викликало деяке пригнічення скоротливості. Виходячи з результатів дослідження ролі TRPV4 каналів, а саме зменшення сили скорочень гладеньких м'язів матки у відповідь на застосування селективного агоніста GSK1016790A (0,3 мкМ), автори припустили, що головний ефект активації цих каналів залежить від експресії та активності розташованих поруч кальцій-залежних кальсієвих каналів. Було виявлено, що застосування ліпосомальної форми кверцетину для активації BKCa каналів пригнічує збудливість клітин міометрію ефективніше, ніж ця сполука, розчинена у DMSO, що є перспективним для корекції передчасної або понаднормово частоти активності матки.

Ключові слова: скорочення матки; окситоцин; TRPC4; TRPV4; BKCa-іонні канали.

Вступ. Йони кальцію Ca^{2+} впливають майже на всі аспекти клітинного життя. Їх вважають універсальними внутрішньоклітинними месенджерами, що контролюють різноманітний спектр клітинних процесів, включаючи скорочення м'язів, серця та гладенької мускулатури, ріст нейронів і вивільнення нейромедіаторів [1]. Транспорт кальцію крізь іонні канали плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин є одним із основних шляхів зміни цитозольної концентрації цього іону [2]. Особливу увагу приділяють каналам транзйентного рецепторного потенціалу (TRP), що експресуються в епітеліальних, нервових і гладеньком'язових клітинах (ГМК). У багатьох наукових роботах показано їх участь у регуляції судинного тону, моторики кишечника, скоротливості сечового міхура та матки, проте механізми активації цих каналів вивчені недостатньо [3]. Відсутність такої ключової інформації відкриває перспективу подальшої роботи в цьому напрямі, спрямовуючи її у фокус актуальних клінічних проблем. В акушерстві такою проблемою є передчасні пологи, зумовлені підвищеною збудливістю та скоротливістю міометрію. У контексті пошуку нових способів регуляції функції міометрію важливим вбачається дослідження участі TRPC4, TRPV4 та BKCa іонних каналів, які, будучи кінцевими ефекторними молекулами сигнальних шляхів, є зручною мішенню впливу на функцію, адже дозволяють оминати ті ланки регуляторного каскаду, які є причиною патологічної відповіді. Фармакологічний вплив на TRP канали може стати перспективним способом регуляції пологової активності. Тому для дослідження впливу на іонні канали в цьому контексті ми зосередились на вивченні зміни скоротливої активності міометрію при застосуванні селективного блокатора механочутливих TRPV4 іонних каналів у нормі та при гіпотонічному набряку тканини, за дії селективного агоніста рецептор-керованих TRPC4 іонних каналів та при активації BKCa каналів.

TRPC4 є одним із семи членів підродини TRPC (канонічних TRP) каналів, який активується $\text{G}\alpha\text{i-}$ та $\text{G}\alpha\text{q-}$ спряженими рецепторами і тирозинкіназами й серед іншого чинить вплив на скорочення ГМК. TRPC4 безпосередньо взаємодіє з рецепторами IP_3 , кальмодуліном, STIM1 , $\alpha\text{i2-}$ субодиницею G-білків і ліпід-зв'язуючим білком SESTD1 , який пов'язує кілька видів фосфоліпідів і є

важливим для ефективної рецептор-опосередкованої активації TRPC5 [4].

TRPV4 належать до ванілоїдної підродини родини TRP-каналів, до групи неселективних катіонних каналів, проникних для натрію, що активуються різними подразниками, включаючи теплу температуру, осмотичні зміни та ендогенні ліпіди, і експресовані в різних типах тканин [5]. Повідомляється про можливий вплив TRPV4 на скорочення гладенької мускулатури вагітної та невагітної матки [6, 7], але його точна роль досі невідома. Експресія TRPV4 каналу починає зростати на 18 день вагітності, це зумовлено його коекспресією з аквапорином AQP5. Висловлено припущення, що знижена експресія AQP5 викликає гіпертонічний стрес, який активує TRPV4 і збільшує скорочення матки в день пологів [8].

ГМК матки мають широкий діапазон калієвих каналів, включаючи й залежні від кальцію канали великої провідності (BKCa) [9]. Їх експресія також зростає під час вагітності, механізмом чого у ГМК артерій є індуковане естрогеном деміліювання промотору $\text{BK}\beta 1$ [10]. В умовах спокою K^+ -провідність є основним фактором, що визначає потенціал мембрани незбудженої клітини, а також активація/інактивація K^+ -каналів впливає на хід потенціалу дії та реполяризації. Із цих причин активність K^+ -каналів зазвичай пов'язана зі спокоєм матки впродовж вагітності, а зміни в експресії – з початком пологів [11]. Установлено взаємодію TRPV4 каналів із BKCa у клітинах нейронів і гладеньких м'язах артерій [12].

Матеріали і методи. Для дослідження скорочень міометрію був відібраний матеріал нелінійних щурів на 18–22 день вагітності, який утримували у стандартних умовах віварію ННЦ "Інститут біології та медицини". Усі експерименти були виконані згідно із "Правилами проведення робіт із використанням експериментальних тварин". Це дослідження отримало експертний висновок Комісії з біоетики ННЦ "Інституту біології та медицини" (розпорядження № 35 від 19 квітня 2017 року).

Тканину було отримано під час операції, якій передувала евтаназія шляхом цервікальної дислокації. Міометрій був вилучений у результаті лапаротомії після виділення матки. Потім ми видалили децидуальний (внутрішній) шар матки. Цей матеріал відпрепарували в чашках Петрі з модифікованим розчином Кребса на

окремі смужки розміром 6 x 2 x 2 мм, на яких вимірювали силу скорочень тензометричним методом.

У роботі були використані: модифікований розчин Кребса; розчин Кребса зі зниженою осмолярністю 220 мОсмоль із такими концентраціями (ммоль/л): NaCl – 133(92), NaHCO₃ – 16.3, NaH₂PO₄ – 1.38, KCl – 4.7, MgCl₂ – 1.05, глюкоза – 11.5, CaCl₂ – 2.73, HEPES – 10). Також застосовували: окситоцин (Gedeon Richter, Угорщина) – 10 нмоль/л, селективний агоніст TRPV4 каналів GSK1016790A (Sigma, США) у концентрації 0,3 мкмоль/л та їхній блокатор HC067047 (Sigma, США) – 1 мкмоль/л, селективний агоніст TRPC4 каналів (-)-енглерін А (Sigma, США) – 1–100 нкмоль/л.

Дослідження скоротливої функції міометрію проводились методом тензометрії на кількох групах гладеньком'язових препаратів [13]. Приготовані смужки фіксували на гачках установки, один із яких з'єднали з мікрогвинтом, за допомогою якого задавали пасивний натяг 1,5 г, а інший – з емнісним датчиком сили. Після надання пасивного натягу смужки тканини залишали для стабілізації активності на 45 хв, після чого записували 15 хв контрольної спонтанної активності. Досліджувані речовини вносили до зовнішнього розчину безпосередньо в камеру. Температуру в камері підтримували в межах 36–38 °С.

Аналіз і статистичну обробку цифрових даних проводили в пакетах програм "Clampfit® 11.0.3", "Origin 9.5.1" та "R 4.0.0 Documentation". Показники амплітуди сили скорочень були нормалізовані (F/F₀) на значення спонтанних скорочень безпосередньо перед додаван-

ням речовин. Нормалізацію проводили з метою порівняти між собою показники, урахувавши особливості кожного окремого препарату, зокрема масу і площу фізіологічного перерізу.

Для статистичної обробки результатів обирали методи на підставі результатів тесту Шапіро – Уїлка на відповідність до нормального розподілу. У тих групах даних, де встановлено нормальний розподіл, використовували методи параметричної статистики (одновібірковий критерій Стюдента і критерій Стюдента для незалежних змінних). Дані експериментів, які мали розподіл, відмінний від нормального, аналізували, використовуючи методи непараметричної статистики, зокрема тест Вілкоксона та критерій Манна – Уїтні. Статистично значущими вважали відмінності за $P < 0,05$.

Результати та обговорення. Участь TRPC4 іонних каналів у регуляції скоротливості міометрію. За активації TRPC4 каналів селективним агоністом (-)-енглеріном А (ЕНА) реєстрували параметри скорочення гладеньком'язових препаратів міометрію вагітних щурів. Для порівняння інтенсивності ефекту брали класичний утеротонік, що застосовується у клінічній практиці – окситоцин, а також карбохолін, який чинить стимулюючий вплив на гладенькі м'язи у щурів. Карбохолін, окситоцин та ЕНА в концентрації до 10 нМ статистично значущо підвищують силу скорочень (рис. 1). ЕНА в концентрації 1 нМ підвищує амплітуду скорочень е середньому на 85 % ($P < 0,05$) від контрольного значення, тоді як окситоцин – на 140 % ($P < 0,05$).

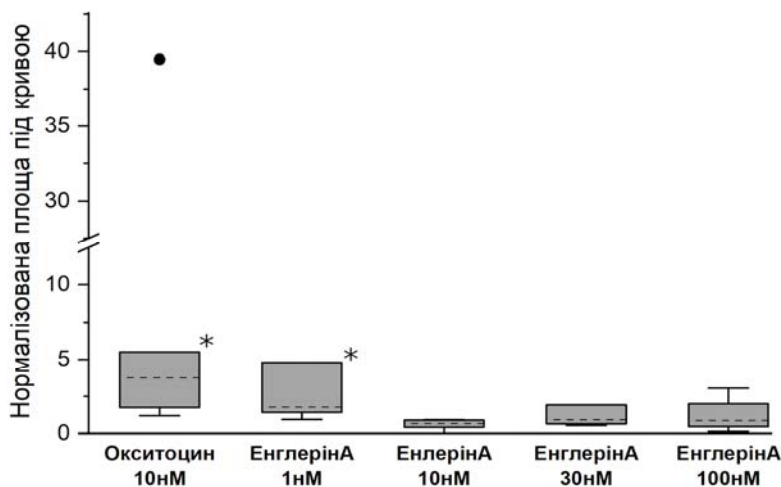


Рис. 1. Амплітуди сили скорочення за дії селективного агоніста TRPC4 іонних каналів (-)-енглеріну А у різних концентраціях: n = 9, Me, Q1, Q3. * – $P < 0,05$ щодо контролю

Проте треба зазначити, що статистичної різниці в дії порівняно з використаними утеротоніками не виявлено, тому такий вплив дозволяє розглядати ЕНА як альтернативний засіб для стимуляції скорочень міометрію й окреслює перспективу фармакологічного впливу на TRPC4 канали в терапії слабкості пологової діяльності.

За концентрації ЕНА 10 нмоль/л фазні скорочення, навпаки, були меншої амплітуди. Сила скорочень знижувалась у середньому на 22 %, проте статистичної значущості для цього ефекту не встановлено. Цю дію агоніста TRPC4 каналів можна пояснити відкриванням такої кількості каналів і входженням такої кількості катіонів, що одразу ж деполяризує плазматичну мембрану до величин потенціалу, несприятливих для відкривання потенціал-залежних Ca²⁺-каналів L-типу і сприятливих для відкривання потенціал-залежних K⁺-каналів. За цих умов зниження збудливості мембрани міоцита та зменшення входження кальцію ззовні скорочення не має можливості розпочатися або ж

розвиває суттєво меншу амплітуду. Для перевірки цих гіпотез необхідне проведення додаткових електрофізіологічних та кальційметричних досліджень на ізольованих клітинах міометрію для реєстрації вхідних і вихідних іонних струмів і встановлення динаміки концентрації внутрішньоклітинного кальцію при активації TRPC4 каналів агоністом у зазначеній концентрації.

Участь TRPV4 іонних каналів у регуляції скоротливості біометрію. TRPV4 канал характеризується як канал із багатьма активаційними властивостями, які дозволяють йому виконувати широкий діапазон функцій – від осморегуляції до термосенсибілізації.

За допомогою останніх досліджень ми маємо уявлення про те, що цей канал може бути не тільки осмотично активований [14], а також стимулюватися за рахунок напруги зсуву [15] і метаболітів арахідонової кислоти [16]. Оскільки TRPV4 канал розповсюджений також у міометрії, то в наших дослідженнях ми мали за

мету дослідити активацію і роль цього каналу в регуляції скорочень міометрію.

Результати експериментів, які ми проводили на гладеньком'язових препаратах міометрію вагітних щурів, показали, що амплітуда сили окремих скорочень препаратів вагітної матки зменшувалась на 28,4 %

($P < 0,001$, рис. 2). В умовах гіпотонічного середовища (перфузія препаратів сольовим розчином із осмолярністю 220 мОсоль/л), коли TRPV4 канали активуються завдяки розтягненню плазматичної мембрани ГМК, препарати міометрію щурів демонстрували збільшення амплітуди сили скорочення на 60 % ($P < 0,05$).

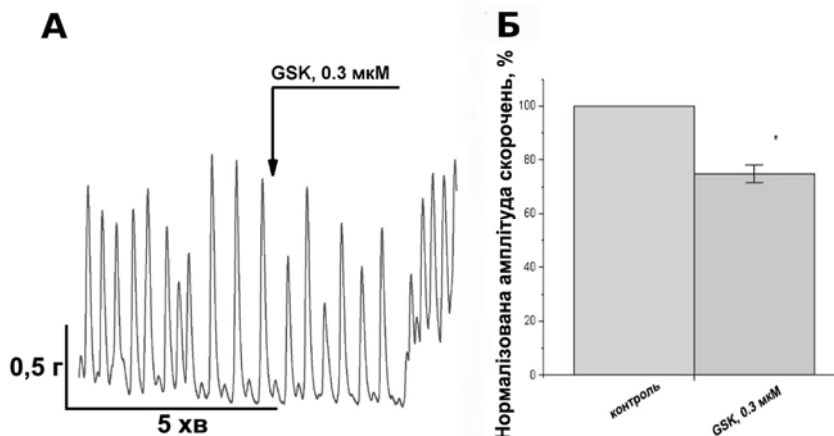


Рис. 2. Зміни скоротливості міометрію щурів за фармакологічної активації TRPV4 іонних каналів їх селективним агоністом GSK1016790A: А) репрезентативна крива скорочення;

Б) амплітуда сили скорочень, нормалізована на показник спонтанної активності, $n = 6$, $M \pm m$, * – $P < 0,05$ щодо контролю

Дещо інші результати на гладеньких м'язах сечового міхура отримали вчені з Університету Нагоя, які зареєстрували збільшення сили скорочення у відповідь на GSK [17]. Така розбіжність може бути зумовлена наявністю на мембранах ГМК цих двох органів інших механочутливих каналів, зокрема TREK, а також колокалізацією механочутливих кальційпроникних TRPV4 і кальційзалежних калієвих каналів, які, активуючись за таких умов експерименту, можуть мати домінуючий вплив. Тому роль TRPV4 у скоротливості гладеньком'язового шару матки потребує детальнішого вивчення.

Роль ВКСа каналів у регуляції скоротливості біометрію. ВКСа у судинах утворюють важливу частину петлі негативного зворотного зв'язку, де збільшення внутрішньоклітинного Ca^{2+} стимулює скорочення і до того ж активує ці канали через Ca^{2+} -іскри, що спричиняє гіперполяризацію та вазодилатацію [18]. У гладеньких м'язах матки канали ВКСа наявні з відносно високою щільністю, а їхня велика провідність (~200 пС), як передбачається, може зіграти значну роль у регуляції

скорочень. Однак блокування цих каналів мало впливає на скорочення матки або сигналізацію кальцію за нормальних умов. Це може бути тому, що для міометрію не властиві Ca^{2+} -іскри, тобто ВКСа канали лише мінімально активуються у фізіологічних умовах. У багатьох збудливих клітинах ВК-канали локалізовані у плазматичних мембранних комплексах із потенціал-керованими Ca^{2+} -каналами; їхня активація через вхід Ca^{2+} спричиняє гіперполяризацію клітин, що запобігає подальшому надходженню Ca^{2+} , забезпечуючи тим самим негативний механізм регуляції зворотного зв'язку для регуляції концентрації Ca^{2+} у клітині [19]. Блокуючи ВКСа канали, можна запобігати гіперполяризації клітин, що, у свою чергу, підвищує їхню збудливість [20].

У наших дослідженнях застосування кверцетину, що є природним агоністом цих іонних каналів, практично не змінювало амплітуду сили скорочення препаратів міометрію щурів у передпологовому етапі вагітності (рис. 3 А).

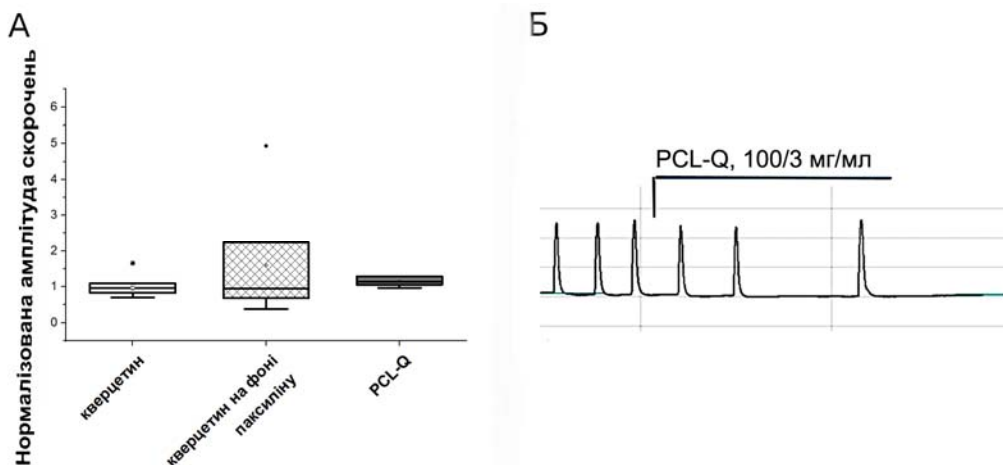


Рис. 3. Скоротливість міометрію за умов фармакологічного впливу на ВКСа канали:

А) сила скорочень при застосуванні природного агоніста кверцетину (3 мг/мл) у розчині та інкорпорованого в ліпосомі (PCL-Q, 100 мг/мл фосфоліпідів і 3 мг/мл кверцетину) на інтактних і перфузованих розчином паксиліну (3 мкМ) препаратах міометрію щурів; $n = 5-10$, Me, Q1, Q3; Б) репрезентативна тензометрична крива, що демонструє зменшення частоти піків скорочення на тлі застосування кверцетину, інкорпорованого в ліпосомі

Проте експерименти із додаванням до зовнішнього розчину ліпосомальної форми кверцетину показали тенденцію до збільшення сили скорочень і зниження їх частоти (рис. 3 Б). Відсутність дії кверцетину на тлі даного блокатора ВКСа каналів паксиліну підтвердила специфічність дії обраного агоніста. Таким чином, ліпосомальна форма кверцетину є перспективною з погляду засобу активації цих каналів.

Висновки. Безпосередня активація TRPC4 каналів екзогенним агоністом може розглядатися як спосіб стимуляції скорочень за ослабленої відповіді матки на окситоцин.

Зміна скоротливості міометрію за активації TRPV4 каналів, імовірно, залежить від локалізації каналу поруч із кальцій-чутливими калієвими каналами, що може зумовлювати пригнічення функціональної активності міоцитів.

Застосування ліпосомальної форми кверцетину активує ВКСа канали і, пригнічуючи збудливість міометрію, може бути перспективним методом для корекції передчасної або надто частої активності матки.

Подяки

Д-ру мед. наук, ст. наук. співроб. Соловійову А. І., Інститут фармакології та токсикології НАН України, за сприяння окремим дослідженням.

Дослідження частково підтримане грантом № 7Б-2018 ВЦП Київського національного університету імені Тараса Шевченка НАН України.

Список використаних джерел

- Carafoli E. Why calcium? How calcium became the best communicator / E. Carafoli, J. Krebs // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291(40). – P. 20849–57.
- Babich L. H. Ca ion transport in smooth muscle mitochondria / L. H. Babich, S. H. Shlykov, S. O. Kosterin // Ukrainian biochemical journal. – 2014. – Vol. 86. – P. 8–30.
- Andersson K. E. Agents in early development for treatment of bladder dysfunction-promise of drugs acting at TRP channels? / K. E. Andersson // Expert Opin Investig Drugs. – 2019. – Vol. 28(9). – P. 749–55.
- Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel / D. Vinayagam, T. Mager, A. Apelbaum et al. // Elife. – 2018. – P. 7.
- The Mechanosensitive Ion Channel TRPV4 is a Regulator of Lung Development and Pulmonary Vascular Stabilization / J. T. Morgan, W. G. Stewart, R. A. McKee, J. P. Gleghorn // Cell. Mol. Bioeng. – 2018. – Vol. 11(5). – P. 309–20.
- Ying L. A Role for the Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel in Modulating Uterine Tone During Pregnancy / L. Ying, C. M. Alvira, D. N. Cornfield // A FASEB J. – 2016. – Vol. 30(1 supplement). – P. 1012.4–1012.4.
- Molecular and functional characterization of TRPV4 channels in pregnant and nonpregnant mouse uterus / V. Singh, M. Ram, K. Kandasamy et al. // Life Sci. – 2015. – Vol. 122. – P. 51–8.
- Ducza E. Significance of transient receptor potential vanilloid 4 and aquaporin 5 co-expression in the rat uterus at term / E. Ducza, A. Csányi, É. Szőke et al. // Heliyon. – 2019. – Vol. 1;5(10).
- Moroz O. F. Uterine Myocytes: Development, Structure and Function. In: L. V. Berhardt, editor / O. F. Moroz, A. V. Zholos // Advances in Medicine and Biology. Nova Science Publishers, Inc. – 2019. – P. 27–96.
- Epigenetic upregulation of large-conductance Ca²⁺-Activated K⁺ channel expression in uterine vascular adaptation to pregnancy / M. Chen, C. Dasgupta, F. Xiong, L. Zhang // Hypertension. – 2014. – Vol. 64(3). – P. 610–8.
- Cox D. H. Modeling a Ca²⁺ channel/BKCa channel complex at the single-complex level / D. H. Cox // Biophys J. – 2014. – Vol. 107(12). – P. 2797–814.
- Treatment of hypertension by increasing impaired endothelial TRPV4-KC a2.3 interaction / D. He, Q. Pan, Z. Chen et al. // EMBO Mol Med. – 2017. – Vol. (11). – P. 1491–503.
- Contractility Measurements of Human Uterine Smooth Muscle to Aid Drug Development / S. Arrowsmith, P. Keov, M. Muttenthaler, C. W. Gruber // J. Vis. Exp. – 2018. – Vol. 26. – № (6). – P. 356–69 (131).
- Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor / W. Liedtke, Y. Choe, M. A. Marti-Renom et al. // Cell. – 2000. – Vol. 103(3). – P. 525–35.
- Gao X. Temperature-modulated Diversity of TRPV4 Channel Gating / X. Gao, L. Wu, R. G. O'Neil // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278(29). – P. 27129–37.

16. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels / H. Watanabe, J. Vriens, J. Prenen et al. // Nature. – 2003. – Vol. 424(6947). – P. 434–8.

17. Functional coupling of TRPV4 channels and BK channels in regulating spontaneous contractions of the guinea pig urinary bladder / A. Isogai, K. Lee, R. Mitsui, H. Hashitani // Pflügers Arch – Eur. J. Physiol. – 2016. – Vol. 468(9). – P. 1573–85.

18. Melnyk M. I. Liposomal quercetin potentiates maxi-K channel openings in smooth muscles and restores its activity after oxidative stress / M. I. Melnyk, D. O. Dryn, L. T. Al Kury et al. // J. Liposome Res. – 2018. – P. 1–8.

19. Lorca R. A. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility / R. A. Lorca, M. Prabakaran, S. K. England // Front Physiol. – 2014. – Vol. 5 JUL(July). – P. 1–12.

20. Zhou Y. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism / Y. Zhou, C. J. Lingle // J. Gen. Physiol. – 2014. – Vol. 144(5). – P. 415–40.

Reference

- Carafoli E, Krebs J. Why calcium? How calcium became the best communicator. J Biol Chem. 2016 Sep 30;291(40):20849–57.
- Babich LH, Shlykov SH, Kosterin SO. Ca ion transport in smooth muscle mitochondria [Internet]. Vol. 86, Ukrainian biochemical journal. 2014 [cited 2020 Feb 26]. p. 18–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25816602>
- Andersson KE. Agents in early development for treatment of bladder dysfunction-promise of drugs acting at TRP channels? Expert Opin Investig Drugs. 2019 Sep 2;28(9):749–55.
- Vinayagam D, Mager T, Apelbaum A, Bothe A, Merino F, Hofnagel O, et al. Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel. Elife. 2018 May 2;7.
- Morgan JT, Stewart WG, McKee RA, Gleghorn JP. The Mechanosensitive Ion Channel TRPV4 is a Regulator of Lung Development and Pulmonary Vascular Stabilization. Cell Mol Bioeng [Internet]. 2018 Oct 16 [cited 2019 Apr 25];11(5):309–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30713588>
- Ying L, Alvira CM, Cornfield DN. A Role for the Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel in Modulating Uterine Tone During Pregnancy. FASEB J [Internet]. 2016;30(1 supplement):1012.4–1012.4. Available from: https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.30.1_supplement.1012.4
- Singh V, Ram M, Kandasamy K, Thangamalai R, Choudhary S, Dash JR, et al. Molecular and functional characterization of TRPV4 channels in pregnant and nonpregnant mouse uterus. Life Sci [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2019 Jan 11];122:51–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25529150>
- Ducza E, Csányi A, Szőke É, Pohóczky K, Hajagos-Tóth J, Kothencz A, et al. Significance of transient receptor potential vanilloid 4 and aquaporin 5 co-expression in the rat uterus at term. Heliyon. 2019 Oct 1;5(10).
- Moroz OF, Zholos A V. Uterine Myocytes: Development, Structure and Function. In: L.V. Berhardt, editor. Advances in Medicine and Biology. Nova Science Publishers, Inc.; 2019. p. 27–96.
- Chen M, Dasgupta C, Xiong F, Zhang L. Epigenetic upregulation of large-conductance Ca²⁺-Activated K⁺ channel expression in uterine vascular adaptation to pregnancy. Hypertension. 2014;64(3):610–8.
- Cox DH. Modeling a Ca²⁺ channel/BKCa channel complex at the single-complex level. Biophys J. 2014 Dec 16;107(12):2797–814.
- He D, Pan Q, Chen Z, Sun C, Zhang P, Mao A, et al. Treatment of hypertension by increasing impaired endothelial TRPV4-KC a2.3 interaction. EMBO Mol Med. 2017 Nov;9(11):1491–503.
- Arrowsmith S, Keov P, Muttenthaler M, Gruber CW. Contractility Measurements of Human Uterine Smooth Muscle to Aid Drug Development. J Vis Exp [Internet]. 2018 Jan 26 [cited 2018 Mar 19];(131). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29443077>
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. Cell [Internet]. 2000 Oct 27 [cited 2019 Apr 29];103(3):525–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081638>
- Gao X, Wu L, O'Neil RG. Temperature-modulated Diversity of TRPV4 Channel Gating. J Biol Chem [Internet]. 2003 Jul 18 [cited 2019 Jan 15];278(29):27129–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738791>
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. Nature [Internet]. 2003 Jul 24 [cited 2019 Jan 20];424(6947):434–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12879072>
- Isogai A, Lee K, Mitsui R, Hashitani H. Functional coupling of TRPV4 channels and BK channels in regulating spontaneous contractions of the guinea pig urinary bladder. Pflügers Arch – Eur J Physiol [Internet]. 2016 Sep 6 [cited 2019 Jan 11];468(9):1573–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497848>
- Melnyk MI, Dryn DO, Al Kury LT, Zholos A V., Soloviev AI. Liposomal quercetin potentiates maxi-K channel openings in smooth muscles

and restores its activity after oxidative stress. J Liposome Res [Internet]. 2018 Apr 19 [cited 2019 Jan 29];1–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08982104.2018.1458864>

19. Lorca RA, Prabakaran M, England SK. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. Front Physiol. 2014;5 JUL(July):1–12.

20. Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. J Gen Physiol. 2014;144(5):415–40.

Надійшла до редколегії 5.10.2020
Отримано виправлений варіант 5.11.2020
Підписано до друку 5.11.2020

Received in the editorial 5.10.2020
Received a revised version on 5.11.2020
Signed in the press on 5.11.2020

В. Тарарина, студ.,
И. Суха, студ.,
Р. Лаврик, студ.,
А. Артеменко, канд. биол. наук,
О. Мороз, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ИОННЫЕ КАНАЛЫ В КОНТЕКСТЕ ПОИСКА НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОСТИ МИОМЕТРИЯ

В наше время многие женщины имеют осложнения родов из-за слабой родовой деятельности, что часто угрожает как матери, так и ребенку. С другой стороны, не решена проблема предотвращения и терапии преждевременных сокращений матки. В предлагаемой работе рассмотрено влияние ионных каналов как конечных эффекторов регуляторных каскадов на сократимость миометрия. Исследовано участие TRPC4, TRPV4 и BKCa ионных каналов в сократимости миометрия с учетом того, что изменение ионных проводимостей в плазматической мембране регулирует спонтанные и агонист-индуцированные сокращения. На препаратах миометрия беременных крыс с применением тензометрического метода регистрировали амплитуду силы сокращений в условиях активации указанных ионных каналов их селективными агонистами. Полученные результаты позволили рассматривать (-)-енглерин А как стимулятор сокращений матки в случае недостаточного ответа на окситоцин, поскольку он в концентрации 1 нМ вызывал значимое увеличение силы сокращений, которые статистически не отличались от показателей при действии окситоцина или карбахолина. Применение агониста в концентрациях 30–100 нМ вызывало некоторое угнетение сократимости. Исходя из полученных результатов исследования роли TRPV4 каналов, а именно уменьшения силы сокращений гладких мышц матки в ответ на применение селективного агониста GSK1016790A (0,3 мкМ), авторы предположили, что главный эффект активации этого канала зависит от экспрессии и активности расположенных рядом кальций-зависимых калиевых каналов. Было обнаружено, что применение липосомальной формы кверцетина для активации BKCa каналов подавляет возбудимость клеток миометрия эффективнее, чем это соединение, растворенное в DMSO, что является перспективным для коррекции преждевременной или патологически частой активности матки.

Ключевые слова: сокращение матки; окситоцин; TRPC4; TRPV4; BKCa ионные каналы.

