ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ISSN 1728-2748 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

БІОЛОГІЯ **4(95)/2023**

Засновано 1958 року

УДК 00.57
DOI 10.17721/1728.2748.2023.95.1-46

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

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР	**Остапченко Людмила, д-р біол. наук, проф.** (Україна)
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	**Берегова Тетяна, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Бубріак Іван, канд. мед. наук** (Велика Британія)**; Гапоненко Вадим, канд. техн. наук, проф.** (США)**; Джаган Вероніка, канд. біол. наук, доц.** (Україна)**; Дзержинський Микола, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Жолос Олександр, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Козирицька Кет, канд. техн. наук** (США)**; Лугоніа Ніколета, канд. хім. наук** (Сербія)**; Людовіко Абенаволі, д-р мед. наук** (Італія)**; Макай Шандор, д-р біол. наук, проф.** (Угорщина)**; Макарчук Микола, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Мандрик Юрій, канд. мед. наук** (Німеччина)**; Мартинюк Віктор, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Мневець Руслан, лікар** (Україна)**; Сиволоб Андрій, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Таран Наталія, д-р біол. наук, проф.** (Україна)**; Торгало Єлизавета, канд. біол. наук (заст. голов. ред.)** (Україна)**; Фагуні Шарміла, канд. біол. наук** (Італія)**; Хоперія Вікторія, д-р мед. наук, проф.** (Україна)
Адреса редколегії	**Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини"** **просп. Акад. Глушкова, 2 а, м. Київ, 03127** **☎ (38044) 521 35 98** **e-mail: biovisnyk@knu.ua** **web: https://bio.visnyk.knu.ua/**
Затверджено	**вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини"** **27.12.23 (протокол № 7)**
Зареєстровано	**Міністерством юстиції України** **Свідоцтво про державну реєстрацію** **КВ № 25415-15355 ПР від 03.02.23**
Атестовано	**Міністерством освіти і науки України (категорія Б)** **Наказ № 1412 від 18.12.18**
Індексування	**DOAJ, Hinari, Open Academic Journal Index (OAJI),** **Quality Open Access Market (QOAM), Research Bib, Index Copernicus,** **Ulrich's Periodicals, CrossRef**
Засновник та видавець	**Київський національний університет імені Тараса Шевченка** **Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"** **Свідоцтво про внесенння до Державного реєстру** **ДК № 1103 від 31.10.02**
Адреса видавця	**ВПЦ "Київський університет"** **б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601** **☎ (38044) 239 32 22, 239 31 58, 239 31 28** **e-mail: vpc@knu.ua**

© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2023

BULLETIN
TARAS SHEVCHENKO NATIONAL UNIVERSITY OF KYIV

ISSN 1728-2748 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

BIOLOGY **4(95)/2023**

Established in 1958

UDC 00.57
DOI 10.17721/1728.2748.2023.95.1-46

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.

EDITOR-IN-CHIEF	**Ostapchenko Lyudmila, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)
EDITORIAL BOARD	**Abenavoli Ludovico, DSc (Med.)** (Italy)**; Beregova Tetyana, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)**; Boubriak Ivan, PhD (Med.)** (United Kingdom)**; Dzerzhynsky Mykola, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)**; Dzhagan Veronika, PhD (Biol.), Assoc. Prof.** (Ukraine)**; Fagoonee Sharmila, PhD (Biol.)** (Italy)**; Gaponenko Vadim, PhD (Engin.), Prof.** (United States)**; Hoperia Viktoriya, DSc (Med.), Prof.** (Ukraine)**; Kozyrytska Kat, PhD (Engin.)** (United States)**; Lugonja Nikoleta, PhD (Chem.)** (Republic of Serbia)**; Makarchuk Mykola, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)**; Makai Sandor, DSc (Biol.), Prof.** (Hungary)**; Mandryk Yuriy, PhD (Med.)** (Germany)**; Martynyuk Viktor, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)**; Mnevets Ruslan, Dr. (technical secretary)** (Ukraine)**; Syvolob Andriy, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)**; Taran Nataliya, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)**; Torgalo Elizabeth, PhD (Biol.) (deputy editor)** (Ukraine)**; Zholos Oleksandr, DSc (Biol.), Prof.** (Ukraine)

Address	**Educational and scientific center "Institute of Biology and Medicine"** **2a, Acad. Glushkova av., Kyiv, 03127** **☎ (38044) 521 35 98** **e-mail: biovisnyk@knu.ua** **web: https://bio.visnyk.knu.ua/**
Approved by	**the Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine"** **27.12.23 (protokol № 7)**
Registared by	**the Ministry of Justice of Ukraine** **Certificate of state registration** **КВ № 25415-15355 ПР dated 03.02.23**
Certified by	**the Ministry of Education and Science of Ukraine (category B)** **Order №1412 dated 18.12.18**
Indexing	**DOAJ, Hinari, Open Academic Journal Index (OAJI),** **Quality Open Access Market (QOAM), Research Bib, Index Copernicus,** **Ulrich's Periodicals, CrossRef**
Founded and published	**Taras Shevchenko National University of Kyiv** **Publishing and Polygraphic Center "Kyiv University"** **Certificate of entry into the State Register** **ДК № 1103 dated 31.10.02**
Address	**PPC "Kyiv University"** **14, Taras Shevchenka blvd., Kyiv, 01601** **☎ (38044) 239 32 22, 239 31 58, 239 31 28** **e-mail: vpc@knu.ua**

© Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Publishing and Polygraphic Center "Kyiv University", 2023

ЗМІСТ

КОРОТЄЄВА Ганна, АНДРІЙЧУК Олена, БУДЗАНІВСЬКА Ірина
Перспективи використання бактеріофагів у боротьбі з фітопатогенними бактеріями 5

БЕРІЯ Віталій, ШУХ Анастасія, ГАНДЗЮРА Володимир
Еколого-фауністичні особливості угруповань зоопланктону, іхтіофауни у річці *Ірпінь* 9

ГАЛЕНОВА Тетяна, КАЛАШНІКОВА Марина, КАРБОВСЬКИЙ Віталій, ШОЛОМОН Світлана, МЕЛЬНИК Володимир
Біохімічні показники крові у хворих на розсіяний склероз, які перенесли інфекцію *SARS-CoV-2* 13

ЄЛЬЯШОВ Семен, РИМАР Вадим
Експресія генів механочутливих рецепторів у детрузорі сечового міхура щура 20

НОВОХАТСЬКА Марина, КАЛМИКОВА Олеся, СКРИПНИК Наталія, НЕБИЛЬЦОВА Оксана
Детекція маркерів *P16/KI-67* при виявленні інтраепітеліальної неоплазії шийки матки 24

НЕФЬОДОВА Анастасія, РУДИК Марія, ДОВГИЙ Роман, СКІВКА Лариса
Органометричні показники лімфоїдних органів у щурів з різними моделями хвороби *Альцгеймера* 32

ГРИЦЕВА Наталія, БАБИЧ Тетяна, АНДРІЄНКО Анна, РУБАНІК Ксенія, ЮМИНА Юлія
Оцінювання стійкості сортів картоплі, поширених на території України, до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки 39

CONTENTS

KOROTIEIEVA Hanna, ANDRIICHUK Olena, BUDZANIVSKA Iryna
Prospects of bacteriophages in management of plant pathogenic bacteria 5

BERIIA Vitalii, SHUKH Anastasiia, GANDZYURA Volodymyr
Ecological and faunal features of zooplankton groups, ichthyofauna in the *Irpin* river 9

HALENOVA Tetiana, KALASHNIKOVA Maryna, KARBOVSKYY Vitaliy, SHOLOMON Svitlana, MELNYK Volodymyr
Blood biochemical parameters in patients with multiple sclerosis who had *SARS-Cov-2* infection 13

YELIASHOV Semen, RYMAR Vadim
Expression of mechano-sensitive receptor genes in the detrusor of the rat bladder 20

NOVOKHATSKA Maryna, KALMUKOVA Olesia, SKRYPNYK Nataliia, NEBYLTSOVA Oksana
Detection of P16/KI-67 markers in the detection of cervical intraepithelial neoplasia 24

NEFODOVA Anastasia, RUDYK Maria, DOVHYI Roman, SKIVKA Larisa
Organometric indicators of lymphoid organs in rats with different models of *ALZHEIMER'S* disease 32

HRYTSEVA Nataliia, BABYCH Tetiana, ANDRIIENKO Anna, RUBANIK Ksenia, YUMYNA Yuliia
Assessment of resistance to the pathogen of soft rot and blackleg common in Ukraine potato varieties 39

UDK 578.81
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.5-8

Hanna KOROTIEIEVA, PhD (Biol.), Assoc. Prof.
ORCID ID: 0000-0002-4059-0741
e-mail: hanna.korotieieva@knu.ua
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Olena ANDRIICHUK, PhD (Biol.), Assoc. Prof.
ORCID ID: 0000-0001-6219-2149
e-mail: aom502@knu.ua
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Iryna BUDZANIVSKA, DSc (Biol.), Prof.
ORCID ID: 0000-0003-2538-7312
e-mail: budzanivskai@knu.ua
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PROSPECTS OF BACTERIOPHAGES IN MANAGEMENT OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA

Background. *In recent years bacteriophages draw attention as environmentally friendly means for controlling the bacterial infection. Their use is an effective measure for number of bacterial crops diseases. Bacteriophages have a number of advantages over other methods of control: they are highly specific to host bacteria, non-toxic to macroorganisms, not pathogenic for normal biota of plants and soil. In particular, phage cocktails with specificity and effectiveness against only certain groups of bacteria are used for preventing the spread of infectious diseases in plants. Therefore, the main objective of the study was to isolate and identify bacteriophages specific to phytopathogenic bacteria.*

Methods. *Samples of beet, potatoe, apple, garlic and mandarin with rotting symptoms were selected from vegetable storehouses. Phages were isolated by direct isolation. Phage titers were determined as plaque forming units (pfu/ml) using the standard double layer agar assay technique. The morphological features of viral particles were examined by electron microscopy.*

Results. *As a result of this work we isolated phages (7591/3, 8573/3, Ser/2) specific to Pseudomonas syringae lachrymans 7591, P. fluorescens 8573 and Serratia marcescens. The phage isolates differed in terms of the morphology of their negative colonies. To identify host range of isolated phages spectrum of lytic activity was studied against 16 laboratory strains of phytopathogenic bacteria. Our research revealed that among 9 phage samples three phage isolates are polyvalent.*

Conclusions. *The obtained data indicate that isolates with a broad spectrum of lytic activity can be promising biological agents in control of bacteriosis. Consequently, isolated polyvalent bacteriophages can be considered for therapeutic use against bacterial infection in plants during storage.*

Keywords: *plant pathogenic bacteria, bacterial cultures, morphological features, bacteriophages.*

Background

Human population has been steadily increasing over the last few centuries. In order to meet the global food demand of the growing world's population, there is a need to increase the production of agricultural products. In addition, it is necessary to reduce crop losses due to bacterial diseases. Despite the existing available methods of treating bacterial diseases, there is a need to develop new environmentally friendly strategies to combat them. Current control methods using antibiotics are losing their effectiveness due to the natural development of bacterial resistance to these agents (Anaghez, 2022; Buttimer, 2017). On the other hand, there are no effective traditional antimicrobial drugs against some of agricultural crops diseases (potato blackleg and soft rot disease caused by members of *Enterobacteriaceae*) (Buttimer, 2017; Czajkowski, 2011). That is why agents such as bacteriophages belonged to environmentally friendly approaches of bacterial diseases control have received increased research interest in recent years (Holtappels, 2019; Nawaz, 2023; Wójcicki, 2023).

It is difficult to imagine natural biocenoses without bacteriophages, which participate in the regulation of microbial populations, affect their enzymatic and synthesizing activity (Drulis-Kawa, 2015). Local viral populations are formed under natural conditions. Artificial introduction of bacteriophages into the natural environment is great deal of attention, allowing to detect and predict their impact in more detail. The importance of this task is due, in particular, to the influence of technogenic factors that can accelerate the evolution of populations of phages and bacteria, the divergence of their characteristics and lead to changes in the structure of ecosystems.

In recent years, agriculture has increasingly faced bacterial diseases that are less sensitive to the existing chemical methods of control. In turn, increased concentrations of such chemical substances can lead to damage to plant tissues as reflected in higher crop losses. A major disadvantage of this method of control of phytopathogenic bacteria is also the chemical contamination of crops. Control of bacterial diseases is problematic due to the lack of effective bactericides, high variability of pathogens, high population growth under optimal conditions, development of pathogen resistance to drugs, etc. Bacteriophage-based drugs are considered safe for the environment and human health. Of particular interest are bacteriophages with polyvalent properties, i.e., capable of infecting (and lysing) several different bacteria (García, 2023).

There are two types of bacteriophages relative to the host – specific, i.e., those infecting a limited number of strains of one type of bacteria, and polyvalent ones. Polyvalent phages are able to infect not only certain strains of one species of bacteria, but also different species and/or genera and groups of bacteria (Sovinska, Korotyeyeva, & Andriychuk, 2017; Sovinska, Petrenko, & Andriychuk, 2015). This ability of certain bacteriophages can be the key in combating dangerous bacterial pathogens in various areas of our lives, including medicine, agriculture and the food industry (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek, Maciejewska, 2015; Halawa, 2023; Faidiuk, 2015). Their practical significance for biological control of microbial populations is undoubtable. Despite the practical and fundamental importance of such phages, bacteriophages

© Korotieieva Hanna, Andriichuk Olena, Budzanivska Iryna, 2023

with a wide host range are rarely described (Loc-Carrillo, & Abedon, 2011). One of the reasons is that a sufficiently reliable method of isolation and a model for studying such viruses have not been developed yet. Because the primary population of any phage isolated from a particular medium is considered heterogeneous, that is, in addition to the main phage, there will be other 'contaminating' phages, as well as mutant forms.

The main objective: to investigate the biological properties of isolated bacteriophages to verify the prospects of their use for antibacterial therapy of plant pathogens.

Methods

Samples of plants (beet, potatoe, apple, garlic and mandarin) with symptoms of bacterial lesions were investigated. In our research we used test bacteria: *Pseudomonas syringae lachrymans* 7591, *P. fluoresc*ens 8573 and *Serratia marcescens*. Phages were isolated by direct isolation. Phage titers were determined as plaque forming units (pfu/ml) using the standard double layer agar assay technique (Mohammadali, & Nilsson, 2015; Sovinska, Korotyeyeva, & Andriychuk, 2017). Pure bacteriophage lines were acquired by 6-times passaging with subsequent accumulation on sensitive bacteria cultivated in commercial nutritional broth with additional aeration at 25 ºC. The morphological features of viral particles were studied using electron microscope JEOL-1400 (Japan) (Holtappels, 2021; Mohammadali, & Nilsson, 2015).

Results

In this research samples of beet, potatoe, apple, garlic and mandarin with rotting symptoms were selected from vegetable storehouses. The main symptoms of bacterial lesions observed in fruits were areas of mild decay, softening of the tissues, and the extraction of the exudate. After selection of vegetable samples with symptoms of bacterial lesions bacteriophages specific to phytopathogenic bacteria were obtained. As a result of this work we isolated phages (7591/3, 8573/3, Ser/2) specific to *Pseudomonas syringae lachrymans* 7591, *P. fluorescens* 8573 and *Serratia marcescens*. All selected phages reproduced with the same efficiency on bacteria strains used in this study.