V. Tararina, stud.,
I. Sukha, stud.,
R. Lavryk, stud.,
O. Artemenko, PhD,
O. Moroz, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ION CHANNELS IN A CONTEXT OF THE DEVELOPMENT OF NEW MOLECULAR TARGETS FOR REGULATION OF UTERINE CONTRACTIONS

Many women now have complications in childbirth due to poor labor, which often threatens both mother and fetus. Also, the problem of prevention and treatment of premature uterine contractions is unresolved. Therefore, in this work we investigated the influence of ion channels as the end stage effectors of the regulatory cascades in the contractility of myometrium. To better understand the participation of TRPC4, TRPV4 and BKCa ion channels in myometrial contractility, we conducted experiments, keeping in mind the fact that changes in ionic conductivity of the plasma membrane regulate spontaneous and agonist-induced contractions. On the myometrial preparations of pregnant rats using isolated tissue tensiometry, the amplitude of contractile force was recorded under the activation of these ion channels by their selective agonists. Obtained results allow us to consider (-) – englerin A as a way to stimulate uterine contractions in case of insufficient response to oxytocin, because at a concentration of 1 nM a significant increase in contraction force was developed and did not differ statistically from the response to oxytocin or carbacholin. The use of an agonist at concentrations of 30–100 nM causes some suppression of contractility. Based on the results describing the role of TRPV4 channels, namely the reduction of uterine smooth muscle contractions in response to their selective agonist GSK1016790A administration, we suggest that the main effect of activation of these channels depends on the expression and activity of adjacent calcium-dependent potassium channels. Our experiments found that the use of the liposomal form of quercetin to activate BKCa channels inhibits the excitability of myometrial cells more effectively than that dissolved in DMSO, which is promising for the correction of premature or excessive uterine activity.

Keywords: uterine contractions, oxytocin, TRPC4; TRPV4; BKCa ion channels.

УДК 582.261/.279, 579.6
DOI 10.17724/1728_2748.2020.83.29-32

В. Петльована, канд. біол. наук,
Чен МінЛей, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОЧИЩЕННЯ КУЛЬТУР МІКРОВОДОРОСТЕЙ КОЛЕКЦІЇ АСКУ ВІД ГРИБНИХ КОНТАМІНАНТІВ

Роботу присвячено підбору оптимальних методів очищення штамів мікроводоростей із колекції АСКУ (Algae Culture Collection of Kyiv University) від контамінації мікроскопічними грибами.

Проведено скринінг колекції культур мікроводоростей АСКУ. Виявлено контамінацію деяких штамів мікроводоростей грибами родів *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees та *Monilia* Bonord. Для експерименту відібрано штами АСКУ 139-02 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell), АСКУ 293-04 (*Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko), АСКУ 364-04 (cf. *Chlorosarcinopsis dissociata* Herndon), АСКУ 599-06 (*Klebsormidium nitens* Menegh. in Kütz. 1849), АСКУ 600-06 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell) та АСКУ 1056 (*Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew.). Досліджено вплив карбендазиму (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate), Antibiotic Antimycotic Solution (пеніцилін – 10 000 МО, стрептомицин – 10 мг, амфотерицин В – 25 мкг) та Nuosept ВМС 422 на гриби-контаміанти штамів культур зелених водоростей із різним типом морфологічної структури талому (кокоїдні та нитчасті). Експериментальні концентрації речовин: карбендазим – 0,005 %, Antibiotic Antimycotic Solution – 1 %, Nuosept ВМС 422 – 0,05 % та 0,2 %. Показано, що Antibiotic Antimycotic Solution та Nuosept ВМС-422 у заявлених концентраціях виявилися не ефективними для очищення штамів зелених водоростей від значного забруднення мікроскопічними грибами. Установлено, що розчин карбендазиму є ефективним при очищенні штамів кокоїдних зелених водоростей від контамінації мікроскопічними грибами *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries). У результаті для штаму АСКУ № 293-04 (*A. obliquus*) було отримано аксентичну культуру.

Ключові слова: штам, АСКУ, культивування, мікроскопічні зелені водорості, Chlorophyta, контамінація, карбендазим, Antibiotic Antimycotic Solution, Nuosept ВМС 422.

Вступ. Поширення мікроскопічних водоростей у природі та їхнє значення для людства важко переоцінити. Культивування мікроводоростей – сучасна та перспективна галузь біотехнології. Попит на промислове культивування водоростей наразі збільшується із різних причин. Зокрема, мікроскопічні водорості використовують для виробництва біопалива, кормів для тварин, продуктів харчування, а також у косметологічній і фармацевтичній галузях. У біотехнологічних процесах приділяється увага функціональній активності фотосинтетичного апарату, дослідженням фізіолого-біохімічних і генетичних характеристик культур, пошуку нових перспективних штамів тощо [2], [5], [3]. У зв'язку із цим важливого значення набуває збереження існуючих і створення нових колекцій живих культур мікроводоростей як генетичних банків потенційно перспективних штамів. Важливим завданням при роботі з колекціями водоростей є постійне вдосконалення методів підтримання в культурі та збереження генофонду мікроводоростей, оцінка їх життєздатності, забезпечення сталості морфологічних параметрів і стабільності біохімічних компонентів [4].

Основою для проведення оригінальних досліджень є колекція культур мікроводоростей Київського національного університету імені Тараса Шевченка (офіційний акронім: АСКУ, від Algae Culture Collection of Kyiv University), що призначена для збереження представлених у ній мікроскопічних водоростей як матеріалу для забезпечення науково-дослідної роботи та навчального процесу. Основу АСКУ становлять штами, що були

ізолювані з наземних і прісноводних біотопів. На сьогодні колекція АСКУ об'єднує більше 1000 штамів (включаючи близько 300 автентичних), що належать переважно до відділів Chlorophyta та Xanthophyta [1].

Великою проблемою вирощування та підтримання в культурі мікроскопічних водоростей є контамінація штамів водоростей бактеріями та грибами. Серед прийнятих методів очищення культур від контамінантів різної природи наразі використовують: 1) серійне пересівання, 2) послідовну зміну фази поживного середовища (рідке/агаризоване), 3) центрифугування, 4) додавання в середовище бактерицидних або фунгіцидних речовин.

Особливою проблемою при культивуванні та зберіганні штамів мікроводоростей є забруднення грибами, що пов'язано з їх біологічними особливостями. Дослідження, що представлені у нашій роботі, присвячені саме очищенню штамів водоростей від мікроскопічних грибів-контамінантів за допомогою фунгіцидів.

Мета роботи: оптимізація методів очищення штамів мікроводоростей від контамінування грибами за рахунок використання фунгіцидних і бактерицидних речовин.

Матеріали та методи. Для дослідження з колекції АСКУ було обрано шість штамів мікроводоростей, що належать до відділу Chlorophyta (табл. 1). Відбір здійснювали після візуального обстеження колекції на наявність грибних контамінантів. Обрані екземпляри штамів зазнали значного впливу забруднення грибами з родів *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees, *Monilia* Bonord. та ін.

Таблиця 1. Перелік штамів, використаних для дослідження

Штам	Вид	Тип будови талому	Контамінант
АСКУ 139-02	<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell 1972	нитчастий	<i>Cladosporium</i> sp.
АСКУ 293-04	<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kütz. 1833 (= <i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) P. Tsarenko et Petlovany 2001)	кокоїдний	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries 1952
АСКУ 364-04	cf. <i>Chlorosarcinopsis dissociata</i> Herndon 1958	кокоїдний	<i>Alternaria</i> sp.
АСКУ 599-06	<i>Klebsormidium nitens</i> Menegh. in Kütz. 1849	нитчастий	не ідентифікований
АСКУ 600-06	<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell 1972	нитчастий	не ідентифікований
АСКУ 1056	<i>Scenedesmus quadricornis</i> Chodat 1913 (= <i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchn.) E. Hegew. 2000)	кокоїдний	<i>Moniliacandida</i> Pers. 1801
Примітка: <i>Acutodesmus obliquus</i> та <i>Desmodesmus abundans</i> у природних умовах представлені ценобіями, що зазвичай складаються із чотирьох клітин (рідко двох або восьми), проте в умовах культури часто представлені одноклітинними формами (особливо на агаризованому середовищі).			

Для проведення досліджень були використані такі препарати:

- Карбендазим [Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate] / (C₉H₉N₃O₂) – системний фунгіцид із класу бензимидазолів, один із перших системних фунгіцидів, що широко використовуються в аграрній промисловості. Ефективність цієї речовини для видалення грибів раніше була вивчена на прикладі культури зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang. [4]. Препарат використовували у концентрації 0,005 %.

- Antibiotic Antimycotic Solution (x100) – AAS (склад на 1 мл: пеніциліну – 10 000 МО, стрептоміцину – 10 мг, амфотерицину В – 25 мкг) – комплексний антибіотичний та антимікотичний розчин, що використовується як добавка в різних типах клітинних культуральних середовищ. Використовували препарат у концентрації 1 %.

- Nuosept ВМс 422 – біоцид широкого спектра дії, що використовується як консервант при виготовленні лакофарбової продукції. Використовували у двох концентраціях – 0,05 % та 0,2%.

Дослідження проводили з використанням агаризованого стандартного середовища Болда (Bold Basal Medium, 1N BBM) для контрольного варіанта та із додаванням одного із зазначених препаратів у відповідній концентрації для експериментальних варіантів (усього чотири модифікації + контроль). Метод посіву – штриховий, повторність – трикратна. Культивування здійснювали у чашках Петрі, у люміностаці з люмінесцентними лампами ЛБ-40 із 12-годинними періодами освітлення та затемнення за температури 18–22 °С. Дослідження проводили впродовж 12 діб. Після першого пересіву щодня проводили візуальний контроль розвитку водоростей та контамінантів і кожні чотири доби з кожного штриха відбирали візуально більш-менш чисті від контамінантів ділянки розростання водоростевих клітин і переносили їх на свіже поживне середовище відповідного складу. Усього було проведено три пасажі. Загальна схема експерименту представлена на рис. 1.

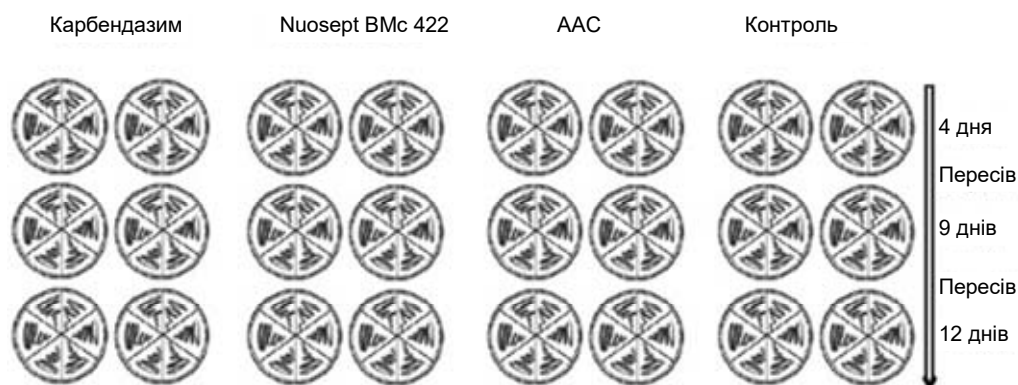


Рис. 1. Схема експерименту

Результати та їх обговорення. За чотири дні після першого пасажу на середовищі з додаванням карбендазиму у досліджуваних штамів візуально не спостерігалось значних змін за кількістю грибних контамінантів порівняно із контролем (рис. 2: 1-6). Виняток становив лише штам АСКУ 293-04. Скоріш за все, такий результат зумовлений методом посіву та типом морфологічної структури талому мікроводорості *Acutodesmus obliquus*. Зазвичай за умов тривалого культивування ценобіальні кокоїдні індивіди переходять до одноклітинної форми, що краще проявляється на твердому (агаризованому) середовищі. Такі форми легше розсіваються та приживаються на новому середовищі, формуючи окремі ізольовані пляшки. Вони майже не пошкоджуються механічно під час пересіву, а також мають меншу ймовірність зберегти супутні забруднювачі під час пересіву, ніж нитчасті форми.

Видимі зміни дії карбендазиму для решти штамів (АСКУ 139-02, АСКУ 364-04, АСКУ 599-06, АСКУ 600-06, АСКУ 1056) спостерігалися на восьму добу експерименту (четверта доба після другого пасажу): ріст водоростей і грибів сповільнився, кількість контамінантів зменшилася. Для АСКУ 293-04 (*Acutodesmus obliquus*) зазначено збільшення біомаси водоростей без видимих ознак контамінації.

На дванадцяту добу експерименту (четверта доба після третього пасажу) на середовищі з додаванням

карбендазиму ріст п'яти з досліджуваних штамів водоростей припинився, хоча рівень контамінації майже не зменшився порівняно з другим пасажем (рис. 2: 7). Штам АСКУ 293-04 очистився від забруднення грибами без втрати здатності до росту (рис. 2: 8).

Використання ААС та Nuosept ВМс-422 не принесло очікуваних результатів. Після першого пасажу на середовищі з додаванням ААС контамінація не зменшилась, а ріст водоростей був значно меншим порівняно з контролем. У наступних пасажах ця тенденція зберігалась. На 12 день ріст водоростей припинився, що, вірогідно, пов'язано із бактерицидною дією окремих компонентів препарату, які пригнічують розвиток супутніх бактерій, що притаманні для певних видів водоростей і стимулюють їхній ріст. Саме тому більшість штамів культур мікроводоростей у різних світових колекціях не є аксеничними, що спрощує їх культивування.

Ріст водоростей і грибів на середовищі з додаванням Nuosept ВМс-422 не спостерігався вже після першого пасажу. Дія цього препарату була не вибірковою: на рівні із фунгіцидною та бактерицидною дією спостерігався й негативний вплив на самі водорості, що унеможливило його використання для деконтамінації штамів мікроводоростей у межах зазначених виробничих концентрацій.

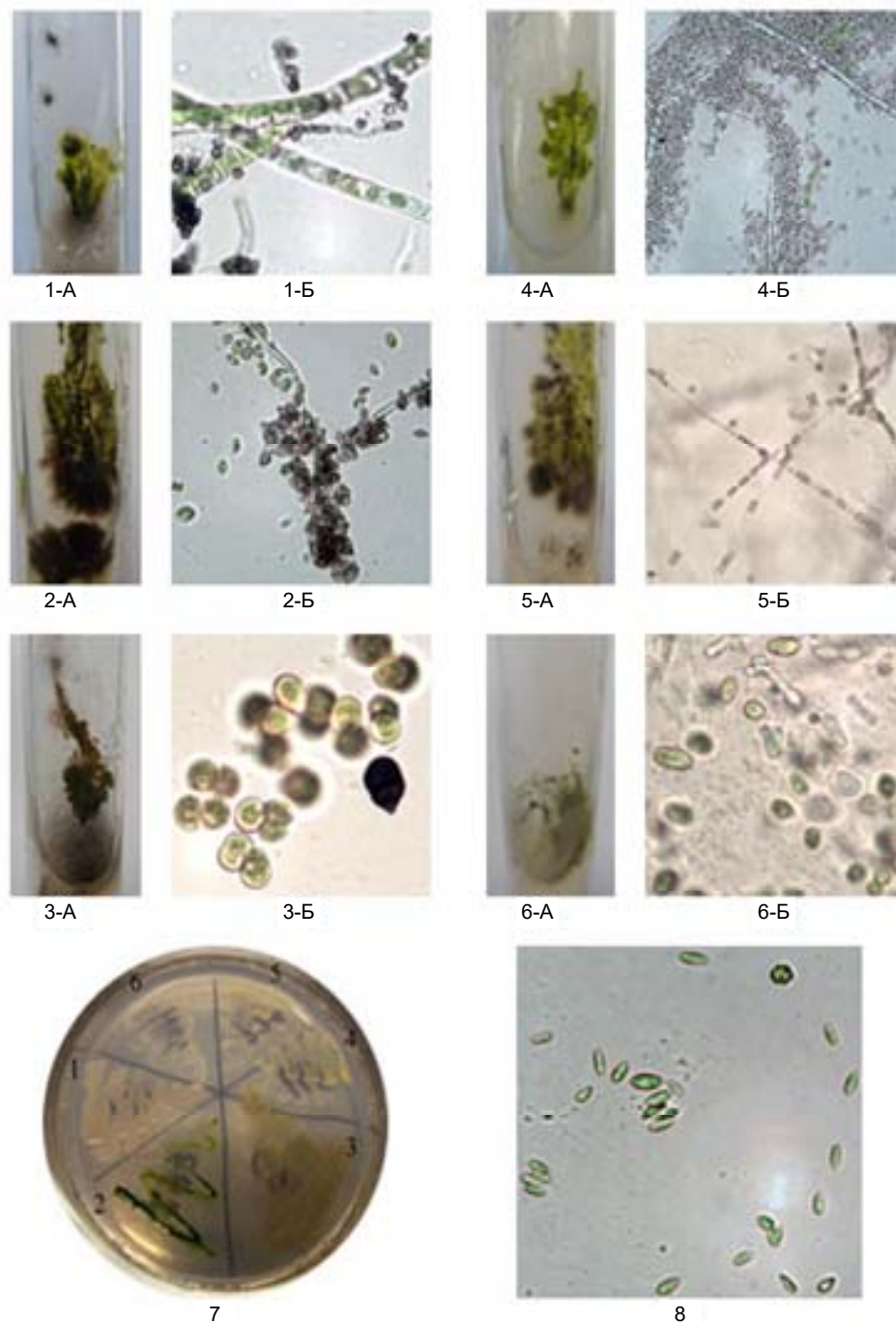


Рис. 2. Штами колекції мікроводоростей АСКУ. 1 – АСКУ 139-02, 2 – АСКУ 293-04, 3 – АСКУ 364-04, 4 – АСКУ 599-06, 5 – АСКУ 600-06, 6 – АСКУ 1056, 7 – дія карбендазиму на 12 добу культивування (чашка Петрі, агаризоване середовище), 8 – штам АСКУ 293-04 після очищення карбендазимом (*Acutodesmus obliquus*). А – колекційний штам (одиниця зберігання), Б – зовнішній вигляд водоростевих клітин із супутніми контамінантами

Зазначимо, що найбільш поширеними контамінантами колекційних культур мікроводоростей є гриби. Для дослідження нами були обрані саме контаміновані грибами зразки штамів мікроводоростей із колекції культур мікроводоростей Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а препарати, дія яких вивчалася, мали практично доведену фунгіцидну дію. Проте ефективність рекомендованих виробниками доз для деконтамінації грибів при вирощуванні штамів мікроводоростей виявилася неоднозначною, оскільки не завжди відповідала поставленим завданням, а отже, потребує подальшого уточнення.

Висновки. Серед досліджених препаратів найефективнішим виявився карбендазим. Завдяки застосуван-

ню препарату карбендазиму в концентрації 0,005 % була отримана чиста культура штаму АСКУ № 293-04 (*Acutodesmus obliquus*), яка була очищена від контамінанту *Cladosporium cladosporioides*. Установлено, що препарат Nuosept ВМс-422 у рекомендованих виробником концентраціях (0,05–0,2 %) є неефективним для боротьби з контамінацією грибами культур водоростей, оскільки спричинював негативний вплив на самі водорості. Препарат Antibiotic Antimycotic Solution (x100) виявився малоефективним для деконтамінації альгологічних культур, імовірно, через високий ступінь контамінації досліджуваних штамів грибами.

Список використаних джерел

1. Костіков І. Ю. Колекція культур водоростей Київського національного університету імені Тараса Григоровича Шевченка : каталог штамів (2008) / І. Ю. Костіков, Е. М. Демченко, М. А. Березовська // Чорноморськ. бот. журн. – 2009. – № 5(1). – С. 37–79.
2. Borowitzka M. A. Microalgae source of pharmaceuticals and other biologically active compounds / M. A. Borowitzka // J. Appl. Phycol. – 1995. – № 7. – P. 3–15.
3. Selection, breeding and engineering of micro algae for bioenergy and biofuel production / A. W. Larkum, I. L. Ross, O. Kruse, B. Hankamer // Trends Biotechnol. – 2012. – № 30. – P. 198–205.
4. Mahan K. M. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures / K. M. Mahan, O. W. Odom, D. L. Herrin // Biotechniques. – 2005. – № 39. – P. 457–458.
5. Wasanasathian A. Algal photobioreactor for production of lutein and zeaxanthin / A. Wasanasathian, C. A. Peng // Shang-Tian Yang editor. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Elsevier. – 2007. – P. 491–505.

Reference

1. Kostikov I.Yu., Demchenko E.M., Berzovska M.A. Kolektsiia kultur vodorostei Kyivskoho natsionalnogo universytetu imeni Tarasa Hryhorovy-

cha Shevchenka. Kataloh shtamiv (2008 r). //Chornomorsk. bot. zhurn. 2009; 5 (1): 37-79.

2. Borowitzka M.A. Micro algae source of pharmaceuticals and other biologically active compounds // J. Appl. Phycol. 1995; 7: 3-15.
3. Larkum A.W., Ross I.L., Kruse O., Hankamer B. Selection, breeding and engineering of micro algae for bioenergy and biofuel production. Trends Biotechnol. 2012; 30: 198-205.
4. Mahan, K.M., Odom O.W., Herrin D.L. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. Biotechniques. 2005; 39:457-458.
5. Wasanasathian A., Peng C.A. Algal photobioreactor for production of lutein and zeaxanthin. In: Shang-Tian Yang editor. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Elsevier. – 2007. p. 491-505.

Надійшла до редколегії 2.10.2020

Отримано виправлений варіант 2.11.2020

Підписано до друку 2.11.2020

Received in the editorial 2.10.2020

Received a revised version on 2.11.2020

Signed in the press on 2.11.2020

В. Петлевана, канд. биол. наук,
Чен Минлей, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОЧИСТКА КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КОЛЛЕКЦИИ АСКУ ОТ ГРИБНЫХ КОНТАМИНАНТОВ

Работа посвящена подбору оптимальных методов очистки штаммов микроводорослей из коллекции АСКУ (Algae Culture Collection of Kyiv University) от загрязнения микроскопическими грибами. Проведен скрининг коллекции культур микроводорослей АСКУ. Выявлена контаминация некоторых штаммов микроводорослей грибами родов *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees и *Monilia* Bonord. Для эксперимента были отобраны штаммы АСКУ 139-02 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell), АСКУ 293-04 (*Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko), АСКУ 364-04 (cf. *Chlorosarcinopsis dissociata* Herndon), АСКУ 599-06 (*Klebsormidium nitens* Menegh. in Kützing), АСКУ 600-06 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell) и АСКУ 1056 (*Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew.). Исследовано влияние карбендазима (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate), Antibiotic Antimycotic Solution (пенициллин – 10000 МЕ, стрептомицин – 10 мг, амфотерицин В – 25 мкг) и Nuosept ВМС 422 на грибы-контаминанты штаммов культур зеленых водорослей с разным типом морфологической структуры таллома (коккоидные и нитчатые). Экспериментальные концентрации веществ: карбендазим – 0,005 %, Antibiotic Antimycotic Solution – 1 %, Nuosept ВМС 422 – 0,05 и 0,2 %. Показано, что Antibiotic Antimycotic Solution и Nuosept ВМС-422 в заявленных концентрациях оказались неэффективными для очистки штаммов зеленых водорослей от значительного загрязнения микроскопическими грибами. Установлено, что раствор карбендазима эффективен при очистке штаммов коккоидных зеленых водорослей от загрязнения микроскопическими грибами *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries). В результате для штамма АСКУ № 293-04 (*A. obliquus*) была получена аксеническая культура.

Ключевые слова: штамм, АСКУ, культивирование, микроскопические зеленые водоросли, Chlorophyta, контаминация, карбендазим, Antibiotic Antimycotic Solution, Nuosept ВМС 422.

V. Petlyovana, PhD,
Chen Minglei, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PURIFICATION OF MICROALGAE CROPS OF ACKU COLLECTION FROM MUSHROOM CONTAMINANTS

The work is focused to the selection of the best purification methods of microalgae strains from ACKU collection (Algae Culture Collection of Kyiv University) from contamination by microscopic fungi.

The screening of microalgae culture collection ACKU (Algae Culture Collection of Kyiv University) is deal. Contamination of some microalgae strains by fungi of *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees, and *Monilia* Bonord genera was detected. The following strains were selected for the experiment: ACKU 139-02 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell), ACKU 293-04 (*Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko), ACKU 364-04 (cf. *Chlorosarcinopsis dissociata* Herndon), ACKU 599-06 (*Klebsormidium nitens* Menegh. in Kützing), ACKU 600-06 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell) and ACKU 1056 (*Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew.). The effect of carbendazim (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate), Antibiotic Antimycotic Solution (penicillin – 10,000 IU, streptomycin – 10 mg, amphotericin B – 25 µg) and Nuosept ВМС 422 on fungi-contaminants of green algal culture strains with different morphological structure (coccoid and filamentous) was studied. Experimental concentrations of substances: carbendazim – 0.005%, Antibiotic Antimycotic Solution – 1%, Nuosept ВМС 422 – 0.05% and 0.2%. Was shown that Antibiotic-Antimycotic Solution and Nuosept ВМС-422 at the selected concentrations were not effective for purifying of green algae strains from significant contamination by microscopic fungi. It was found that the carbendazim solution is effective in the purification of coccoid green algae strains from contamination by microscopic fungi *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries). As a result, an axenic culture was obtained for the ACKU strain No.293-04 (*A. obliquus*).

Keywords: strain, ACKU, cultivation, microscopic green algae, Chlorophyta, contamination, Carbendazim, Antibiotic Antimycotic Solution, Nuosept ВМС 422.

УДК 595.44(477)

DOI 10.17724/1728_2748.2020.83.33-37

Є. Гриник, експерт із лісового напрямку
ГО "Українська природоохоронна група", Київ, Україна,
Є. Сінгаєвський, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПАВУКИ (ARACHNIDA, ARANEI) ЛАНДШАФТНОГО ЗАКАЗНИКА "ЯХНІВСЬКИЙ" (КИЇВСЬКА ОБЛАСТЬ)

Уперше досліджено видовий склад і відносну чисельність павуків соснового та вільхового лісу в межах заказника "Яхнівський". Виявлено 46 видів павуків із 17 родин. Установлено, що кількісно в сосновому лісі переважають павуки родин *Linyphiidae* (43,4 %) та *Araneidae* (42,9 %), а у вільховому – *Tetragnathidae* (37 %) та *Linyphiidae* (34 %). У трав'яному ярусі соснового лісу кількісно домінували *Araneidae*, у підстилці – *Linyphiidae* (91 %). У трав'яному ярусі вільхового лісу кількісно домінували *Tetragnathidae* (34 %), а у підстилці – *Linyphiidae* та *Tetragnathidae*, відповідно 32 та 43 %. Виявлено домінуючі види для трав'яного та підстилкового ярусів (за шкалою Тішлера): у сосновому лісі – *Mangora acalypha* (48,6 %), *Linyphia triangularis* (18,85 %) та *Leptothrix hardyi* (89 %); у вільховому – *Linyphia triangularis* (24,1 %), *Metellina segmentata* (23 %), *Tetragnatha pinicola* (18,8 %) та *Piratula hygrophila* (38,5 %) і *Pachygnatha listeri* (19,2 %), відповідно до ярусів. Виявлено дев'ять видів павуків, з яких: п'ять видів – *Agroeca cuprea* (родина *Liocranidae*), *Bathypantes nigrinus*, *Dicymbium nigrum*, *Floronina bucculenta* та *Neriene montana* (родина *Linyphiidae*), які вказуються вперше для території Київського Полісся, і чотири види – уперше для Українського Полісся – *Cheiracanthium elegans* (родина *Cheiracanthidae*), *Leptothrix hardyi*, *Sintula spiniger* та *Walckenaeria alticeps* (родина *Linyphiidae*). Для цих видів наведено дані із фауністичного матеріалу, місць і методу збирання, поширення та екології. За даними власних досліджень і літературними джерелами територія Київського Полісся наразі включає 150 видів павуків. Обраховано індекси фауністичної подібності та видового різноманіття, проведено ареалогічний аналіз.

Ключові слова: павуки, фауна, видове різноманіття, нові знахідки, Київська область, Київське Полісся, ландшафтний заказник "Яхнівський".

Вступ. За останніми даними для фауни України вказано 997 видів павуків [8]. Однак дослідження території України мають вельми мозаїчний характер, тому певні регіони потребують ґрунтовних системних досліджень для заповнення "білих плям". Одним із таких регіонів є Київське Полісся. Останні спроби створення списку видів для цього регіону здійснювалися К. В. Євтушенком на початку 90-х років минулого сторіччя [2, 3]. Стараннями автора було виявлено 141 вид, що втричі більше, ніж було відомо раніше [4]. Фауна регіону потребує подальших досліджень та інвентаризації і доповнення регіонального видового списку. Особливо актуальними є фауністичні дослідження біоти об'єктів природно-заповідного фонду територій регіону, адже об'єкти ПЗФ часто можуть містити потенційні знахідки нових або регіонально рідкісних видів. До таких об'єктів, зокрема, належить ландшафтний заказник місцевого значення "Яхнівський". Отримані під час досліджень дані можуть бути використані при складанні чи доповненні вже існуючих регіональних фауністичних списків і кадастрів.

Метою дослідження є вивчення видового складу павуків заказника "Яхнівський", визначення структури домінування в угрупованнях павуків, порівняння видового складу угруповань павуків досліджених біотопів за індексом фауністичної подібності та індексом різноманіття.

Об'єкти та методи досліджень. Ландшафтний заказник місцевого значення "Яхнівський" знаходиться в межах Кухарівського лісництва ДП "Тетерівський лісгосп" у адміністративних межах Кухарської сільської ради Іванківського району та займає площу в 426 га. Рослинність території представлена мішаним, переважно пристигаючим і стиглим деревостаном, який утворений сосною звичайною (*Pinus sylvestris*), дубом черешчатим (*Quercus robur*), березою бородавчатою (*Betula pendula*). Найбільшу цінність представляють хвойно-дубові ліси з домінуванням ялівцю звичайного (*Juniperus communis*) віком 100–130 років. Територіально об'єкт розміщується вздовж р. Тетерів і відіграє важливу роль у регіональній схемі екологічної мережі як частина екологічного коридору вздовж усього русла цієї ріки [1].

Фауністичний матеріал зібрано під час польових виїздів у вересні – жовтні 2016 р. Досліджено два типи

біотопів: сосновий та вільховий ліси. При цьому застосовано стандартні методики: ручний збір за допомогою ексаустера, косіння стандартним ентомологічним сачком і ґрунтові пастки Барбера [5]. Обстежено: поверхню ґрунту та підстилку, трав'яний ярус, крону і поверхню стовбурів кущів та дерев, а також шпалери під відставою корою. Відібраний матеріал фіксували і зберігали в 70 %-му розчині етилового спирту. Усього зібрано й оброблено близько 650 екземплярів павуків. Матеріал зберігається на кафедрі екології та зоології Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для визначення таксономічної приналежності павуків використовували вітчизняні [6] та зарубіжні визначники [7]. Визначали павуків за допомогою стереоскопічного мікроскопу МБС-10. Матеріал у процесі визначення поміщали в чашку Петрі, наповнену гліцирином. Для порівняння видових угруповань павуків біотопів різних типів використано індекс фауністичної подібності Чекановського – Серенсена (Ics). Для оцінки біорізноманіття досліджених біотопів використано індекс біорізноманіття Шеннона. Використано класифікацію домінантності Т. Тішлера за ступенем представленості в матеріалі статевозрілих особин того чи іншого виду. Ми використовували такі категорії: 2,5–5 % – субдомінанти, 5–10 % – домінанти, > 10 % – еудомінанти [5].

Результати та їх обговорення. У результаті досліджень на території заказника "Яхнівський" уперше виявлено 46 видів павуків із 17 родин, що відповідає 32,6 % від загальної кількості видів Київського Полісся та 4,6 % від загальної кількості видів, зазначених на території України. У ході досліджень було виявлено 9 видів павуків, що вказуються вперше для території Київського Полісся (у табл. 1 позначені *). До них належать чотири види, що вказуються вперше для Українського Полісся (позначені **): *Cheiracanthium elegans* з родини *Cheiracanthidae*; *Leptothrix hardyi*, *Sintula spiniger* та *Walckenaeria alticeps* (належать до родини *Linyphiidae*). Загалом, з урахуванням результатів наших досліджень, список павуків Київського Полісся нараховує 150 видів.

Для видів, уперше зазначених для Київського та Українського Полісся загалом, наводимо дані щодо фауністичного матеріалу, дат, місць і способу збирання, поширення та деяких екологічних особливостей (за літературними джерелами).

Agroeca cuprea (Menge, 1873). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: ♂, сосновий ліс, чотири пастки Барбера, 30.09–04.11.2016. Поширення: Європа, Центральна Азія. Примітки: герпетобіонт, звичайний вид, поширений у степах та сухих лісах; за даними по Центральній Європі статевозрілі особини зустрічаються протягом року [7]. Раніше зазначений у біотопах Чернігівського Полісся [4]. Уперше вказується для території Київського Полісся.

Bathypantes nigrinus (Westring, 1851). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: ♂, 3 juv., вільховий ліс, трав'яний ярус, косіння ентомологічним сачком, 500 помахів, 14.09.2016. Поширення: Палеарктика. Примітки: герпетобіонт, хортобіонт, рідкісний вид, зустрічається у вологих і темних місцях, часто в заболочених лісах; за даними по Центральній Європі статевозрілі особини активні протягом року [7]. Раніше зазначений у біотопах Чернігівського, Волинського (дубовий ліс) та Новгород-Сіверського Полісся (мішаний і березовий ліси) [4]. Уперше вказується для Київського Полісся.

Cheiracanthium elegans (Thorell, 1875). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: ♀, сосновий ліс, трав'яний ярус, косіння ентомологічним сачком, 500 помахів, 14.09.2016. Поширення: Європа та Центральна Азія. Примітки: хортобіонт, рідкісний вид, зустрічається на сухих відкритих ділянках у кущах чи іншій рослинності; за даними по Центральній Європі статевозрілі особини зустрічаються протягом червня [7]. Уперше вказується для території Українського Полісся.

Dicymbium nigrum (Blackwall, 1834). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: ♂, вільховий ліс, чотири пастки Барбера, 14–30.09.2016. Поширення: Палеарктика. Примітки: герпетобіонт, надзвичайно рідкісний вид, зустрічається по краю лісів та у луках; за даними по Центральній Європі статевозрілі особини зустрічаються весною та восени [7]. Раніше зазначений у біотопах Чернігівського, Волинського (луки) та Новгород-Сіверського Полісся (сосновий ліс та агроценози) [4]. Уперше вказується для Київського Полісся.

Floronia bucculenta (Clerck, 1757). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: 2♀♀, вільховий ліс, трав'яний ярус, косіння ентомологічним сачком, 500 помахів, 14.09.2016. Поширення: Європа, Росія. Примітки: хортобіонт, надзвичайно рідкісний вид, зустрічається на низькій рослинності у вологих ділянках лісу; за даними по Центральній Європі – літній вид [7]. Раніше зазначений у біотопах Волинського (луки, болота) та Чернігівського Полісся [4]. Уперше вказується для Київського Полісся.

Leptothrix hardyi (Blackwall, 1850). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: 2♀♀, 4♂♂, сосновий ліс, чотири пастки Барбера, 14–30.09.2016; 21♀♀, 22♂♂, сосновий ліс, чотири пастки Барбера, 30.09–04.11.2016. Поширення: Палеарктика. Примітки: герпетобіонт, надзвичайно рідкісний вид, зустрічається на моху в сухих лісах; за даними по Центральній Європі – осінньо-зимовий вид [7]. Уперше вказується для території Українського Полісся.

Nerene montana (Clerck, 1757). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: 3♀♀, вільховий ліс, косіння ентомологічним сачком, 500 помахів, 14.09.2016. Поширення: Голарктика. Примітки: тамнобіонт, дендробіонт, рідкісний вид; за даними по Центральній Європі – весняно-літній вид [7]. Раніше зазначений у біотопах Чернігівського, Волинського (дубовий ліс) та Новгород-Сіверського Полісся (луки) [4]. Уперше вказується для території Київського Полісся.

Sintula spiniger (Balogh, 1935). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: ♂, сосновий ліс,

чотири пастки Барбера, 30.09–04.11.2016. Поширення: Центральна та Східна Європа. Примітки: герпетобіонт, звичайний вид, зустрічається в опалому листі у листяних лісах; за даними по Центральній Європі – осінній вид [7]. Уперше вказується для території Українського Полісся.

Walckenaeria alticeps (Denis, 1952). Матеріал: Україна, Київська область, Іванківський район: ♂, вільховий ліс, чотири пастки Барбера, 14–30.09.2016. Поширення: Європа, Центральна Азія. Примітки: герпетобіонт, звичайний вид, часто зустрічається у вологих та затінених лісах; за даними по Центральній Європі – весняно-осінній вид [7]. Уперше вказується для території Українського Полісся.

Кількісна представленість різних родин павуків неоднакова і залежить від умов біотопу. У біотопі соснового лісу найбільш представленими є дві родини: Araneidae (42,9 % від загальної кількості зібраних екземплярів павуків) та Linyphiidae (43,4 %). При цьому більшу частину населення трав'яного ярусу становили Araneidae (58 % проти 22 % Linyphiidae), тоді як 91 % представників підстилкового ярусу належали до родини Linyphiidae. Зазначені тут види з даних родин надають перевагу сухим і помірно вологим умовам перебування, які спостерігаються у світлих соснових лісах.

У біотопі вільхового лісу переважали дві родини: Tetragnathidae та Linyphiidae, що представлені 36,4 та 38 % знайдених видів, відповідно. Цікаво, що більша частина зібраних тетрагнатид припала на два види, які виявилися еудомінантами: *Metellina segmentata* (19,5 %) і *Tetragnatha pinicola* (16 % від зібраних екземплярів павуків). У герпетобії вільхового лісу переважали лініфіїди та тетрагнати (32 та 42 %, відповідно), також у хортобії домінуючими групами виявилися представники родини Tetragnathidae (34 %).

За шкалою Тішлера визначено види-домінанти в досліджуваних біотопах. У хортобії соснового лісу розподіл виявився таким: еудомінантами стали два види – *Mangora acalypha* (48,6 %) та *Linyphia triangularis* (18,85 %). До субдомінантів належать *Agalenatheia redii* (2,86 %), *Cyclosa conica* (4,57 %) та *Stemonyphantes lineatus* (3,43 %). У герпетобії видом-еудомінантом став *Leptothrix hardyi* (більше 89 % екземплярів у зібраному фауністичному матеріалі). Більшість із цих видів тяжіє до сухих, добре освітлених, переважно помірно вологих умов соснових лісів.

У хортобії вільшаника еудомінантами виявилися *L. triangularis*, *M. segmentata* та *T. pinicola*, частка яких у загальному обсязі становила 24,1, 23,0 та 18,8 %, відповідно. Види-субдомінанти були представлені у зборах лише ювенільними особинами, що ускладнило їхню визначення до виду. У герпетобії еудомінантами виявилися вологолюбні види, які тяжіють до затінених місць існування та близькості води – це *Piratula hygrophila* та *Pachygnatha listeri*, частка яких становила 38,5 та 19,2 %, відповідно.

Розрахунок індексу подібності або індексу Чекановського – Серенсена дав такі результати. Якщо розраховані значення індексу фауністичної подібності Чекановського – Серенсена (I_{cs}) < 0,5, то це вказує на низьку спорідненість угруповань павуків порівнюваних біотопів. Якщо значення I_{cs} = 0,5, то спорідненість середня, а за значення I_{cs} > 0,5 спорідненість угруповань висока. Загальний індекс подібності, який був розрахований на основі всіх отриманих даних для обох ярусів, становив 0,38, що вказує на невисоку подібність угруповань павуків соснового та вільхового лісів. Цікаво, що для павуків герпетобію обох біотопів I_{cs} становить 0,5, тоді як для хортобію це значення набагато нижче – 0,13. Відмінності у видовому складі

обох біотопів залежать від наявності частки спеціалізованих видів, які тяжіють до гігрофітних умов вільшаника або ксерофітних умов соснового лісу.

Розрахунок індексу біорізноманіття Шеннона показав такі значення: індекс різноманіття аранеофауни соснового лісу становив $3,258 \pm 207$ біт, для вільхового лісу – відповідно $3,584 \pm 403$ біт. Ці показники свідчать про доволі високий рівень біорізноманіття фауни павуків заказника "Яхнівський".

Спільними для біотопів соснового та вільхового лісів виявились 13 видів. В обох біотопах еудомінантом був широко розповсюджений вид *L. triangularis*. Решта видів представлені у ранзі субдомінантів чи нижче: *S. lineatus* (родина Linyphiidae), *Araneus* sp., *Gibbaranea bituberculata* (родина Araneidae), *Alopecosa* sp. (родина Lycosidae), *Dolomedes* sp., *Pisaura* sp. (родина Pisauridae), *Anyphaena accentuata* (родина Anyphaenidae), *Clubiona* sp. (родина Clubionidae), *Philodromus* sp. (родина Philodromidae), *Ebrechtella tricuspidata*, *Xysticus* sp. та *X. striatipes* (родина Thomisidae).

У біотопі соснового лісу зазначено 13 видів павуків, які не виявлені у вільховому. Серед них видо-еудомінанти *L. hardyi* та *C. conica*, *M. acalypha* (родина Linyphiidae та Araneidae). Решта видів, виявлених лише у сосновому лісі, представлені небагатьма екземплярами: *S. spiniger* (родина Linyphiidae), *A. redii*, *Araneus diadematus* (родина Araneidae), *Cheiracanthium* sp., *C. elegans* (родина Cheiracanthiidae), *A. cuprea* (родина

Liocranidae), *Zelotes* sp. *Z. subterraneus* (родина Gnaphosidae), *Tibellus oblongus* (родина Philodromidae), *Evarcha* sp. (родина Salticidae).

У біотопі вільхового лісу виявлено 23 види, які не знайдені у сосновому. Серед них два види-еудомінанти: *M. segmentata* і *T. pinicola* (родина Tetragnathidae) та субдомінант *P. hygrophila* (родина Lycosidae). Решта видів, зазначених тут, представлені незначною кількістю екземплярів: *Episus angulatus*, *Theridion varians* (родина Theridiidae), *B. nigrinus*, *Centromerus sylvaticus*, *D. nigrum*, *Erigonella* sp., *F. bucculenta*, *Helophora insignis*, *Microlinyphia* sp., *N. montana*, *Tenuiphantes* sp., *W. alticeps* (родина Linyphiidae), *P. listeri* (родина Tetragnathidae), *Cercidia prominens* (родина Araneidae), *Pardosa* sp., *Trochosa* sp. (родина Lycosidae), *Agelena labyrinthica* (родина Agelenidae), *Dictyna* sp. (родина Dictynidae), *Micrommata virescens* (родина Sparassidae), *Tmarus piger* (родина Thomisidae).

Для аранеофауни заказника "Яхнівський" проведено зоогеографічний аналіз поширення видів, класифікація ареалів відповідно до [7]. За його результатами визначили, що більшість видів, а саме 52,9 %, мають Палеарктичний ареал, 23,5 % виявлених видів поширені в Голарктиці, 14,7 % вказані для Європи та Центральної Азії. Із Європейським типом ареалу виявились 5,9 % видів і лише один вид (*Sintula spiniger*) має Центрально-Східноєвропейське поширення.

Таблиця 1. Видовий склад і відносна представленість павуків ярусів підстилки та трав'янистої рослинності соснового та вільхового лісів ландшафтного заказника "Яхнівський"

Родина	Вид	Сосновий ліс		Вільшаник	
		Екз.	%	Екз.	%
Theridiidae	<i>Episus angulatus</i> (Blackwall, 1836)	–	–	1	0,3
	<i>Theridion varians</i> (Hahn, 1833)	–	–	1	0,3
Linyphiidae	<i>*Bathyphantes nigrinus</i> (Westring, 1851)	–	–	4	1,2
	<i>Centromerus sylvaticus</i> (Blackwall, 1841)	–	–	1	0,3
	<i>*Dicymbium nigrum</i> (Blackwall, 1834)	–	–	1	0,3
	<i>Erigonella</i> sp.	–	–	1	0,3
	<i>*Floronia bucculenta</i> (Clerck, 1757)	–	–	2	0,6
	<i>Helophora insignis</i> (Blackwall, 1841)	–	–	3	0,9
	<i>**Leptothrix hardyi</i> (Blackwall, 1850)	49	16,4	–	–
	<i>Linyphia triangularis</i> (Clerck, 1757)	73	24,5	85	25,6
	<i>Microlinyphia</i> sp.	–	–	4	1,2
	<i>*Nereine montana</i> (Clerck, 1757)	–	–	4	1,2
	<i>**Sintula spiniger</i> (Balogh, 1935)	1	0,3	–	–
	<i>Stemonyphantes lineatus</i> (Linnaeus, 1758)	6	2	2	0,6
Araneidae	<i>Tenuiphantes</i> sp.	–	–	7	2,1
	<i>**Walckenaeria alticeps</i> (Denis, 1952)	–	–	1	0,3
	<i>Metellina segmentata</i> (Clerck, 1757)	–	–	65	19,5
	<i>Pachygnatha listeri</i> Sundevall, 1830	–	–	3	0,9
	<i>Tetragnatha pinicola</i> (L. Koch, 1870)	–	–	53	16
	<i>Agalenatea redii</i> (Scopoli, 1763)	5	1,7	–	–
	<i>Araneus diadematus</i> (Clerck, 1757)	3	1	–	–
	<i>Araneus</i> sp.	1	0,3	13	3,9
	<i>Cercidia prominens</i> (Westring, 1851)	–	–	2	0,6
	<i>Cyclosa conica</i> (Pallas, 1772)	26	8,7	–	–
Lycosidae	<i>Gibbaranea bituberculata</i> (Walckenaer, 1802)	3	1	1	0,3
	<i>Mangora acalypha</i> (Walckenaer, 1802)	90	30,2	–	–
	<i>Alopecosa</i> sp.	2	0,7	1	0,3
	<i>Pardosa</i> sp.	–	–	1	0,3
Agelenidae	<i>Piratula hygrophila</i> (Thorell, 1872)	–	–	9	2,7
	<i>Trochosa</i> sp.	–	–	1	0,3
	<i>Agelena labyrinthica</i> (Clerck, 1757)	–	–	1	0,3
Pisauridae	<i>Dolomedes</i> sp.	3	1	8	2,4
	<i>Pisaura</i> sp.	1	0,3	1	0,3
Dictynidae	<i>Dictyna</i> sp.	–	–	10	3
Cheiracanthiidae	<i>**Cheiracanthium elegans</i> (Thorell, 1875)	1	0,3	–	–
	<i>Cheiracanthium</i> sp.	4	1,3	–	–
Anyphaenidae	<i>Anyphaena accentuata</i> (Walckenaer, 1802)	1	0,3	5	1,5
Liocranidae	<i>*Agroeca cuprea</i> (Menge, 1873)	1	0,3	–	–

Закінчення табл. 1

Родина	Вид	Сосновий ліс		Вільшаник	
		Екз.	%	Екз.	%
Clubionidae	<i>Clubiona</i> sp.	1	0,3	12	3,6
Gnaphosidae	<i>Zelotes subterraneus</i> (C.L. Koch, 1833)	2	0,7	—	—
	<i>Zelotes</i> sp.	1	0,3	—	—
Sparassidae	<i>Micrommata virescens</i> (Clerck, 1758)	—	—	1	0,3
Philodromidae	<i>Philodromus</i> sp.	10	3,4	9	2,7
	<i>Tibellus oblongus</i> (Walckenaer, 1802)	2	0,7	—	—
Thomisidae	<i>Ebrechtella tricuspidata</i> (Fabricius, 1775)	3	1	7	2,1
	<i>Tmarus piger</i> (Walckenaer, 1802)	—	—	2	0,6
	<i>Xysticus striatipes</i> (L. Koch, 1870)	3	1	2	0,6
	<i>Xysticus</i> sp.	5	1,7	5	1,5
Salticidae	<i>Ballus chalybeius</i> (Walckenaer, 1802)	—	—	3	0,9
	<i>Evarcha</i> sp.	1	0,3	—	—
Сума екземплярів		298	100%	332	100%

Висновки. Видовий склад павуків ландшафтного заказника "Яхнівський" нараховує 46 видів із 17 родин. Дев'ять видів павуків указуються вперше для території Київського Полісся, чотири види – уперше для Українського Полісся. Підраховано, що за даними власних досліджень і літературними джерелами список павуків Київського Полісся становить 150 видів. У сосновому лісі еудомінантами трав'яного ярусу були *Mangora acalypha* та *Linyphia triangularis*, у підстилковому ярусі еудомінантом був *Leptothrix hardyi*. У трав'яному ярусі вільхового лісу еудомінантами були: *L. triangularis*, *Metellina segmentata* та *Tetragnatha pinicola*; у підстилковому ярусі субдомінантом виступає *Piratula hygrophila*. Значення індексу фауністичної подібності дорівнює 0,38, що вказує на суттєву відмінність видових угруповань павуків соснового та вільхового лісів. Показники індексу Шеннона свідчать про доволі високий рівень видового різноманіття угруповань павуків заказника. Більшість виявлених видів мають Палеарктичний та Голарктичний ареали поширення. Центральнo-Східноєвропейське поширення має один вид – *Sintula spiniger*.

Список використаних джерел

1. Василюк О. Природно-заповідний фонд Київської області / О. Василюк, В. Костюшин, К. Норенко та ін. – К.: НЕЦУ, 2012. – 338 с.
2. Евтушенко К. В. Пауки северной части Киевского Полесья / К. В. Евтушенко // Вестн. зоол. – 1991. – № 3. – С. 79–80.
3. Евтушенко К. В. Эколого-фаунистические исследования пауков (Aranei) в Киевском Полесье / К. В. Евтушенко // Вестн. зоол. АН УССР. – К., 1991. – 9 с. – Деп. в ВИНТИ 04.06.1991, № 2338-B91.
4. Евтушенко К. В. Пауки (Araneae) фауны Украинского Полесья: автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.08 "Зоология" / Константин Вячеславович Евтушенко. – К., 1991. – 17 с.
5. Песенко Ю. А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях / Ю. А. Песенко. – М.: Наука, 1982. – 287 с.

Е. Грынык, експерт по лесному направлению
ОО "Украинская природоохранная группа", Киев, Украина,
Е. Сингаевский, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ПАУКИ (ARACHNIDA, ARANEI) ЛАНДШАФТНОГО ЗАКАЗНИКА "ЯХНОВСКИЙ" (КИЕВСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Впервые исследованы видовой состав и относительная численность пауков соснового и ольхового леса в пределах заказника "Яхновский". Обнаружено 46 видов пауков из 17 семейств. Установлено, что количественно в сосновом лесу преобладают пауки семейства Linyphiidae (43,4 %) и Araneidae (42,9 %), а в ольховом – Tetragnathidae (37 %) и Linyphiidae (34 %). В травяном ярусе соснового леса количественно доминировали Araneidae, в подстилке – Linyphiidae (91 %). В травяном ярусе ольхового леса количественно доминировали Tetragnathidae (34 %), а в подстилке – Linyphiidae и Tetragnathidae, соответственно 32 и 43 %. Выявлены доминирующие виды для травяного и подстилочного ярусов (по шкале Тишлера): в сосновом лесу это *Mangora acalypha* (48,6 %), *Linyphia triangularis* (18,85 %) и *Leptothrix hardyi* (89 %); в ольховом – *Linyphia triangularis* (24,1 %), *Metellina segmentata* (23 %), *Tetragnatha pinicola* (18,8 %) и *Piratula hygrophila* (38,5 %) с *Pachygnatha listeri* (19,2 %), в соответствии с указанными ярусами. Обнаружено девять видов пауков, из которых пять видов – *Agroeca cuprea* (семейство Liocranidae), *Bathypantes nigrinus*, *Dicymbium nigrum*, *Floronina bucculenta* и *Neriene montana* (семейство Linyphiidae) – указываются впервые для территории Киевского Полесья и четыре вида – впервые для Украинского Полесья: *Cheiracanthium elegans* (семейство Cheiracanthidae), *Leptothrix hardyi*, *Sintula spiniger* и *Walckenaeria alticeps* (семейство Linyphiidae). Для этих видов отдельно указаны данные по фаунистическому материалу, местам и методам сбора, распространению и экологии. По данным собственных исследований и литературным источником территория Киевского Полесья на сегодня включает 150 видов пауков. Рассчитаны индексы фаунистического сходства и видового разнообразия обследованных биотопов, сделан ареалогический анализ.

Ключевые слова: пауки, фауна, видовое разнообразие, новые находки, Киевская область, Киевское Полесье, ландшафтный заказник "Яхновский".

6. Тыщенко В. П. Определитель пауков Европейской части СССР / В. П. Тыщенко. – Л.: Наука, 1971. – 280 с.

7. Nentwig W., Blick T., Bosmans R., Gloor D., Hänggi A., Kropf C. – Version 04.2020. Online at <https://www.araneae.nmbe.ch>, accessed on 17.04.2020.

8. Polchaninova N. Yu. Catalogue of the spiders (Arachnida, Aranei) of Left-Bank Ukraine / N. Yu. Polchaninova, E. V. Prokopenko // Arthropoda Selecta. – 2013. – Supplement № 2. – 268 p.

Reference (Scopus)

1. Vasylyuk O., Kostyushyn V., Norenko K., Plyha A., Prekrasna Ye., Kolomitsev H., et al. Nature reserve fund of Kiev region. Kiev, NECU; 2012. 338 p. Ukrainian.
2. Yevtushenko KV. Spiders of the northern part of Kiev Polesie. Vestn. zool. 1991; (3): 79–80. Russian.
3. Yevtushenko KV. Ecological and faunistic research of spiders (Aranei) in Kiev Polesie. Vestn. zool. 1991; (Dep. at VINITI 06.04.1991, №2338 – B91): 9 p. Russian.
4. Yevtushenko KV. Spiders (Araneae) of the fauna of Ukrainian Polissya [dissertation]. Kiev: I.I. Schmalhausen Institute of Zoology of National Academy of Sciences of Ukraine; 1991. Russian.
5. Pesenko YuA. Principles and methods of quantitative analysis in faunal studies. Moscow, Nauka; 1982. 287 p. Russian.
6. Tyschenko VP. Key to spiders of the European part of the USSR. Leningrad, Nauka; 1971. 280 p. Russian.
7. Nentwig W., Blick T., Bosmans R., Gloor D., Hänggi A., Kropf C. – Version 04.2020. Online at <https://www.araneae.nmbe.ch>, accessed on 17.04.2020.
8. Polchaninova NYu., Prokopenko E.V. Catalogue of the spiders (Arachnida, Aranei) of Left-Bank Ukraine. Arthropoda Selecta. 2013 (Supplement № 2). 268 p.

Надійшла до редколегії 5.10.2020
Отримано виправлений варіант 5.11.2020
Підписано до друку 5.11.2020

Received in the editorial 5.10.2020
Received a revised version on 5.11.2020
Signed in the press on 5.11.2020

E. Grynyk, assessor on Forest direction
NGO "Ukrainian Nature Conservation Group",
E. Singayevskiy, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE SPIDERS (ARACHNIDA, ARANEI) IN THE LANDSCAPE RESERVE "YAKHNIIVSKY" (KIEV REGION)

For the first time, the species composition and relative abundance of spiders in pine and alder forests within the Yakhnovsky reserve have been studied; 46 species of spiders which represent 17 families were found. It was found that quantitatively in the pine forest spiders of the families Linyphiidae (43,4 %) and Araneidae (42,9 %) prevail, and in the alder forest – Tetragnathidae (37 %) and Linyphiidae (34 %). In the herbaceous layer of the pine forest, spiders of Araneidae family dominated quantitatively, and in the litter dominated Linyphiidae spiders – 91 %. In the herbaceous layer of the alder forest Tetragnathidae spiders quantitatively dominated – 34 %, and in the litter layer Linyphiidae and Tetragnathidae, are dominants – respectively, 32 % and 43 %. The dominant species for the grass and litter layers were revealed (according to the Tischler scale): in the pine forest, these are *Mangora acalypha* (48,6 %), *Linyphia triangularis* (18,85 %) and *Leptothrix hardyi* (89 %); in the alder forest – *Linyphia triangularis* (24,1 %), *Metellina segmentata* (23 %), *Tetragnatha pinicola* (18,8 %) and *Piratula hygrophila* (38,5 %) with *Pachygnatha listeri* (19,2 %), in accordance with indicated tiers. Nine species of spiders were identified, of which five species – *Agroeca cuprea* (family Liocranidae), *Bathyphantes nigrinus*, *Dicymbium nigrum*, *Floronina bucculenta* and *Neriele montana* (family Linyphiidae), are indicated for the first time for the territory of Kiev Polesie, and four species, for the first time for Ukrainian Polesie: *Cheiracanthium elegans* (family Cheiracanthiidae), *Leptothrix hardyi*, *Sintula spiniger* and *Walckenaeria alticeps* (family Linyphiidae). For these species is given the data on faunal material, places and methods of collection, distribution and ecological features. According to our own research and literary sources, the territory of Kiev Polesie currently includes 150 species of spiders. The indices of faunistic similarity and species diversity of the surveyed biotopes were calculated, an arealological analysis was performed.

Keywords: spiders, fauna, species diversity, finds of new species, Kiev region, Kiev Polesie, "Yakhnivsky" landscape reserve.

УДК 576.3: 612.4

DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.37-43

A. Пустовалов, канд. біол. наук,
О. Ткаченко, студ.,
М. Матвієнко, канд. біол. наук,
М. Дзержинський, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ВІСЦЕРАЛЬНОЇ БІЛОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ОЖИРІННЯ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

Досліджено морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів за умов розвитку ожиріння і при введенні розчинів солі срібла та наночастинок срібла. Зокрема, проаналізовано морфофункціональні зміни, а також ефекти введення розчинів нітрату срібла та наночастинок срібла в дозах 1 мг / 1 кг і 0,5 мг / 1 кг маси тіла, відповідно, на морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів на тлі висококалорійної дієти. Установлено морфофункціональні зміни у клітинах білої жирової тканини щурів на тлі висококалорійної дієти та при введенні препаратів срібла в різних концентраціях. Стан жирової тканини оцінювався на основі таких параметрів: відносна маса вісцерального жиру, площа поперечного перерізу адипоцитів, відносна кількість адипоцитів на одиницю площі. Порівнювалися ефекти введення тваринам з ожирінням розчинів нітрату срібла в дозах 1 мг/1 кг і 0,5 мг / 1 кг маси тіла, а також розчину наночастинок срібла в дозах 1 мг / 1 кг і 0,5 мг / 1 кг маси тіла. Усі вищезазначені препарати срібла різною мірою зменшували вияви ожиріння у тварин, які утримувалися в умовах висококалорійної дієти. Окрім форми препарату срібла (розчин нітрату срібла чи наночастинок срібла), важливе значення мала концентрація. Найбільшу ефективність виявлено за введення тваринам розчину наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг маси тіла. При цьому в щурів зазначеної експериментальної групи досліджувані параметри не тільки досягли контрольних значень, а і перевершили їх, що свідчить про виражений вплив препарату на вияви ожиріння. Крім того, у щурів спостерігали ознаки виснаження жирової тканини.

Ключові слова: біла жирова тканина, висококалорійна дієта, ожиріння, наночастинок срібла, нітрат срібла.

Вступ. Ожиріння є однією з найважливіших проблем сучасної медицини, оскільки воно тісно пов'язане із цукровим діабетом другого типу, раком і серцево-судинними захворюваннями. Ці захворювання становлять помітну загрозу для населення, оскільки супроводжуються важкими ускладненнями та сприяють високій смертності [12, 17]. У зв'язку із цим для профілактики і лікування вищезазначених захворювань українською важливо вести здоровий спосіб життя та підтримувати масу тіла на оптимальному рівні, уникаючи ожиріння.

На сьогоднішній день існує чимало препаратів для профілактики розвитку і лікування ожиріння, але здебільшого вони характеризуються неспецифічністю дії та нестійким ефектом. Тому необхідні нові, удосконалені підходи до корекції ожиріння. Нанотехнологічні методи терапії розглядаються як альтернативна стратегія, яка може лікувати ожиріння та долати перепони, пов'язані зі звичайними методами терапії. Зокрема, виділяють три основні стратегії боротьби з ожирінням на основі нанотехнологій, спрямовані на білу жирову тканину та її судинну систему. Наприклад, механізмами

протистояння ожирінню є пригнічення ангиогенезу в білій жировій тканині, трансформація її в буру та фототермічний ліполіз [16, 20].

Порівняно зі звичайною терапією, наносистеми характеризуються високою переносимістю для пацієнта, зменшеними побічними ефектами та високою ефективністю. Необхідні ефекти досягаються за допомогою різних наноносіїв (ліпосом, полімерних і металевих наночастинок) [11, 18, 19].

У ХХІ століття досить популярне використання наночастинок у різних сферах. Вони широко застосовуються як бактерицидні агенти, однак їх потенційна токсичність поки що не дозволяє вільно їх використовувати в медицині [3]. Стосовно використання наночастинок срібла при лікуванні ожиріння робіт мало, і погляди вчених щодо цього різноманітні. Наприклад, в одному дослідженні оцінювався вплив наночастинок срібла на буру жирову тканину. Результати дослідження показали, що незалежно від розміру частинки срібла інгібують адипогенні, мітохондріальні та термогенні генні програми бурих адипоцитів, тим самим пригнічуючи їхню

здатність до диференціювання, мітохондріальну активність і термогенну відповідь. Наночастинки підвищують рівень реактивних форм кисню. Однак негативного впливу наночастинок срібла на бурі адипоцити можна уникнути за допомогою антиоксидантів або інгібіторів реактивних форм кисню [21]. Незважаючи на невелику кількість даних щодо можливості використання наночастинок срібла в корекції ожиріння, ця технологія бачиться досить перспективною [22].

Метою роботи було дослідження морфофункціонального стану вісцеральної білої жирової тканини щурів за умов розвитку ожиріння і при введенні розчинів солі срібла та наночастинок срібла.

Згідно з метою дослідження були поставлені такі **завдання**:

- 1) Охарактеризувати морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів при висококалорійній дієті.
- 2) Дослідити ефект введення розчину нітрату срібла в дозі 1 мг / 1 кг маси тіла на морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів на тлі висококалорійної дієти.
- 3) Вивчити вплив розчину нітрату срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг маси тіла на морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів на тлі висококалорійної дієти.
- 4) Дослідити морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів при введенні розчину наночастинок срібла в дозі 1 мг / 1 кг маси тіла на тлі висококалорійної дієти.
- 5) Вивчити морфофункціональний стан вісцеральної білої жирової тканини щурів при введенні розчину наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг маси тіла на тлі висококалорійної дієти.