Bacteriophages led to the formation of negative colonies with large (5 ± 1 mm) and medium (2 ± 0,1 mm) sizes depending on the test bacterium (fig. 1).



Fig. 1. Phage plaque morphology on test culture
a – *Serratia marcescens*, b – *P. fluorescens* 8573,
c – *Pseudomonas syringae lachrymans 7591* (plaques diameter = 5 ± 1 (a); 2 ± 0,1(b); 2 ± 0,1 (c) mm)

Isolates 7591/3, affecting *Pseudomonas syringae lachrymans* 7591; 8573/3 of *P. fluorescens* 8573; and an isolate Ser/2 of *Serratia marcescens* were selected among all the isolated bacteriophgages. These isolates were chosen due to the stability of their biological activity during storage, the formation of transparent lytic zone, which allows them to be considered as virulent (non-lysogenic) to indicator strains of phytopathogenic bacteria used in this study. The latter condition is mandatory for the practical use of phages as antagonists of phytopathogenic microbiota in ecosystems, as lysogenization of natural strains by phages introduced for therapeutic purposes does not reduce the number of bacteria, but only provides their immunity.

To identify host range specificity of isolated phages, their spectrum of lytic activity was studied against 16 strains of phytopathogenic bacteria. Our research revealed that from 9 phage isolates three expressed lytic activity against different strains of phytopathogenic bacteria. Hence, these phages possessed a wide range of lytic activity (i.e., these were polyvalent bacteriophages) and could be used as perspective biologic agents for controlling bacterial diseases (fig. 2).

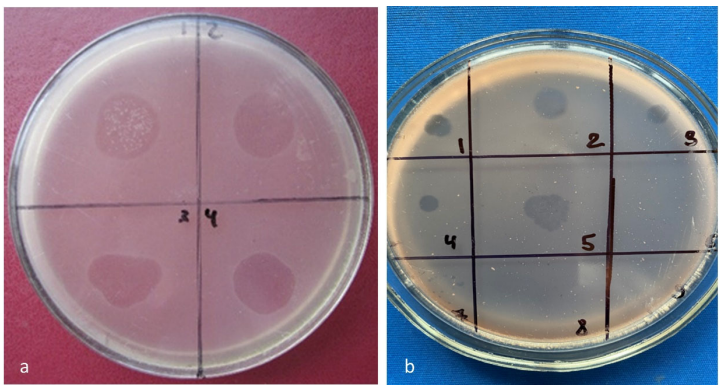


Fig. 2. The spectrum of phages' lytic activity against test bacteria:
a – *Pseudomonas fluorescens 8573,* b – *Serratia marcescens*

Analysis of electron microscopic observations showed that investigated bacteriophages had different morphology and size. Phage particles were icosahedral structures with a head of approximately 43 ± 1 nm in diameter and a short tail of 1 ± 0,5 nm in length, visually belonging to the C1 morphotype of *Podoviridae* family, *Caudovirales*. Transmission electron microscopy also showed the presence of another group of bacteriophages with morphology typical for representatives of *Siphoviridae* family of *Caudovirales* order (icosahedral head with long tail, size – head diameter 67 ± 2 nm, tail length 120 ± 3 nm) (fig. 3).

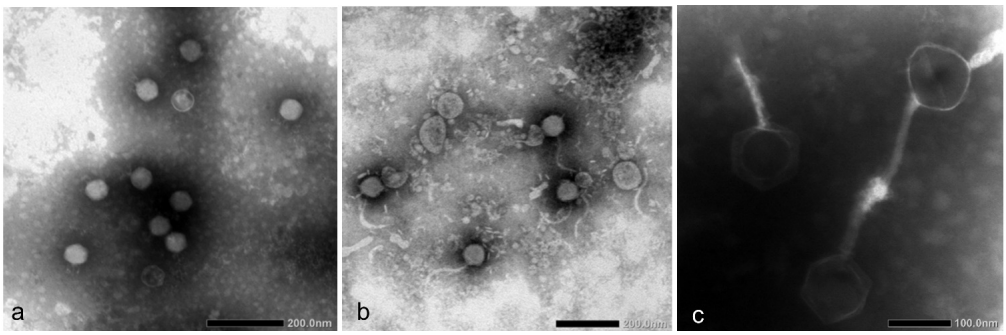


Fig. 3. Electron microscopy images of phage isolates: virions of phages belonging to the *Podoviridae* (a) and *Siphoviridae* (b, c) families

Discussion and conclusions

Plant diseases caused by bacteria are a serious problem in the cultivation and storage of agricultural products. Among such pathogens the most important are bacteria related to the *Pseudomonas* and *Serratia* genera (Sovinska, Petrenko, & Andriychuk, 2015). Using such species as test bacteria, the selection of specific phages is carried out. The selected phages possessed a wide range of lytic activity against these bacterial species and virtually eliminate them. That is why one of the alternative approaches for controlling bacterial diseases is the application of bacteriophages as natural bacterial antagonists (Clokie, 2011; Tahir, 2022). Due to the high specificity of phages against host bacteria, such therapy will destroy the pathogenic biota without affecting the normal one. In addition, the ability of phages to self-replicate allows to use low doses of phage preparations to protect plants. Thus, the use of phages led to a reduction of peach morbidity caused by *Xanthomonas pruni* at 86 – 100 %. In the US, a patent was granted for the production of phage-based antimicrobials to control legume infections caused by *Pseudomonas syringae* (Ramos, 2012).

In this study using selected phages, we have composed a biological plant protection product for use in agriculture. This product has a selective effect on phytopathogenic bacteria, doesn't pollute the environment, increases the profitability of production and provides environmentally friendly agricultural production. Its application could reduce the exposure of toxic chemicals on food products. Biologically active preparation was designed for protection against bacterial infections of sugar beet plants and reduction of rot during the storage of agricultural products. The active ingredients of the preparation were naturally occurring bacteriophages that selectively and specifically killed only certain strains of microorganisms.

On the basis of specific bacterial viruses (bacteriophages) a biologically active preparation for protection against bacterial infections of plants is developed. Product is provided an all-natural, nontoxic, safe and effective means for significantly reducing or eliminating disease-causing bacteria. The laboratory conducts preliminary tests of the drug for controlling plant bacteriosis in agriculture.

Authors' contribution: Olena Andriichuk designed the study; Olena Andriichuk, Hanna Korotieieva and Iryna Budzanivska prepared material for the experiments and collected data; Olena Andriichuk, Hanna Korotieieva and Iryna Budzanivska performed the experiments; Olena Andriichuk and Hanna Korotieieva wrote the paper. All authors discussed the results, commented and approved on the manuscript.

Acknowledgments, sources of funding. This work was partly funded by Taras Shevchenko National University of Kyiv (project 16KF036-05 "Structure and functions of viruses under different environmental conditions", scientific supervisor DSc (Biol), prof. I. Budzanivska).

References

Anaghez, Z. Z., Rasizadeh, R., Aghbash, P. S., Feizi, H., Khakvar, R., & Baghi, H. B. (2022). Bacteriophages against pathogenic bacteria: in medicine and agriculture. *Current Bioactive Compounds*, 19(5), 63–72. https://doi.org/10.2174/1573407219666221019090227.

Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8(34). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034.

Buttimer, C., Hendrix, H., Oliveira, H., Casey, A., Neve, H., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., Noben, J.-P., O'Mahony, J., Lavigne, R., & Coffey, A. (2017). Things Are Getting Hairy: Enterobacteria Bacteriophage vB_PcaM_CBB. *Frontiers in Microbiology*, 8(44). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00044.

Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942.

Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by Pectobacterium and Dickeya species: a review. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x.

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., & Maciejewska, B. (2015). Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 22(14), 1757–1773. https://doi.org/10.2174/0929867322666150209152851.

Faidiuk, I. V., Boyko, A. A., Muchnyk, F. V., & Tovkach, F. I. (2015). Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages tt10-27 and key. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal* (Kiev, Ukraine: 1993), 77(3), 36–46. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26214897/

Farooq, T., Hussain, M. D., Shakeel, M. T., Tariqjaveed, M., Aslam, M. N., Naqvi, S. A. H., Amjad, R., Tang, Y., She, X., & He, Z. (2022). Deploying viruses against phytobacteria: potential use of phage cocktails as a multifaceted approach to combat resistant bacterial plant pathogens. *Viruses*, 14(2), 171. https://doi.org/10.3390/v14020171.

García, P., Tabla, R., Anany, H., Bastías, R., Brøndsted, L., Casado, S., Cifuentes, P., Deaton, J. W., Denes, T. G., Islam, M. A., Lavigne, R., Moreno-Switt, A. I., Nakayama, N., Madero, C. M., Sulakvelidze, A., Svircev, A. M., Wagemans, J., Biosca, E. G., & Rivera, D. (2023). ECOPHAGE: Combating Antimicrobial Resistance Using Bacteriophages for Eco-Sustainable Agriculture and Food Systems. *Viruses*, 15(11), 2224–2224. https://doi.org/10.3390/v15112224.

Halawa, E. M. (2023). Challenges of bacteriophages application in controlling bacterial plant diseases and how to overcome them. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(98). https://doi.org/10.1186/s43141-023-00549-y.

Holtappels, D., Lavigne, R., Huys, I., & Wagemans, J. (2019). Protection of Phage Applications in Crop Production: A Patent Landscape. *Viruses*, 11(3), 277. https://doi.org/10.3390/v11030277.

Holtappels, D., Fortuna, K., Lavigne, R., & Wagemans, J. (2021). The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 60–71. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.016.

Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590.

Mirzaei, M. K., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLOS ONE*, 10(5), e0127606. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127606.

Nawaz, A., Zafar, S., Shahzadi, M, Burkari, S. M., Khan, N. A., Shah, A. A., Badshah, M., & Khan, S. (2023). Bacteriophages: an overview of the control strategies against phytopathogens. *Egyptian Journal of Biologica l Pest Control*, 33(108). https://doi.org/10.1186/s41938-023-00751-7.

Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012). Pseudomonas savastanoipv.savastanoi: some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998–1009. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x.

Sovinska, R., Korotyeyeva, G., & Andriychuk, O. (2017). Prospective use of bacteriophages as agents to combat phytopathogenic bacteria of potatoes. *Agriculture and Forestry*, 63(4), 69–74. https://doi.org/10.17707/AgricultForest.63.4.07

Sovinska, R., Petrenko, S., & Andriychuk, O. (2015). The polyvalence of bacteriophages, isolated from bacteriosis-affected potato samples. *Journal Quarantine and Plant Protection*, 7, 13–16.

Wójcicki, M., Świder, O., Gientka, I., Błażejak, S., Średnicka, P., Shymialevich, D., Cieślak, H., Wardaszka, A., Emanowicz, P., Sokołowska, B., & Juszczuk-Kubiak, E. (2023). Effectiveness of a Phage Cocktail as a Potential Biocontrol Agent against Saprophytic Bacteria in Ready-To-Eat Plant-Based Food. *Viruses*, 15(1), 172–172. https://doi.org/10.3390/v15010172.

Отримано редакцією журналу / Received: 04.10.23
Прорецензовано / Revised: 06.11.23
Схвалено до друку / Accepted: 06.11.23

Ганна Коротєєва, канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0000-0002-4059-0741
e-mail: hanna.korotieieva@knu.ua
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Олена Андрійчук, канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0000-0001-6219-2149
e-mail: aom502@knu.ua
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ірина Будзанівська, д-р біол. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0003-2538-7312
e-mail: budzanivskai@knu.ua
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ У БОРОТЬБІ З ФІТОПАТОГЕННИМИ БАКТЕРІЯМИ

В с т у п . ***Бактеріофаги останнім часом викликають підвищений дослідницький інтерес як екологічно чисті засоби протидії бактеріальним інфекціям. Їх застосування є ефективним заходом боротьби проти бактеріальних захворювань сільськогосподарських культур. Бактеріофаги мають низку переваг порівняно з іншими методами контролю збудників бактеріозів: вони високоспецифічні до бактерій-хазяїв, не токсичні для макроорганізмів, не шкодочинні для нормобіоти рослин і ґрунту. Зокрема, використовують фагові коктейлі, які виявляють специфічність та уражують лише певні групи бактерій, запобігаючи розповсюдженню інфекційних захворювань у рослинах. Отже, метою дослідження було виділення та ідентифікація бактеріофагів, специфічних для фітопатогенних бактерій.***

М е т о д и . ***З овочесховищ було відібрано зразки буряка, картоплі, яблуні, часнику й мандарина з ознаками гнилі. Фаги виявляли шляхом прямого висіву. Титри визначали у бляшкоутворювальних одиницях в 1 мл (БУО/мл) методом двошарового агару за Граціа. Морфологію віріонів вивчали методом трансмісивної електронної мікроскопії.***

Р е з у л ь т а т и . ***Виділено фаги (7591/3, 8573/3, Ser/2), специфічні до Pseudomonas syringae lachrymans 7591, P. fluorescens 8573 і Serratia marcescens. Морфологія негативних колоній ізолятів фагів відрізнялася. Досліджено спектр біологічної активності щодо 16 штамів фітопатогенних бактерій. Серед досліджуваних дев'яти зразків фагів три виявилися полівалентними.***

В и с н о в к и . ***Отримані дані свідчать про можливість використання ізолятів із широким спектром літичної дії як перспективних біологічних засобів у боротьбі з бактеріозом. Отже, ізольовані полівалентні бактеріофаги можна розглядати для терапевтичного використання проти бактеріальної інфекції при зберіганні рослинної продукції.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***фітопатогенні бактерії, бактеріальні культури, морфологічні особливості, бактеріофаги.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 591.5
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.9-12

Віталій БЕРІЯ, асп.
ORCID ID: 0000-0001-6071-7415
e-mail: vitaliylionow@gmail.com
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Анастасія ШУХ, асп.
ORCID ID: 0000-0001-9567-0776
e-mail: fg54ilwgor3sa@gmail.com
Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України, Київ, Україна

Володимир ГАНДЗЮРА, д-р біол. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0001-9192-7423
e-mail: gandzyura@gmail.com
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЕКОЛОГО-ФАУНІСТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ УГРУПОВАНЬ ЗООПЛАНКТОНУ, ІХТІОФАУНИ У РІЧЦІ ІРПІНЬ

В с т у п . ***Моніторинг екосистем, які постраждали від воєнних дій, є елементом комплексного оцінювання їхнього стану в післявоєнний період. Результати представленого дослідження важливі для післявоєнного відновлення постраждалого від воєнних дій регіону, оцінювання стану та якості його водних ресурсів для подальшого використання, а також для оцінювання наслідків російської збройної агресії щодо місцевих водних екосистем і гідрологічної мережі загалом. У лютні-березні 2022 року було здійснено підрив Козаровицької греблі, що спричинило затоплення заплави на понад 20 км за течією. Унаслідок затоплення земель сільськогосподарського призначення відбулося забруднення вод річки Ірпінь продуктами людської життєдіяльності (місця поховань, утримання худоби, птахів; скотомогильники, сільські туалети; добрива, продукти гниття рослинних решток), а також військовою технікою і боєприпасами.***

Метою цієї роботи є дослідження зоопланктону й іхтіофауни в річці Ірпінь та її притоках, а саме річках Мощунка й Горенка.