Матеріали та методи дослідження. Синтез наночастинок срібла було проведено співробітниками Інституту фізичної хімії ім. В. Л. Писаржевського НАН України канд. хім. наук Гродзюк Г. Я. та канд. хім. наук Андрюшиною Н. С.

Експеримент був проведений на 24 самцях білих щурів *Rattus norvegicus* масою 100–110 г, які утримувались за стандартних умов виварію з вільним доступом до води та їжі та постійним температурним режимом.

Усі маніпуляції із тваринами виконувалися з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (*European convention, Strasburg, 1985*), ст. 26 Закону України "Про захист тварин від жорсткого поводження" (№ 3447-IV від 21.02.2006), а також усіх норм біоетики, біологічної безпеки та загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.) [5].

Упродовж першого тижня всі щури отримували стандартну їжу "*Purina rodent chow*" і воду. На 8-й день тварини рандомізовано були розділені на 2 групи: контрольні перебували на стандартному раціоні (3,81 ккал/г), а група з висококалорійною дієтою (ВКД, 5,35 ккал/г) отримувала висококалорійний корм, який складався зі стандартного корму (60 %), свинячого жиру (10 %), курячих яєць (10 %), сахарози (9 %), арахісу (5 %), сухого молока (5 %) і рослинної олії (1 %). Тварин зважували один раз на тиждень. Для підтвердження розвитку ожиріння розраховували приріст маси тіла. Коли достовірна різниця цього показника між двома групами становила 30 %, тварин із групи ВКД рандомізовано поділили на 5 груп по 4 тварини в кожній: ВКД, С1, С2, НС1, НС2. Схему введення відповідних препаратів наведено в табл. 1.

Усі препарати вводили тваринам внутрішньочеревно о 10:00 протягом 10 днів. В останній день експерименту за годину після введення речовин тварин прищипляли в атмосфері CO₂, декапітували і відбирали вісцеральну (гонадні, навколонишкові та задньочеревні ділянки) білу жирову тканину.

Таблиця 1. Характеристика експериментальних груп тварин

№	Назва групи	Режим харчування	Назва речовини	Доза
1	Контроль	Стандартна дієта	0,9 % NaCl	0,5 мл/100 г маси тіла
2	ВКД	Висококалорійна дієта	0,9 % NaCl	0,5 мл/100 г маси тіла
3	С1	Висококалорійна дієта	0,2 г/л розчин нітрату срібла	1 мг/1 кг маси тіла
4	С2	Висококалорійна дієта	0,2 г/л розчин нітрату срібла	0,5 мг / 1 кг маси тіла
5	НС1	Висококалорійна дієта	0,2 г/л розчин наночастинок срібла	1 мг/1 кг маси тіла
6	НС2	Висококалорійна дієта	0,2 г/л розчин наночастинок срібла	0,5 мг / 1 кг маси тіла

Для гістологічних досліджень зразки вісцеральної жирової тканини фіксували у формаліні, після чого зневоднювали і заливали в парафін за загальноприйнятою методикою. Із готових парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном Беймера і еозинном [9].

Для оцінювання морфофункціонального стану вісцеральної білої жирової тканини препарати аналізували на мікроскопі "Olympus Primo Star" при збільшенні $\times 10$, $\times 40$, після чого отримували кольорові мікрофотографії за допомогою камери "Tucsen 5.0MP CMOS TCA-5.0C". Морфометричні параметри адипоцитів вимірювали за допомогою програми "ImageJ" (NIH, США) [14].

Для оцінювання змін у жировій тканині вимірювали такі параметри: відносну масу вісцерального жиру, площу поперечного перерізу адипоцитів і відносну кількість адипоцитів на одиницю площі. Відносна маса вісцерального жиру обчислювалася як відношення маси жиру до загальної маси тіла [10]. Зазначені параметри вважають інформативними при дослідженні морфології жирової тканини [4].

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми "Microsoft Excel 2007". Отримані дані представляли як середнє $\pm$ стандартна похибка середнього ($M \pm m$). Оскільки відхилення від нормального розподілу не було зазначено, то відмінності між групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Різницю вважали достовірною за $P < 0,05$. Числові значення за всіма досліджуваними параметрами порівнювали з даними щурів контрольної групи і тварин, які отримували висококалорійну дієту.

Отримані статистичні результати при порівнянні параметрів між різними групами візуалізували у вигляді гістограм, які створювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. Жирова тканина щурів усіх експериментальних груп має типову структуру. Біла жирова тканина складається із відокремлених один від одного прошарками пухкої сполучної тканини часток, утворених адипоцитами. При цьому розміри жирових часток у білій жировій тканині гіподерми прямо пропорційні ступеню вираженості цієї

тканини. У сполучнотканинних прошарках містяться кровоносні й лімфатичні судини та нервові волокна, які проникають углиб часток. Крім адипоцитів, у білій жировій тканині зустрічаються й інші клітини: преадипоцити, фібробласти, макрофаги, лейкоцити, тучні клітини тощо. При ожирінні тучні клітини значною мірою інфільтрують жирову тканину [7].

Адипоцити мають переважно округлу або неправильну форму та близько прилягають один до одного. При забарвленні гематоксиліном та еозином ці

клітини мають вигляд оптично порожніх фігур із вузьким еозинофільним цитоплазматичним обрамленням під цитолемою (рис. 1). В адипоцитах ядра слощені та зміщені на периферію однією гігантською краплею жиру. У цитоплазмі клітин містяться помірно розвинені органели загального значення. Цитоплазма цих клітин заповнена переважно ліпідами, а також білками (3–6 % загальної маси клітини) і водою (до 30 % загальної маси клітини) [15].

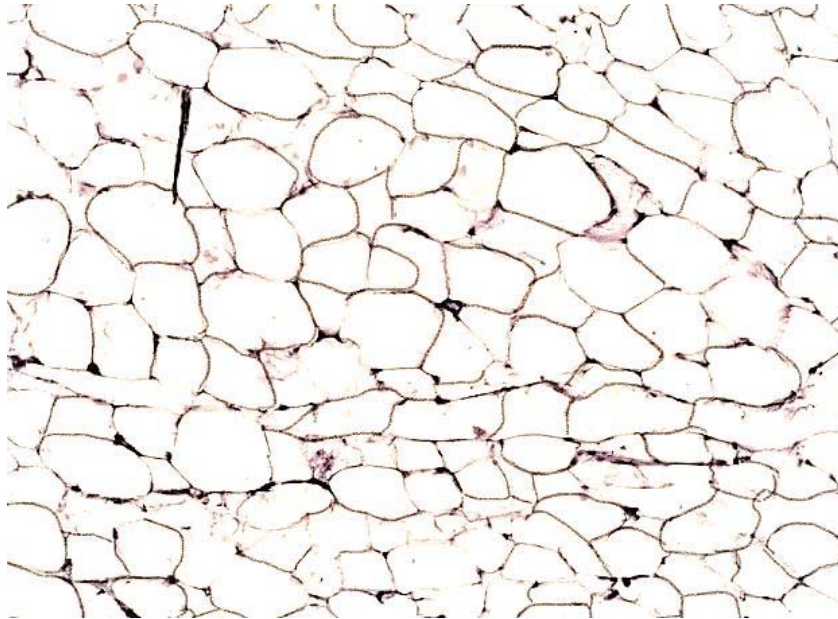


Рис. 1. Мікрофотографія зрізу жирової тканини тварин контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об. $\times 10$. Ок. $\times 10$

У щурів контрольної групи відносна маса вісцерального жиру дорівнює 1,53 %. Площа поперечного перерізу адипоцитів становить 2383,6 μm^2 . Відносна кількість адипоцитів – 420 клітин на 1 mm^2 (рис. 2–4).

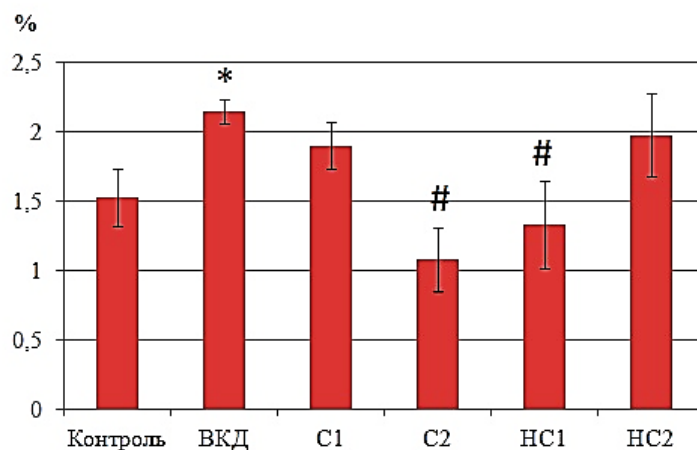


Рис. 2. Відносна маса вісцерального жиру: * – достовірна різниця між контрольною та експериментальними досліджуваними групами, $p < 0,05$; # – достовірна різниця між групою ВКД та іншими експериментальними групами, $p < 0,05$

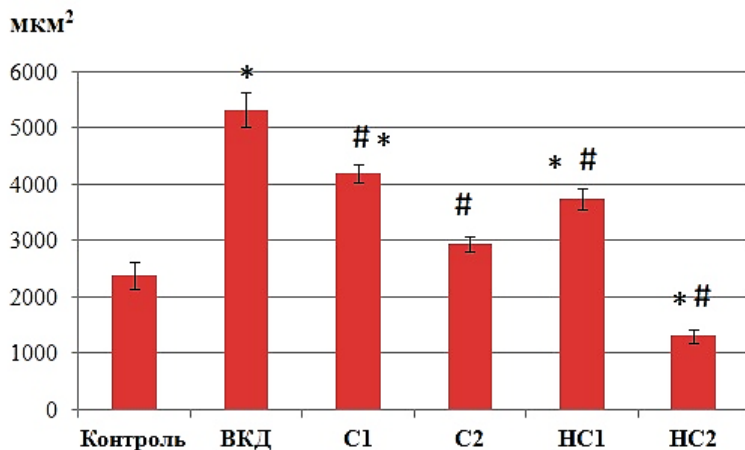


Рис. 3. Площа поперечного перерізу адипоцитів: * – достовірна різниця між контрольною та експериментальними досліджуваними групами, $p < 0,05$; # – достовірна різниця між групою ВКД та іншими експериментальними групами, $p < 0,05$

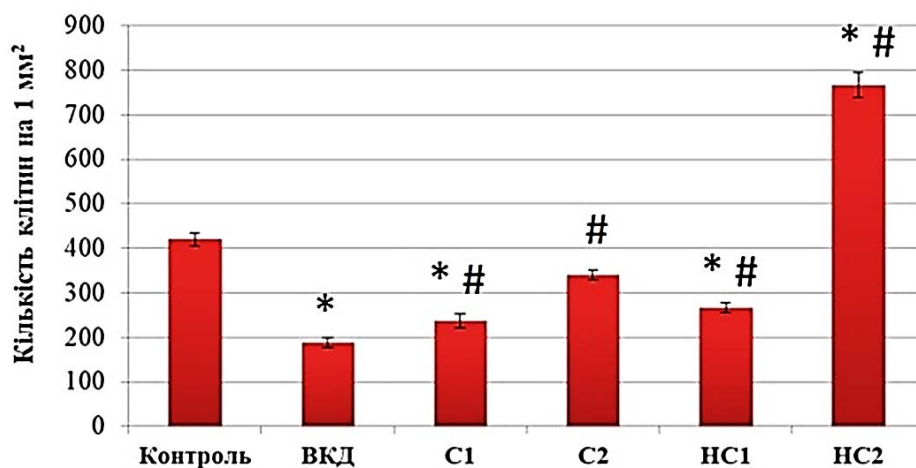


Рис. 4. Відносна кількість адипоцитів: * – достовірна різниця між контрольною та експериментальними досліджуваними групами, $p < 0,05$; # – достовірна різниця між групою ВКД та іншими експериментальними групами, $p < 0,05$

Відносна маса вісцерального жиру щурів групи ВКД становить 2,15 %, що достовірно більше, ніж у тварин контрольної групи. Адипоцити цієї групи тварин мають площу поперечного перерізу 5313,9 мкм², що достовірно більше, ніж у контролі. Відносна кількість адипоцитів становить 189 клітин на 1 мм², що достовірно менше, ніж у контрольній групі (рис. 2–4).

Загалом висококалорійна дієта призвела до достовірного зростання відносної маси вісцерального жиру у тварин, збільшення розміру адипоцитів і зменшення їх кількості на одиницю площі. Ці зміни свідчать про гіпертрофічний тип ожиріння [6].

У тварин групи С1, які отримували 0,2 г/л розчину нітрату срібла в дозі 1 мг/1 кг м. т., відносна маса вісцерального жиру становила 1,90 %. Цей показник більше, ніж у контролі, і менше, ніж у групі ВКД, але ці зміни статистично недостовірні. Площа поперечного перерізу адипоцитів у групі ВКР становить 4203 мкм². Цей параметр достовірно більше, ніж у тварин контрольної групи, і достовірно менше, ніж у групі ВКД. Відносна кількість адипоцитів становить 238 клітин на 1 мм², що достовірно менше, ніж у контролі, і достовірно більше, ніж у групі ВКД (рис. 2–4).

Загалом тварини після введення розчину нітрату срібла в дозі 1 мг/1 кг м. т. демонстрували ознаки гіпертрофічного типу ожиріння, як і тварини попередньої гру-

пи, які перебували на висококалорійній дієті. У той самий час морфофункціональні показники жирової тканини тварин після введення розчину нітрату срібла в дозі 1 мг/1 кг м. т. свідчать про полегшення виявів ожиріння, оскільки параметри не настільки виражені, як у групі ВКД.

Відносна маса вісцерального жиру в щурів групи С2, яким вводили 0,2 г/л розчин нітрату срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг м. т., становить 1,1 %. Цей показник достовірно нижчий, ніж у групі ВКД. Також цей параметр менше, ніж у тварин контрольної групи, але недостовірно. Адипоцити щурів цієї групи мають площу поперечного перерізу 2936,6 мкм², що достовірно більше, ніж у групі ВКД. Цей показник вищий за контрольний, але недостовірно. Відносна кількість адипоцитів становить 340 клітин на 1 мм², що достовірно більше, ніж у групі ВКД. Цей показник нижчий за контрольний, але ці зміни недостовірні (рис. 2–4).

Загалом щури, які отримували розчин нітрату срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг м. т., виявили ознаки корекції гіпертрофічного типу ожиріння, при цьому вимірювані параметри повернулися майже до контрольних значень.

У щурів групи НС1, які отримували розчин наночастинок срібла в дозі 1 мг/1 кг м. т., відносна маса вісцерального жиру дорівнює 1,33 %, що достовірно менше, ніж у групі ВКД. Цей показник також менший за контрольний, але ці зміни недостовірні. Площа попе-

речного перерізу адипоцитів у групі НС1 становить 3746 мкм², що достовірно більше, ніж у контролі, і достовірно менше, ніж у групі ВКД. Відносна кількість адипоцитів становить 267 клітин на 1 мм², що достовірно більше, ніж у групі ВКД, і достовірно менше, ніж у контролі (рис. 2–4).

Загалом тварини, які отримували розчин наночастинок срібла в дозі 1 мг/1 кг м. т., виявили ознаки гіпертрофічного типу ожиріння, але не настільки виражені, як у тварин групи ВКД, тобто незважаючи на те, що введення розчину наночастинок срібла в дозі 1 мг / 1 кг м. т. не повернуло досліджувані морфофункціональні параметри до контрольних рівнів, але спричинило коригуючий вплив на ознаки ожиріння.

Відносна маса вісцерального жиру тварин групи НС2, яким вводили розчин наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг м. т., дорівнює 1,98 %. Цей показник позначає тенденцію до збільшення щодо контролю та зменшення щодо групи ВКД, але зміни статистично недостовірні. Площа поперечного перерізу адипоцитів у групі НС2 становить 1303 мкм², що достовірно менше, ніж у контролі та ВКД. Відносна кількість адипоцитів становить 767 клітин на 1 мм², що достовірно більше, ніж у контролі та ВКД (рис. 2–4).

Загалом тварини, яким вводили розчин наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг м. т., демонстрували виснаження жирової тканини, оскільки їхні досліджувані параметри були нижчі навіть за контрольні рівні.

Аналізуючи досліджувані параметри жирової тканини, можна помітити, що вони закономірно змінювалися. Так, площа поперечного перерізу адипоцитів, тобто розмір клітин, зворотно пропорційно пов'язані з їх кількістю. Тому в усіх випадках при зростанні площі перерізу клітин зменшувалася їхня відносна кількість, і навпаки, при зменшенні розміру клітин зростала їх кількість на одиницю площі. Така взаємозалежність цих параметрів пояснюється тим, що при ожирінні клітини суттєво збільшуються в розмірі, відповідно займають більше простору у тканині, тому в одиниці площі вміщується менше клітин у випадку ожиріння. У нашому дослідженні висококалорійна дієта призвела тварин до ожиріння вісцеральної жирової тканини, що позначилося у зростанні розмірів адипоцитів за рахунок накопичення ліпідів. Подібні морфологічні ознаки зазначені також в іншій науковій праці [1].

Якщо площа поперечного перерізу адипоцитів та їх кількість змінювалися узгоджено, то показники відносної маси вісцеральної жирової тканини не завжди змінювалися відповідно до вищезазначених параметрів. У групах тварин, які утримувалися в умовах висококалорійної дієти та яким вводили розчин нітрату срібла в дозі 1 мг / 1 кг м. т., демонструвалися односпрямовані зміни за параметром відносної маси вісцеральної жирової тканини та площею перерізу адипоцитів. Такі зміни не суперечать ствердженню, що збільшення розмірів адипоцитів позначається на зростанні маси всієї тканини [8].

Однак подібна взаємозалежність маси жирової тканини від розмірів адипоцитів спостерігалася не в усіх випадках. Зокрема, зміни за зазначеними параметрами мали протилежний напрям у групах щурів, які отримували розчин нітрату срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг м. т., а також розчин наночастинок срібла в дозах 1 мг / 1 кг м. т. та 0,5 мг / 1 кг м. т. Подібні результати демонструють, що не завжди збільшення розмірів адипоцитів призводить до зростання загальної маси жирової тканини. Причиною такого явища може бути зміна щільності

ліпідів, якими заповнений адипоцит, у результаті біохімічних перетворень. Для остаточного з'ясування причини, яка зумовлює збільшення розмірів адипоцитів без зростання маси жирової тканини, необхідні подальші імуногістохімічні та біохімічні дослідження [2].

У дослідженні вивчали можливості срібла в різних формах коригувати ознаки ожиріння. При цьому важливе значення має не лише форма препарату, а й доза. Незалежно від форми препарату срібла (розчин нітрату срібла чи розчин наночастинок срібла), доза 0,5 мг / 1 кг м. т. виявилася більш ефективною, ніж 1 мг / 1 кг м. т. Зокрема, у групі тварин, яким вводили розчин нітрату срібла у зазначеній дозі, спостерігалися тенденції до змін площі перерізу адипоцитів і відносної кількості клітин майже до контрольного рівня. А щури, які отримували розчин наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг м. т., демонстрували неочікувані ефекти: площа перерізу адипоцитів опустилася нижче контрольного рівня, а відносна кількість суттєво перевищила такий показник у контрольній групі. Подібні зміни свідчать не просто про зменшення виявів ожиріння та гіпертрофії клітин, а навпаки, спостерігається виснаження жирової тканини [13].

Вивчення механізмів, які спричинили вищезазначені ефекти, і можливості імплементації отриманих результатів при лікуванні людей з ожирінням вимагають подальших досліджень.

Висновки

1. Висококалорійна дієта призводила щурів до ожиріння за гіпертрофічним типом, що виявлялося у зростанні відносної маси вісцерального жиру, збільшенні розмірів адипоцитів і зменшенні відносної кількості клітин.

2. Введення тваринам розчину нітрату срібла в дозі 1 мг / 1 кг маси тіла на тлі висококалорійної дієти зумовило зменшення морфофункціональних ознак ожиріння, однак ці зміни не досягали контрольного рівня.

3. Розчин нітрату срібла в дозі 1 мг / 1 кг маси тіла спричинив зміни в морфофункціональних параметрах вісцеральної білої жирової тканини щурів, які свідчать про суттєву корекцію ознак ожиріння (майже до контрольних рівнів), які розвинулися у тварин на тлі висококалорійної дієти.

4. Тварини, яким вводили розчин наночастинок срібла в дозі 1 мг / 1 кг маси тіла на тлі висококалорійної дієти, виявили ознаки зменшення ступеня ожиріння (хоч і не до контрольного рівня), що підтверджується відповідними морфофункціональними параметрами.

5. Щури, які отримували розчин наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг маси тіла на тлі висококалорійної дієти, мали найбільш виражені зміни параметрів морфофункціонального стану вісцеральної білої жирової тканини. Досліджувані показники не лише досягли контрольного рівня, а й суттєво його перевершили, при цьому мали місце ознаки виснаження у жировій тканині.

Таким чином, препарати у формі розчинів нітрату срібла та наночастинок срібла здійснюють ефекти на морфофункціональні параметри вісцеральної білої жирової тканини щурів з ожирінням. При цьому важливе значення має не тільки форма препарату срібла, а й концентрація. Найбільшу ефективність щодо корекції ознак ожиріння спричинило введення щурам розчину наночастинок срібла в дозі 0,5 мг / 1 кг маси тіла.

Список використаних джерел

1. Морфометрические параметры белой жировой ткани разной локализации у крыс при высокожировой диете / В. Н. Васильев,

И. В. Мильто, И. Ю. Якимович и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 1–5.

2. Адипо-цитокинный профиль адипоцитов эпикардиальной жировой ткани при ишемической болезни сердца на фоне висцерального ожирения / О. В. Груздева, Д. А. Бородин, О. Е. Акбашева и др. // Ожирение и метаболизм. – 2017. – № 14 (4). – С. 38–45.

3. Вплив наночастинок срібла на кісептин-опосередковану регуляцію морфо-функціонального стану сім'яників щурів / В. Калиновський, А. Пустовалов, М. Держинський та ін. // Вісник Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2016. – № 1. – С. 8–11.

4. Коновалова О. О. Ремоделивання жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті / О. О. Коновалова, О. М. Камішнін // Запорізький медичний журнал. – 2013. – № 4 (79). – С. 95–98.

5. Морфофункціональні зміни в тестикулах щурів 24-місячного віку під впливом кісептина на фоні блокади та активації альфаадренорецепторів і при введенні мелатоніну / М. Г. Матвієнко, А. С. Пустовалов, Н. О. Бузинська, М. Е. Держинський // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – Т. 95, № 2. – С. 170–173.

6. Патогістологічне особливості жирової ткани підкожної жирової клітчатки і сальника у лиц с метаболічним синдромом і ожиренням / К. Н. Милица, И. В. Сорокіна, М. С. Мірошніченко, О. Н. Плitenь // Охрана материнства и детства. – 2015. – № 2 (26). – С. 45–49.

7. Белая и бурая жировые ткани: взаимодействие со скелетной мышечной тканью / О. Д. Мяделец, В. О. Мяделец, И. С. Соболевская, Т. Н. Кичигина // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 32–44.

8. Титов В. Н. Функциональное различие висцеральных жировых клеток и подкожных адипоцитов / В. Н. Титов // Клиническая медицина. – 2015. – № 2. – С. 14–23.

9. Гістологічне виявлення і оцінка ступеня жирової емболії малого круга кровообігання в сучасній судебно-медичній практиці / Е. И. Филиппенкова, К. Н. Крупин, М. А. Кислов // Судебная медицина. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 91–92.

10. Влияние физических нагрузок на морфометрические параметры мезентериальной и подкожной жировой ткани крыс с ожирением, индуцированным высокожировой диетой / И. Ю. Якимович, Д. А. Бородин, И. К. Подрезов и др. // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2015. – № 2. – С. 1–9.

11. Efficacy, long-term toxicity, and mechanistic studies of gold nanorods photothermal therapy of cancer in xenograft mice / M. R. K. Ali, M. A. Rahman, Y. Wu et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – Vol. 114, № 15. – P. 3110–3118.

12. Apovian C. M. Perspectives on the global obesity epidemic / C. M. Apovian, K. M. Riffenburg // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. – 2017. – Vol. 24, № 5. – P. 307–309.

13. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders / S. S. Choe, J. Y. Huh, I. J. Hwang et al. // Front. Endocrinol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–16.

14. Collins T. J. Image J for microscopy / T. J. Collins // Biotechniques. – 2007. – Vol. 43, № 1 (Suppl.). – P. 25–30.

15. Fatty infiltration Of right ventricle (adipositas cordis): an unrecognized cause of early graft failure after cardiac transplantation / R. Krishnamani, R. S. Nawgiri, M. A. Konstam et al. // J. Heart Lung Transplant. – 2015. – Vol. 4. – P. 1143–1145.

16. Kwok K. H. M. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications / K. H. M. Kwok, K. S. L. Lam, A. Xu // Exp. Mol. Med. – 2016. – Vol. 48, № 3. – P. 215.

17. Obesity and type 2 diabetes: two diseases with a need for combined treatment strategies—easo can lead the way / D. R. Leitner, G. Frühbeck, V. Yumuk et al. // Obes. Facts. – 2017. – Vol. 10, № 5. – P. 483–492.

18. Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy / V. P. Pattani, J. Shah, A. Atalis et al. // J. Nanoparticle Res. – 2015. – Vol. 17, № 1. – P. 20.

19. Nanotechnology advances towards development of targeted-treatment for obesity / N. R. S. Sibuyi, K. L. Moabelo, M. Meyer et al. // J. Nanobiotechnol. – 2019. – Vol. 17, № 122. – P. 1–21.

20. Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the treatment of obesity? / A. Vargas-Castillo, R. Fuentes-Romero, L. A. Rodriguez-Lopez et al. // Arch. Med. Res. – 2017. – Vol. 48, № 5. – P. 401–413.

21. Silver nanoparticles inhibit beige fat function and promote adiposity / L. Yue, W. Zhao, D. Wang et al. // Molecular Metabolism. – 2019. – Vol. 19. – P. 1–11.

22. Nanomedicine for obesity treatment / Y. Zhang, J. Yu, L. Qiang et al. // Sci. China Life Sci. – 2018. – Vol. 61. – P. 373–379.

References

1. Vasilyev VN, Milto IV, Yakimovich IYU, et al. Morfometricheskie parametry beloy zhirovoy tkani raznoy lokalizatsii u krys pri vysokozhirovoy diyetе. Sovremennyye problem nauki i obrazovaniya. 2015;5:1-5.

2. Gruzdeva OV, Borodkina AD, Akbasheva OE, et al. [Adipokine-cytokine profile of adipocytes of epicardial adipose tissue in ischemic heart disease complicated by visceral obesity]. Ozhireniye i metabolism. 2017;14(4):38-45.

3. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Dzerzhynskyi M, et al. [Kisspeptin-mediated regulation of the morpho-functional state of the rat testicles under the effect of silver nanoparticles]. Visnyk Kyivskogo natsionalnogo universytetu im. Tarasa Shevchenka. Seriya: Problemy regulyatsii fiziologichnykh funktsiy. 2016;1:8-11.

4. Konovalova OO, Kamysnyy O M. [Remodeling of the adipose tissue in experimental diabetes mellitus model]. Zaporizkyi medychny zhurnal. 2013;4(79):95-98.

5. Matvienko M G, Pustovalov AS, Buzynska NO, Dzerzhynsky ME. [Morphofunctional Changes In 24-Month Rat Testes Under Kisspeptin Influence Against Blockade And Activation Of Alpha-Adrenergic Receptors And Melatonin Administration]. Visnyk problem biologii ta medytsyny. 2012;95(2):170-173.

6. Milita KN, Sorokina IV, Myroshnychenko MS, Pliten ON. [Pathohistological features of fat tissue of epiploon and subcutaneous fat tissue in patients with metabolic syndrome and obesity]. Okhrana materinstva i detstva. 2015;2(26):45-49.

7. Myadelets OD, Myadelets VO, Sobolevskaya IS, Kichigina TN. [White and brown adipose tissue: interaction with skeletal muscle tissue]. Vestnik VGMU. 2014;13(5):32-44.

8. Titov VN. [The functional difference between visceral fatty cells and subcutaneous adipocytes]. Klinicheskaya meditsina. 2015;2:14-23.

9. Filippenkova Yel, Krupin KN, Kislov MA. Gistologicheskoye vyvayeniye i otsenka stepeni zhirovoy emboli malogo kruga krovoobrashcheniya v sovremennoy sudebno meditsinskoj praktike. Sudebnaya meditsina. 2016;2(2):91-92.

10. Yakimovich IY, Borodin DA, Podrezov IK, et al. [Influence of physical activities on morphometric parameters of the mesenteric and subcutaneous tissue of rats with obesity, high-fat diet induced] Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova. 2015;2:1-9.

11. Ali MRK, Rahman MA, Wu Y, et al. Efficacy, long-term toxicity, and mechanistic studies of gold nanorods photothermal therapy of cancer in xenograft mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(15):3110–3118.

12. Apovian CM, Riffenburg KM. Perspectives on the global obesity epidemic. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2017;24(5):307-309.

13. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. Front Endocrinol. 2016;7:1-16.

14. Collins TJ. Image J for microscopy. Biotechniques. 2007;43(1):25-30.

15. Krishnamani R, Nawgiri RS, Konstam MA, et al. Fatty infiltration Of right ventricle (adipositas cordis): an unrecognized cause of early graft failure after cardiac transplantation. J Heart Lung Transplant. 2015;4:1143–1145.

16. Kwok KHM, Lam KSL, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. Exp Mol Med. 2016;48(3):215.

17. Leitner DR, Frühbeck G, Yumuk V, et al. Obesity and type 2 diabetes: two diseases with a need for combined treatment strategies—easo can lead the way. Obes Facts. 2017;10(5):483-492.

18. Pattani VP, Shah J, Atalis A, et al. Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy. J Nanoparticle Res. 2015;17(1):20.

19. Sibuyi NRS, Moabelo KL, Meyer M, et al. Nanotechnology advances towards development of targeted-treatment for obesity. J Nanobiotechnol. 2019;17(122):1-21.

20. Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R, Rodriguez-Lopez LA, et al. Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the treatment of obesity? Arch Med Res. 2017;48(5):401-413.

21. Yue L, Zhao W, Wang D, et al. Silver nanoparticles inhibit beige fat function and promote adiposity. Molecular Metabolism. 2019;19:1-11.