М е т о д и . ***Дослідження проводили у літній період 2023 року. Для відбору проб зоопланктону використовували конічну планктонну сітку. Визначення кількісних показників зоопланктону здійснювали згідно з обчислювальним методом Гензена у камері Богорова за допомогою бінокуляра. Визначення сапробіологічного стану досліджуваних водних об'єктів здійснювали згідно з методом Пантле-Букка. Іхтіологічні проби відбирали за допомогою підсаки.***

Р е з у л ь т а т и . ***У дослідний період було виявлено 15 видів зоопланктону, до яких належали коловертки, кладоцери й копеподи та представники інших таксонів, а також 3 види риб.***

В и с н о в к и . ***Отримані результати вказують на суттєве зменшення видового багатства зоопланктону в досліджуваних водоймах порівняно з минулорічними показниками, що може бути пояснено наслідками антропогенного навантаження на досліджувані водні екосистеми під час активних воєнних дій у межах Бучанського району.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***річка Ірпінь, зоопланктон, іхтіофауна, біорізноманіття, затоплення, сапробність.***

Вступ

Моніторинг водних екосистем є необхідним для виявлення деструктивних змін у їхньому стані. Украй важливим такий моніторинг є для тих екосистем, що в минулому потерпали від бойових дій, оскільки може служити одним із основних елементів для комплексного оцінювання загального стану екосистем у післявоєнний період.

Річка Ірпінь є правою притокою Дніпра, що протікає в межах Київської та Житомирської областей. Починається у с. Яроповичі (Бердичівський р-н Житомирської обл.) і закінчується у с. Козаровичі (Вишгородський р-н Київської обл.). Довжина її становить 162 км, з них 131 км вище від Київського водосховища є магістральним каналом (Ірпінської осушувально-зволожувальної системи).

У лютому-березні 2022 року під час російсько-української війни було здійснено два підриви греблі у с. Козаровичі. Під час другого підриву були відкриті шлюзи вище за течією, а також Вишгородська ГЕС подбала про підвищення рівня води в Київському водосховищі. Завдяки стрімкому зростанню рівня річки в полях застрягала й тонула російська військова техніка, вода з річки затоплювала позиції росіян (Гарасим, & Кельм, 2022).

Ірпінь розлилась, протягом наступних днів і тижнів заплава була затоплена на понад 20 км вгору за течією. На мілководне плесо перетворилась площа у 2842 га. За понад місяць від підриву греблі підтоплення досягло навколишніх сіл. Після звільнення території почалося відновлення інфраструктури, зокрема й відкачування води до Київського водосховища (Стародубцев та ін., 2022; Науковці Академії спрогнозували характер підтоплення…, 2022).

Окрім затоплення території, гідрологи й екологи України справедливо вказують на погіршення якості води у водному об'єкті. Була затоплена велика площа меліоративних ґрунтів, з яких у воду потрапили агрохімікати, продукти рослинного гниття; також вода була забруднена відходами людської життєдіяльності (місця поховань, утримання худоби, птахів; скотомогильники, сільські туалети тощо). Навіть зараз води забруднені через те, що на дні залишається велика кількість російської техніки (Науковці Академії спрогнозували характер підтоплення…, 2022; Хільчевський, & Гребінь, 2022).

Однак існує думка, що затоплення мало позитивні наслідки завдяки відновленню болотних екосистем. Можливо, затоплена територія стане придатною для нересту риби, кількість якої останніми роками зменшувалась на досліджуваній території, і гніздування водно-болотних птахів (Науковці Академії спрогнозували характер підтоплення…, 2022; Mundy, 2022). Проте на підтоплених ділянках можуть утворитися несприятливі умови для нересту реофільних видів риб через застій води. У річці Ірпінь, у зв'язку з руйнуванням Козаровицької греблі, складаються сприятливі умови для поширення чужорідних інвазивних видів риб (Mundy, 2022; Василюк, & Симонов, 2022).

Раніше двоє з авторів цієї статті досліджували стан угруповань зоопланктерів водойм гідрологічної мережі Бучанського району (Берія, & Гандзюра, 2022).

© Берія Віталій, Шух Анастасія, Гандзюра Володимир, 2023

ISSN 1728-2748

Методи

Матеріал гідробіологічних проб зібрано методом проціджування за допомогою планктонної сітки й набору сит (Трохимець, & Алексієнко, 2010). Видовий склад визначено згідно з методом Гензена (Hensen, 1895). Сапробність водойм визначено завдяки індексу Пантле-Букка (Чертопруд, 2007).

Іхтіологічні проби були відібрані за допомогою підсака з берега та зафіксовані у спирті. Визначення молоді риб проводили за визначником Кобліцької (Коблицкая, 1981).

Загалом було проведено чотири серії відбору проб зоопланктону 9 серпня 2023 року. Кожна серія включала відбір однієї проби з кожної із чотирьох станцій з інтервалом у три години для врахування особливостей добової динаміки гідробіонтів. Загалом за весь досліджуваний період було відібрано 16 проб зоопланктону. Перелік станцій зображено на рис. 1.



Рис. 1. Карта розташування дослідних станцій

Станція збирання дослідного матеріалу № 1. Рекреаційна водойма с. Мощун. Рівень прозорості води на момент відбору проб становив 30 см, муловий шар був завтовшки 30–40, а подекуди й 50 см. Для станції характерною була низька просторова щільність гідрофітів і гідатофітів у воді, що створювало умови незаросло біотопу.

Станція збирання дослідного матеріалу № 2. Річка Мощунка. Рівень прозорості води на момент відбору проб ледве сягав 10 см, муловий шар сягав 50–70 см і складався з детриту й піску. Для станції характерною була висока просторова щільність гідрофітів і гідатофітів у воді, що створювало умови зарослого біотопу.

Станція збирання дослідного матеріалу № 3. Річка Горенка. Рівень прозорості води на момент відбору проб сягав 5 см, муловий шар був завтовшки 40–50 см. Для станції характерною була низька просторова щільність гідрофітів і гідатофітів у воді, що створювало умови незаросло біотопу.

Станція збирання дослідного матеріалу № 4. Річка Ірпінь. Рівень прозорості води на момент відбору проб сягав 5 см, муловий шар був завтовшки 50 см. Для станції характерною була висока просторова щільність гідрофітів та гідатофітів у воді, що створювало умови зарослого біотопу.

Результати

Отримано дані за показниками видового багатства й видового різноманіття для таких груп гідробіонтів: зоопланктону й риб у серпні 2023 року в межах річок Ірпінь, Горенка й Мощунка Бучанського району Київської області.

У досліджених водоймах було виявлено лише один вид моногонантних коловерток, який належав до родини Testudinellidae. Кладоцери в досліджених водоймах були представлені п'ятьма видами й, відповідно, трьома родинами, а найчисленнішою була родина Chydoridae із трьома видами. Родини Daphniidae та Macrotrichidae були представлені по одному виду кожна. Копеподи в досліджених водоймах були представлені чотирма видами, які належали до родини Cyclopidae. Домінантним видом зоопланктерів на всіх чотирьох станціях протягом дослідного періоду був *Ceriodaphnia affinis*, частка представників якого становила від 13,6 % на станції р. Горенка до 87,3 % на станції р. Ірпінь. Коефіцієнт видового різноманіття p_i був найбільшим на станції р. Горенка, де серед 8 видів зоопланктерів представленість кожного окремого виду варіювала в межах від 8,9 до 13,6 %, що вказувало на відносну рівноважність представленості видів зоопланктону в межах цієї станції. Коефіцієнт видового різноманіття p_i був найменшим на станції р. Ірпінь, де серед 4 видів зоопланктерів представленість кожного окремого виду варіювала у межах від 3,8 % до 87,3 % із суттєвим домінуванням одного виду – *Ceriodaphnia affinis,* що вказувало на нерівноважність у представленості видів зоопланктерів.

Отримані результати вказують на суттєве зменшення видового багатства й видового різноманіття зоопланктону в досліджуваних водоймах порівняно з минулорічними показниками (Берія, & Гандзюра, 2022). Наприклад, у 2022 році загальне видове багатство зоопланктону становило 35 видів. Дослідна станція в межах рекреаційної водойми с. Мощун налічувала 10 видів, серед яких представленість кожного виду зоопланктерів варіювала в межах від 8,2 до 14,1 %. Дослідна станція в межах р. Мощунка налічувала 14 видів, серед яких представленість кожного виду зоопланктерів варіювала в межах від 6,3 до 12,1 %. Дослідна станція в межах р. Горенка налічувала 22 види, серед яких представленість кожного виду зоопланктерів варіювала в межах від 3,3 до 5,2 %. Дослідна станція в межах р. Ірпінь налічувала 8 видів, серед яких представленість кожного виду зоопланктерів варіювала в межах від 6,9 до 43,5 %. Такі показники вказували на більшу врівноваженість у представле-

ності зоопланктерів по дослідних водоймах відносно цьогорічних показників.

Дослідна станція № 1. Рекреаційна водойма с. Мощун. Співвідношення угруповань зоопланктону для незарослого біотопу цієї станції було таким: кладоцер – 1 вид (33,3 %) із загальних 3 видів; коловерток, копепод та остракод виявлено не було. Сапробний індекс (S) для цієї станції становив 2,1, що є типовим для помірно забруднених водних об'єктів.

Дослідна станція № 2. Річка Мощунка. Співвідношення угруповань зоопланктону для зарослого біотопу цієї станції було таким: кладоцер – 1 вид (20 %); копепод – 2 види (40 %); остракод – 1 вид (20 %) із загальних 5 видів. Сапробний індекс (S) для цієї станції становив 2,4, що є типовим для забруднених водних об'єктів.

Дослідна станція № 3. Річка Горенка. Співвідношення угруповань зоопланктону для незарослого біотопу цієї станції було таким: коловерток – 1 вид від загальних 10 (10 %); кладоцер – 2 види (20 %); копепод – 1 вид (10 %); остракод – 1 вид (10 %). Сапробний індекс (S) для цієї станції становив 2,0, що є типовим для чистих водних об'єктів.

Дослідна станція № 4. Річка Ірпінь. Співвідношення угруповань зоопланктону для зарослого біотопу цієї станції було таким: кладоцер – 2 види від загальних 7 (28,4 %); копепод – 3 види (42,6 %); коловерток та остракод виявлено не було. Сапробний індекс (S) для цієї станції становив 2,7, що є типовим для помірно забруднених водних об'єктів.

Іхтіологічні проби вдалося відібрати лише у двох точках: р. Ірпінь (смт Гостомель) та р. Мощунка. На р. Горенка та одній зі станцій на р. Мощунка не було виявлено риб. У р. Мощунка зафіксовано молодь лише одного виду риб – вівсянка неповнолінійна *Leucaspius delineatus*. У р. Ірпінь зустрічаються три види риб: вівсянка неповнолінійна *L. delineatus*, гірчак європейський *Rhodeus amarus* і ротань-головешка *Perccottus glenii.* Крім того, за повідомленнями місцевих рибалок, у р. Ірпінь зустрічаються щука, окунь, карась сріблястий, короп. Усі зазначені види є типовими для цієї місцевості. Серед зазначених видів риб більшість є аборигенними, видами-вселенцями є ротань-головешка й карась сріблястий. Ротань-головешка також є видом з Європейського Чорного списку інвазивних чужорідних видів (Black list…). Гірчак європейський занесений до Бернської конвенції (Годлевська, Парнікоза, & Різун, 2010).

Іхтіофауна р. Ірпінь та її приток вивчена недостатньо й потребує подальших досліджень. Під час перших досліджень у середині XIX й на початку XX ст. у р. Ірпінь було зафіксовано від 15 до 25 видів (Белинг, 1915; Кесслер, 1856). За більш сучасними даними (Мовчан, 2012) в іхтіофауні зазначено 27 видів. Зустрічаються також види-вселенці (*Pseudorasbora parva*, *Sabanejewia baltica*, *Pungitius platygaster*, *Gasterosteus aculeatus* тощо) (Мовчан, 2012).

Дискусія і висновки

У річці Ірпінь та її притоках було зафіксовано 15 видів зоопланктону, серед яких є представники гіллястовусих і веслоногих ракоподібних, коловерток і представників інших таксонів. В іхтіологічних пробах було визначено 3 види риб, серед яких один інвазивний (ротань-головешка). Видове багатство зоопланктону значно зменшилось порівняно з даними за минулий рік. Для подальшого дослідження варто збільшити кількість дослідних станцій.

Список використаних джерел

Белинг, Д. Е. (1915). Очерки по ихтиофауне Днепра. К ихтиофауне Днепровского бассейна под Киевом. *Тр. Днепров. биол. ст.,* 2, 113–119.

Берія, В. Д., & Гандзюра, В. П. (2022). Стан угруповань літорального зоопланктону різнотипних водойм Бучанського району. *Міжнародна наукова конференція за участю молодих науковців "Регіональні проблеми охорони довкілля та збалансованого природокористування".* Одеський державний екологічний університет, 24–26.

Василюк О., & Симонов Є. (2022). План відновлення України у дзеркалі розливу річки Ірпінь. *Журнал про екологічні наслідки війни. Ukraine War Environmental Consequences Work Group*, 5, 3–20.

Гарасим, А., & Кельм, Н. (2022, 15 червня). *Підрив греблі річки Ірпінь. Як росіян зупинила вода.* Тексти.org.ua. https://texty.org.ua/articles/106945/pidryv-hrebli-richky-irpin-yak-rosiyan-zupynyla-voda/

Годлевська, О., Парнікоза, І., & Різун, В. (2010). Фауна України: охоронні категорії. *Довідник.*

Кесслер, К. Ф. (1856). *Естественная история губерний Киевского учебного округа. Рыбы.*

Коблицкая, А. Ф. (1981). Определитель молоди пресноводных рыб. Легкая и пищевая промышленность.

Мовчан, Ю. В. (2012). Сучасний склад іхтіофауни басейну верхнього Дніпра (фауністичний огляд). *Збірник праць зоологічного музею*, 43, 35–50.

Національна академія наук України. (2022). Науковці Академії спрогнозували характер підтоплення території Київської області, спричиненого російським вторгненням. https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/news/Pages/View.aspx?MessageID=9011

Стародубцев, В. М., Ладика, М. М., Жофань, У., Паламарчук, С. П., & Наумовська О. І. (2022). Героїчна оборона та екологічна драма в долині річки Ірпінь. *International scientific journal "Grail of Science"*, 23, 172–182.

Трохимець, В. М., & Алексієнко, В. Р. (2010). Методичні рекомендації до практикуму з курсу "Гідробіологія", 5–19. Київський університет.

Хільчевський, В. К., & Гребінь, В. В. (2022). Деякі аспекти щодо стану територій районів річкових басейнів та моніторингу вод під час вторгнення Росії в Україну (2022 р.). *Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія*, 3(65), 6–14. https://doi.org/10.17721/2306-5680.2022.3.1.

Чертопруд, М. В. (2007). Модификация индекса сапробности Пантле-Букка для водоемов европейской России. *Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем,* 1–6.

Black list of invasive alien species. https://environment.ec.europa.eu/topics/nature-and-biodiversity/invasive-alien-species_en

Hensen, V. (1895). Methodik der untersuchungen. *In Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humbolt-Stiftung.* Lipsius and Tischer.

Mundy, V. (2022). Ukraine's 'hero river' helped save Kyiv. But what now for its newly restored wetlands?. *The Guardian.* https://www.theguardian.com/environment/2022/may/11/ukraine-hero-irpin-river-helped-save-kyiv-but-what-now-for-its-newly-restored-wetlands-aoe

References

Beling, D. E. (1915). Essays on the ichthyofauna of the Dnieper. To the ichthyofauna of the Dnieper basin near Kyiv.*Tr. Dnieper biol. Art.*, 2, 113–119 [in Russian].

Beria, V. D., Gandzyura, & V. P. (2022). State of communities of littoral zooplankton of different types of water bodies of Buchansk district. *International scientific conference with the participation of young scientists "Regional problems of environmental protection and balanced nature management".* Odesa State Environmental University, 24–26 [in Ukrainian]

Black list of invasive alien species. https://environment.ec.europa.eu/topics/nature-and-biodiversity/invasive-alien-species_en

Chertoprud, M. V. (2007). Modification of the Pantle-Bucca saprobity index for water bodies of European Russia. *Bioindication in monitoring freshwater ecosystems,* 1–6 [in Russian].

Garasym, A., & Kelm, N. (2022). *Undermining the dam of the Irpin River. How water stopped the Russians.* https://texty.org.ua/articles/106945/pidryv-hrebli-richky-irpin-yak-rosiyan-zupynyla-voda/ [in Ukrainian].

Godlevska, O., Parnikosa, I., & Rizun, V. (2010). Fauna of Ukraine: protective categories. *Directory* [in Ukrainian].

Hensen, V. (1895). Methodik der untersuchungen. *In Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humbolt-Stiftung.* Lipsius and Tischer.

Kessler, K. F. (1856). *Natural history of the province of the Kyiv educational district. Fish* [in Russian]

Khilchevskyi, V. K., & Grebin, V. V. (2022). Some aspects regarding the state of river basin areas and water monitoring during Russia's invasion of Ukraine (2022). *Hydrology, hydrochemistry and hydroecology*, 3(65), 6–14. https://doi.org/10.17721/2306-5680.2022.3.1 [in Ukrainian].

Koblytskaya, A. F. (1981). Determinant of young freshwater fish. Light and food industry [in Ukrainian].

Movchan, Yu. V. (2012). Modern composition of the ichthyofauna of the upper Dnieper basin (faunistic survey). *Proceedings of the Zoological Museum*, 43, 35–50 [in Ukrainian].

Mundy, V. (2022). Ukraine's 'hero river' helped save Kyiv. But what now for its newly restored wetlands?. *The Guardian.* https://www.theguardian.com/environment/2022/may/11/ukraine-hero-irpin-river-helped-save-kyiv-but-what-now-for-its-newly-restored-wetlands-aoe

National Academy of Sciences of Ukraine. (2022). The scientists of the Academy predicted the nature of the flooding of the territory of the Kyiv region caused by the Russian invasion. https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/news/Pages/View.aspx?MessageID=9011 [in Ukrainian].

Starodubtsev, V. M., Ladyka, M. M., Zhofan, U., Palamarchuk, S. P., & Naumovska O. I. (2022). Heroic defense and ecological drama in the valley of the Irpin river. *International scientific journal "Grail of Science"*, 23, 172–182 [in Ukrainian].

Trokhymets, V. M., & Alexienko, V. R. (2010). Methodological recommendations for the workshop on the course "Hydrobiology", 5–19. Kyiv University [in Ukrainian].

Vasylyuk O., & Simonov E. (2022) Ukraine's Recovery Plan in the Mirror of the Irpin River Flood. *Journal of Environmental Consequences of War. Ukraine War Environmental Consequences Work Group*, 5, 3–20 [in Ukrainian].

Отримано редакцією журналу / Received: 19.11.23
Прорецензовано / Revised: 24.11.23
Схвалено до друку / Accepted: 28.11.23

Vitalii BERIIA, PhD Student
ORCID ID: 0000-0001-6071-7415
e-mail: vitaliylionow@gmail.com
Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

Anastasiia SHUKH, PhD Student
ORCID ID: 0000-0001-9567-0776
e-mail: fg54ilwgor3sa@gmail.com
I. I. Schmalhausen Institute of Zoology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Volodymyr GANDZYURA, DSc (Biol.), Prof.
ORCID ID: 0000-0001-9192-7423
e-mail: gandzyura@gmail.com
Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

ECOLOGICAL AND FAUNAL FEATURES OF ZOOPLANKTON GROUPS, ICHTHYOFAUNA IN THE IRPIN RIVER

Background. ***Monitoring of ecosystems affected by military actions is an element of a comprehensive assessment of the state of the ecosystem in the post-war period. The results of this study are key for the post-war recovery of the war-affected region and assessment of the state and quality of water resources in the area for their further use, as well as for the assessment of the consequences of Russian armed aggression for local water ecosystems and the hydrological network of the region in general. In February-March 2022, the Kozarovytska dam was blown up, which caused flooding of the floodplain more than 20 km downstream.***

Methods. ***As a result of the flooding of agricultural lands, the waters of the Irpin River were polluted with products of human life (burial sites, cattle cemeteries, village toilets, places where livestock and birds are kept, fertilizers, decay products of plant remains) and flooded military equipment and ammunition. The purpose of this work is to study the zooplankton and ichthyofauna in the Irpin River and its tributaries the Moschunka and the Gorenka rivers. The study was conducted in the summer of 2023. A conical plankton net was used for zooplankton sampling. Quantitative parameters of zooplankton were determined according to Hensen's computational method in Bogorov's chamber using binoculars.***

Results. ***Determination of the saprobiological state of the investigated water bodies was carried out according to the Pantle-Bucca method. Ichthyological samples were taken using a dip bag. During the experimental period, 10 species of zooplankton were found, which included rotifers, cladocera and copepods, and 3 species of fish.***

Conclusions. ***The obtained results indicate a significant decrease in the species richness of zooplankton in the studied reservoirs in comparison with last year's indicators, which can be explained by the consequences of anthropogenic load on the studied water ecosystems during the phase of active military operations within the Buchansky district.***

Keywords: ***Irpin River, zooplankton, ichthyofauna, biodiversity, flooding, saprobity.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 616.8-004:578.834.1:616.153
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.13-19

Тетяна ГАЛЕНОВА[1], канд. біол. наук, ст. дослідник
ORCID ID: 0000-0003-2973-2646
e-mail: galenovatanya@knu.ua

Марина КАЛАШНІКОВА[1], магістр
ORCID ID: 0000-0002-2600-4806
e-mail: maryna.kalashnikova@knu.ua

Віталій КАРБОВСЬКИЙ[2], канд. біол. наук
ORCID ID: 0000-0003-2226-0914
e-mail: Vkarbovskyy@gmail.com

Світлана ШОЛОМОН[3], лікар вищої категорії
ORCID ID: 0000-0003-2097-9562
e-mail: sholomon19@gmail.com

Володимир МЕЛЬНИК[3], д-р мед. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0003-4645-8239
e-mail: volodymyr.melnyk@nmu.ua

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
[2]ТОВ "БІОФАРМА ПЛАЗМА", Біла Церква, Україна
[3]Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ У ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ, ЯКІ ПЕРЕНЕСЛИ ІНФЕКЦІЮ SARS-CoV-2

В с т у п . ***Розсіяний склероз (РС) є важливою медико-соціальною проблемою сьогодення. У світі нараховується понад 2,8 млн хворих на РС, а через відсутність ефективних методів лікування і профілактики їхня кількість продовжує зростати. Отже, пошук шляхів і засобів, націлених на стабілізацію стану хворого, є пріоритетним завданням сучасної нейробіології. Важливим також є встановлення тригерних чинників, що можуть сприяти прогресуванню захворювання. Оскільки РС є імуноопосередкованою патологією, то можна припустити, що супутні захворювання інфекційної етіології через активацію каскаду запальних реакцій можуть викликати погіршення стану хворого. Однак остаточного висновку щодо впливу гострих вірусних інфекцій на стан пацієнтів із РС ще не зроблено. У контексті епідеміологічної ситуації, яка склалася в останні роки, через поширеність коронавірусної інфекції SARS-CoV-2 цікавим є дослідження можливих негативних наслідків* **COVID-19** *у осіб, що страждають на РС. Отже, метою представленого дослідження був аналіз даних лабораторних досліджень у хворих на розсіяний склероз залежно від наявності* **COVID-19** *в анамнезі.*

М е т о д и . ***У дослідженні взяли участь 127 осіб, у тому числі 97 хворих на РС та 30 відносно здорових донорів, які за віком і статтю відповідали групі пацієнтів. Хворих на РС розподілили на дві групи: I група (n = 56; 36 жінок і 20 чоловіків, середній вік 41,3 ± 5,5, тривалість захворювання 4,4 ± 1,5 року) – пацієнти із РС, що не мали підтвердженого*** **COVID-19** **в анамнезі;*** ***II група (n = 41; 27 жінок і 14 чоловіків, середній вік 40,2 ± 5,6, тривалість захворювання 4,6 ± 1,3 року) – пацієнти із РС, у яких протягом останніх 4–7 місяців був лабораторно верифікований діагноз*** **COVID-19.** ***Зразки сироваток крові пацієнтів і відносно здорових донорів надходили з Університетської клініки Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (Київ, Україна). Діагноз РС усім пацієнтам встановлювали відповідно до діагностичних критеріїв McDonald (2017).***

Р е з у л ь т а т и . ***У результаті вивчення загального біохімічного аналізу крові встановлено, що обидві групи пацієнтів мали аналогічні зміни показників порівняно з показниками здорових донорів: зниження концентрацій креатиніну й сечової кислоти, рівнів окремих ліпідних фракцій, а саме ЛПДНЩ та ТАГ, рівнів активності ЛФ і ЛДГ; підвищення концентрації С-реактивного білка. Достовірні відмінності між I та II групами зазначені за рахунок різнонаправлених змін у концентрації сироваткового феритину й підвищення рівня амілазної активності в сироватці крові пацієнтів із РС у постковідний період.***

В и с н о в к и . ***Відсутність статистично значущих різниць між показниками біохімічного аналізу крові у хворих на РС, які мають або не мають підтвердженого*** **COVID-19** **в анамнезі, свідчить про відсутність взаємозв'язку між інфекцією** ***SARS-CoV-2 і зміною окремих досліджуваних параметрів. Серед отриманих результатів особливий інтерес становить різнонаправлена зміна концентрації феритину в пацієнтів із РС до та у постковідний період.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***розсіяний склероз, інфекція SARS-CoV-2,*** **COVID-19**, ***біохімічний аналіз крові, лабораторні дослідження*****.**

Вступ

Розсіяний склероз (РС) – хронічне імуноопосередковане нейродегенеративне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), що характеризується появою численних вогнищ демієлінізації як у головному, так і у спинному мозку (Lassmann, 2018). В основі розвитку цієї патології лежать аутоімунні процеси, за яких власна імунна система хворого руйнує мієлінову оболонку нервових волокон, порушуючи їхню провідність і функціонування (Dargahi et al., 2017). Це призводить до різноманітних неврологічних розладів, зокрема порушень моторної функції, проблем із координацією і балансом, погіршення окремих когнітивних функцій, а у більш важких випадках – втрати зору та паралічу. Широкий спектр клінічних виявів захворювання пояснюється множинністю вогнищ демієлінізації та відмінностями у їхній анатомічній локалізації в межах певного відділу ЦНС (Oh et al., 2018).

Згідно з даними офіційної статистики, станом на 2020 рік у світі було зареєстровано 2,8 млн людей, які страждають на РС (Zhornitsky et al., 2016). Серед хворих – переважно особи молодого віку: середній вік дебюту РС становить 29–33 роки. На жаль, уже через 10–15 років від початку захворювання 50 % хворих мають серйозні порушення моторної функції і втрачають працездатність, що значною мірою негативно відображається на якості життя пацієнтів (Безсмертний та ін., 2017).

© Галенова Тетяна, Калашнікова Марина, Карбовський Віталій, Шоломон Світлана, Мельник Володимир, 2023

ISSN 1728-2748

Отже, РС характеризується раннім початком, здебільшого прогресуючим перебігом і вимагає постійної висококваліфікованої медичної допомоги, що робить його однією з найактуальніших проблем у неврології та нейроімунології.

Беручи до уваги вагоме медико-соціальне значення РС, актуальним є уповільнення темпу інвалідизації, чого можна досягти шляхом зменшення ризику розвитку загострень, стабілізації стану хворого, а також запобіганням трансформації ремітуючого РС у прогресуючий варіант хвороби. Зважаючи на те, що імунні механізми посідають центральне місце в патогенезі РС, логічно припустити, що різної природи інфекції можуть виконувати роль тригерних чинників запуску каскаду імунних реакцій, які, своєю чергою, здатні спровокувати рецидив захворювання та сприяють погіршенню неврологічного статусу пацієнта (Brand et al., 2022).

Інфекційне захворювання COVID-19, спричинене коронавірусом SARS-CoV-2, безсумнівно, є однією з найактуальніших і найбільш обговорюваних проблем сьогодення (Sharma et al., 2020). Оскільки інфекція SARS-CoV-2 характеризується посиленою запальною реакцією з боку всіх систем організму людини, то вона може обумовлювати загострення аутоімунних захворювань, зокрема РС (Chaudhry et al., 2021), і призводити до стрімкого погіршення стану пацієнтів. Однак на сьогодні зв'язок між наявністю COVID-19 в анамнезі та загостреннями РС не доведено. На нашу думку, показники біохімічного аналізу крові є надійним джерелом інформації щодо функціонального стану внутрішніх органів та їхніх систем, а також вони дозволяють оцінити інтенсивність основних обмінних процесів. Тому ***метою*** нашого дослідження є аналіз даних лабораторних досліджень у хворих на розсіяний склероз залежно від наявності COVID-19 в анамнезі.

Методи

Зразки сироваток крові пацієнтів, як і відносно здорових донорів, надходили з Університетської клініки Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (Київ, Україна). Усі учасники були проінформовані щодо проведення досліджень і підписали інформовану згоду на використання свого біологічного матеріалу в наукових цілях. Протокол дослідження було погоджено з Етичним комітетом Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, Україна) та Етичним комітетом Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця.