22. Zhang Y, Yu J, Qiang L, et al. Nanomedicine for obesity treatment. Sci China Life Sci. 2018;61:73–379.

Надійшла до редколегії 5.10.2020

Отримано виправлений варіант 5.11.2020

Підписано до друку 5.11.2020

Received in the editorial 5.10.2020

Received a revised version on 5.11.2020

Signed in the press on 5.11.2020

А. Пустовалов, канд. биол. наук,
Е. Ткаченко, студ.,
М. Матвиенко, канд. биол. наук,
Н. Дзержинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ ОЖИРЕНИЯ И ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Исследовано морфофункциональное состояние висцеральной белой жировой ткани крыс в условиях развития ожирения и при введении растворов соли серебра и наночастиц серебра. В частности, проанализированы морфофункциональные изменения, а также эффекты введения растворов нитрата серебра и наночастиц серебра в дозах 1 мг/1 кг и 0,5 мг/1 кг массы тела на морфофункциональное состояние висцеральной белой жировой ткани крыс на фоне высококалорийной диеты. Установлены морфофункциональные изменения в клетках белой жировой ткани крыс на фоне высококалорийной диеты и при введении препаратов серебра в различных концентрациях. Состояние жировой ткани оценивалось на основе следующих параметров: относительная масса висцерального жира, площадь поперечного сечения адипоцитов, относительное количество адипоцитов на единицу площади. Сравнивались эффекты введения животным с ожирением растворов нитрата серебра в дозах 1 мг/1 кг и 0,5 мг/1 кг массы тела, а также растворов наночастиц серебра в дозах 1 мг/1 кг и 0,5 мг/1 кг. Все указанные препараты серебра в разной степени снижали проявления ожирения у животных, которые содержались в условиях высококалорийной диеты. Помимо формы препарата серебра (раствор нитрата серебра или раствор наночастиц серебра), существенное значение имеет концентрация. Наибольшую эффективность имело введение животным раствора наночастиц серебра в дозе 0,5 мг/1 кг массы тела. При этом у крыс данной экспериментальной группы исследуемые параметры не только достигли контрольных значений, а и превзошли их, что свидетельствует о существенном влиянии препарата на проявления ожирения. Кроме того, у крыс наблюдались признаки истощения жировой ткани.

Ключевые слова: белая жировая ткань, высококалорийная диета, ожирение, наночастицы серебра, нитрат серебра.

A. Pustovalov, PhD,
O. Tkachenko, stud.,
M. Matviienko, PhD,
M. Dzerzhynsky, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF RAT VISCERAL WHITE ADIPOSE TISSUE UNDER OBESITY DEVELOPMENT AND SILVER NANOPARTICLES ADMINISTRATION

There was studied the morphofunctional state of the visceral white adipose tissue of rats with obesity and after introduction of silver salt solution and silver nanoparticles solution. In particular, we analyzed the morphofunctional changes in the visceral white adipose tissue of rats on a high-calorie diet, as well as the effects of the silver nitrate solution and the silver nanoparticles solution at a dose of 1 mg / 1 kg body weight and 0.5 mg / 1 kg body weight on the morphofunctional state of the visceral white adipose tissue of rats on a high-calorie diet. There were established morphofunctional changes in cells of the rats white adipose tissue on the high-calorie diet and with the introduction of silver preparations in different concentrations. The condition of the adipose tissue was evaluated on the basis of the following parameters: the relative mass of the visceral fat, the cross-sectional area of adipocytes, the relative number of adipocytes per unit area. There were compared effects of administration to animals with obesity of the silver nitrate solution at a dose of 1 mg / 1 kg body weight and 0.5 mg / 1 kg body weight, as well as of the silver nanoparticles solution at a dose 1 mg / 1 kg body weight and 0.5 mg / 1 kg of body weight. All the above silver preparations reduced the manifestations of obesity in animals which were maintained in a high-calorie diet. In addition to the form of the silver preparation (silver nitrate solution or silver nanoparticle solution), its concentration is important. The highest efficiency was shown after the administration of the silver nanoparticles solution at a dose 0.5 mg / 1 kg of body weight. In rats of this experimental group, the studied parameters not only reached the control values, but they also exceeded them, which indicates expressed influence of the drug on the obesity manifestations. In addition, the rats showed signs of fat depletion.

Keywords: white adipose tissue, high-calorie diet, obesity, silver nanoparticles, silver nitrate.

УДК 582.623.2:57.049
DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.43-49

Ю. Хома, асп.,
Л. Худолєєва, канд. біол. наук,
Н. Куцоконь, канд. біол. наук
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

ВПЛИВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ НА РОСЛИНИ ТОПОЛІ КЛОНУ 'INRA 353-38' ТА ВЕРБИ КЛОНУ 'ЖИТОМИРСЬКА-1' В УМОВАХ КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Засолення ґрунтів є важливим абіотичним фактором, що негативно впливає на ріст, розвиток і продуктивність рослин. Швидкорослі дерева тополі та верби є важливими біоенергетичними рослинами, що виявляють різний ступінь адаптації до різноманітних середовищ існування. Дослідження солестійкості у різних клонів тополі і верби дозволяє виявити генотипи, які можна вирощувати на засолених ґрунтах із використанням біомаси в біоенергетичній галузі. Тому метою роботи було вивчення впливу сольового стресу на рослини тополі клону 'INRA 353-38' (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) та верби клону 'Житомирська-1' (*Salix* sp.) в умовах культури *in vitro*. Для проведення дослідження рослини культивували на поживному середовищі на основі солей МС із додаванням хлориду натрію у концентраціях 25, 50 та 100 мМ. Контрольні рослини вирощували на вільному від хлориду натрію середовищі. Стан рослин (за 4-бальною шкалою), інтенсивність їх росту (за довжиною пагона) і коренеутворення (за кількістю коренів) оцінювали на 10-й та 30-й дні культивування. Отримані результати свідчать про високий рівень чутливості до хлориду натрію обох досліджених клонів за умов культури *in vitro*. Проте верба 'Житомирська-1' характеризувалася вищою чутливістю до сольового стресу порівняно з гібридною тополю клону 'INRA 353-38', оскільки ростові реакції у верби значно знижувалися вже за вмісту хлориду натрію в поживному середовищі 50 мМ, а за короткотривалої дії (10 днів) високої концентрації хлориду натрію (100 мМ) усі рослини верби припиняли ріст і швидко гинули. У гібридної тополі ростові реакції знижувалися впродовж місяця, переважно за найвищої концентрації хлориду натрію, проте навіть за таких умов частина пагонів залишалась життєздатною.

Ключові слова: тополя (*Populus*), верба (*Salix*), сольовий стрес, культура *in vitro*.

Вступ. Засолення ґрунтів є одним із важливих абіотичних стресів у навколишньому середовищі, що обмежує ріст, розвиток і продуктивність рослин. Згідно з даними ФАО, у світі близько 1 млрд га земель є засоле-

ними [4]. В Україні, за даними Державного земельного кадастру, засолені ґрунти займають 1,92 млн га [20]. Існують первинне (природне) і вторинне (антропогенне) засолення. Якщо первинне засолення є природним

явищем, то вторинне відбувається через нераціональний вплив людини на ґрунти. Накопичення солі в орних ґрунтах відбувається переважно зі зрошувальної води, що містить незначну кількість хлориду натрію (NaCl), і внаслідок використання неорганічних добрив [6, 18]. Серед зрошувальних земель в Україні налічується близько 350 тис. га засолених, з них 70–100 тис. га – вторинно засолених, і їхня площа невпинно зростає [20]. Крім цього, значного засолення зазнають ґрунти в мегаполісах унаслідок використання хлориду натрію в зимовий період для зменшення ожеледиці на дорогах [19].

Засолення ґрунтів відбувається переважно катіонами Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} та аніонами Cl^- , CO_3^{2-} та S^{2-} . Серед різних типів засолення найбільш негативний вплив на ґрунти та рослини здійснюється хлоридами, зокрема хлоридом натрію (NaCl) [24]. Як і за посушливих умов, збільшення солоності ґрунту передбачає зменшення потенціалу води у ґрунті [9]. Особливість впливу хлориду натрію порівняно з іншими абіотичними стресами полягає у його подвійній дії на рослини. По-перше, іони Na^+ та Cl^- створюють високий осмотичний тиск у ґрунтового розчині, у результаті чого відбувається зв'язування води та ускладнюється її поглинання коренем, що призводить до осмотичного стресу. По-друге, поглинені разом із водою Na^+ та Cl^- іони викликають порушення у функціонуванні мембран, негативно впливають на метаболічні процеси рослин і призводять до зменшення ефективності фотосинтезу, що відбувається в результаті іонного стресу. Токсичність сольових іонів чинить численні шкідливі ефекти на рослини, такі як денатурація цитозольних ферментів, і сприяє утворенню активних форм кисню, які можуть пошкодити мембрани та білки [2, 12, 15, 17]. Продихи у листках рослин чутливі до змін водного потенціалу ґрунту, тому їх закривання зазвичай відбувається під час посухи та сольового стресу. Зниження провідності продихів зменшує кількість вхідного CO_2 , що призводить до послаблення фотосинтезу. А це, у свою чергу, спричиняє зниження ростової активності та зменшує продуктивність рослин. Для пом'якшення осмотичного стресу рослини застосовують різноманітні механізми для зменшення втрат води. Крім того, рослини мінімізують шкідливий вплив стресу іонного Na^+ шляхом виключення Na^+ із тканин листків і його компартменталізації, головним чином у вакуолі [1].

Швидкорослі дерева тополі та верби належать до широко розповсюдженої в Північній півкулі родини Salicaceae, яка надзвичайно активно використовується людиною в різних сферах діяльності. Багато видів вербових відіграють важливу роль у виробництві біопалива, охороні навколишнього середовища та лісорозведенні на деградованих ґрунтах [23]. Ці деревні породи виявляють різний ступінь адаптації до різноманітних середовищ існування [2, 3, 9], деякі з них є толерантними до сольового стресу [5, 10]. Ураховуючи занепокоєння громадськості із приводу використання орних земель для виробництва біоенергії, існує можливість реалізувати економічні й екологічні вигоди шляхом вирощування нехарчових деревних культур, таких як тополя і верба, на маргінальних землях, що є непридатними для вирощування сільськогосподарських культур [13].

Окрім економічної та екологічної значущості, рід *Populus* також є моделлю для з'ясування фізіологічних і молекулярних механізмів толерантності до стресів у деревних порід. Різні види дерев суттєво відрізняються за стійкістю до сольового стресу, при цьому *Populus euphratica* вважають найбільш солестійким видом серед тополь [7]. Основними механізмами толерантності цього виду до засолення є розподіл іонів Cl^- у вакуолях клітин кореня, активація розподілу Na^+ у ґрунтового

розчині та зменшення надмірних втрат K^+ шляхом регуляції каналів, що активуються деполяризацією. Це підтримує баланс K^+/Na^+ , що є важливою передумовою виживання в умовах сольового стресу [3]. Абсцизова кислота, Ca^{2+} , активні форми кисню та накопичення різноманітних первинних і вторинних метаболітів беруть участь у сприйнятті стресу. Після тривалого впливу солі *Populus euphratica* розвиває соковитість листків як пластичну морфологічну адаптацію, що розріджує сіль [3].

Рід *Salix* характеризується ще більш значною видовою різноманітністю, серед якої є види з різною стійкістю до абіотичних стресів. Зокрема, у Канаді серед 37 нативних та екзотичних клонів виявлено 6 генотипів із високою стійкістю до сильного засолення у зразках ґрунту [8]. Тетраплоїдна верба *Salix matsudana* має високу толерантність до абіотичних стресів, зокрема порівняно з диплоїдними батьківськими формами. Такі дерева висаджують на березі моря з метою покращення екологічної ситуації та використання маргінальних земель [14]. Вагомий внесок у освоєння засолених ґрунтів і прибережних солончаків роблять і тополі, отримані методами генетичної інженерії [11, 22].

Оскільки засолення ґрунтів в Україні та світі все більше зростає через нераціональний вплив людини, а також через глобальні зміни клімату, то існує потреба у ефективному використанні цих ґрунтів. Дослідження солестійкості у різних клонів тополі та верби дозволить виявити генотипи, які можуть бути придатними для використання в біоенергетичній галузі, меліорації маргінальних ґрунтів, а також відновлення місцевого біорізноманіття.

Метою роботи було вивчення впливу сольового стресу на рослини тополі клону 'INRA 353-38' та верби клону 'Житомирська-1' в умовах культури *in vitro*.

Матеріали і методи. Чутливість до засолення гібридних тополі клону 'INRA 353-38' (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) та верби клону 'Житомирська-1' (*Salix* sp.) оцінювали за дії хлориду натрію в культурі *in vitro*. Для проведення дослідження рослини мультиплікували шляхом мікроклонального розмноження та вирощували у пробірках на модифікованому середовищі МС (Murashige & Skoog medium, Duchefa, Нідерланди) із додаванням 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (IMK). Експериментальні рослини культивували на аналогічному середовищі з додаванням хлориду натрію у концентраціях 25, 50 та 100 мМ. Контрольні рослини вирощували на вільному від хлориду натрію середовищі. На кожен варіант висаджували по 10 рослин. Рослини культивували протягом 30 днів за температури 24 °C і 16-годинного фотоперіоду. Стан рослин, інтенсивність їх росту (за довжиною пагона) і коренеутворення (за кількістю коренів) оцінювали на 10-й та 30-й дні культивування. Стан рослин оцінювали за розробленою нами 4-бальною шкалою, де 0 балів – рослина повністю загинула; 1 бал – більшість листків та/або стебла засохли, проте частина рослини залишається живою, ріст значно пригнічений; 2 бали – невелика частина листків має слабкі ознаки в'янення чи підсихання, ріст дещо пригнічений; 3 бали – рослина без ознак в'янення чи підсихання, перебуває в найбільш активній ростовій стадії. Результати вимірювань опрацьовували з використанням пакету аналізу "MS Excel". Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стюдента, відхилення експериментальних варіантів від контрольних вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. За змінами висоти пагона рослин статистично достовірні відмінності від контрольних значень були помітні в обох клонів вже після 10 діб вирощування за концентрації 50 мМ солі в

поживному середовищі (рис. 1). На 30-ту добу дослідження у верби клону 'Житомирська-1' спостерігали повну загибель рослин, вирощених за концентрації 100 мМ NaCl (рис. 2). У рослин гібридної тополі клону 'INRA 353-38' після місяця вирощування на поживному середовищі, що містило 100 мМ хлориду натрію, некроз апікальної частини пагона продовжувався, але певна його частина залишилась життєздатною.

Значні зміни у процесах ризогенезу у верби клону 'Житомирська-1' були помітні вже за короткотривалої дії сольового стресу. На 10-ту добу культивування

рослин цього клону на поживному середовищі з 50 мМ хлориду натрію спостерігали статистично достовірне зменшення кількості коренів більше ніж у 2 рази порівняно з контрольними рослинами, а у рослин, вирощених за концентрації 100 мМ NaCl, виявлено повну відсутність коренів. При цьому за нормальних умов культивування верба характеризується високим ступенем коренеутворення. Статистично достовірних відмінностей у впливі досліджених концентрацій хлориду натрію на ризогенез у рослин гібридної тополі клону 'INRA 353-38' не виявлено (рис. 3).

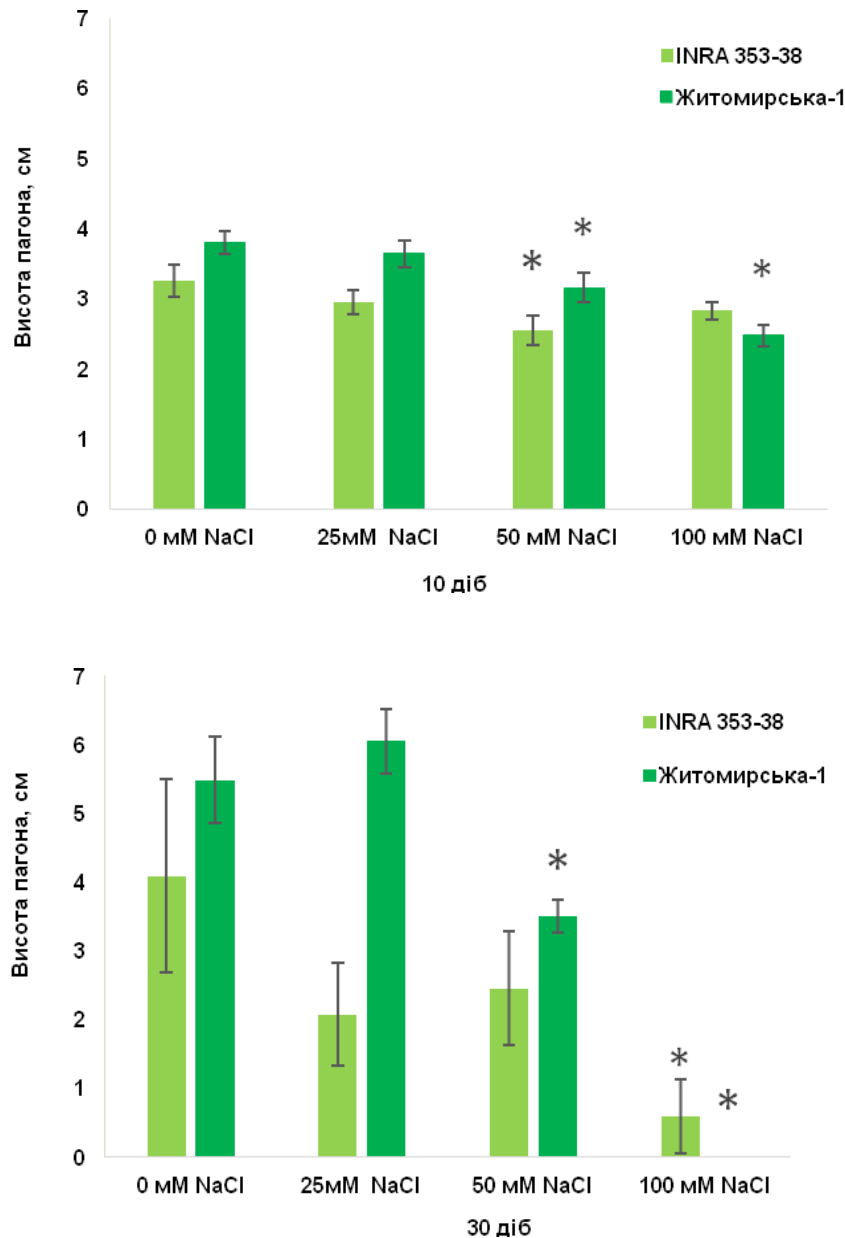


Рис. 1. Вплив хлориду натрію на висоту пагона ($\pm$ SE) тополі 'INRA 353-38' та верби 'Житомирська-1' на 10-й (А) та 30-й (Б) день експерименту (* – $p < 0,05$)

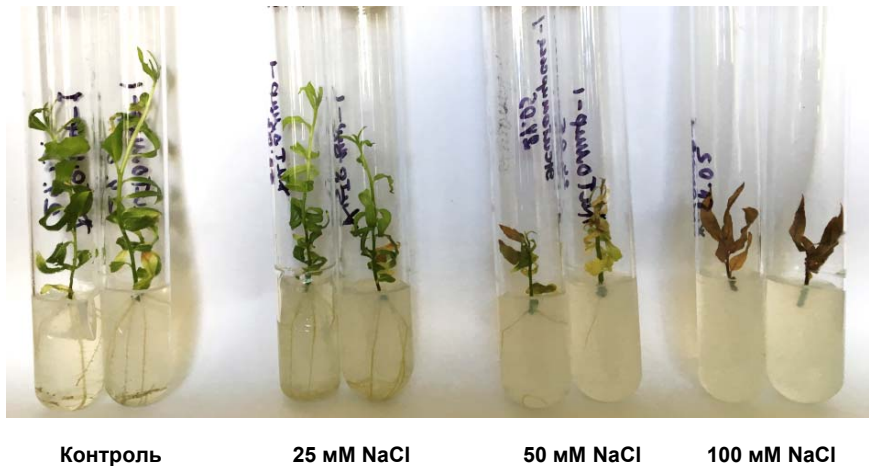


Рис. 2. Вплив хлориду натрію на вербу клону 'Житомирська-1' на 30-й день експерименту

За критерієм загального стану рослин після 30 днів культивування засолення поживного середовища сильніше впливало на вербу 'Житомирська-1' порівняно з тополею 'INRA 353-38'. Як видно з рис. 4, за найвищої

концентрації хлориду натрію в поживному середовищі всі рослини верби загинули, у той час як у гібридній тополі загальний стан хоч і погіршився значуще, проте частина пагонів залишилась життєздатною ($1,3 \pm 0,2$ балів).

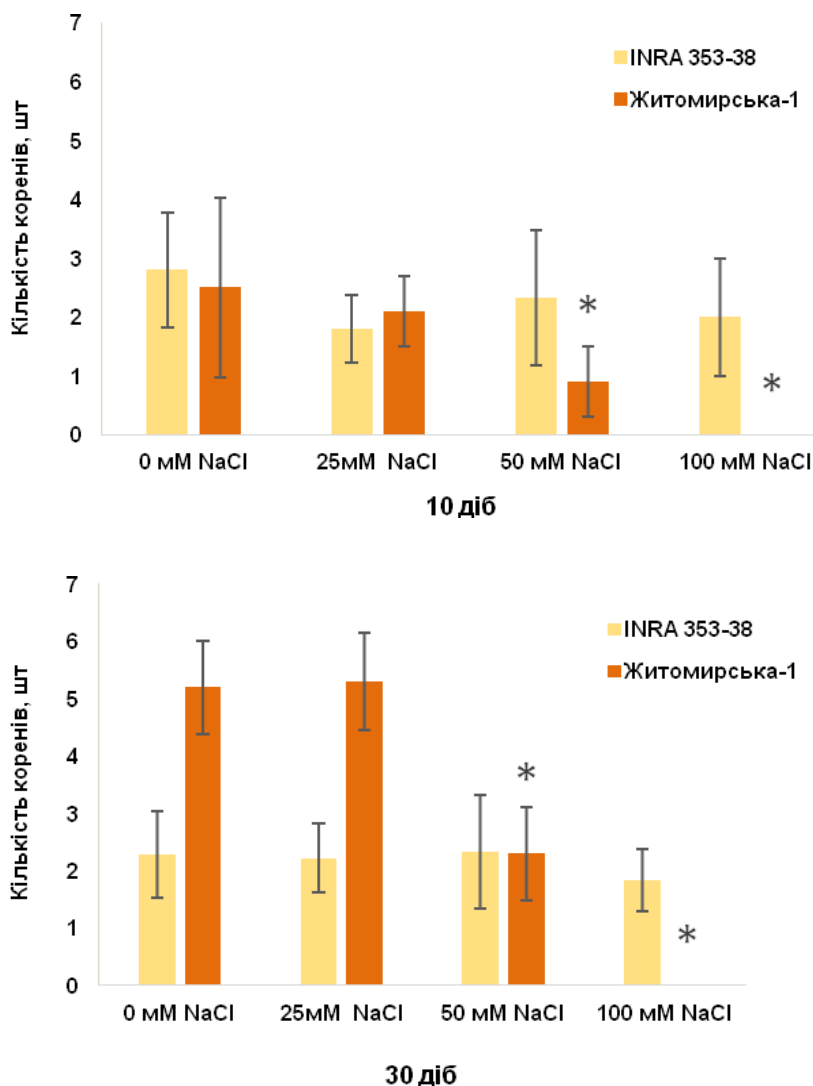


Рис. 3. Вплив хлориду натрію на коренеутворення (кількість коренів $\pm$ SE) у тополі 'INRA 353-38' та верби 'Житомирська-1' на 10-й (А) та 30-й (Б) день експерименту (* – $p < 0,05$)

Отже, як показали наші дослідження, в умовах культивування *in vitro* гібридна тополя клону 'INRA 353-38' виявляла дещо вищий рівень солестійкості порівняно з вербою 'Житомирська-1'. Раніше нами було оцінено чутливість гібридної тополі (*P. tremula* × *P. alba*) клону 'INRA 717-184', осики (*P. tremula*) та верби (*Salix alba* × *Salix fragilis*) клону 'Олімпійський вогонь' [24] і показано високий рівень толерантності верби клону 'Олімпійський вогонь' до дії хлориду натрію навіть після двох місяців культивування на середовищі з концентрацією NaCl 100 мМ [24]. У зв'язку з вищезазначеним вважаємо, що обидва вивчені клони характеризуються відносно невисокою солестійкістю в умовах культури *in vitro*.

Косаківська І. В. та Голов'янка І. В. [21] виділяють чотири стадії адаптації рослин за тривалої дії стресового фактора: 1) стадію відповіді, яка супроводжується відхиленнями від функціональної норми, зниженням

життєздатності, активацією катаболічних процесів порівняно з анаболічними; 2) стадію опору, для якої є типовими процеси адаптації і репарації та розвиток стійкості; 3) стадію виснаження, за якої має місце перевищення адаптаційного порогу, хронічне захворювання або загибель; 4) стадію регенерації, за якої організм частково або повністю адаптується з відновленням фізіологічних функцій після припинення дії стресу [21]. Обидва досліджені клони виявилися чутливими до засолення поживного середовища навіть у відносно невисоких концентраціях хлориду натрію. Проте ці клони показали різний ступінь адаптації до дії сольового стресу. Стадія опору була яскравіше виражена у гібридній тополі, де частина рослин залишилася життєздатною за найвищого рівня засолення, у той час як за таких умов усі рослини верби загинули.

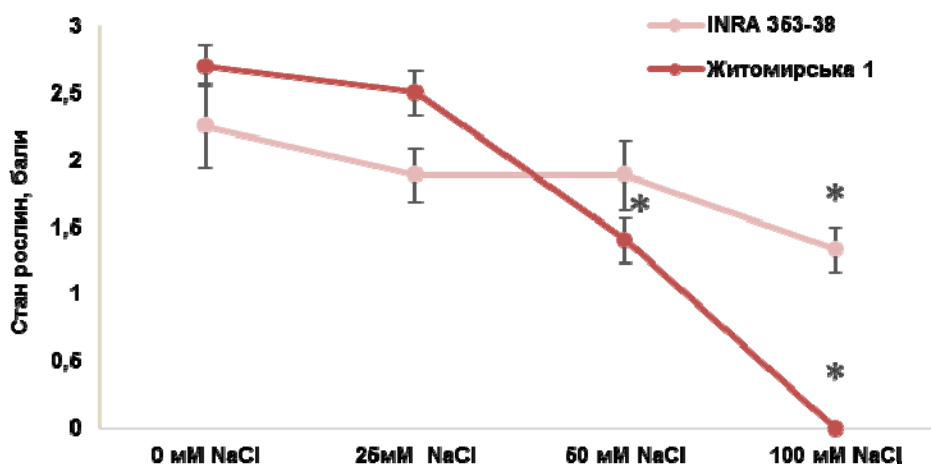


Рис. 4. Вплив хлориду натрію на загальний стан рослин ($\pm$ SE) тополі 'INRA 353-38' та верби 'Житомирська-1' після 30 діб культивування (* – $p < 0,05$)

Як бачимо, солестійкість рослин обумовлена генотипом, а отже, пошук клонів, стійких до дії сольового стресу, є важливим для ефективного використання маргінальних ґрунтів та озеленення мегаполісів [16]. Необхідно зауважити, що верба 'Житомирська-1' є високопродуктивним перспективним клоном, придатним для вирощування в біоенергетичних плантаціях [23]. Проте, як свідчить проведене дослідження, солестійкість цього клону може бути невисокою, що необхідно враховувати при плануванні насаджень.

Метод селекції в культурі *in vitro* дозволяє провести дослідження за надзвичайно короткий проміжок часу та у будь-яку пору року. Однак слід зазначити, що такі дослідження не повною мірою відображають реакцію рослин на стрес і процеси, що відбуваються в польових умовах, тому вони дозволяють робити лише попередні висновки і потребують підтвердження солестійкості клонів в умовах, наближених до природних.

Висновки. Отримані результати свідчать про високий рівень чутливості до хлориду натрію обох досліджених клонів за умов культури *in vitro*. Проте верба 'Житомирська-1' характеризувалася вищою чутливістю до сольового стресу порівняно з гібридною тополею клону 'INRA 353-38', оскільки ростові реакції у верби значно знижувалися вже за вмісту хлориду натрію в поживному середовищі 50 мМ, а за короткотривалої дії (10 днів) хлориду натрію у високій концентрації (100 мМ) усі рослини верби припиняли ріст і швидко

гинули. У гібридній тополі ростові реакції знижувалися впродовж місяця, переважно за найвищої концентрації хлориду натрію, проте навіть за таких умов частина пагонів залишалася життєздатною.

ПОДЯКИ. Автори висловлюють подяку заступнику директора Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України проф. Рахметову Д. Б. за надання живців верби клону 'Житомирська-1'. Робота виконувалася за підтримки цільової програми наукових досліджень НАН України "Біопаливні ресурси і біоенергетика" (2017–2021), проект "Створення генофонду високопродуктивних біоенергетичних трав'янистих та деревних культур як біопаливного матеріалу", а також за підтримки конкурсу Національного фонду досліджень України "Підтримка досліджень провідних та молодих учених" (проект № 84/02.2020).

Список використаних джерел

- Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants / E. Blumwald // Curr. Opin. Cell Biol. – 2000. – Vol. 12. – P. 431–434.
- Molecular bases of responses to abiotic stress in trees / M. Barcala, M. Matterna, C. Soliani et al. // J. of Experimental Botany. – 2019. – P. 1–15.
- Chen S. Salinity tolerance of Populus / S. Chen, A. Polle // Plant Biol. – 2010. – Vol. 12. – P. 317–33.
- FAO & IFAD. Status of the World's Soil Resources (SWSR) // Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils. – Rome, Italy, 2015. – P. 648.
- Fischer U., Polle A. Populus responses to abiotic stress / U. Fischer, A. Polle // Genetics and genomics of Populus / Springer. – 2010. – P. 225 – 246.