У дослідження було залучено 97 пацієнтів із РС, які проходили комплексне амбулаторне або стаціонарне лікування на базі Університетської клініки Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця в період із жовтня 2021 до квітня 2023 року включно. Усі пацієнти були розподілені на дві групи залежно від наявності COVID-19 в анамнезі: I група – пацієнти із РС, що не хворіли на COVID-19 (n = 56; 36 жінок і 20 чоловіків віком від 35 до 46 років, середній вік 41,3 ± 5,5, тривалість захворювання 4,4 ± 1,5 року); II група – пацієнти із РС, у яких протягом останніх 4–7 місяців був лабораторно верифікований діагноз COVID-19 (n = 41; 27 жінок і 14 чоловіків віком від 35 до 45 років, середній вік 40,2 ± 5,6, тривалість захворювання 4,6 ± 1,3 років). Діагноз РС усім пацієнтам було встановлено відповідно до критеріїв McDonald (2017) (Thompson et al., 2018). Серед критеріїв виключення пацієнтів із дослідження були такі: тяжка супутня соматична патологія (серцева або ниркова недостатність, інфаркт міокарда), гострий інфекційний процес, злоякісні новоутворення, позитивний ПЛР-тест на COVID-19. Контрольну групу становили 30 відносно здорових донорів віком від 35 до 46 років. Критеріями включення в контрольну групу були: відсутність симптомів гострих інфекцій протягом принаймні одного місяця до моменту забору крові; відсутність хронічних запальних і аутоімунних захворювань.

Забір крові для біохімічних досліджень проводили з ліктьової вени в ранкові години натщесерце в одноразові пробірки без антикоагулянту. Для одержання сироватки кров витримували за кімнатної температури протягом 30 хв до повного утворення згустку, після чого центрифугували при 1500 g упродовж 20 хв. Зразки сироватки заморожували та зберігали при -20 °C (допускалося лише однократне заморожування-розморожування матеріалу).

Біохімічне дослідження включало визначення концентрацій: загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну, сечової кислоти, загального холестеролу (ЗХС), ліпопротеїнів дуже низької, низької та високої щільності (ЛПДНЩ, ЛПНЩ, ЛПВЩ, відповідно), триацилгліцеридів (ТАГ), білірубіну (загального, прямого, непрямого), а також установлення активностей сироваткових ферментів: аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), гамма-глутаматтрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) та амілази. Параметри оцінювали за допомогою біохімічного аналізатора Microlab 300 (Elitech Holding, Нідерланди) з використанням відповідних стандартних наборів виробництва фірми Human Gmb H (Німеччина).

Розрахунок коефіцієнта атерогенності (КАт) проводили за формулою А. М. Клімова:

$$КАт = (ЗХС – ЛПВЩ) / ЛПВЩ.$$

Концентрацію феритину визначали імунохімічним методом з електрохемілюмінісцентною детекцією (ECLIA), рівень С-реактивного білка високочутливого (hsСРБ) – імунотурбідіметричним методом (Crystal Chem, США). Наявність анти-SARS-CoV-2 антитіл у сироватці крові встановлювали за допомогою хемілюмінесцентної технології імуноаналізу на мікрочастинках із застосуванням комерційного набору готових реактивів (Abbott Diagnostics, США). Результати аналізу на наявність анти-SARS-CoV-2 антитіл наведено як значення індексу (S/C), при цьому, відповідно до рекомендацій виробника, показники $S/C < 1{,}40$ вважали негативними, тоді як показники $S/C \geq 1{,}40$ класифікували як позитивні.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за програмою "STATISTICA 12.0" (Statsoft Inc., США) із використанням параметричних і непараметричних методів варіаційної статистики. Для кожного з отриманих варіаційних рядів оцінювали нормальність розподілу й обраховували середні значення (M) і стандартні відхилення (SD). За рівень достовірності статистичних показників прийняли $p < 0{,}05$.

Результати

У дослідженні взяли участь 127 осіб, у тому числі 97 хворих на РС і 30 відносно здорових донорів, які за віком і статтю відповідали групі пацієнтів. Загальна характеристика груп наведена у табл. 1. На момент забору крові всі донори й пацієнти із РС були додатково перевірені на наявність анти-SARS-CoV-2 антитіл з метою верифікації інфікування у разі прихованого перебігу хвороби (табл. 1).

Таблиця 1

Загальна характеристика осіб, які брали участь у дослідженні

Критерій	Відносно здорові донори (n = 30)	Хворі на розсіяний склероз	
		I група (n = 56)	II група (n = 41)
Вік, роки	41,3 ± 5,5	41,3 ± 5,5	40,2 ±5,6
Стать			
чоловіки, n(%)	10(33)	20(36)	14(34)
жінки, n(%)	20(67)	36(64)	27(66)
Тривалість захворювання, роки	-	4,4 ± 1,5	4,6 ± 1,3
Індексанти-SARS-CoV-2 антитіл, S/C	< 1,40 (негативний)	< 1,40 (негативний)	70 ± 8 (позитивний)

Оцінювання показників біохімічного аналізу крові (БАК) є важливим інструментом як на початковому етапі діагностики, так і на етапі лікування; воно дає змогу охарактеризувати ефективність терапії та передбачити можливі супутні ускладнення на ранній стадії. Більше того, порівняльний аналіз результатів БАК у групі хворих на РС, які мають або не мають підтвердженого діагнозу COVID-19 в анамнезі, дасть змогу виявити зміни, пов'язані з перенесенням коронавірусної інфекції, допоможе встановити потенційні біологічні маркери, що вказуватимуть на можливі зміни стану хворого під дією інфекції SARS-CoV-2.

Результати досліджень наведено в табл. 2. Установлено, що хворі на РС за відсутності підтвердженого COVID-19 в анамнезі (I група пацієнтів) мали такі зміни показників БАК: зниження концентрацій креатиніну на 30 % ($p < 0,05$), сечової кислоти на 40 % ($p < 0,05$); рівнів окремих ліпідних фракцій, зокрема ЛПДНЩ та ТАГ, – на 45 і 40 %, відповідно ($p < 0,05$); рівнів активності ЛФ – на 25 % ($p < 0,05$) і ЛДГ – на 35 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками відносно здорових донорів. У 50 % хворих I групи також зазначали підвищення концентрації феритину у 2,7 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем, тоді як інші 50 % пацієнтів цієї групи мали нормальний рівень зазначеного білка. Концентрація С-реактивного білка у сироватці крові пацієнтів із РС I групи була вищою на 83 % ($p < 0,05$) від значень контрольної групи. Усі інші показники БАК у пацієнтів із РС I групи були в межах норми (табл. 2).

Аналогічні результати БАК були одержані й для групи пацієнтів із РС, які протягом останніх 4–7 місяців перенесли інфекцію SARS-CoV-2 (табл. 2). Більше того, для вищеозначених показників, зокрема концентрації креатиніну, сечової кислоти, ЛПДНЩ, ТФГ, С-реактивного білка, а також активності ЛФ та ЛДГ, ми не спостерігали достовірної різниці між групами хворих I та II, що може вказувати на те, що зміна цих параметрів обумовлена патогенетичними механізмами РС і не залежить від наявності або відсутності COVID-19 в анамнезі. Однак для II групи хворих були також зазначені деякі специфічні зміни. Серед них: підвищення амілазної активності на 58 % ($p < 0,05$); зниження концентрації феритину у 3 рази ($p < 0,05$) порівняно з показниками відносно здорових донорів.

Таблиця 2

Показники біохімічного аналізу крові у хворих на розсіяний склероз (m ± SD)

Показник	Відносно здорові донори (n = 30)	Хворі на розсіяний склероз	
		I група (n = 56)	II група (n = 41)
Загальний білок, г/л	59,10 ± 7,02	60,22 ± 3,69	60,60 ± 3,63
Альбумин, г/л	41,17 ± 3,57	39,69 ± 2,50	38,28 ± 2,21
Креатинін, мкмоль/л	70,45 ± 6,24	51,90 ± 5,19*	57,96 ± 6,22*
Сечовина, мкмоль/л	4,25 ± 0,56	4,24 ± 1,14	4,14 ± 0,46
Загальний білірубін, мкмоль/л	9,07 ± 1,13	9,54 ± 2,61	7,84 ± 1,21
Прямий білірубін, мкмоль/л	1,97 ± 0,43	2,28 ± 0,63	1,81 ± 0,36
Непрямий білірубін, мкмоль/л	7,00 ± 1,22	7,43 ± 1,99	6,00 ± 1,00
Сечова кислота, мкмоль/л	331,40 ± 17,51	199,03 ± 25,02*	210,67 ± 34,53*
Холестерин, ммоль/л	4,50 ± 0,61	4,53 ± 0,89	4,00 ± 0,83
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,43 ± 0,02	0,24 ± 0,02*	0,29 ± 0,04*
ЛПНЩ, ммоль/л	2,51 ± 0,34	2,72 ± 0,72	2,19 ± 0,49
ЛПВЩ, ммоль/л	1,16 ± 0,23	1,75 ± 0,27	1,52 ± 0,44
ТАГ, ммоль/л	0,95 ± 0,06	0,57 ± 0,03*	0,64 ± 0,08*
Коефіцієнт атерогенності	1,92 ± 0,51	1,94 ± 0,70	1,70 ± 0,50
АлАТ, Од/л	16,18 ± 3,26	12,27 ± 1,87	12,99 ± 1,54
АсАТ, Од/л	20,96 ± 3,17	15,06 ± 1,66	17,84 ± 2,17
ГГТ, Од/л	15,17 ± 4,96	8,26 ± 2,00	13,15 ± 2,79
ЛФ, Од/л	49,56 ± 2,49	36,57 ± 3,60*	33,90 ± 1,05*
ЛДГ, Од/л	165,83 ± 14,48	112,92 ± 15,15*	113,94 ± 8,06*
Амілаза, Од/л	38,08 ± 4,21	33,40 ± 2,08	51,63 ± 3,78*#
Трансферин, г/л	2,14 ± 0,30	2,46 ± 0,33	2,13 ± 0,20
Феритин, мкг/л	42,44 ± 1,10	115,0 ± 7,7* (50 %) 35,34 ± 9,48 (50 %)	14,22 ± 4,24*#
С-реактивнийбілок, мг/л	0,42 ± 0,09	0,77 ± 0,20*	0,68 ± 0,11*

*Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з показниками групи відносно здорових донорів, # – $p < 0,05$ порівняно з показниками I групи хворих на РС.*

Дискусія і висновки

Оскільки ключовою ланкою патогенезу РС є аутоімунне запалення, то існує думка, що різного роду інфекції, які виконують роль тригерів запального процесу, можуть спонукати до прогресування РС і обумовлювати погіршення стану хворого (Brand et al., 2022; Dargahi et al., 2017). На

сьогодні ця гіпотеза активно перевіряється, однак зв'язок між інфекційними захворюваннями й ризиком прогресування РС не доведено. Відкритим залишається і питання щодо впливу інфекції SARS-CoV-2 на стан пацієнтів із РС. На нашу думку, вивчення загального біохімічного статусу хворих на РС, які мають або не мають підтверджений COVID-19 в анамнезі, є вдалим підходом для розуміння можливих наслідків коронавірусної інфекції на стан пацієнтів.

Зважаючи на те, що БАК є одним із найінформативніших методів лабораторної діагностики, який дозволяє оцінити загальний стан пацієнта й дає змогу виявити порушення у роботі внутрішніх органів і систем організму, ми вважаємо, що аналіз показників БАК може бути вдалою вихідною точкою у вивченні патогенезу РС на тлі постковідного стану й допоможе визначити пріоритетні напрями майбутніх досліджень, направлених на більш глибоке розуміння розвитку патології.

Інтенсивність білкового обміну оцінювали на основі показників загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну тощо (табл. 2). Деякі дослідники зазначали зниження концентрації сироваткового альбуміну в пацієнтів із РС (Freedman et al, 2005). Наприклад, показано, що через руйнування гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) альбумін може проникати до ЦНС, при чому його відносна концентрація у циркуляторному руслі знижується. Було навіть запропоновано використовувати співвідношення концентрацій альбуміну у спинномозковій рідині до альбуміну крові як показник руйнування ГЕБ при РС (Le Vine, 2016). Однак нами не було зазначено змін рівня сироваткового альбуміну у хворих на РС. Такі результати можна пояснити відсутністю змін бар'єрної функції ГЕБ через відносно короткий термін захворюваності на РС у досліджуваних пацієнтів. Так, середній час від моменту встановлення діагнозу становив 4,4 ± 1,5 року в пацієнтів I групи та 4,6 ± 1,3 року – в пацієнтів II групи. У цьому дослідженні ми навмисно обмежили вибірку пацієнтів за віком, статтю і тривалістю хвороби, щоб максимально точно інтерпретувати встановлені зміни показників БАК.

Сечова кислота є кінцевим продуктом обміну пуринів, які утворюються при розпаді нуклеїнових кислот під час клітинного оновлення. Згідно з отриманими результатами (табл. 2) концентрація сечової кислоти у сироватці крові хворих на РС знижувалася на 60 % у пацієнтів I групи та на 64 % – у пацієнтів II групи порівняно з показниками відносно здорових донорів. Як бачимо, відсутня достовірна різниця між цими показниками у хворих, які мають або не мають COVID-19 в анамнезі. Загалом наші результати узгоджуються з результатами інших дослідників щодо динаміки змін рівня сечової кислоти у хворих на РС (Drulović et al., 2001; Toncev et al., 2002). Результати попередніх досліджень показали, що сечова кислота є потужним природним хелатором пероксинітриту і його похідних (Hooper et al., 2000). Також було доведено, що саме вільні радикали оксиду азоту, зокрема пероксинітрит, залучені до руйнування бар'єрної функції ГЕБ при РС. Було навіть показано ефективність використання сечової кислоти для підтримання цілісності ГЕБ на тваринних моделях РС (Hooper et al., 2000). Отже, показник рівня сечової кислоти є цінним біомаркером при РС, а низька концентрація сечової кислоти під час захворюваності може бути однією із причин деструкції ГЕБ і прогресування РС.

Інтенсивність ліпідного обміну оцінювали на основі показників концентрацій ЗХС, ЛПДНЩ, ЛПНЩ, ЛПВЩ та ТАГ. Відомо, що порушення ліпідного метаболізму може бути наслідком хронічного запального процесу і часто визначається на тлі РС (Gafson et al., 2018). Результати попередніх досліджень часто вказували на підвищення концентрації різних ліпідних фракцій у сироватці крові хворих на РС (Boshra et al., 2022; Tettey et al., 2014; Zhornitsky et al, 2016), однак наші результати, навпаки, констатують достовірне зниження рівнів ЛПДНЩ та ТАГ у сироватці крові пацієнтів із РС. Статистичної різниці між показниками хворих I та II групи не спостерігали. Усі інші показники ліпідного обміну були в межах контрольних значень (табл. 2). Наразі важко зробити висновок щодо причин зниження рівнів окремих ліпідних фракцій за розвитку РС, цей феномен потребує більшої уваги в майбутніх дослідженнях.

Аутоімунні захворювання, зокрема й РС, часто супроводжуються порушеннями в роботі печінки. Зміни функціонального стану органа можуть бути обумовлені, з одного боку, безпосереднім впливом імунної системи на клітини печінки через аутоімунні реакції, а з іншого – токсичною дією лікарських засобів, безперервне вживання яких є важливою умовою у боротьбі з прогресуванням РС (Tremlett et al., 2006). Оскільки рівні активностей маркерних ферментів (АлАТ, АсАТ та ГГТ) у сироватці крові пацієнтів із РС були в межах норми, то ми можемо констатувати відсутність деструктивних змін у функціонуванні печінки, що може бути свідченням вдало підібраної терапії.