6. Flowers T. J. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? / T. J. Flowers, A. R. Yeo // Aust. J. Plant Physiol. – 1995. – Vol. 22. – P. 875–884.
7. Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica* / R. Gu, S. Fonseca, L. Puskás et al. // Tree Physiol. – 2004. – Vol. 24. – P. 265–276.
8. Examining the salt tolerance of willow (*Salix* spp.) bioenergy species for use on salt-affected agricultural lands / R. D. Hangs, J. J. Schoenau, V. Rees et al. // Plant Sci. – 2011. – Vol. 91. – P. 509–517.
9. Plant cellular and molecular responses to high salinity / P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, J. K. Zhu et al. // Ann. Rev. Plant Physiol. / Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 51. – P. 463–499.
10. Jansson S. *Populus*: a model system for plant biology / S. Jansson, C. Douglas // Annu Rev Plant Biol. – 2007. – Vol. 58. – P. 435–58.
11. Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance / Y. Li, X. Su, B. Zhang et al. // Tree Physiol. – 2009. – Vol. 29, № 2. – P. 273–279.
12. Munns R. Mechanisms of salinity tolerance / R. Munns, M. Tester // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – Vol. 59. – P. 651–681.
13. Rees V. Developing a national agroforestry and afforestation network for Canada / V. Rees // Policy Options. – 2008. – Vol. 29. – P. 54–57.
14. The genetic architecture of growth traits in *Salix matsudana* under salt stress / J. Zhang, H. Yuan, Q. Yang et al. // Hortic Res. – 2017. – Vol. 4. – P. 17024.
15. Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data / C. Sahi, A. Singh, E. Blumwald et al. // Physiol. Plant. – 2006. – Vol. 127. – P. 1–9.
16. Šerá B. Salt-tolerant trees usable for Central European cities – Review / B. Šerá // Horticultural Science. – 2017. – Vol. 44(1). – P. 43–48.
17. Teakle N. L. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance / N. L. Teakle, S. D. Tyerman // Plant Cell Environ. – 2010. – Vol. 33. – P. 566–589.
18. Tester M. Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants / M. Tester, R. Davenport // Ann. Bot. – 2003. – Vol. 91. – P. 503–527.
19. Urbańska S. Impact of salts from winter road maintenance on selected properties of roadside soils / S. Urbańska, P. Obrzut, E. Ogiela // Infrastructure and ecology of rural areas. – 2016. – P. 1521–1534.
20. Екологічний стан ґрунтів України / С. Балюк, В. Медведєв, В. Мірошніченко та ін. // Український географічний журнал. – 2012. – С. 38–42.
21. Косаківська І. В. Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків / І. В. Косаківська, І. В. Головянко // Український фітоценологічний збірник. – 2006. – С. 3–17.
22. Куцоконь Н. К. Основні напрямки генетичної трансформації представників роду *Populus* / Н. К. Куцоконь // Цитологія і генетика. – 2011. – № 6. – С. 67–78.
23. Ростові характеристики та енергопродуктивність тополь і верб у короткотривалій плантації за перший рік вегетації / Н. Куцоконь, Д. Рахметов, Л. Худолєєва та ін. // Біологічні системи. – 2017. – Т. 9. – Вип. 2. – С. 238–246.
24. Худолєєва Л. В. Порівняння солестійкості представників родів *Populus* і *Salix* в умовах *in vitro* / Л. В. Худолєєва, Н. К. Куцоконь // Science Rise: Biological Science. – 2018. – № 2(11). – С. 35–38.
4. FAO & IFAD. Status of the World's Soil Resources (SWSR) // Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils. Rome, Italy. 2015:648.
5. Fischer U., Polle A. *Populus* responses to abiotic stress. Genetics and genomics of *Populus*. Springer. 2010; 3:225 – 246.
6. Flowers T.J., Yeo A.R. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? Aust. J. Plant Physiol. 1995;22:875-884
7. Gu R., Fonseca S., Puskás L., et al. Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. Tree Physiol. 2004;24:265–276.
8. Hangs R. D., Schoenau J. J., Rees V., et al. Examining the salt tolerance of willow (*Salix* spp.) bioenergy species for use on salt-affected agricultural lands. Can. J. Plant Sci. 2011; 91: 509–517.
9. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000; 51:463–499.
10. Jansson S., Douglas C. *Populus*: a model system for plant biology. Annu Rev Plant Biol. 2007;58:435 – 58.
11. Li Y., Su X., Zhang B., Huang Q., et al. Expression of jasmonic ethylene responsive factor gene in transgenic poplar tree leads to increased salt tolerance. Tree Physiol. 2009; 29 (2): 273–279.
12. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 2008; 59:651-681.
13. Rees V. Developing a national agroforestry and afforestation network for Canada. Policy Options. 2008; 29:54-57.
14. Zhang J., Yuan H., Yang Q., et al. The genetic architecture of growth traits in *Salix matsudana* under salt stress. Hortic Res. 2017; 4:17024.
15. Sahi C., Singh A., Blumwald E., et al. Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. Physiol. Plant. 2006; 127:1-9
16. Šerá B. Salt-tolerant trees usable for Central European cities – Review. Horticultural Science. 2017; 44(1): 43-48.
17. Teakle N.L., Tyerman S.D. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. Plant Cell Environ. 2010; 33:566-589.
18. Tester M., Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Ann. Bot. 2003; 91:503-527.
19. Urbańska S., Obrzut P., Ogiela E. Impact of salts from winter road maintenance on selected properties of roadside soils. Infrastructure and ecology of rural areas. 2016; 1521 – 1534.
20. Balyuk S., Medvedev V., Miroshnichenko V., et al. Ecological condition of soils of Ukraine. Ukrainian Geographical Journal. 2012; 38-42.
21. Kosakivska I., Golovyanko I. Adaptation of plants: biosynthesis and functions of stress proteins. Ukrainian phytocenological collection. 2006; 3-17.
22. Kutsokon N. The main directions of genetic transformation of the genus *Populus*. Cytology and Genetics. 2011; 6:67-78.
23. Kutsokon N., Rakhmetov D., Khudoleieva L. et al. Growth characteristics and energy productivity of poplars and willows under short rotation planting for the first vegetation year. Biological systems. 2017; 9 (2):238-246.
24. Khudoleeva L., Kutsokon N. Comparison of salt resistance of representatives of the genera *Populus* and *Salix* *in vitro*. Science Rise: Biological Science. 2018; 2 (11):35-38.

References (Scopus)

1. Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr. Opin. Cell Biol. 2000;12:431-434.
2. Barcala M., Mattera M., Soliani C., et al. Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. Journal of Experimental Botany. 2019; 1-15.
3. Chen S., Polle A. Salinity tolerance of *Populus*. Plant Biol. 2010;12: 317 – 33.

Ю. Хома, асп.,
Л. Худолєєва, канд. биол. наук,
Н. Куцоконь, канд. биол. наук
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА НА РАСТЕНИЯ ТОПОЛЯ КЛОНА "INRA 353-38" И ИВЫ КЛОНА 'ЖИТОМИРСКАЯ-1' В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Засоление почвы является важным абиотическим фактором, отрицательно влияющим на рост, развитие и продуктивность растений. Быстрорастущие деревья тополя и ивы являются важными биоэнергетическими растениями, проявляющими разную степень адаптации к различным средам обитания. Исследование солеустойчивости различных клонов тополь и ив позволит выявить генотипы, которые можно выращивать на засоленных почвах с использованием биомассы в биоэнергетической отрасли. В связи с этим целью работы было изучение влияния солевого стресса на растения тополя клона 'INRA 353-38' (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) и ивы клона 'Житомирская-1' (*Salix* sp.) в условиях культуры *in vitro*. Для проведения исследования растения культивировали на питательной среде на основе солей МС с добавлением хлорида натрия в концентрациях 25, 50 и 100 мМ. Контрольные растения выращивали на среде, свободной от хлорида натрия. Состояние растений (по 4-балльной шкале), интенсивность их роста (по длине побега) и корнеобразование (по количеству корней) оценивали на 10-й и 30-й дни культивирования. Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне чувствительности к хлориду натрия обоих клонов в условиях культуры *in vitro*. Однако ива 'Житомирская-1' характеризовалась более высокой чувствительностью к солевому стрессу по сравнению с тополем клона 'INRA 353-38', поскольку ростовые реакции у ивы значительно снижались уже при содержании хлорида натрия в среде 50 мМ, а при кратковременном действии (10 дней) высокой концентрации хлорида натрия (100 мМ) у всех растений ивы рост останавливался и они быстро погибали. У гибридного тополя ростовые реакции снижались на протяжении месяца, в основном при наивысшей концентрации хлорида натрия, но даже в таких условиях часть побегов оставалась жизнеспособной.

Ключевые слова: тополь (*Populus*), ива (*Salix*), солевой стресс, культура *in vitro*.

Надійшла до редколегії 7.10.2020
Отримано виправлений варіант 9.11.2020
Підписано до друку 9.11.2020

Received in the editorial 7.10.2020
Received a revised version on 9.11.2020
Signed in the press on 9.11.2020

Yu. Khoma, PhD stud.,
L. Khudolieieva, PhD,
N. Kutsokon, PhD

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF SALT STRESS ON PLANTS OF POPLAR CLONE 'INRA 353-38' AND WILLOW CLONE 'ZHYTOMYRSKA – 1' IN IN VITRO CULTURE

Soil salinization is an important abiotic factor negatively affecting plant growth, development and productivity. Fast-growing poplar and willow trees are important plants for bioenergy production demonstrating varying degrees of adaptation to different habitats. The study of salt resistance in different clones of poplars and willows will reveal genotypes that can be planted in saline soils for producing biomass for the bioenergy industry. Therefore, the aim of the study was to investigate the effects of salt stress on poplar plants of clone 'INRA 353-38' (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) and willow clone 'Zhytomyrska – 1' (*Salix* sp.) under in vitro culture. For this purpose the plants were cultivated on MS nutrient medium with the addition of sodium chloride in concentrations 25 mM, 50 mM and 100 mM. The control plants were grown on the sodium chloride-free medium. The plant status (with a 4-score scale), the intensity of their growth (by shoot length) and rooting capacity (by the number of roots) were assessed on the 10th and the 30th day of cultivation. The results obtained indicate a high level of sensitivity to sodium chloride of both studied clones under in vitro cultivation. But the willow 'Zhytomyrska – 1' had a higher sensitivity to salt stress comparing to hybrid polar 'INRA 353-38' since growth parameters of willow were significantly decreased even under the concentration of sodium chloride 50 mM, and in the case of short term influence (10 days) of the highest concentration of sodium chloride (100 mM) all willow plants terminated their growth and quickly died. The growth parameters of hybrid poplar were declined within a month, mainly under the highest concentration of sodium chloride, but even under such conditions some part of the shoots were able to survive.

Keywords: poplar (*Populus*), willow (*Salix*), salt stress, in vitro culture.

УДК 581.9 (477.41)

DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.49-55

В. Коломійчук, д-р біол. наук
Ботанічний сад ім. акад. О. В. Фоміна, Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Баранський, канд. біол. наук
Національний ботанічний сад ім. акад. М. М. Гришка НАН України, Київ, Україна

ФЛОРА ТА РОСЛИННІСТЬ ІРПІНСЬКОГО ЛІСУ

Охарактеризовано фіторізноманіття цінного масиву Ірпінського лісу в Київській області. Наведено дані про історію досліджень цієї цікавої у ботанічному сенсі території Київського Полісся. Наведено особливості рослинності різних комплексів цього лісового масиву, де переважають соснові ліси, злакові та мохово-лишайникові. Найбільш цінними тут є дубові ліси, насичені рідкісними трав'янистими видами рослин. Також на понижених формах рельєфу фрагментарно поширені вільшняки. Подано дані щодо флори цієї території, яка нараховує 437 видів судинних рослин із 67 родин та 4 відділів. Десять провідних родин флори (*Asreaceae*, *Roaceae*, *Rosaceae* та ін.) об'єднують 51,1 % видів флори лісу. Зазначено високий рівень адвентизації цієї флори (19,6 %), що розвинувся внаслідок доступності території та значної кількості населення прилеглих населених пунктів. До видів із високим рівнем інвазійної здатності належать *Amorpha fruticosa* L., *Iva xanthiifolia* Nutt., *Erigeron annuus* (L.) Desf., *Galinsoga parviflora* Cav., *Oenothera biennis* L., *Oxalis stricta* L., *Reynoutria japonica* Houtt., *Solidago canadensis* L., *Solanum nigrum* L. Вони найчастіше зустрічаються уздовж лісових доріг, на галявинах, у місцях проведення вибіркового рубок, на узліссях. По периферії лісового масиву виявлено низку здичавілих із культури інтродуцентів – *Berberis aquifolium* Pursh, *Datura stramonium* L., *Gaillardia pulchella* Foug., *Ricinus communis* L., *Vitis vinifera* L. Наведено дані щодо фіторарушення цієї території. Тут зазначені 34 раритетні таксони, з яких найбільшу цінність мають представники родин *Orchidaceae*, *Ranunculaceae*, *Roaceae*. П'ять видів рослин цього лісу (*Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó, *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Pulsatilla patens* (L.) Mill. s.l.) занесені до Червоної книги України. Запропоновано створити на частині цієї території новий об'єкт природно-заповідного фонду Київської області – регіональний ландшафтний парк "Потоки", згодом – адміністрацію, службу охорони і розробити менеджмент-план щодо управління ресурсами цього об'єкта.

Ключові слова: флора, рослинність, Ірпінський ліс, Київське Полісся, Україна.

Вступ. Серед лісової рослинності Українського Полісся мішані та широколистяні ліси південних районів краю найбільш флористично багаті, оскільки вони приурочені до родючіших ґрунтів, порівняно з лісами північних районів Полісся, і межують на півдні із флористично багатими широколистяними лісами лісостепових районів.

Згідно із сучасним фізико-географічним районуванням територія нашого дослідження – масив Ірпінського лісу – розташована в межах Здовзько-Ірпінського району фізико-географічної області Київського Полісся, мішано-лісової, хвойно-широколистої помірно теплої зони [6]. За геоботанічним районуванням України масив Ірпінського лісу розташований у Київському правобережному окрузі грабово-дубових, дубових, дубово-соснових лісів, заплавної луки і евтрофних боліт Поліської підпровінції хвойно-широколистяних лісів Східноєвропейської провінції Європейської широколистянолісової області [4].

Відповідно до гербарних даних (KW, KWHU, KWHA) і літературних свідчень (Флора УРСР) цей лісовий масив досліджували на початку ХХ ст. Ю. М. Семенкевич, у 1930-60-ті роки – М. В. Клоков, О. М. Дубовик, Д. М. Доброчаєва, С. С. Харкевич, у 1970-80-ті – М. М. Бортняк, В. Г. Собко, Т. Л. Андрієнко, С. Л. Мосякін

[1, 3, 9, 12]. Однак ці дослідження мають фрагментарний характер. Мета нашої роботи – схарактеризувати флору та рослинність Ірпінського лісу з подальшим обґрунтуванням переведення найбільш цінної частини лісового масиву в категорію природоохоронної території.

Об'єкт та методи досліджень. Масив Ірпінського лісу розташований на плакорній ділянці в межиріччі Ірпеня та Бучі. На півночі та північному сході він межує з м. Ірпнем, на північному заході відмежовується заплавою р. Буча, на заході межує із с. Забуччям, на сході відмежовується заплавою р. Ірпін, а на півдні межує із сс. Стоянкою, Капітанівкою, Дмитрівкою Києво-Святошинського району Київської області. Північно-східна ділянка лісу перебуває у власності Ірпінської міської ради, а більша (південно-західна) підпорядкована ДП "Київське лісове господарство" (Ірпінське та Приміське лісництва).

В основу роботи покладено власні ботанічні дослідження, проведені маршрутно-польовими та геоботанічними методами у 2013, 2015, 2018–2020 рр. Під час досліджень складено геоботанічні описи в межах кожного виділу лісу. Зібраний гербарій рослин передано у фонди Національного ботанічного саду НАН України.

Фотоматеріали рослин Ірпінського лісу опубліковано в інформаційних базах "iNaturalist" і BGIF [2]. Латинські назви рослин подано за базою "Catalogue of Life": 2020 Annual Checklist (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2020/>).

Результати дослідження. Найбільшу площу в Ірпінському лісі, його ядро, охоплюють флористично багаті дубово-соснові ліси (субори). Вони сформувалися на місці колишніх дубових, дубово-грабових і сосново-дубових лісів, від яких нині лишилися лише окремі вікові дерева *Quercus robur* L. Перший ярус цих лісів представлений *Pinus sylvestris* L. віком від 100 до 70–60 років. У другому ярусі зростають *Quercus robur* із домішкою інших широколистяних видів *Tilia cordata* Mill., *Acer platanodes* L., *Betula pendula* Roth, *Ulmus glabra* Huds., *Pyrus communis* L., *Malus sylvestris* Mill., *Sorbus aucuparia* L. та адвентивного виду *Quercus rubra* L. У чагарниковому ярусі зростають *Corylus avellana* L., *Frangula alnus* Mill., *Sambucus nigra* L., *S. racemosa* L., *Prunus padus* L., *P. serotina* Ehrh., *Rubus nessensis* Hall. Переважно на галявинах і узліссях зростають *Chamaecytisus ruthenicus* Wol., *Rosa canina* L., *Rubus caesius* L. У трав'яно-чагарниковому ярусі співдомінують *Clinopodium vulgare* L., *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H.P. Fuchs, *Luzula pilosa* (L.) Willd., *Melampyrum nemorosum* L., *Moehringia trinervia* (L.) Clairv., *Poa nemoralis* L., *Veronica chamaedrys* L., рідше трапляються *Anthericum ramosum* L., *Cruciata glabra* (L.) Ehrend., *Fragaria vesca* L., *Hylotelephium telephium* (L.) H. Ohba, *Hypochaeris radicata* L., *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. На більш освітлених галявинах зростають *Achillea millefolium* L., *Berteroia incana* (L.) DC., *Centaurea phrygia* ssp. *pseudophrygia*, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Trifolium repens* L. Серед регіонально рідкісних видів Полісся варто зазначити *Campanula persicifolia* L., *Clematis recta* L., *Hepatica nobilis* Mill., які спорадично зростають у південних районах Полісся, але далі на північ трапляються дуже рідко.

Значним видовим різноманіттям неморальної флори характеризуються фрагменти дубово-грабових лісів, які островками ростуть у периферійних частинах лісового масиву ближче до заплави річок Ірпін і Буча. Основу деревостану становлять середньовікові та молоді насадження *Quercus robur* і *Carpinus betulus* L., іноді трапляються вікові дерева дуба як залишки колишніх дібров. У чагарниковому ярусі дібров спорадично трапляються *Corylus avellana* L., *Sambucus nigra*.

Рясний весняний аспект дібров Ірпінського лісу утворюють ефемероїди: *Anemone nemorosa* L., *A. ranunculoides* L., *Ficaria verna* Huds., *Gagea lutea* (L.) Ker Gawl., *G. minima* (L.) Ker Gawl., *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. та інші ранньоквітучі види – *Melica nutans* L., *Pulmonaria obscura* Dumort., *Stellaria holostea* L., а серед них – деякі регіонально-рідкісні: *Pulmonaria angustifolia* L., *Mercurialis perennis* L., *Viola hirta* L.

У літню пору року у трав'яно-чагарниковому ярусі лісу розвинуті синузії *Geranium sanguineum* L., *Luzula pilosa*, *Vinca minor* L., *Viola mirabilis* L. та низка зазначених вище трав'янистих видів для суборів. Ближче до заплави у діброві Ірпінського лісу зростають *Aristolochia clematidis* L., *Galium aparine* L.

Найбільш флористично бідними є лишайникові соснові ліси. Їхній деревний ярус представлений монодомінантними культурами сосни. У розрідженому чагарниковому ярусі трапляються *Frangula alnus*, *Sambucus racemosa*. У трав'яно-чагарниковому ярусі співдомінують *Chelidonium majus* L., *Geranium robertianum* L., *Mycelis muralis* (L.) Dumort., *Veronica officinalis* L., а в більш вологих місцях – *Molinia caerulea* (L.) Moench,

спорадично трапляються *Lapsana communis* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. На піщаних галявинах у полиново-куничникових ценозах зростають *Corynephorus canescens* (L.) P. Beauv., *Dianthus borbasii* Vandas, *Jasione montana* L., *Helicrysum arenarium* (L.) Moench, *Viola arvensis* Murray.

На знижених ділянках лісу, ближче до заплави р. Буча і навколо штучних озер та улоговин зазначено фрагменти вільхових і вільхово-березових лісів, деревостан яких складений із *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Betula pubescens* Ehrh. У чагарниковому ярусі вільшняків зростають *Salix cinerea* L., *S. caprea* L., *S. alba* L., *Frangula alnus*. Трав'янистий ярус представлений вологолюбними видами *Cicuta virosa* L., *Inula britannica* L., *Juncus effusus* L., *Myosoton aquaticum* (L.) Moench., *Veronica longifolia* L., *Urtica dioica* L. У найбільш обводнених місцях зростають *Alisma plantago-aquatica* L., *Lycopus europaeus* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Thelypteris palustris* Schott та деякі інвазійні види: *Bidens frondosa* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. & A.Gray.

Значне рекреаційне навантаження призводить до появи у крайових ділянках лісу, наближених до міста і навколишніх сіл, а також уздовж лісових доріг, на вирубках і узліссях адвентивних видів – *Amorpha fruticosa* L., *Asclepias syriaca* L., *Iva xanthiifolia* Nutt., *Erigeron annuus* (L.) Desf., *Galinsoga parviflora* Cav., *Oenothera biennis* L., *Oxalis stricta* L., *Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim., *Reynoutria japonica* Houtt., *Senecio viscosus* L., *Solidago canadensis* L., *Solanum nigrum* L. У периферійних, наближених до населених пунктів районах лісу, виявлено низку здичавілих із культури інтродуцентів *Berberis aquifolium* Pursh, *Datura stramonium* L. var. *tatula* (L.) B. Boivin, *Gaillardia pulchella* Foug., *Ricinus communis* L., *Vitis vinifera* L. [2].

За оригінальними відомостями, а також літературними і гербарними матеріалами ми склали анотований список флори судини рослин цієї території, який нині об'єднує 437 видів із 196 родів, 67 родин, 5 класів та 4 відділів (додаток). Квіткові рослини у цій флорі мають панівне становище (422 види, 96,6 %). Провідні родини цієї флори – *Asteraceae* (59; 13,5 %), *Rosaceae* (29; 6,6 %), *Fabaceae* (27; 6,2 %), *Lamiaceae* (24; 5,5 %), *Poaceae* (22; 5,0 %), *Caryophyllaceae* (20; 4,6 %), *Apiaceae* (17; 3,9 %), *Ranunculaceae* (14; 3,2 %), *Cyperaceae* та *Plantaginaceae* (по 8 видів; разом 2,6 %), які об'єднують 51,1 % видів флори загалом. 32 родини містять від 2 до 7 видів, а 25 родин флори лісу представлені одним видом. Порівнюючи флору Ірпінського лісу із флорою Українського Полісся [12], зазначаємо певну їхню подібність, особливо в розташуванні провідних родин у спектрі. Унаслідок одноманітності орографічних чинників у флорі Ірпінського лісу вдалося виявити лише 1/8 частку флори Українського Полісся. За частотою трапляння 56 видів на дослідженій території зазначені часто, 42 – звичайно, 166 – спорадично, 145 – рідко і 12 – поодинокі.

Близьке розташування населених пунктів, розвинена мережа стежок, стихійне лісонасадження не властиві для флори Полісся деревних і кущових видів рослин спричинило значну синантропізацію флори. Загалом тут зазначено 52 види адвентивних рослин, частка яких становить 19,6 % від загальної кількості флори. Серед адвентивних видів найбільш небезпечним для Ірпінського лісу є *Padus serotina*, що місцями утворює щільні зарості в підліску дубово-соснового лісу, пригнічуючи й витісняючи рідкісні трав'янисті види. За нашими багаторічними спостереженнями, *Padus serotina*

інтенсивно займає порушені внаслідок антропогенного впливу лісові ділянки, рясно плодоносить і розсівається на значні території.

Раритетна компонента флори майбутньої природоохоронної території, за матеріалами досліджень та науковими публікаціями інших науковців, налічує 34 таксони [3, 7, 9, 12]. Найбільше раритетних видів зазначено в родинях *Poaceae* (6), *Orchidaceae* (4), *Rosaceae* (3). На території проєктованого парку зафіксовано 26 видів рослин із Європейського червоного списку рідкісних рослин і тварин, 9 – зі списку МСОП, 1 вид – з Додатку I Бернської конвенції та 4 види рослин – зі списку CITES [7]. П'ять видів судинних рослин (*Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó, *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Pulsatilla patens* (L.) Mill. s.l.) внесено до Червоної книги України [13]. Крім того, на території парку зростають п'ять видів рослин, що підлягають особливій охороні в межах Київської області [7, 11].

Також у межах проєктованого регіонального ландшафтного парку зазначено низку оселищ із резолюції 4 (1996) Постійного комітету Бернської конвенції [9], а саме: C2.34. Рослинність водотоків із повільною течією і евтрофною водою (на площі до 1 га); D5.2. Болота з домінуванням великих осок (до 1 га).

З огляду на значне фітосозологічне та рекреаційне значення, Ірпінський ліс потребує охорони. Ми підготували обґрунтування для створення регіонального ландшафтного парку "Потоки" на площі близько 540 га.

Система природоохоронного менеджменту зі збереження та відтворення корінних лісових насаджень майбутнього регіонального ландшафтного парку передбачає заходи, які сприятимуть максимальному наближенню видового складу деревостану його вікової структури, ярусної та просторової структури до аналогів корінних лісів південного Полісся. На території створеного парку потребують дослідження популяції низки рідкісних видів рослин (зозулинцеві, види родів сон *Pulsatilla*, півники *Iris* та деякі інші). Для оцінювання стану їхніх популяцій, змін чисельності тощо необхідно створити моніторингові ділянки (постійні пробні площі) і провести популяційні спостереження впродовж вегетаційного періоду року з подальшим розробленням відповідних заходів щодо їх охорони та відтворення.

Очікуваними результатами цих заходів мають стати такі: наявність інформації про стан популяцій рідкісних видів флори парку; наявність необхідних відомостей для розроблення заходів із відтворення чисельності популяцій рідкісних видів рослин парку.

Висновки. Зважаючи на значне різноманіття флори для такої невеликої території (437 видів судинних рослин на площі 540 га), а також на збереженість угруповань Ірпінського лісу (де найбільш цінні дубові та сосново-дубові ліси), є нагальна потреба його охорони. Вигідне розташування лісу між заплавами двох річок (Ірпінь і Буча) створює перспективу щодо залучення цієї території до об'єктів Смарагдової мережі України. За умов ухвали рішення про створення на цій території регіонального ландшафтного парку треба розробити проєкт його організації з відповідним зонуванням, створити адміністрацію та службу охорони і запровадити менеджмент його ресурсів.

Список використаних джерел

1. Андриенко Т. Л. Растительный мир Украинского Полесья в аспекте его охраны / Т. Л. Андриенко, Ю. Р. Шеляг-Сосонко. – К.: Наук. думка, 1983. – 216 с.
2. Baransky A. (2020). iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2020-11-19.
3. Бортняк М. М. До поширення деяких нових та маловідомих для Київського Полісся рослин / М. М. Бортняк // Укр. ботан. журн. – 1962. – Т. 19, № 3. – С. 79–84.
4. Дідух Я. П. Геоботаничне районування України та суміжних територій / Я. П. Дідух, Ю. Р. Шеляг-Сосонко // Укр. ботан. журн. – 2003. – Т. 60, № 1. – С. 6–17.
5. Заверуха Б. В. Флора вищих і нижчих рослин України / Б. В. Заверуха // Природа Української РСР. Рослинний світ. – К.: Наук. думка, 1985. – С. 17–44.
6. Загальногеографічний атлас України. – К.: ДНВП "Картографія", 2004. – 112 с.
7. Червона книга Київської області / В. В. Конішук, С. Л. Мосякін, П. М. Царенко та ін. // Агроекологічний журнал, 2012. – № 3. – С. 46–58.
8. Коротченко І. А. Представленість видів природної флори України Європейському Червоному списку судинних рослин / І. А. Коротченко // Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронної стратегії: матер. IV Міжнар. наук. конф. (16-20.05.2016 р., Київ, Україна). – К.: Паливода А. В., 2016. – С. 32–37.
9. Мосякін С. Л. Флористичні знахідки на Київському Поліссі (УРСР) / С. Л. Мосякін // Укр. ботан. журн. – 1988. – Т. 45, № 4. – С. 65–67.
10. Онищенко В. А. Оселища України за класифікацією EUNIS / В. А. Онищенко. – К.: Фітосоціоцентр, 2016. – 54 с.
11. Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України: довідкове видання / упорядники: Т. Л. Андриенко, М. М. Перегрим. – К.: Альтерпрес, 2012. – 148 с.
12. Фіторізноманіття Українського Полісся та його охорона / за заг. ред. Т. Л. Андриенко. – К.: Фітосоціоцентр, 2006. – 316 с.
13. Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Українська енциклопедія, 2009. – 912 с.

References

1. Andrienko T.L., Shelyag-Sosonko Yu.R. The flora of the Ukrainian Polesie in the aspect of protection. – K.: Nauk. dumka, 1983. – 216 p.
2. Baransky A. (2020). iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2020-11-19.
3. Bortnyak M.M. Before the spread of some new and little-known plants for Kyiv Polissya // Ukr. botan. jour. – 1962. – Vol.19, №3. – P. 79-84.
4. Didukh Ya.P., Shelyag-Sosonko Yu.R. Geobotanical zoning of Ukraine and adjacent territories // Ukr. botan. jour. – 2003. – Vol.60, №1. – P.6-17.
5. Zaverukha B.V. Flora of higher and lower plants // Nature of the Ukrainian SSR. Flora. – K.: Nauk. dumka, 1985. – P.17-44.
6. General geographical atlas of Ukraine. – K.: DNV "Cartography", 2004. – 112 p.
7. Konishchuk V.V., Mosyakin S.L., Tsarenko P.M. and others. Red Book of Kyiv region // Agroecological Journal, 2012. – №3. – P.46-58.
8. Korotchenko I.A. Representation of species of natural flora of Ukraine to the European Red List of vascular plants // Rare plants and fungi of Ukraine and adjacent territories: implementation of environmental strategy / Mat-ly IV International. Science. conference (May 16-20, 2016, Kyiv, Ukraine). – K.: Palivoda A.V., 2016. – P. 32-37.
9. Mosyakin S.L. Floristic finds in Kyiv Polissya (USSR) // Ukr. botan. jour. – 1988. – Vol.45, №4. – P.65-67.
10. Onyshchenko V.A. Habitats of Ukraine according to the EUNIS classification. – K.: Fitosociocentre, 2016. – 54 p. 11. Official lists of regionally rare plants of administrative territories of Ukraine (reference edition) / Encl. Andrienko T.L., Peregrym M.M. – Kyiv: Alterpress, 2012. – 148 p.
12. Phytodiversity of Ukrainian Polissya and its protection / Under general ed. T.L. Andrienko. – Kyiv: Fitosociocentre, 2006. – 316 p.
13. Red Book of Ukraine. Flora. – Kyiv: Globalconsalting, 2009. – 912 p.

Надійшла до редколегії 12.10.2020
Отримано виправлений варіант 12.11.2020
Підписано до друку 12.11.2020

Received in the editorial 12.10.2020
Received a revised version on 12.11.2020
Signed in the press on 12.11.2020

В. Коломийчук, д-р биол. наук
 Ботанический сад им. А. В. Фомина, Учебно-научный центр "Институт биологии и медицины",
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
 А. Баранский, канд. биол. наук
 Национальный ботанический сад им. акад. Н. Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина

ФЛОРА И РАСТИТЕЛЬНОСТЬ ИРПЕНСКОГО ЛЕСА

Исследовано фиторазнообразие ценного массива Ирпенского леса в Киевской области. Приводятся данные об истории исследований этой интересной в ботаническом отношении территории Киевского Полесья. Характеризуются особенности растительности разных комплексов этого лесного массива, где преобладают по площади дубово-сосновые леса, злаковые и мохово-лишайниковые. Наиболее ценными здесь являются дубовые леса, насыщенные редкими травянистыми видами растений. Кроме того, по понижениям тут фрагментарно отмечены ольшаники. Приведены данные о флоре этой территории, которая включает 437 видов сосудистых растений из 67 семейств и 4 отделов. Десять ведущих семейств флоры (Asreaceae, Poaceae Rosaceae и др.) объединяют 51,1 % всех видов флоры леса. Отмечен высокий уровень адвентизации этой флоры (19,6 %), развивающейся вследствие доступности территории и значительного количества населения прилегающих населенных пунктов. К видам с высоким уровнем инвазивной способности принадлежат *Amorpha fruticosa* L., *Iva xanthiifolia* Nutt., *Erigeron annuus* (L.) Desf., *Galinsoga parviflora* Cav., *Oenothera biennis* L., *Oxalis stricta* L., *Reynoutria japonica* Houtt., *Solidago canadensis* L., *Solanum nigrum* L. Они чаще всего отмечаются вдоль лесных дорог, на полянах и опушках леса, в местах проведения выборочных санитарных рубок. По периферии лесного массива выявлен ряд одичавших из культуры интродуцентов – *Berberis aquifolium* Pursh, *Datura stramonium* L. *Gaillardia pulchella* Foug., *Ricinus communis* L., *Vitis vinifera* L. Приводятся данные о фитораритетах этой территории. Отмечены 34 раритетных таксона, из которых наибольшую ценность имеют представители семейства Orchidaceae, Ranunculaceae, Poaceae. Пять видов растений этого леса (*Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó, *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Pulsatilla patens* (L.) Mill. s.l.) занесены в Красную книгу Украины. Предложено создать на части данной территории новый объект природно-заповедного фонда Киевской области – региональный ландшафтный парк "Потоки", а в дальнейшем – его администрацию, службу охраны и разработать менеджмент-план по управлению ресурсами данного объекта.

Ключевые слова: фитобиота, фитораритеты, Ирпенский лес, Киевское Полесье, Украина.

V. Kolomiychuk, Dr. Sci.,
 O. V. Fomin Botanical Garden, Education and Science Center "Institute of Biology and Medicine",
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
 A. Baransky, PhD,
 M. M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

FLORA AND VEGETATION OF THE IRPIN FOREST

It is reported about the diversity of phytobiota of the valuable natural complex "Irpin Forest" in the Kyiv region. The data on the history of research of this interesting from a botanical perspective territory of Kyiv Polissia are presented.

The features of the vegetation of different complexes of this forest area, dominated by oak-pine, cereal and moss-lichen forests, are characterized. The most valuable forests here are oak ones, which are rich in rare herbaceous plant species. Besides, there fragmentary occur alder stands on lowland areas. The data on the flora of this territory, which includes 437 species of vascular plants from 67 families and 4 divisions, are presented. Ten dominating families of flora (Asreaceae, Poaceae Rosaceae, etc.) include 51.1 % of the forest flora species. A high level of adventization of this flora (19.6 %) has been noted, which is a result of the accessibility of the territory and a significant number of the population of adjacent settlements. Species with a high level of invasiveness include *Amorpha fruticosa* L., *Iva xanthiifolia* Nutt., *Erigeron annuus* (L.) Desf., *Galinsoga parviflora* Cav., *Oenothera biennis* L., *Oxalis stricta* L., *Reynoutria japonica* Houtt., *Solidago canadensis* L., *Solanum nigrum* L. They most often occur along forest roads, on meadows, in places of selective cuttings, on the fringes of the forest. On the periphery of the forest, a number of species were found which have fallen out of cultivation – *Berberis aquifolium* Pursh, *Datura stramonium* L. *Gaillardia pulchella* Foug., *Ricinus communis* L., *Vitis vinifera* L. The data on the rare plant species of this territory are given. There are 34 rare taxa, the most valuable of which are the representatives of the families Orchidaceae, Ranunculaceae, Poaceae. Five species of plants of the forest (*Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó, *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Pulsatilla patens* (L.) Mill. s.l.) are listed in the Red Data Book of Ukraine. It is proposed to create a new object of the nature reserve fund of the Kyiv region – a regional landscape park "Streams" ("Potoky") on a part of this territory, with further plans to create an administration, security service and develop a management plan for resource management of the object.

Keywords: phytobiota, rare plant species, Irpin forest, Kyiv Polissia, Ukraine.

Додаток

АНОТОВАНИЙ СПИСОК ФЛОРИ ІРПІНЬСЬКОГО ЛІСУ

Addition

ANNOTATED LIST OF FLORA OF "IRPIN FOREST"

DIVISIO EQUISETOPHYTA
 CLASSIS EQUISETOPSIDA
 LYCOPODIACEAE: *Lycopodium clavatum* L. – р.
 EQUISETACEAE: *Equisetum arvense* L. – звич. (ЕЧС), *Equisetum fluviatile* L. – споп., *Equisetum hyemale* L. – споп., *Equisetum palustre* L. – споп., *Equisetum sylvaticum* L. – споп.
 DIVISIO POLYPODIOPHYTA
 CLASSIS POLYPODIOPSIDA
 ASPIDACEAE
Dryopteris carthusiana (Vill.) H.P.Fuchs – споп., *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. – споп.
 ATHYRIACEAE: *Athyrium filix-femina* (L.) Roth – р.
 HYPOLEPIDACEAE: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn – споп., *Pteridium pinetorum* C.N.Page & R.R.Mill – ч.
 THELYPTERIDACEAE: *Thelypteris palustris* Scott – споп.
 DIVISIO PINOPHYTA
 CLASSIS PINOPSIDA
 PINACEAE: *Picea abies* (L.) Karst. – споп., *Pinus banksiana* Lamb. – п., *Pinus sylvestris* L. – ч.
 DIVISIO MAGNOLIOPHYTA
 CLASSIS LILIOPSIDA
 ALISMACEAE: *Alisma plantago-aquatica* L. – споп. (МСОП, ЕЧС); *Sagittaria sagittifolia* L. – р.
 ASPARAGACEAE: *Asparagus officinalis* L. – споп. (ЕЧС)
 CONVALLARIACEAE: *Convallaria majalis* L. – ч.

CYPERACEAE: *Carex acuta* L. – р (ЕЧС), *Carex ericetorum* Pollich – ч., *Carex hirta* L. – звич., *Carex pilosa* Scop. – р., *Carex riparia* Curt. – р. (ЕЧС), *Lyzula sylvatica* (Huds) Gaudin – споп., *Luzula multiflora* (Ehrh.) Lej. – споп., *Scirpus sylvaticus* L. – ч.

HEMEROCALLIDACEAE: *Hemerocallis fulva* (L.) L. – р.

IRIDACEAE: *Iris pseudacorus* L. – ч., *Iris aphylla* L. – споп.

JUNCACEAE: *Juncus articulatus* L. – споп., *Juncus bufonius* L. – споп., *Juncus conglomeratus* L. – р., *Juncus effusus* L. – споп. (МСОП, ЄЧС).

LEMNACEAE: *Lemna minor* L. – споп. (МСОП, ЕЧС), *Lemna trisulca* L. – р., *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. – споп.

LILIACEAE: *Anthericum ramosum* L. – р., *Gagea lutea* (L.) Ker Gawl. – споп., *Gagea minima* (L.) Ker Gawl. – споп., *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce – споп., *Polygonatum multiflorum* (L.) All. – р.

ORCHIDACEAE: *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó – поод. (ЄЧС, ЧКУ, CITEC), *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó – поод. (ЄЧС, ЧКУ, CITEC), *Epipactis helleborine* (L.) Crantz – поод. (ЄЧС, ЧКУ, CITEC), *Platanthera bifolia* (L.) Rich. – поод. (ЄЧС, ЧКУ, CITEC).

POACEAE: *Agrostis stolonifera* L. – споп., *Agrostis tenuis* Sibth – звич., *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv. – звич., *Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth – звич., *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth – звич., *Corynephorus canescens* (L.) Beauv. – звич., *Dactylis glomerata* L. – звич., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. – р., *Elytrigia repens* (L.) Nevski ssp. *repens* – звич., *Festuca ovina* L. – звич. (ЄЧС), *Festuca rubra* L. – р., *Glyceria maxima* (C. Hartm.) Holmb. – др. (ЄЧС), *Koeleria glauca* (Spreng.) DC. – споп., *Lolium perenne* L. – споп. (ЕЧС), *Melica nutans* L. – споп., *Milium effusum* L. – споп., *Molinia caerulea* (L.) Moench – звич., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. – споп. (МСОП, ЕЧС), *Poa nemoralis* L. – звич., *Poa pratensis* L. – споп. (ЄЧС), *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. – звич., *Setaria verticillata* (L.) P. Beauv. – звич.

TYPHACEAE: *Typha angustifolia* L. – р. (ЕЧС, МСОП), *Typha latifolia* L. – споп.

CLASSIS MAGNOLIOPSIDA

ACERACEAE: *Acer negundo* L. – споп., *Acer platanoides* L. – споп., *Acer pseudoplatanus* L. – р., *Acer tataricum* L. – споп.

AMARANTHACEAE: *Amaranthus cruentus* L. – р., *Amaranthus retroflexus* L. – споп.

APIACEAE: *Aegopodium podagraria* L. – ч., *Angelica sylvestris* L. – р., *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. – ч., *Berula erecta* (Huds.) Coville – р., *Chaerophyllum aromaticum* L. – споп., *Chaerophyllum temulum* L. – споп., *Cicuta virosa* L. – поод., *Conium maculatum* L. – споп., *Daucus carota* L. – ч., *Heracleum sosnowskyi* Manden – р., *Heracleum sphondylium* subsp. *sibiricum* (L.) Simonk. – споп., *Oenanthe aquatica* (L.) Poir. – р., *Pastinaca sativa* L. – ч., *Peucedanum oreoselinum* (L.) Moench – ч., *Peucedanum palustre* (L.) Moench – р., *Pimpinella saxifraga* L. – споп., *Torilis japonica* (Houtt.) DC.

APOCYNACEAE: *Vinca minor* L. – споп.

ARISTOLOCHACEAE: *Aristolochia clematitis* L. – ч., *Asarum europaeum* L. – споп.

ASCLEPIADACEAE: *Asclepias syriaca* L. – р., *Vincetoxicum hirundinaria* Medik. – споп.

ASTERACEAE: *Achillea millefolium* L. – ч., *Ambrosia artemisiifolia* L. – р., *Arctium lappa* L. – споп., *Arctium tomentosum* Mill. – споп., *Artemisia absinthium* L. – споп., *Artemisia annua* L. – р., *Artemisia campestris* L. – споп., *Artemisia marschalliana* Spreng. – р., *Artemisia vulgaris* L. – споп., *Bellis perennis* L. – споп., *Bidens frondosa* L. – споп., *Bidens tripartita* L. – р., *Carduus acanthoides* L. – р., *Carduus crispus* L. – р., *Carlina biebersteinii* Bernh. ex Hornem. – р., *Centaurea jacea* L. – споп., *Centaurea pseudopharga* C.A. Mey – споп., *Centaurea sumensis* Kalen. – р., *Chondrilla juncea* L. – р., *Cichorium intybus* L. – споп., *Cirsium arvense* (L.) Scop. – споп., *Cirsium palustre* (L.) Coss. ex Scop. – р., *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. – р., *Cosmos bipinnatus* Cav. – р., *Erectites hieracifolia* (L.) Raf. ex DC. – р., *Erigeron annuus* (L.) Desf. – ч., *Erigeron canadensis* L. – споп., *Eupatorium cannabinum* L. – р., *Filago arvensis* L. – р., *Gaillardia pulchella* Foug. – р., *Galinsoga parviflora* Cav. – споп., *Gnaphalium sylvaticum* L. – р., *Gnaphalium uliginosum* L. – р., *Helicrysum arenarium* (L.) Moench – споп., *Hieracium umbellatum* L. – звич., *Hieracium murorum* L. – р., *Hypochaeris radicata* L. – ч., *Inula britannica* L. – р., *Inula salicina* L., *Iva xanthiifolia* Nutt. – р., *Lactuca serriola* L. – ч., *Lapsana communis* L. – споп., *Leontodon autumnalis* L. – споп., *Leucanthemum vulgare* (Vaill.) Lam. – р., *Mycelis muralis* (L.) Dumort. – споп. (ЄЧС), *Onopordum acanthium* L. – р., *Picris hieracioides* L. – р., *Pilosella officinarum* F. Schultz et Sch. Bip. – ч., *Pilosella* sp. – р., *Pyrethrum corymbosum* (L.) Scop. – р., *Senecio viscosus* L. – р., *Senecio vulgare* L. – споп., *Solidago canadensis* L. – р., *Solidago virgaurea* L. – споп., *Stenactis annua* Nees – споп., *Tanacetum vulgare* L. – споп., *Taraxacum officinale* Wigg. – ч., *Tragopogon dubius* Scop. – споп., *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Bip. – споп., *Tussilago farfara* L. – споп.

BALSAMINACEAE: *Impatiens noli-tangere* L. – р., *Impatiens parviflora* DC. – ч.

BERBERIDACEAE: *Berberis aquifolium* Pursh – р.

BETULACEAE: *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. – споп., *Betula pendula* Roth – звич., *Betula pubescens* Ehrh. – р., *Carpinus betulus* L. – р., *Corylus avellana* L. – ч.

BORAGINACEAE: *Anchusa officinalis* L. – р., *Echium vulgare* L. – р., *Myosotis arvensis* (L.) Hill – споп., *Myosotis stricta* Link ex Roem. & Schult. – споп., *Myosotis sparsiflora* J.C.Mikan ex Pohl. – споп., *Pulmonaria angustifolia* L. – р., *Pulmonaria obscura* Dumort. – споп., *Symphytum officinale* L. – р.

BRASSICACEAE: *Alliaria petiolata* (M.Bieb.) Cavara et Grande – звич., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – споп., *A Armoracia rusticana* Gaertn., Mey. & Scherb. – споп., *Berteroa incana* (L.) DC. – ч., *Bunias orientalis* L. – споп., *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik – ч., *Cardamine impatiens* L. – р., *Dentaria bulbifera* L. – р., *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl – споп., *Draba nemorosa* L. – р., *Erysimum cheiranthoides* L. – р., *Lepidium densiflorum* Schrad – р., *Sisymbrium loeselii* L. – споп., *Turritis glabra* L. – споп.

CAMPANULACEAE: *Campanula persicifolia* L. – р., *Campanula patula* L. – споп., *Campanula rapunculoides* L. – споп., *Campanula rotundifolia* L. – р., *Jasione montana* L. – споп.

CANNABACEAE: *Humulus lupulus* L. – звич.

CAPRIFOLIACEAE: *Sambucus nigra* L. – споп., *Sambucus racemosa* L. – р., *Symphoricarpos albus* (L.) S.F. Blake. – р., *Viburnum opulus* L. – р.

CARYOPHYLLACEAE: *Arenaria serpyllifolia* L. – споп., *Cerastium arvense* L. – р., *Cerastium semidecandrum* L., *Dianthus borbasii* Vandas – р., *Dianthus deltoides* L. – р., *Gypsophila fastigiata* L. – р., *Herniaria glabra* L. – р., *Silene latifolia* Poir. – звич., *Silene nutans* L. Moehringia trinervia (L.) Clairv. – ч., *Saponaria officinalis* L. – р., *Scleranthus perennis* L. – р., *Silene flos-cuculi* (L.) Greuter & Burdet – споп., *Silene nutans* L. – ч., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke – споп.,

Spergula arvensis L., *Stellaria aquatica* (L.) Scop. – споп., *Stellaria graminea* L. – споп., *Stellaria holostea* L. – звич., *Stellaria media* (L.) Vill. – звич.

CELASTRACEAE: *Euonymus europaea* L. – ч., *Euonymus verrucosus* Scop. – споп.

CHENOPODIACEAE: *Atriplex patula* L. – п., *Chenopodium album* L. – ч., *Chenopodium betaceum* Andr. – п., *Chenopodium hybridum* L. – п.

CLUSIACEAE: *Hypericum perforatum* L. – споп.

CONVOLVULACEAE: *Calystegia sepium* (L.) R. Br. – п., *Convolvulus arvensis* L. – споп.,

CORNACEAE: *Cornus sanguinea* L. – ч.

CORULACEAE: *Carpinus betulus* L. – п., *Corylus avellana* L. – споп. (МСОП)

CRASSULACEAE: *Hylotelephium telephium* (L.) H. Ohba – споп., *Sedum acre* L. – ч., *Sedum maximum* (L.) Suter – споп., *Sedum reflexum* L. – п.

CUCURBITACEAE: *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. & A. Gray. – п.

DIPSACACEAE: *Knautia arvensis* (L.) Coult. – споп., *Scabiosa ochroleuca* L. – п.

ERICACEAE: *Calluna vulgaris* (L.) Hull – споп., *Vaccinium myrtillus* L. – п., *Vaccinium vitis-idaea* L. – споп.

EUPHORBIACEAE: *Euphorbia cyparissias* L. – споп., *Euphorbia virgata* Waldst. et Kit. – п., *Mercurialis perennis* L. – др., *Ricinus communis* L. – поод.

FABACEAE: *Amorpha fruticosa* L. – споп., *Astragalus glycyphyllos* L. – споп., *Caragana arborescens* Lam. – п., *Chamaecytisus ruthenicus* (Fisch. ex Wol.) Klaskova – звич., *Genista tinctoria* L. – споп., *Lathyrus niger* (L.) Bernh. – п., *Lathyrus pratensis* L. – споп., *Lathyrus sylvestris* L. – п., *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. – п., *Lotus corniculatus* L. – ч., *Medicago falcata* L. – споп., *Medicago lupulina* L. – споп., *Medicago sativa* L. – п., *Melilotus albus* Medik. – споп. (ЕЧС), *Robinia pseudoacacia* L. – споп., *Securigera varia* (L.) Lassen – ч., *Trifolium arvense* L., *Trifolium hybridum* L. – п., *Trifolium medium* L. – споп., *Trifolium montanum* L. – п., *Trifolium pratense* L. звич., *Trifolium repens* L. – звич., *Vicia cracca* L. – п., *Vicia hirsuta* (L.) S. F. Gray – споп., *Vicia sepium* L. – споп., *Vicia tetrasperma* (L.) Schreb. – споп., *Vicia villosa* Roth – п.

FAGACEAE: *Quercus borealis* Michx. – п., *Quercus robur* L. – ч.

GERANIACEAE: *Geranium robertianum* L. – звич., *Geranium sanguineum* L. – споп., *Geranium palustre* L., *Geranium pusillum* L. – споп., *Geranium sibiricum* L. – п.

GROSSULACEAE: *Ribes nigrum* L. – п., *Ribes spicatum* Robson – п.

HYDROCHARITACEAE: *Hydrocharis morsus-ranae* L. – споп.

JUGLANDACEAE: *Juglans regia* L. – п.

LAMIACEAE: *Ajuga genevensis* L. – споп., *Ajuga reptans* L. – споп., *Ballota nigra* L. – споп., *Betonica officinalis* L. – споп., *Clinopodium vulgare* L. – ч., *Galeopsis bifida* Boenn. – споп., *Glechoma hederacea* L. – звич., *Lamium album* L. – ч., *Lycopus europaeus* L. – п., *Lamium galeobdolon* (L.) L. – споп., *Lamium maculatum* (L.) L. – споп., *Lamium purpureum* L. – ч., *Lycopus exaltatus* L.f. – споп., *Mentha aquatica* L. – споп., *Mentha arvensis* L. – споп., *Mentha longifolia* (L.) L. – п., *Origanum vulgare* L. – споп., *Salvia pratensis* L., *Scutellaria galericulata* L. – споп., *Stachys annua* (L.) L. – п., *Stachys sylvatica* L. – споп., *Teucrium chamaedrys* L. – п., *Thymus pulegioides* L. – споп., *Thymus serpyllum* L. – споп.

LORANTHACEAE: *Viscum album* L. – споп.

LYTRACEAE: *Lythrum salicaria* L. – споп.

MALVACEAE: *Alcea rosea* L. – споп., *Lavatera thuringiaca* L. – споп., *Malva sylvestris* L. – п., *Malva verticillata* L. – п., *Tilia cordata* Mill. – ч.

MORACEAE: *Morus alba* L. – п.

NYCTAGINACEAE: *Oxybaphus nyctagineus* (Michx.) Sweet. – поод.

OLEACEAE: *Fraxinus excelsior* L. – ч., *Ligustrum vulgare* L. – п.

ONAGRACEAE: *Epilobium hirsutum* L. – споп., *Epilobium parviflorum* Schreb. – п., *Oenothera biennis* L. – звич., *Oenothera rubricaulis* Kleb. – п.

OXALIDACEAE: *Oxalis acetosella* L. – споп., *Oxalis stricta* L. – п.

PAPAVERACEAE: *Chelidonium majus* L. – звич., *Papaver rhoeas* L. – споп.

PHYTHOLACCACEAE: *Phytolacca americana* L. – п.

PLANTAGINACEAE: *Plantago lanceolata* L. – ч., *P. major* L. – звич., *Plantago media* L. – п., *Veronica chamaedrys* L. – ч., *Veronica officinalis* L. – звич., *Veronica persica* Poir. – п., *Veronica polita* Fr. – п., *Veronica spicata* L. – п.

POLYGONACEAE: *Fallopia convolvulus* (L.) A. Löve – споп., *Fallopia dumetorum* (L.) Holub – споп., *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbe – п., (ЕЧС), *Persicaria lapathifolia* (L.) Delarbe – п., *Polygonum arenastrum* Boreau – споп., *Polygonum aviculare* L. – звич., *Reynoutria japonica* Houtt. – п., *Rumex acetosella* L. – ч., *Rumex acetosa* L. – п., *Rumex confertus* Willd. – споп., *Rumex crispus* L. – споп., *Rumex hydrolapathum* Huds. – споп., *Rumex obtusifolius* L. – споп., *Rumex thyrsiflorus* Fingerh. – ч.

POLEMONIACEAE: *Polemonium caeruleum* L. – п. (ЧСКО)

PRIMULACEAE: *Primula veris* L. – п., *Trientalis europaea* L. – споп.

PYROLACEAE: *Pyrola rotundifolia* L. – п.

RANUNCULACEAE: *Anemone nemorosa* L. – споп., *A. ranunculoides* L. – споп., *Clematis recta* L. – п., *Consolida regalis* Gray – споп., *Ficaria verna* Huds. – ч., *Hepatica nobilis* Mill. – п. (ЧСКО), *Pulsatilla patens* (L.) Mill. – поод. (ЕЧС, БК, ЧКУ), *Ranunculus acris* L. – споп., *Ranunculus auricomus* L. – п., *Ranunculus flammula* L. – п., *Ranunculus polyanthemus* L. – споп., *Ranunculus repens* L. – звич., *Ranunculus sceleratus* L. – п., *Thalictrum aquilegifolium* L. – п.

RHAMNACEAE: *Frangula alnus* Mill. – звич.

ROSACEAE: *Agrimonia eupatoria* L. – споп., *Agrimonia procera* L. – споп., *Amelanchier spicata* (Lam.) K. Koch – ч., *Argentina anserina* (L.) Rydb. – ч., *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. – поод., *Armeniaca vulgaris* Lam. – споп., *Crataegus monogyna* Jacq. – ч., *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. – споп., *Fragaria vesca* L. – ч., *Fragaria viridis* Duch. – п. (ЕЧС), *Geum aleppicum* – п., Jacq. *Geum urbanum* L. – звич., *Geum rivale* L. – споп., *Malus domestica* Borkh. – споп., *Malus sylvestris* Mill. – споп., *Padus avium* Mill. – споп., *Padus serotina* (Ehrh.) Ag. – звич., *Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim. – споп., *Potentilla alba* L. – п., *Potentilla argentea* L. – звич., *Potentilla reptans* L. – споп., *Prunus padus* L. – споп.

(ЕЧС), *Pyrus communis* L. – ч. (ЕЧС), *Rosa canina* L. – ч., *Rosa rubiginosa* L. – р., *Rubus caesius* L. – звич., *Rubus idaeus* L. – звич., *Rubus nessensis* Hall. – р., *Sorbus aucuparia* L. – звич.

RUBIACEAE: *Cruciata glabra* (L.) Ehrend. – спор., *Galium aparine* L. – звич., *Galium album* Mill. – спор., *Galium odoratum* (L.) Scop., *Galium palustre* L. – спор., *Galium mollugo* L. – ч., *Galium uliginosum* L. – спор., *Galium verum* L. – звич.

RUTACEAE: *Ptelea trifoliata* L. – р.

SALICACEAE: *Populus tremula* L. – звич., *Populus nigra* L. – ч. (МСОП), *Salix alba* L. – спор., *Salix cinerea* L. – звич., *Salix caprea* L. – ч., *Salix fragilis* L. – ч., *Salix triandra* L. – ч.

SANTALACEAE: *Viscum album* L. – спор.

SCROPHULARIACEAE: *Digitalis grandiflora* Mill. – р., *Linaria vulgaris* Mill. – ч., *Melampyrum nemorosum* L. – ч., *Scrophularia nodosa* L. – спор., *Verbascum lychnitis* L. – спор., *Verbascum nigrum* L. – р., *Verbascum phlomoides* L. – спор.

SAXIFRAGACEAE: *Chrysosplenium alternifolium* L. – р.

SOLANACEAE: *Datura stramonium* L. var. *tatula* – р., *Solanum dulcamara* L. – спор., *Solanum nigrum* L. – ч.

ULMACEAE: *Ulmus glabra* Huds. – ч., *Ulmus laevis* Pall. – р., *Ulmus minor* Mill. – р.

URTICACEAE: *Urtica dioica* L. – ч. (ЕЧС), *Urtica galeopsifolia* J. Jacq. ex Blume – р.

VALERIANACEAE: *Valeriana officinalis* L. – спор.

VIOLACEAE: *Viola arvensis* Murray – ч., *Viola canina* L. – спор., *Viola hirta* L. – р., *Viola mirabilis* L. – р., *Viola odorata* L. – спор., *Viola tricolor* L. – ч.

VITACEAE: *Parthenocissus incerta* (A.Kern.) Fritsch – спор., *Vitis vinifera* L. – р.

Умовні позначення та скорочення: Частота трапляння: ч. – часто, звич. – звичайно, спор. – спорадично, р. – рідко, поод. – поодинокі. Природоохоронний статус: МСОП – Червоний список МСОП, ЕЧС – Європейський червоний список, ЧКУ – Червона книга України, БК – Додаток Бернської конвенції, ЧСКО – список регіонально рідкісних рослин Київської області.

Symbols and abbreviations. Frequency of occurrence: ч. – often, звич. – of course, спор. – sporadically, р. – rarely, поод. – singly. Conservation status: IUCN – IUCN Red List, ЕЧС – European Red List, ЧКУ – Red Book of Ukraine, БК – Annex to the Bern Convention, ЧСКО – list of regionally rare plants of Kyiv region.

УДК 575.113.001.8-001.73:612.112:616.15:575.224.4
DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.55-61

М. Романенко, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

Д. Курінний, канд. біол. наук,

О. Демченко, канд. біол. наук,

С. Клименко, д-р мед. наук

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ, Україна,

С. Рушковський, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ *IN VITRO* НА ГЕНОМ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРІФЕРИЧНОЇ КРОВІ БЕЗСИМПТОМНИХ НОСІЇВ МУТАЦІЇ 5382insC У ГЕНІ *BRCA1*

Одним зі спадкових чинників, що впливає на розвиток раку молочної залози та яєчників, є точкова мутація 5382insC гена *BRCA1*. Однак приблизно у 15 % носіїв цієї мутації протягом життя онкологічна симптоматика не виявляється. Нині особливості розвитку спонтанної та індукованої геномної нестабільності у безсимптомних носіїв мутації в гені *BRCA1* вивчені недостатньо. Метою роботи було оцінити вплив мутації 5382insC у гені *BRCA1* на радіочутливість лімфоцитів у осіб без реалізованої онкопатології. Було проведено культивування лімфоцитів крові дев'яти жінок (трьох осіб із мутацією 5382insC *BRCA1* без реалізованої онкопатології та шести умовно здорових волонтерів). Частина зразків була опромінена γ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) у дозі 1,0 Гр перед початком культивування. За допомогою методу електрофорезу окремих клітин (Comet assay) у нейтральних умовах було здійснено оцінювання відносного рівня пошкодження ДНК. Установлено, що спонтанний рівень пошкодження ДНК у культурах лімфоцитів у носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* перевищував показники групи контролю ($p < 0,01$). Після впливу іонізуючого випромінювання в культурах лімфоцитів осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* зазначено зменшення ($p < 0,01$) кількості клітин із високим рівнем пошкодження ДНК на тлі статистичного зростання ($p < 0,01$) апоптичної активності в культурі. Зроблено припущення, що посилення елімінації клітин із високим рівнем пошкодження ДНК через зростання апоптичної активності у відповідь на дію пошкоджуючих геном факторів є одним із ефективних механізмів, що може суттєво знижувати ймовірність виникнення онкологічних захворювань у безсимптомних носіїв мутації гена *BRCA1*.

Ключові слова: ген *BRCA1*, Comet assay, апоптоз, лімфоцити периферичної крові, опромінення, пошкодження ДНК.

Вступ. Рак молочної залози та яєчників є найбільш поширеним пухлинним захворюванням серед жінок у світі. Щодня фіксується близько 3,5 тис. нових випадків. Близько 69 % від загальної кількості хворих реєструються в нерозвинутих країнах, де більшість випадків хвороби діагностуються на пізніх стадіях. Згідно зі статистикою, кожна восьма жінка ризикує захворіти на один із цих типів раку [1–5].

На сьогодні є відомими як середовищні, так і спадкові чинники, що впливають на розвиток раку молочної

залози та яєчників. До основних середовищних факторів можна віднести замісну терапію естрогеном, паління використання внутрішньоматкової спіралі синдром полікістозних яєчників, тривале приймання препаратів для лікування безпліддя [5]. Найважливішими генетичними чинниками є генеративні мутації генів *BRCA1* або *BRCA2*, які обумовлюють спадкові форми раку молочної залози та яєчників [6–8].

Успадкованими точковими мутаціями 5382insC, 185delAG, 300T>G та 4153delA в гені *BRCA1* обумовле-

ний приблизно кожен двадцятий випадок раку молочної залози та яєчників. Мутаційні зміни в гені *BRCA1* призводять до значного підвищення ризику розвитку первинних раків молочної залози та яєчників у когорті осіб-носіїв (до 80 і 69 %, відповідно). Після діагностування інвазивного раку молочної залози ці жінки мають високий ризик розвитку повторного іпсилатерального або контралатерального раку молочної залози.

Гени *BRCA1* та *BRCA2* задіяні у процесі репарації дволанцюгових розривів ДНК за типом гомологічної рекомбінації (HR), яка пригнічується при порушенні експресії цих генів у результаті мутацій або епігенетичних змін [9, 10]. Інші шляхи репарації (BER, NER, NHEJ) не можуть повністю компенсувати відсутність гомологічної репарації, що призводить до накопичення із часом репараційних помилок, наслідком чого є значне підвищення ризику виникнення злоякісних новоутворень молочної та підшлункової залоз, простати, яєчників [11, 12]. Крім того, генетичні чи епігенетичні зміни гена *BRCA1* призводять до порушення регуляції клітинного циклу та нормальної сегрегації хромосом у мітозі [13].

Таким чином, розвиток онкологічних патологій у носіїв мутацій у гені *BRCA1* є чітко асоційованим із високим рівнем геномної нестабільності, якій критично збільшується за наявності мутагенного навантаження. Однак приблизно у 15 % носіїв протягом життя онкологічна симптоматика не виявляється.