Нещодавні дослідження показали, що підвищення активності різних ізоформ ЛДГ у спинномозковій рідині може бути перспективним біомаркером при РС (Elishkevitz et al., 2009), однак наші результати показали зниження активності ЛДГ у сироватці крові пацієнтів обох груп (табл. 2). Відомо, що деякі препарати можуть знижувати рівень ЛДГ, однак такі зміни за РС є нетиповими й не узгоджуються з висновками інших досліджень (Lewin et al., 2016). Оскільки низький рівень ЛДГ корелює з ризиком розвитку депресивних станів (Dwyer et al., 2015), що також може сприяти прогресуванню РС і його супутніх ускладнень, то наші результати мають бути перевірені на більш широкій вибірці пацієнтів з урахуванням можливих порушень когнітивних функцій, виявів депресивних станів, схильності до суїцидальної поведінки тощо.

Цікаві дані були одержані щодо активності амілази в сироватці крові пацієнтів із РС. Її активність перебувала в межах норми у I групі хворих, тоді як у II групі цей показник був статистично вищим за показники як відносно здорових донорів, так і пацієнтів із РС, що не мали в анамнезі COVID-19. α-Амілаза крові є одним із основних маркерів деструкції панкреатичної залози. Результати деяких попередніх досліджень констатували взаємозв'язок між інфекцією SARS-CoV-2 та розладами у функціонуванні органів шлунково-кишкового тракту, зокрема панкреатичної залози (Prasad et al., 2023). Було висунуто припущення, що гострий панкреатит у пацієнтів із COVID-19 може бути викликаний безпосереднім цитопатичним ефектом, опосередкованим локальною реплікацією SARS-CoV-2, або опосередковано спричинений гіпоксією і негативним впливом цитокінів, що надмірно продукуються імунною системою під час коронавірусної інфекції. Однак остаточний механізм ураження підшлункової залози на тлі COVID-19 не встановлений, а отже, розглядуваний напрям досліджень є актуальним для поглиблення розуміння впливу інфекції SARS-CoV-2 на стан пацієнтів.

Залізо необхідне для низки ключових метаболічних процесів, зокрема окисного фосфорилювання та синтезу ДНК, воно також є невід'ємною частиною реакцій утворення мієліну (Da Costa et al., 2011). Отже, дослідження концентрації білків, що відповідають за накопичення і транспорт заліза в організмі, є актуальним у контексті РС, який є хронічним демієлінізувальним захворюванням. Феритин є білковим комплексом, який виконує функцію основного внутрішньоклітинного депо заліза в

організмі людини й функціонує як буфер, що забезпечує доступність цього елементу за необхідності й одночасно запобігає перенавантаженню організму вільним залізом. Наші результати показали достовірне підвищення концентрації феритину лише в половини пацієнтів І групи, тоді як у іншої половини цей показник був у межах норми. Такі дані узгоджуються з результатами інших дослідників (Da Costa et al., 2011; Sonnweber et al., 2020). Відомо, що рівень сироваткового феритину позитивно корелює з важкістю перебігу захворювання COVID-19 (Suriawinata, & Mehta, 2020), і, навпаки, у важкохворих пацієнтів зазначали низький рівень сироваткового трансферину (Hippchen et al., 2020). Оскільки наші дослідження були обмежені групою пацієнтів із РС у постковідний період, то ми не зазначали достовірних змін показників трансферину, тоді як концентрація феритину була нижче показників відносно здорових донорів (табл. 2).

С-реактивний білок – це білок гострої фази запалення. Він є дуже чутливим, але малоспецифічним маркером запальних процесів в організмі. Його достовірне підвищення спостерігали у хворих на РС обох групи, незалежно від наявності підтвердженого COVID-19 в анамнезі. Це може свідчити про активацію запальних реакцій, які є ключовим тригерним чинником розвитку та прогресування РС (Eren, & Demir, 2020).

Внесок авторів: Володимир Мельник, Світлана Шоломон – робота з пацієнтами, постановка діагнозу, забір зразків крові, отримання сироватки крові; Віталій Карбовський – ідея та концептуальні положення проведених досліджень, написання статті; Тетяна Галенова – проведення експерименту, обрахунки та статистичний аналіз результатів, написання статті; Марина Калашнікова – проведення експерименту й обрахунки результатів.

Список використаних джерел

Безсмертний, Ю. О., Безсмертна, Г. В., Гриневич, Ю. Ф., & Веремій, Л. Г. (2017). Медико-соціальна характеристика інвалідності внаслідок розсіяного склерозу в Україні. *Буковинський медичний вісник*, 21, 4(84), 178–187. https://doi:10.24061/2413-0737. XXI.4.84.2017.140

Boshra, H., Awad, M., Hussein, M., & Elyamani, E. (2022). Vascular dysfunction and dyslipidemia in multiple sclerosis: are they correlated with disease duration and disability status? *Egypt Heart J.,* 74(1), 9. https://doi:10.1186/s43044-022-00244-2

Brand, J. S., Smith, K. A., Piehl, F., Olsson, T., & Montgomery, S. (2022). Risk of serious infections in multiple sclerosis patients by disease course and disability status: Results from a Swedish register-based study. *Brain BehavImmun Health,* 22, 100470. https://doi:10.1016/j.bbih.2022.100470

Chaudhry, F., Jageka, C., Levy, P. D., Cerghet, M., & Lisak, R. P. (2021). Review of the COVID-19 Risk in Multiple Sclerosis. *J. Cell Immunol.*, 3(2), 68–77. https://doi:10.33696/immunology.3.080

Da Costa, R., Szyper-Kravitz, M., Szekanecz, Z., Csépány, T., Dankó, K., Shapira, Y., Zandman-Goddard, G., Orbach, H., Agmon-Levin, N., & Shoenfeld, Y. (2011). Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. *Isr Med Assoc J.,* 13(2), 91–95.

Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., De Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*, 7(7), 78. https://doi.org/10.3390/brainsci7070078

Donati, D. (2020). Viral infections and multiple sclerosis, Drug Discovery Today. *Disease Models*, 32, 27–33. https://doi:10.1016/j.ddmod.2020.02.003

Drulović, J., Dujmović, I., Stojsavljević, N., Mesaros, S., Andjelković, S., Miljković, D., Perić, V., Dragutinović, G., Marinković, J., Lević, Z., & Mostarica Stojković, M. (2021). Uric acid levels in sera from patients with multiple sclerosis. *J Neurol,* 248(2), 121–126. https://doi:10.1007/s004150170246

Dwyer, M. G., Zivadinov, R., Markovic-Plese, S., Bergsland, N., Heininen-Brown, M., Carl, E., & Dangond, F. (2015). Associations between changes in ferritin levels and susceptibility-weighted imaging filtered phase in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis over 24 weeks of therapy with subcutaneous interferon beta-1a three times weekly. *J. Neuroimmunol.*, 281, 44–50. https://doi:10.1016/j.jneuroim.2015.03.002

Elishkevitz, K. P., Nussinovitch, U., & Nussinovitch, M. (2009). Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Adolescents With Multiple Sclerosis. *Pediatric Neurology,* 41(4), 259–262. https://doi:10.1016/j.pediatrneurol.2009.04.018

Eren, F., & Demir, A. (2020). C-reactiveprotein/albumin ratioin patients with multiple sclerosis and its relation ship with disease sub type and disability. *J. Surg. Med.*, 4(11), 974–977. https://doi.org/10.28982/josam.736846

Freedman, M. S., Thompson, E. J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M. K., Sharief, M., Sindic, C. J., Sellebjerg, F., & Tourtellotte, W. W. (2005). Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol,* 62, 865–870. https://doi:10.1001/archneur.62.6.865

Gafson, A. R., Thorne, T., McKechnie, C. I. J., Jimenez, B., Nicholas, R., & Matthews, P. M. (2018). Lipoprotein markers associated with disability from multiple sclerosis. *Sci. Rep.*, 19, 8(1), 17026. https://doi:10.1038/s41598-018-35232-7

Hippchen, T., Altamura, S., Muckenthaler, M. U., & Merle, U. (2020). Hypoferremia is Associated with Increased Hospitalization and Oxygen Demand in COVID-19 Patients. *Hemasphere*, 10, 4(6), e492. https://doi:10.1097/HS9.0000000000000492

Hooper, D. C., Scott, G. S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R. B., Koprowski, H., & Spitsin, S. V. (2000). Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.,* 14(5), 691–698. https://doi:10.1096/fasebj.14.5.691

Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 8(3), a028936. https://doi:10.1101/cshperspect.a028936

LeVine, S. M. (2016). Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol.*, 16, 47. https://doi:10.1186/s12883-016-0564-9

Lewin, A., Hamilton, S., Witkover, A., Langford, P., Nicholas, R., Chataway, J., & Bangham, C. R. M. (2016). Free serum haemoglobin is associated with brain atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Wellcome Open Res.*, 1, 10. https://doi:10.12688/wellcomeopenres.9967.2

Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol.*, 31(6), 752–759. https://doi:10.1097/WCO.0000000000000622

Prasad, H., Ghetla, S. R., Butala, U., Kesarkar, A., & Parab, S. (2023). COVID-19 and serumamylase and lipase levels. *Indian J. Surg.*, 85(2), 337–340. https://doi:10.1007/s12262-022-03434-z

Sharma, A., Tiwari, S., Deb, M. K., & Marty, J. L. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *Int J. Antimicrob Agents.*, 56(2), 106054. https://doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106054

Sonnweber, T., Boehm, A., Sahanic, S., Pizzini, A., Aichner, M., & Sonnweber, B. (2020). Persisting alterations of iron homeostasis in COVID-19 are associated with non-resolving lung pathologies and poor patients' performance: a prospective observational cohort study. *Respir. Res. BioMed Central.,* 21, 1–9.

Suriawinata, E., & Mehta, K. J. (2023). Iron and iron-related proteins in COVID-19. *Clin Exp Med.*, 23(4), 969-991. https://doi:10.1007/s10238-022-00851-y

Tettey P, Simpson, S. Jr., Taylor, B., Blizzard, L., Ponsonby, A. L., Dwyer, T., Kostner, K., & van der Mei, I. (2014). An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in people with MS. *Multiple sclerosis*, 20, 1737–1744. https://doi:10.1177/1352458514533162

Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., . . . Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.*, 17(2), 162–173. https://doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2

Toncev, G., Milicic, B., Toncev, S., & Samardzic, G. (2002). Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *European Journal of Neurology*, 9(3), 221–226. https://doi:10.1046/j.1468-1331.2002.00384.x

Tremlett, T, Seemüller, S, Zhao, Y, Yoshida, E. M., Oger, J., & Petkau, J. (2006). Liver test abnormalities in multiple sclerosis: Findings from placebo-treated patients. *Neurology*, 67(7), 1291–1293. https://doi:10.1212/01.wnl.0000238515.27055.62

Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler.*, 26(14), 1816–1821. https://doi:10.1177/1352458520970841

Zhornitsky, S., McKay, K. A., Metz, L. M., Teunissen, C. E., & Rangachari, M. (2016). Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. *Multiple sclerosis and related disorders*, 5, 53–65. https://doi:10.1016/j.msard.2015.10.005

References

Bezsmertnyi, Y. O., Bezsmertna, G. V., Grynevych, Yu. F. (2017). Medical and social charactristics of disability in Ukraine to multiple sclerosis. *Bukovinian Medical Herald*, 21, 4(84), 178–187. https://doi:10.24061/2413-0737. XXI.4.84.2017.140 [in Ukrainian].

Boshra, H., Awad, M., Hussein, M., & Elyamani, E. (2022). Vascular dysfunction and dyslipidemia in multiple sclerosis: are they correlated with disease duration and disability status? *Egypt Heart J.,* 74(1), 9. https://doi:10.1186/s43044-022-00244-2

Brand, J. S., Smith, K. A., Piehl, F., Olsson, T., & Montgomery, S. (2022). Risk of serious infections in multiple sclerosis patients by disease course and disability status: Results from a Swedish register-based study. *Brain BehavImmun Health,* 22, 100470. https://doi:10.1016/j.bbih.2022.100470

Chaudhry, F., Jageka, C., Levy, P. D., Cerghet, M., & Lisak, R. P. (2021). Review of the COVID-19 Risk in Multiple Sclerosis. *J. Cell Immunol.*, 3(2), 68–77. https://doi:10.33696/immunology.3.080

Da Costa, R., Szyper-Kravitz, M., Szekanecz, Z., Csépány, T., Dankó, K., Shapira, Y., Zandman-Goddard, G., Orbach, H., Agmon-Levin, N., &

Shoenfeld, Y. (2011). Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. *Isr. Med. Assoc. J.,* 13(2), 91–95.

Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., De Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*, 7(7), 78. https://doi.org/10.3390/brainsci7070078

Donati, D. (2020). Viral infections and multiple sclerosis, Drug Discovery Today. *Disease Models*, 32, 27–33. https://doi:10.1016/j.ddmod.2020.02.003

Drulović, J., Dujmović, I., Stojsavljević, N., Mesaros, S., Andjelković, S., Miljković, D., Perić, V., Dragutinović, G., Marinković, J., Lević, Z., Mostarica, & Stojković, M. (2021). Uric acid levels in sera from patients with multiple sclerosis. *J. Neurol.,* 248(2), 121–126. https://doi:10.1007/s004150170246

Dwyer, M. G., Zivadinov, R., Markovic-Plese, S., Bergsland, N., Heininen-Brown, M., Carl, E., & Dangond, F. (2015). Associations between changes in ferritin levels and susceptibility-weighted imaging filtered phase in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis over 24 weeks of therapy with subcutaneous interferon beta-1a three times weekly. *J. Neuroimmunol.*, 281, 44–50. https://doi:10.1016/j.jneuroim.2015.03.002

Elishkevitz, K. P., Nussinovitch, U., & Nussinovitch, M. (2009). Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Adolescents With Multiple Sclerosis. *Pediatric Neurology,* 41(4), 259–262. https://doi:10.1016/j.pediatrneurol.2009.04.018

Eren, F., & Demir, A. (2020). C-reactive protein/albumin ratioin patients with multiple sclerosis and its relation ship with disease sub type and disability. *J. Surg. Med.*, 4(11), 974–977. https://doi.org/10.28982/josam.736846

Freedman, M. S., Thompson, E. J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M. K., Sharief, M., Sindic, C. J., Sellebjerg, F., & Tourtellotte, W. W. (2005). Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch. Neurol.,* 62, 865–870. https://doi:10.1001/archneur.62.6.865

Gafson, A. R., Thorne, T., Mc Kechnie, C. I. J., Jimenez, B., Nicholas, R., & Matthews, P. M. (2018). Lipoprotein markers associated with disability from multiple sclerosis. *Sci. Rep.*, 19, 8(1), 17026. https://doi:10.1038/s41598-018-35232-7

Hippchen, T., Altamura, S., Muckenthaler, M. U., & Merle, U. (2020). Hypoferremia is Associated with Increased Hospitalization and Oxygen Demand in COVID-19 Patients. *Hemasphere*, 10, 4(6), e492. https://doi:10.1097/HS9.0000000000000492

Hooper, D. C., Scott, G. S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R. B., Koprowski, H., & Spitsin, S. V. (2000). Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.,* 14(5), 691–698. https://doi:10.1096/fasebj.14.5.691

Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 8(3), a028936. https://doi:10.1101/cshperspect.a028936

Le Vine, S. M. (2016). Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol.*, 16, 47. https://doi:10.1186/s12883-016-0564-9

Lewin, A., Hamilton, S., Witkover, A., Langford, P., Nicholas, R., Chataway, J., & Bangham, C. R. M. (2016). Free serum haemoglobin is associated with brain atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Wellcome Open Res.*, 1, 10. https://doi:10.12688/wellcomeopenres.9967.2

Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol.*, 31(6), 752–759. https://doi:10.1097/WCO.0000000000000622

Prasad, H., Ghetla, S. R., Butala, U., Kesarkar, A., & Parab, S. (2023). COVID-19 and serum amylase and lipase levels. *Indian J. Surg.*, 85(2), 337–340. https://doi:10.1007/s12262-022-03434-z

Sharma, A., Tiwari, S., Deb, M. K., & Marty, J. L. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *Int J. Antimicrob Agents.*, 56(2), 106054. https://doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106054

Sonnweber, T., Boehm, A., Sahanic, S., Pizzini, A., Aichner, M., & Sonnweber, B. (2020). Persisting alterations of iron homeostasis in COVID-19 are associated with non-resolving lung pathologies and poor patients' performance: a prospective observational cohort study. *Respir. Res. Bio. Med. Central.,* 21, 1–9.