На сьогодні особливості розвитку спонтанної та індукованої геномної нестабільності у безсимптомних носіїв мутацій у гені *BRCA1* вивчені недостатньо.

Мета роботи: оцінити вплив мутації 5382insC у гені *BRCA1* на радіочутливість лімфоцитів у осіб без реалізованої онкопатології.

Матеріали та методи. Було проведено культивування лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) дев'яти жінок: трьох осіб із мутацією 5382insC *BRCA1* без реалізованої онкопатології віком від 47 до 52 років, у середньому 51 рік (експериментальна група), і шести умовно здорових волонтерів віком від 36 до 51, у середньому 47 років (група порівняння). У всіх випадках

наявність мутації було верифіковано з використанням полімеразно-ланцюгової реакції.

Загальний обсяг досліджень включав аналіз 14400 клітин, із яких 8400 – лімфоцити умовно здорових волонтерів, 6000 – клітини осіб-носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1*. Особи з обох груп брали добровільну участь в обстеженнях після підписання інформованої згоди.

Культивування ЛПК проводили відповідно до стандартного протоколу впродовж 48 год. Частину культур опромінювали γ -квантами (випромінювач IBL-237C, потужність 2,34 Гр/хв) у дозі 1,0 Гр перед початком інкубації клітин.

Оцінювання відносного рівня пошкоджень ДНК проводили за допомогою методу електрофорезу окремих клітин (Comet assay) у нейтральних умовах.

Для приготування слайдів, лізису клітин і проведення нейтрального кометного електрофорезу використовували загальноприйнятну методику [14, 15]. Виділення лімфоцитів у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, USA) проводили згідно із протоколом виробника. Отриману суспензію клітин змішували з 1 %-ю легкоплавкою агарозою (Sigma, USA) при 37 °C. Після лізису скельця відмивали у буфері TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 7,5), після чого проводили електрофорез у TBE-буфері 15 хв за температури 4 °C, напруги 1 В/см і сили струму у 200 mA.

Після електрофорезу препарати фарбували DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) та аналізували під люмінесцентним мікроскопом, до якого приєднували фотоапарат "Canon D1000". Зображення обробляли за допомогою програми "ImageJ" (imagej.nih.gov) із використанням плагіну "Open Comet" [16]. Як основний параметр для визначення відносного рівня пошкодження ДНК застосовували показник Tail Moment (TM), який одночасно враховує як кількість ДНК у хвостовій частині "комети", так і довжину хвостової частини [15]. Атипові "комети" (рис. 1 Б), які утворюються із клітин, що перебувають у стані апоптозу [17], ураховували окремо. Частоту атипових "комет" використовували для оцінювання інтенсивності процесів апоптозу у клітинній культурі.



Рис. 1. "Комети", що утворюються внаслідок міграції ДНК у агарозний гель:
А – типові "комети"; Б – атипові "комети"

Статистичну обробку даних проводили стандартними методами. Достовірність різниці між рядами даних значень TM розраховували за критерієм Мана – Вітні [18].

Результати та їх обговорення. Індивідуальні фонові значення TM у культурах ЛПК волонтерів із групи порівняння коливались у межах $3,47 \pm 0,68$ – $6,46 \pm 0,27$, а індивідуальні середні значення TM трьох

осіб носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* були $15,52 \pm 1,16$, $18,51 \pm 1,98$ та $26,19 \pm 1,71$. При попарному порівнянні індивідуальних рядів даних різниці між ними не досягали достовірного рівня значущості ($p > 0,05$) ні у групі порівняння, ні у групі осіб-носіїв, тому в подальших розрахунках для кожної групи ми використовували об'єднаний пул "комет".

Розподіли значень параметра ТМ після культивування інтактних та опромінених ЛПК осіб із обох груп представлені на рис. 2.

В осіб із групи порівняння фоновий рівень показника ТМ після 48-годинного культивування ЛПК у середньому становив $4,26 \pm 0,30$, що збігається з результатами наших попередніх досліджень [19, 20].

При аналізі фонових рівнів ТМ у культурах ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* було зазна-

чено статистично значуще зростання ($p < 0,001$) значення показника порівняно з даними групи контролю ($19,83 \pm 1,72$ по групі в середньому). Отриманий результат указує на наявність високої частоти нерепарованих одно- та дволанцюгових розривів ДНК у ЛПК осіб цієї групи.

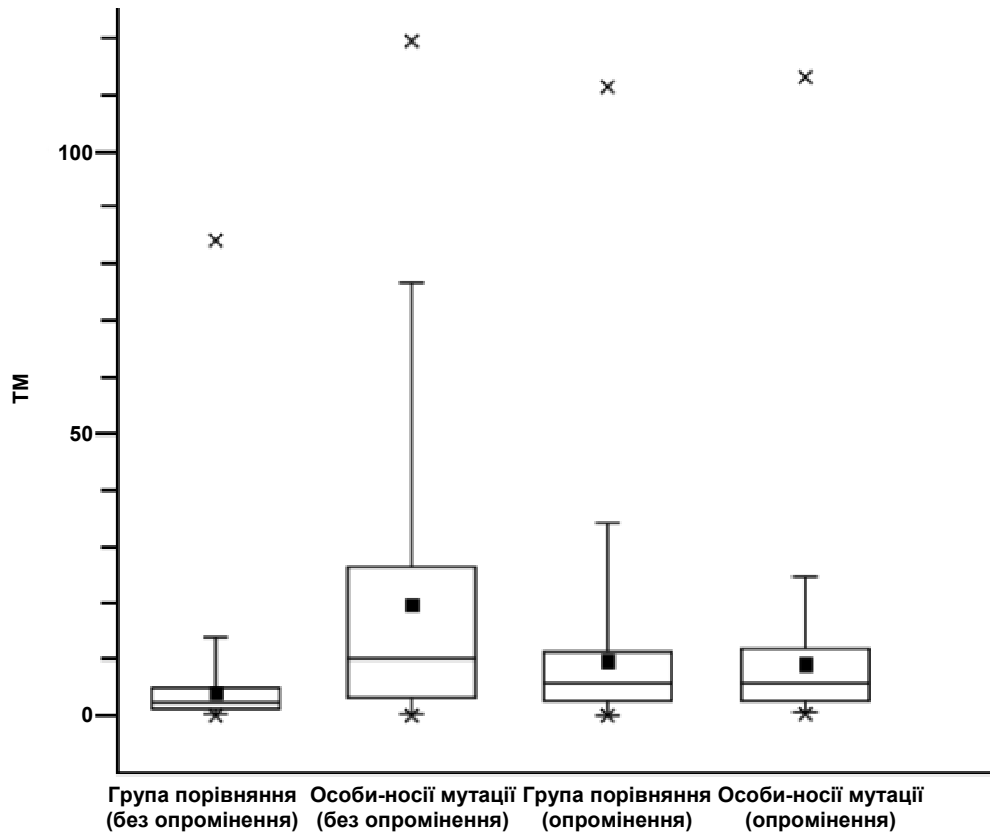


Рис. 2. Діаграма розмаху значень ТМ у осіб із групи порівняння та осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*. Нижня та верхня сторони коробу відповідають першому та третьому квартилям, лінія у середині коробу – медіані. Границі "вусів" показують, у які межі попадають 90 % значень ТМ (з 5-го по 95-й процентиль); ■ – середнє значення ТМ, × – мінімальне та максимальні значення ТМ одна чи множина?

Опромінення *in vitro* культур лімфоцитів спричинило різноспрямовану реакцію: у культурах ЛПК групи порівняння було зафіксовано очікуване зростання ТМ (середній показник по групі становив $12,86 \pm 0,74$), у той самий час у групі носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* дія іонізуючого випромінювання зумовила падіння середньогрупового значення ТМ із $19,83 \pm 1,72$ (до опромінення) до $9,11 \pm 0,85$ (після опромінення).

Для того щоб установити, із чим пов'язане зниження рівня ТМ у ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC *BRCA1*, зареєстроване під впливом опромінення, було проведено оцінювання частотного розподілу "комет". Усі "комети" були розподілені за значеннями ТМ на 17 груп (ТМ від 0 до 16+). Якщо ТМ дорівнював

граничному значенню, то "комету" відносили до наступної групи [19].

Аналіз розподілу "комет" при культивуванні неопромінених ЛПК осіб групи порівняння (рис. 3) показав переважання груп клітин із відносно низьким рівнем розривів ДНК (ТМ у межах від 0 до 5). Після опромінення спостерігався статистично значущий ($p < 0,01$) зсув розподілу "комет" у напрямку збільшення частот клітин із високими рівнями пошкодження ДНК. Так, частота "комет" останньої групи, які утворюються з клітин із найбільшим відносним рівнем пошкодження геному (ТМ 16+), зросла від $4,30 \pm 0,90$ % (культури неопромінених ЛПК) до $15,46 \pm 1,17$ % (культури ЛПК після опромінення), що узгоджується з нашими попередніми даними [19, 20].

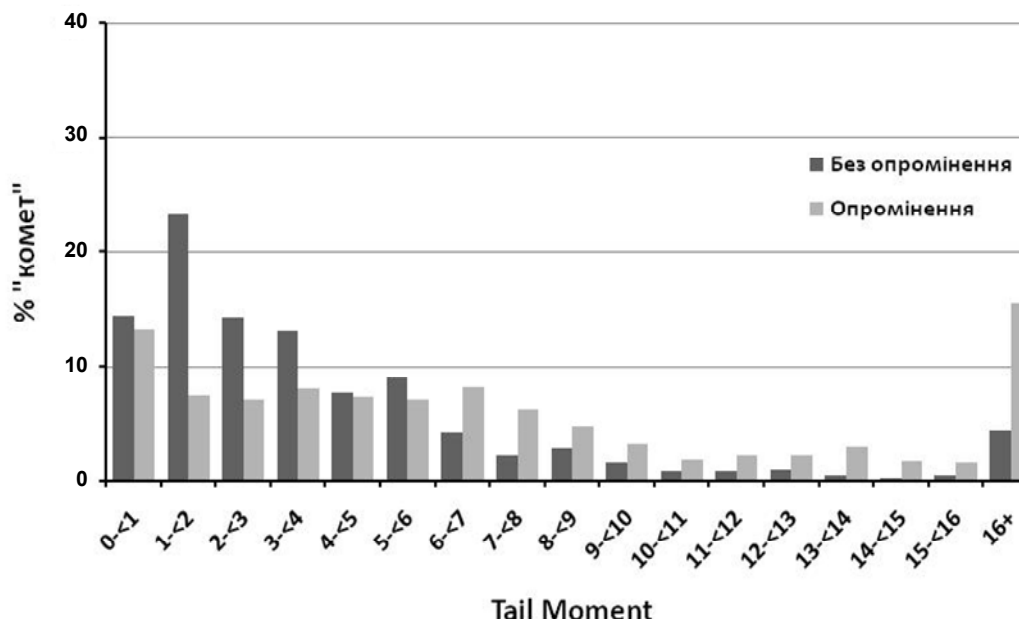


Рис. 3. Розподіли частот "комет" за значеннями ТМ після культивування інтактних та опромінених ЛПК осіб із групи порівняння

Як можна побачити з рис. 4, після культивування інтактних лімфоцитів безсимптомних носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* найбільша кількість "комет" належала до останньої групи ТМ 16+ ($38,74 \pm 3,52$ %). Саме з наявністю пулу клітин із високою спонтанною частотою розривів ДНК пов'язано значне збільшення середньогрупового рівня ТМ у культурах лімфоцитів експериментальної групи відносно відповідних показників групи порівняння. Таким чином, у осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* без реалізованої онкологічної патології спостерігається надзвичайно високий рівень геномної нестабільності навіть в умовах відсутності додаткового мутагенного навантаження.

Після впливу іонізуючого випромінювання на ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* було зазначено неочікуване статистично значуще падіння рівня

клітин із високим ступенем пошкодження геному: до $12,98 \pm 2,33$ %, $p < 0,001$ (рис. 4). Зважаючи на те, що радіаційне навантаження є потужним мутагенним фактором, а доза в 1,0 Гр призводить до виникнення 1000 одно- та 40 дволанцюгових розривів ДНК [21], слід було очікувати ще більшого домінування групи із ТМ > 16 за рахунок зменшення частоти клітин у групах із ТМ від 0 до 10.

Можливим поясненням отриманих результатів могло бути посилення елімінації клітин із сублетальним рівнем пошкодження ДНК через зростання апоптичної активності в культурі ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC *BRCA1* у відповідь на дію іонізуючого випромінювання. Для перевірки цього припущення було проведено аналіз частот атипових "комет", які утворюються із клітин, що перебувають у стані апоптозу [17, 19].

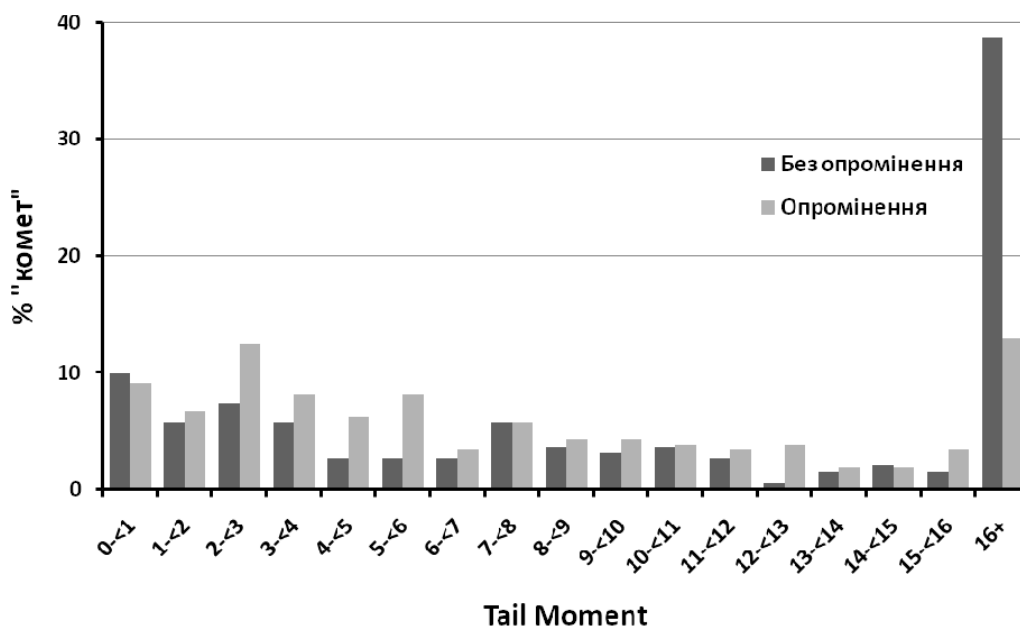


Рис. 4. Розподіли частот комет за значеннями ТМ після культивування інтактних та опромінених ЛПК осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*

У культурах ЛПК групи порівняння під впливом опромінення зафіксовано зростання середньої частоти атипичних "комет" із $1,15 \pm 1,00\%$ до $3,78 \pm 0,81\%$ ($p < 0,01$). Отриманий результат відповідає нашим попереднім даним [20, 21]. Середній рівень атипичних "комет" осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* дорівнював $5,95 \pm 1,49\%$ в інтактній культурі ЛПК і статисти-

чно значуще ($p < 0,01$) зростає (до $14,39 \pm 2,16\%$) після опромінення (рис. 5). Таким чином, спонтанна та індукована дією іонізуючого випромінювання апоптична активність у культурах ЛПК безсимптомних носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1* статистично значуще ($p < 0,01$) перевищувала відповідні показники групи порівняння.

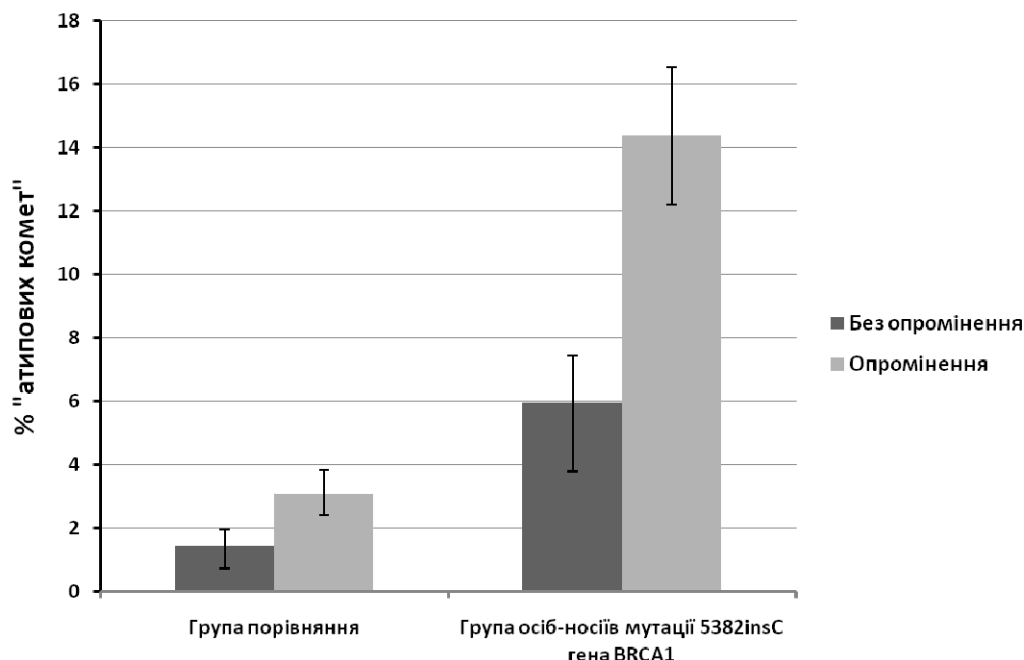


Рис. 5. Частота атипичних "комет" у інтактних та опроміненних культурах ЛПК осіб із групи порівняння та групи осіб-носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок, що рівень спонтанної геномної нестабільності в культурах ЛПК носіїв мутації 5382insC у гені *BRCA1* статистично значуще ($p < 0,01$) перевищував відповідні показники групи порівняння. Цей результат демонструє негативні наслідки мутаційних змін у гені *BRCA1* для геному загалом – зростання із часом репараційних помилок у зв'язку із пригніченням HR-репарації дволанцюгових розривів ДНК. У той самий час нами було встановлено, що вплив зовнішніх мутагенних чинників на ЛПК осіб групи дослідження (особи з мутацією 5382insC у гені *BRCA1* з невиявленою онкопатологією) викликає значне посилення апоптичної активності та, як наслідок, елімінації клітин із високим рівнем пошкоджень геному.

Таким чином, одним із важливих та ефективних механізмів, який компенсує низьку ефективність репарації та суттєво знижує ймовірність виникнення онкологічних захворювань у осіб цієї групи, є апоптоз.

Висновки. За допомогою методу "Comet assay" нами було встановлено високий спонтанний рівень пошкодження ДНК у лімфоцитах периферичної крові безсимптомних носіїв мутації 5382insC гена *BRCA1*. У відповідь на дію іонізуючого випромінювання в культурах лімфоцитів осіб-носіїв зазначено суттєве падіння частоти клітин із високою кількістю розривів ДНК і статистично значуще зростання атипичних "комет", що може свідчити про збільшення апоптичної активності в культурі.

Список використаних джерел

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. International Classification of Diseases for Oncology. – 3rd edition. Accessed March 1, 2018. – URL : <http://codes.iarc.fr/>.
2. World Health Organization. International Classification of Diseases, 10th revision. Accessed March 1, 2018. – URL : <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.

3. Cancer in North America: 2010–2014. Volume One: Combined Cancer Incidence for the United States, Canada and North America / G. Copeland, A. Lake, R. Firth et al. // Springfield, IL : North American Association of Central Cancer Registries. – 2017. – Vol. .
4. Ovarian cancer statistics, 2018 / L. A. Torre, B. Trabert, C. E. de Santis et al. // CA : A Cancer Journal for Clinicians. – 2018. – Vol. 68. – P. 284–296.
5. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors / Z. Momenimovahed, A. Tiznobaik, S. Taheri et al. // International Journal of Women's Health. – 2019. – Vol. 11. – P. 287–299.
6. *BRCA 1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer / Fergus J. Couch, Michelle L. Deshano, M. Anne Blackwood et al. // New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 336. – P. 1409–1415.
7. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi jews / Jeffery P. Struwing, Patricia Hartge, Sholom Wacholder et al. // The New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 336. – P. 1401–1408.
8. *BRCA* germline mutation test for all woman with ovarian cancer? / A. V. Paradiso, M. Digennaro, M. Patruno et al. // BMC Cancer. – 2019. – Vol. 19. – P. 641–652.
9. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes / Olafur A. Stefansson, Sebastian Moran, Antonio Gomez et al. // Molecular Oncology. – 2015. – Vol. 9. – P. 555–568.
10. *BRCA1* and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells / P. Mita, X. Sun, D. Fenyö et al. // Nature Structural Molecular Biology. – 2020. – Vol. 27. – P. 179–191.
11. *Brca1* Controls Homology-Directed DNA Repair / Mary Ellen Moynahan, Joanne W. Chiu, Beverly H. Koller et al. // Molecular Cell. – 1999. – Vol. 4. – P. 511–518.
12. Tarsounas M. The antitumorigenic roles of *BRCA1*–*BARD1* in DNA repair and replication / Madalena Tarsounas, Patrick Sung // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2020. – Vol. 21. – P. 284–299.
13. Ashok R. Venkitaraman. Cancer Susceptibility and the Functions of *BRCA1* and *BRCA2* / Venkitaraman R. Ashok // Cell. – 2020. – Vol. 108. – P. 171–182.
14. Burlinson B. The *in vitro* and *in vivo* comet assays / B. Burlinson // Methods Molecular Biology. – 2012. – Vol. 817. – P. 143–163.
15. Azqueta A. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights / A. Azqueta, S. Langie, A. Collins // Frontiers. – 2007.
16. Open Comet: an automated tool for comet assay image analysis / Benjamin M. Gyori, Gireedhar Venkatachalam, P. S. Thiagarajan et al. // Redox Biology. – 2014. – Vol. 2. – P. 457–465.

17. Radioprotective properties of astaxanthin: The Impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes *in vitro* / S. R. Rushkovsky, D. A. Kurinnyi, O. M. Demchenko et al. // Ionizing radiation. Advances in research and applications. – 2018. – Vol. 7. – P. 221–240.
18. Rosner B. Fundamentals of Biostatistics, Eighth Edition / B. Rosner // Cengage Learning. – 2015. – P. 962.
19. Olive P. L. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells / P. L. Olive, J. P. Banáth // Nat. Protoc. – 2006 – Vol. 1. – P. 23–29.
20. Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed *in vitro* on different stages of the mitotic cycle / D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko et al. // Cytology and Genetics. – 2018. – Vol. 1. – P. 40–45.
21. Astaxanthin as a modifier of genome instability after γ -radiation / D. Kurinnyi, S. Rushkovsky, O. Demchenko et al. // Progress in Carotenoid Research. – 2018. – Vol. 7. – P. 121–138.

References

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. International Classification of Diseases for Oncology, 3rd edition. Accessed March 1, 2018. URL: <http://codes.iarc.fr/>.
2. World Health Organization. International Classification of Diseases, 10th revision. Accessed March 1, 2018. URL: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
3. Copeland G, Lake A, Firth R. et al. Cancer in North America: 2010–2014. Volume One: Combined Cancer Incidence for the United States, Canada and North America. Springfield, IL: North American Association of Central Cancer Registries. 2017. June.
4. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE et al. Ovarian cancer statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018 Jul; 68(4): 284–296.
5. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S. et al. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. International Journal of Women's Health. 2019 Apr 30; 11: 287–299.
6. Fergus J. Couch, Michelle L. Deshano, M. Anne Blackwood et al. *BRCA 1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. New England Journal of Medicine. 1997; 336: 1409–1415.
7. Jeffery P. Struwing, Patricia Hartge, Sholom Wacholder et al. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. The New England Journal of Medicine. 1997; 336(20): 1401–1408.
8. A. V. Paradiso, M. Digennaro, M. Patruno et al. *BRCA* germline mutation test for all woman with ovarian cancer? BMC Cancer. 2019; 19: 641–652.
9. Olafur A. Stefansson, Sebastian Moran, Antonio Gomez et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. Molecular Oncology. 2015; 9(3): 555–568.

10. Mita P., Sun X., Fenyö D. et al. *BRCA1* and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. Nature Structural Molecular Biology. 2020; 27: 179–191.
11. Mary Ellen Moynahan, Joanne W Chiu, Beverly H Koller et al. *BRCA1* Controls Homology-Directed DNA Repair. Molecular Cell. 1999; 4(4): 511–518.
12. Tarsounas, M., Sung, P. The antitumorigenic roles of *BRCA1*–*BARD1* in DNA repair and replication. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2020; 21: 284–299.
13. Ashok R. Venkitaraman. Cancer Susceptibility and the Functions of *BRCA1* and *BRCA2*. Cell. 2002 Jan 25; 108(2): 171–182.
14. Burlinson B. The *in vitro* and *in vivo* comet assays. Methods Molecular Biology. 2012; 817: 143–163.
15. A. Azqueta, S. Langie, A. Collins. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights. Frontiers. 2007.
16. Benjamin M. Gyor, Gireedhar Venkatachalam, P.S. Thiagarajan et al. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. Redox Biol. 2014 Jan 9; 2: 457–465.
17. S. R. Rushkovsky, D. A. Kurinnyi, O. M. Demchenko et al. Radioprotective properties of astaxanthin: The Impact on radiation induced chromosomal aberrations and DNA breaks in human lymphocytes *in vitro*. Ionizing radiation. Advances in research and applications. 2018; 221–240.
18. Rosner, B. Fundamentals of Biostatistics, Eighth Edition, Cengage Learning. 2015; 962.
19. D. A. Kurinnyi, S. R. Rushkovsky, O. M. Demchenko et al. Peculiarities of modification by astaxanthin the radiation-induced damages in the genome of human blood lymphocytes exposed *in vitro* on different stages of the mitotic cycle. Cytology and Genetics. 2018; 52(1): 40 – 45.
20. Kurinnyi D., Rushkovsky S., Demchenko O. et al. Astaxanthin as a modifier of genome instability after γ -radiation. Progress in Carotenoid Research. 2018; 121–138.
21. Ahnström G., Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography, in DNA Repair. A Laboratory Manual of Research Procedures, eds Friedberg. 1981; 403–418.

Надійшла до редколегії 15.10.2020
Отримано виправлений варіант 16.11.2020
Підписано до друку 16.11.2020

Received in the editorial 15.10.2020
Received a revised version on 16.11.2020
Signed in the press on 16.11.2020

М. Романенко, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Д. Куринний, канд. биол. наук,
Е. Демченко, канд. биол. наук,
С. Клименко, д-р мед. наук
ГУ "Національний научний центр радіаційної медицини НАМН України",
Київ, Україна,
С. Рушковський, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ *IN VITRO* НА ГЕНОМ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИИ 5382insC В ГЕНЕ *BRCA1*

Одним из наследственных факторов, влияющих на развитие рака молочной железы и яичников, является точечная мутация 5382insC в гене *BRCA1*. Однако примерно у 15 % носителей этой мутации в течение жизни онкологическая симптоматика не проявляется. В настоящее время особенности развития спонтанной и индуцированной геномной нестабильности у бессимптомных носителей мутаций в гене *BRCA1* изучены недостаточно. Целью работы было оценить влияние мутации 5382insC в гене *BRCA1* на радиочувствительность лимфоцитов у лиц без реализованной онкопатологии.

Было проведено культивирование лимфоцитов крови девяти женщин (трех с мутацией 5382insC *BRCA1* без реализованной онкопатологии и шести условно здоровых добровольцев). Часть культур была облучена γ -квантами (излучатель IBL-237C, мощность 2,34 Гр / мин) в дозе 1,0 Гр перед началом культивирования. С помощью метода "Comet assay" в нейтральных условиях была проведена оценка относительного уровня повреждаемости ДНК.

Установлено, что спонтанный уровень повреждений ДНК в культурах лимфоцитов носителей мутации 5382insC в гене *BRCA1* превышал показатели группы контроля ($p < 0,01$). После воздействия ионизирующего излучения в культурах лимфоцитов лиц-носителей мутации 5382insC гена *BRCA1* было отмечено падение ($p < 0,01$) частоты клеток с высоким уровнем повреждений ДНК на фоне роста ($p < 0,01$) апоптотической активности. Сделано предположение, что увеличение элиминации клеток с высоким уровнем повреждений ДНК благодаря росту апоптотической активности в ответ на действие повреждающих геном факторов является одним из эффективных механизмов, который может существенно снижать вероятность возникновения онкологических заболеваний у бессимптомных носителей мутаций гена *BRCA1*.

Ключевые слова: ген *BRCA1*, Comet assay, апоптоз, лимфоциты периферической крови, облучение, повреждения ДНК.

M. Romanenko, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
D. Kurinnyi, PhD (Biol. Sci.),
O. Demchenko, PhD (Biol. Sci.),
S. Klymenko, Dr. Sci. (Med.)
National Scientific Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine,
S. Rushkovsky, PhD (Biol. Sci.)
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE IMPACT OF IONIZING IRRADIATION *IN VITRO* ON THE GENOME OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF THE ASYMPTOMATIC CARRIERS OF THE 5382insC MUTATION IN THE *BRCA1* GENE

One of the hereditary factors affecting the development of breast and ovarian cancer is the 5382insC mutation in BRCA1 gene. But, nearly 15 % of carriers of this mutation do not manifest cancer during their lifetime. At present, the features of the development of spontaneous and induced genomic instability in asymptomatic carriers of BRCA1 mutations are studied insufficiently. The aim of the work was to evaluate the effect of the 5382insC BRCA1 mutation on the radiosensitivity of lymphocytes of individuals without an established oncopathology.

The cultivation of blood lymphocytes obtained from 9 women (3 individuals with the 5382insC BRCA1 mutation without established oncopathology, and 6 conditionally healthy volunteers) was carried out. Some of the cultures were irradiated with γ -quanta (IBL-237C emitter, power 2.34 Gy/min) at a dose of 1.0 Gy before cultivation. For evaluation of the relative level of DNA damage the method of Comet assay was applied.

It was found that spontaneous level of DNA damage in cultures of lymphocytes of carriers of the BRCA1 5382insC mutation was statistically significantly ($p < 0.01$) higher than in the control group. After exposure to ionizing radiation for lymphocyte cultures of individuals with BRCA1 5382insC mutation, a decrease ($p < 0.01$) in the level of cells with a high degree of DNA damage was observed while the apoptotic activity was found to be increased ($p < 0.01$). It has been suggested that an increase in the elimination of damaged cells due to apoptotic activity in response to the action of genome-damaging factors is one of the effective mechanisms that can significantly reduce the likelihood of cancer in asymptomatic carriers of the BRCA1 gene mutations.

Keywords: *BRCA1 gene, Comet assay, apoptosis, peripheral blood lymphocytes, radiation, DNA damage.*

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 4 (83)

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редакція залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 7,2. Наклад 300. Зам. № 220-9907.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 4.
Підписано до друку 30.11.20

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02