Suriawinata, E., & Mehta, K. J. (2023). Iron and iron-related proteins in COVID-19. *Clin. Exp. Med.*, 23(4), 969–991. https://doi:10.1007/s10238-022-00851-y

Tettey P, Simpson, S. Jr., Taylor, B., Blizzard, L., Ponsonby, A. L., Dwyer, T., Kostner, K., van der Mei, I. (2014). An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in people with MS. *Multiple sclerosis.*, 20, 1737–1744. https://doi:10.1177/1352458514533162

Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., . . . Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.*,17(2), 162–173. https://doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2

Toncev, G., Milicic, B., Toncev, S., & Samardzic, G. (2002). Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *European J. of Neurology*, 9(3), 221–226. https://doi:10.1046/j.1468-1331.2002.00384.x

Tremlett, T, Seemüller, S, Zhao, Y, Yoshida, E. M., Oger, J., & Petkau, J. (2006). Liver test abnormalities in multiple sclerosis: Findings from placebo-treated patients. *Neurology*, 67(7), 1291–1293. https://doi:10.1212/01.wnl.0000238515.27055.62

Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler.*, 26(14), 1816–1821. https://doi:10.1177/1352458520970841

Zhornitsky, S., McKay, K. A., Metz, L. M., Teunissen, C. E., & Rangachari, M. (2016). Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. *Multiple sclerosis and related disorders*, 5, 53–65. https://doi:10.1016/j.msard.2015.10.005

Отримано редакцією журналу / Received: 06.10.23
Прорецензовано / Revised: 06.11.23
Схвалено до друку / Accepted:06.11.23

Tetiana HALENOVA[1], PhD (Biol.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0003-2973-2646
e-mail: galenovatanya@knu.ua

Maryna KALASHNIKOVA[1], Master's Student
ORCID ID: 0000-0002-2600-4806
e-mail: maryna.kalashnikova@knu.ua

Vitaliy KARBOVSKYY[2], PhD (Biol.)
ORCID ID: 0000-0003-2226-0914
e-mail: Vkarbovskyy@gmail.com

Svitlana SHOLOMON[3], Doctor of the Highest Category
ORCID ID: 0000-0003-2097-9562
e-mail: sholomon19@gmail.com

Volodymyr MELNYK[3], DSc (Med.), Prof.
ORCID ID: 0000-0003-4645-8239
e-mail: volodymyr.melnyk@nmu.ua

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
[2]LLC "BIOPHARMA PLASMA", Bila Tserkva, Kyiv region, Ukraine
[3]O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS WHO HAD SARS-COV-2 INFECTION

Background. ***Currently, multiple sclerosis (MS) is an important medical and social problem. There arealready more than 2.8 million people with MS worldwide, and due to the lack of effective methods of treatment and prevention, the number of patients is increasing constantly. Therefore, the search for new ways and approaches aimed towards stabilizing the patient's condition is a priority task of modern neurobiology. It is also important to identify triggers that can lead to accelerating the rate of disease progression. Since MS is an immune-mediated disorder, we hypothesized that concomitant diseases of infectious etiology, via the activation of aninflammatory reactions cascade, can lead to a worsening of the MS patient's condition. However, the final answer to the question of whether acute viral infections affect the condition of patients with MS has not been obtained yet. In the context of the epidemiological situation that has developed in recent years, due to the spread of the SARS-CoV-2 coronavirus infection, it is interesting to study the possible negative consequences of COVID-19 in people suffering from MS.***

The aim of the study was to analyze the general biochemical status of patients with MS who had or did not have a confirmed history of COVID-19.

M e t h o d s . ***A total of 271 participants were enrolled in this study, including 97 MS patients and 30 healthy volunteers who matched for age and sex. Patients with MS were divided into two groups: group I (n= 56; 36 women and 20 men, average age: 41.3 ± 5.5, disease duration: 4.4 ± 1.5 years) – patients with MS who did not have confirmed history of COVID-19 and group II (n= 41; 27 women and 14 men, average age: 40.2 ± 5.6, disease duration: 4.6 ± 1.3 years) – patients with MS, who had a laboratory-verified diagnosis of COVID-19 in the past 4-7 months. Blood serum samples of patients and healthy donors were obtained from the University Clinic of O.O. BogomoletsNational Medical University, Kyiv, Ukraine. All patients were diagnosed with MS according to the 2017McDonald criteria.***

R e s u l t s . ***It was established that both groups of MS patients had similar changes in blood biochemical parameters compared to the healthy indicators: a decrease in creatinine and uric acid concentrations; decrease in the levels of particular lipid fractions, namely VLDL and TAG; decrease in the activities of AP and LDH; increase in C-reactive protein concentration. The only significant differences between groups I and II were noted due to multidirectional changes in serum ferritin concentration and an increase in the level of amylase activity in the blood serum of patients with MS in post-COVID period.***

C o n c l u s i o n s . ***The absence of statistically significant differences between the blood biochemical parameters in patients with MS who had or did not have confirmed history of COVID-19 indicates the absence of a relationship between SARS-CoV-2 infection and changesof particular studied parameters. Among the results obtained, the multidirectional changes in ferritin concentration in MS patients before and after COVID-19 could be of great interest to further research.***

K e y w o r d s : ***multiple sclerosis, SARS-CoV-2 infection, COVID-19, biochemical blood parameters, laboratory studies.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 577.25
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.20-23

Семен ЄЛЬЯШОВ, асп.
ORCID ID: 0000-0002-1633-4828
e-mail: s.yeliash@biph.kiev.ua
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

Вадим РИМАР, провідний біолог
ORCID ID: 0009-0000-8119-3489
e-mail: rymarvi@gmail.com
ТОВ "БІОКОРП", Київ, Україна

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ МЕХАНОЧУТЛИВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ДЕТРУЗОРІ СЕЧОВОГО МІХУРА ЩУРА

В с т у п . ***Автономна механочутливість м'язового шару (детрузора) сечового міхура є актуальною проблемою, що досі залишається малодослідженою. Відомо про ймовірну експресію низки механочутливих каналів, однак на сьогодні встановлено лише провідну роль механочутливого каналу TREK-1. Метою дослідження було перевірити експресію генів механорецепторів гладком'язової тканини (KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1 та Piezo2) у детрузорі сечового міхура.***

М е т о д и . ***За допомогою програмного забезпечення BLAST були підібрані унікальні праймери для детекції зазначених генів каналів, а також референсного гена GAPDH. Валідацію проводили за допомогою однокрокової ПЛР зі зворотною транскрипцією на ампліфікаторі CFX96 з детекцією флуоресценції Fam-проби. Зразок матричної РНК виділяли з м'язового й уротеліального шарів сечового міхура та дорзальних корінцевих гангліїв (ДКГ) здорових щурів лінії Wistar за допомогою комерційного колонкового набору для екстракції нуклеїнових кислот (Біокорп, Україна).***

Р е з у л ь т а т и . ***Було показано експресію каналів Piezo1 та TREK-1 в уротеліальному й м'язовому шарах сечового міхура, тоді як TRPV4 в наших зразках був експресований лише в уротелії. Експресії гена Piezo2 не було виявлено.***

В и с н о в к и . ***Підібрані послідовності праймерів до TREK-1, Piezo1, TRPV4 й гена "домашнього господарства" GAPDH ефективні для дослідження експресії зазначених генів у щурів. Синтезовані послідовності відповідають очікуваним розмірам фрагментів. У сечовому міхурі експресуються гени трьох механочутливих каналів: TREK-1, Piezo1 та TRPV4.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***механочутливість, сечовий міхур, гладком'язові клітини, експресія.***

Вступ

Сечовий міхур, як і більшість порожнистих м'язових органів, регулюється як ефектор центральною нервовою системою (*Araki et al., 2008*). Однак наразі відомо про його самостійну здатність до сприймання механічних подразнень без залучення аферентних нейронів (*Young et al., 2013*). Було показано, що сечовому міхуру властивий механочутливий рефлекс, який має два типи відповіді залежно від критичного об'єму: на початковій фазі наповнення розслабляти гладком'язовий шар (детрузор) і наповнюватись, а також скорочувати м'язи після наповнення на понад 50 % для утримання максимального об'єму органа (*Roccabianca, & Bush, 2016*). За механічну чутливість відповідають специфічні механочутливі іонні канали (*Ranade, Syeda, & Patapoutian, 2015*). У літературі зазначається фундаментальна роль TREK-1 – K^+-провідного механочутливого каналу, активація якого викликає розслаблення м'яза *(Qi et al., 2014*). Не зовсім визначеною залишається функціональна присутність найбільш вірогідних Ca^{2+}-провідних каналів Piezo1 та TRPV4 (англ. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*) у детрузорі, а також остаточно не встановлені механізм і основний учасник автономного механочутливого рефлексу сечового міхура (*Li et al., 2022*). Наразі відомо, що уротелій експресує такі механочутливі йонні канали, як: представники субродини ваніло їдного транзієнтного рецепторного потенціалу (TRPV) TRPV4 та TRPV2, субродини канонічних TRP-каналів – TRPC1 та TRPC4, канали родини Piezo – Piezo1, Piezo2 та епітеліальний натрієвий канал (ENaC) (*Merrill et al., 2016*). Детальне дослідження клітиноспецифічної експресії (крім TREK-1) механочутливих каналів саме у м'язовому шарі (детрузорі) щура не виконували, хоча попередні дослідження вказують на функціонування цих каналів у м'язових клітинах детрузора.

Отже, метою представленої роботи було підібрати праймери для пошуку мРНК генів найбільш перспективних імовірних механорецепторів – KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1 та Piezo2 – і перевірити експресію відповідних генів у детрузорі сечового міхура.

Методи

Модельним об'єктом було обрано лабораторного щура (*Rattus norvegicus var. alba*) лінії Wistar. Ця лінія характеризується альбінізмом. В експеримент брали щурів віком 3 місяці, статевозрілих, масою від 200 до 250 г (n = 4). Тварини були вирощені й утримувались на стандартній дієті й водогінній воді, забезпечені *ad libitum* зі стандартним лікуванням. Необхідні умови утримання забезпечувались згідно зі стандартами віварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України.

За зразки брали тканини, які не мали анатомічних вад, без видимих новоформувань або пухлин і внутрішніх сечових каменів. Після вилучення органи поміщали в охолоджений (4 °C) стерильний фізіологічний розчин Рінгера для промивання від крові. У стерильних умовах сечовий міхур розрізали поздовжньо і стерильними хірургічними інструментами відділяли уротеліальний шар від м'язового.

Після очищення і розділення тканини одразу заморожували в рідкому азоті, а подальше виділення нуклеїнової кислоти проводили за допомогою набору для виділення нуклеїнової кислоти з колонками (ТОВ Біокорп, Україна) згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію та чистоту отриманої нуклеїнової кислоти перевіряли спектрофотометром DS-11 (DeNovix, США).

Для визначення експресії каналів було підібрано праймери та флюоресцентні проби для подальшого дослідження згідно з послідовностями відповідних генів *Rattus norvegicus* із бази даних NCBI Gene за допомогою програмного забезпечення BLAST. Як референсний брали ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (англ.

© Єльяшов Семен, Римар Вадим, 2023

ISSN 1728-3817 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), який використовують для перевірки якості проходження реакції та виділеної нуклеїнової кислоти (*Barber et al., 2005*). Як і до механорецепторів KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1 та Piezo2, проби для *GAPDH* були обрані зі флюорофором під канал FAM (табл. 1) і разом із праймерними олігонуклеотидами синтезовані на замовлення фірмою "Metabion" (Німеччина).

Таблиця 1

Підібрані послідовності праймерів і проб для генів *Rattus norvegicus*

Ген	Праймер	Послідовність	Розмір продукту, нукл.
GAPDH	For	5'-CATCTTCCAGGAGCGAGATCC-3'	323
	Rev	5'- CATGGACTGTGGTCATGAGC -3'	
	Probe	5'- Cy5 – AGAAGGCTGGGGCTCACCTGAAG – BHQ3 -3'	
Piezo1	For	5'- CAGCTGAAAAGACAGATGAAGCG -3'	189
	Rev	5'- ACCAGAGTGGATGACTGTGG -3'	
	Probe	5'- FAM – TCAGGAGCCAGGGCCTGACAG – BHQ1 -3'	
Piezo2	For	5'- GACGATGCAAGGACACACAG -3'	243
	Rev	5'- CCCTTCAAGCTTTCGAAGCC -3'	
	Probe	5'- FAM – ACCCGCTTACAACTGCTCAACTTGGG – BHQ1 -3'	
TRPV4	For	5'- TCTTTACCAGTATCAAAGACTTGTTCATG -3'	265
	Rev	5'- TCTTTGAAGAGGATCTTCTGAATCATG -3'	
	Probe	5'- FAM – TCCAGTTGCTCTACTTCATCTACTCAGTGCT – BHQ1 -3'	
KCNK2 (TREK-1)	For	5'- ATGAACTCATCCAGCAAATAGTGAC -3'	313
	Rev	5'- GTCTGACTAACATTCCACTTAATAAATGTGTC -3'	
	Probe	5'- FAM – TGTTATCACAACCATAGGATTTGGAAACATCTCCC – BHQ1 -3'	

Для проведення зворотної транскрипції і подальшої ампліфікації використовували "Суміш для однокрокової ПЛР" (ТОВ "Біокорп", Україна) з *Taq*-полімеразою і РНК-залежною ДНК-полімеразою згідно з рекомендаціями виробника. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера CFX 96 (Bio-Rad, США) відповідно до протоколу, наведеного в табл. 2.

Таблиця 2

Протокол однокрокової ампліфікації зі зворотною транскрипцією

Стадія 1 – зворотна транскрипція	50 °C	10 хв
Стадія 2 – гарячий старт полімерази	95 °C	10 хв
Стадія 3 – вирівнювання сигналу (5 циклів)	95 °C	10 с
	60 °C	20 с
	72 °C	30 с
Стадія 4 – ампліфікація цільової послідовності (40 циклів)	95 °C	10 с
	60 °C	20 с*
	72 °C	30 с

Примітка: * – детекція флуоресцентного сигналу відбувається на цьому етапі.

Електрофорез проводили за допомогою набору з електричного блока живлення, комплектних клем та електрофоретичної камери (Bio Rad, США). 1 %-й агарозний гель готували з агарози (Sigma, США) у TBE-буфері (Trizma 0,1 моль/л, борна кислота 0,1 моль/л, ЕДТА 0,002 моль/л) (Sigma, США) з додаванням 10 мкл на 100 мл розчину етидій броміду (Sigma, США) для детекції ДНК, а також комерційного маркера для визначення розміру ампліконів із кроком у 100 пар нуклеотидів (Thermo, США).

Результати

У результаті проведеного дослідження було встановлено оптимальну концентрацію праймерів із пробами у пропорції 10-10-10 (For-Rev-Probe) для генів *GAPDH*, *Piezo1* та *TRPV4*. Для праймерів під ген *TREK-1* подібна пропорція виявляла нижчу специфічність, тому пропорція під праймери *TREK-1* була 9-9-3 (For-Rev-Probe). В ампліфікаційну реакцію праймери додавали в кінцевій концентрації 10 нМ (крім *TREK-1*). Методом послідовного розведення встановили оптимальну кількість матричної РНК у зразку: найбільш ефективна ампліфікація *GAPDH* спостерігалась для кількості мРНК у межах 10–20 нг, номер порогового циклу Cq був близьким до 20 (рис. 1 А). Дослідження показали наявність експресії генів *Piezo1* (детрузор – Cq = 29, уротелій – Cq = 27, дорзальні корінцеві ганглії (ДКГ) – Cq = 28) і *TREK-1* у всіх досліджених тканинах (детрузор – Cq = 39, уротелій – Cq = 37, ДКГ – Cq = 34), тоді як *TRPV4* однозначно експресується лише в уротелії, що є основною чутливою тканиною в сечовому міхурі (Cq = 30) (*Girard et al., 2016*) (рис. 1 Б, В, Г), але не у ДКГ, хоча з літературних даних нейрони ДКГ мають експресувати TRPV4 *(Cao, Yu, & Premkumar, 2009*). Контрольні експерименти за відсутності нуклеїнової кислоти у пробірці, а також із внесеною нуклеїновою кислотою людини були негативними, що свідчить про високу специфічність і стабільність реакції з підібраними праймерами.

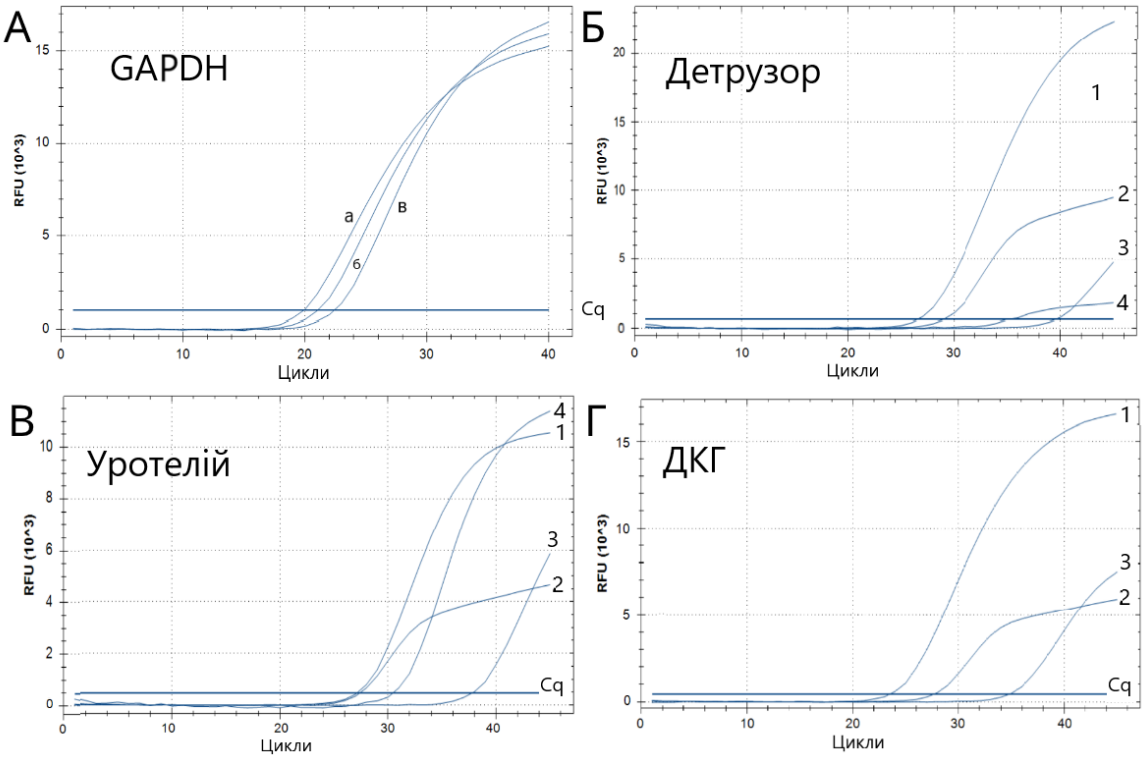


Рис. 1. Криві ампліфікації мРНК досліджених генів, виділеної із тканин щурів.
А –розведення зразка посмугованого м'яза для визначення чутливості праймерів до гена "домашнього господарства": а – 52 нг загальної РНК, б – 10 нг загальної РНК, в – 1 нг загальної РНК. Б – гладком'язова тканина сечового міхура: 1 – GAPDH, 2 – Piezo1, 3 – TREK-1, 4 – TRPV4. В – уротеліальний шар сечового міхура: 1 – GAPDH, 2 – Piezo1, 3 – TREK-1, 4 – TRPV4. Г – дорзальні корінцеві ганглії: 1 – GAPDH, 2 – Piezo1, 3 – TREK-1; Cq – порогова лінія

Для контролю специфічності реакції саме для ділянок досліджуваних генів провели агарозний гель-електрофорез (рис. 2). Виходячи з розмірів ампліконів, продукти ампліфікаційної реакції були специфічні до відповідних генів-мішеней: *GAPDH* – 323 п. н., *Piezo1* – 189 п. н., *TREK-1* – 313 п. н., *TRPV4* – 265 п. н. Крім цього, можна побачити, що найбільшою мірою світиться ген "домашнього господарства" *GAPDH*, який і на графіках ампліфікації мав найвищий рівень свічення проби (RFU). Практично відсутні розсіяні хвости й амплікони інших розмірів, крім очікуваних, що може вказувати на високу специфічність реакції та відсутність димеризації.

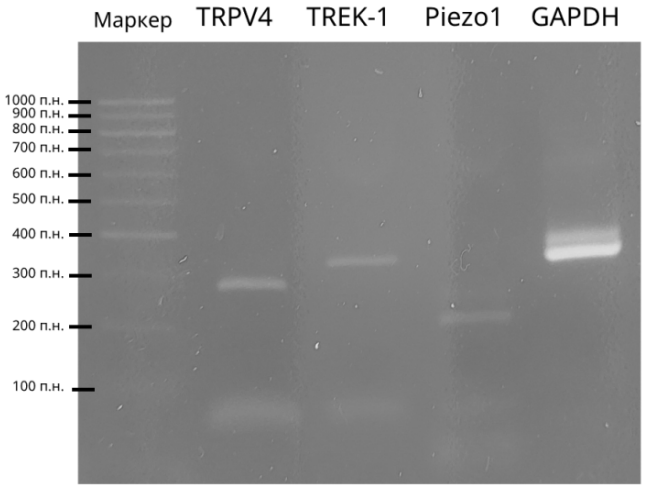


Рис. 2. Агарозний гель-електрофорез ампліконів.
Електрофорез в 1 %-й агарозі протягом 25 хв за напруги 180 В. Маркер молекулярної ваги із кроком 100 пар нуклеотидів. Розміри ампліконів: GAPDH – 323 п. н., Piezo1 – 189 п. н., TREK-1 – 313 п. н., TRPV4 – 265 п. н.

Дискусія і висновки

- Було підібрано на основі відомих послідовностей генів (база даних NCBI) п'ять наборів праймерів і проб для детекції мРНК механочутливих іонних каналів щура TREK-1, Piezo1, Piezo2, TRPV4 й гена "домашнього господарства" *GAPDH*.
- Чотири з п'яти пар праймерів (TREK-1, Piezo1, TRPV4 та GAPDH) дозволяють детектувати відповідні мРНК у клітинах детрузора сечового міхура.

ISSN 1728-3817 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

- Синтезовані послідовності відповідають очікуваним розмірам фрагментів послідовностей досліджуваних генів.
- Попередні результати функціонування рецепторів TREK-1, Piezo1 та TRPV4 було підтверджено експресією їхніх генів саме у м'язових клітинах детрузора.

Внесок авторів: Семен Єльяшов – концептуалізація, вибір генів-кандидатів і контрольного гена, аналіз джерел, огляд літератури, практичне виконання та аналіз; Вадим Римар – підбір і супровід праймерів.

Подяки, джерела фінансування: Робота виконана за підтримки гранту 2020.02/0189 від Національного фонду досліджень України.

Список використаних джерел

Araki, I., Du, S., Kobayashi, H., Sawada, N., Mochizuki, T., Zakoji, H., & Masayuki, T. (2008, May 4). Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and over active bladder. *International Journal of Urology,* 15(8), 681–7.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a house keeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics,* 21(3), 389–95. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769908

Cao, D. S., Yu, S. Q., & Premkumar, L. S. (2009, Jan. 1). Modulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Mediated Membrane Currents and Synaptic Transmission by Protein Kinase C. *Molecular Pain.*, 5, 5.

Girard, B. M., Merrill, L., Malley, S., & Vizzard, M. A. (2013, May 21). Increased TRPV4 Expression in Urinary Bladder and Lumbosacral Dorsal Root Ganglia in Mice with Chronic Over expression of NGF in Urothelium. *Journal of Molecular Neuroscience,* 51(2), 602–14.

Li, X., Hu, J., Zhao, X. D., Li, J., & Chen, Y. (2022, Jun 14). Piezo channels in the urinary system. *Experimental and Molecular Medicine,* 54(6), 697–710.

Merrill, L., Gonzalez, E. J., Girard, B. M., & Vizzard, M. A. (2016, Mar 1). Receptors, channels, and signaling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nature Reviews Urology*, 13(4), 193–204.

Qi, L., Pan, X., Chang, S. S., Malkowicz, B., Guzzo, T. J., & Malykhina, A. P. (2014, May 21). Response of the human detrusor stretches regulated by TREK-1, a two-pore-domain (K_{2P}) mechano-gated potassium channel. *The Journal of Physiology,* 592(14), 3013–30.

Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015, Sep 23). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron,* 87(6), 1162–79. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4582600/

Roccabianca, S., & Bush, T. R. (2016, Mar). Under standing the mechanics of the bladder through experiments and theoretical models: Where westarted and where weare heading. *TECHNOLOGY,* 04(01), 30–41.

Young, J. S., Johnston, L., Soubrane, C., McCloskey, K. D., McMurray, G., Eccles, R., & Fry, C. H. (2013, Feb). The passive and active contractile properties of the neurogenic, under active bladder. *BJU Int.*, 111(2), 355–61. https://doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11300.x.

References

Araki, I., Du, S., Kobayashi, H., Sawada, N., Mochizuki, T., Zakoji, H., & Masayuki, T. (2008, May 4). Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and over active bladder. *International Journal of Urology,* 15(8), 681–7.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a house keeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics,* 21(3), 389–95. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769908

Cao, D. S., Yu, S. Q., & Premkumar, L. S. (2009, Jan 1). Modulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Mediated Membrane Currents and Synaptic Transmission by Protein Kinase C. *Molecular Pain,* 5, 5.

Girard, B. M., Merrill, L., Malley, S., & Vizzard, M. A. (2013, May 21). Increased TRPV4 Expression in Urinary Bladder and Lumbosacral Dorsal Root Ganglia in Mice with Chronic Over expression of NGF in Urothelium. *Journal of Molecular Neuroscience,* 51(2), 602-14.

Li, X., Hu, J., Zhao, X. D., Li, J., & Chen, Y. (2022, Jun 14). Piezo channels in the urinary system. *Experimental and Molecular Medicine,* 54(6), 697–710.

Merrill, L., Gonzalez, E. J., Girard, B. M., & Vizzard, M. A. (2016, Mar 1). Receptors, channels, and signaling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nature Reviews Urology,* 13(4), 193–204.

Qi, L., Pan, X., Chang, S. S., Malkowicz, B., Guzzo, T. J., & Malykhina, A. P. (2014, May 21). Response of the human detrusor stretches regulated by TREK-1, a two-pore-domain (K_{2P}) mechano-gated potassium channel. *The Journal of Physiology,* 592(14), 3013–30.

Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015, Sep 23). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron,* 87(6), 1162–79. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4582600/

Roccabianca, S., & Bush, T. R. (2016, Mar). Under standing the mechanics of the bladder through experiments and theoretical models: Where westarted and where weare heading. *TECHNOLOGY,* 04(01), 30–41.

Young, J. S., Johnston, L., Soubrane, C., McCloskey, K. D., McMurray, G., Eccles, R., & Fry, C. H. (2013, Feb). The passive and active contractile properties of the neurogenic, under active bladder. *BJU Int.*, 111(2), 355–61. https://doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11300.x.

Отримано редакцією журналу / Received: 11.10.23
Прорецензовано / Revised: 13.11.23
Схвалено до друку / Accepted:13.11.23

Semen YELIASHOV, PhD Student
ORCID ID: 0000-0002-1633-4828
e-mail: s.yeliash@biph.kiev.ua
O. O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences (NAS) of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Vadim RYMAR, Biology Specialist
ORCID ID: 0009-0000-8119-3489
e-mail: rymarvi@gmail.com
LTD BIOCORP, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF MECHANO-SENSITIVE RECEPTOR GENES IN THE DETRUSOR OF THE RAT BLADDER

B a c k g r o u n d . ***Autonomic mechanosensitivity of the muscle layer (detrusor) of the urinary bladder is an actual problem that still remains understudied. It is known that a number of mechanosensitive channels are probably expressed, but to date, only the leading role of the mechanosensitive channel TREK-1 has been established. The aim of the study was to check the expression of mechanoreceptor genes of smooth muscle tissue (KCNK2 (TREK-1), TRPV4, Piezo1, and Piezo2) in the bladder detrusor.***

M e t h o d s . ***Unique primers were selected for the detection of the specified channel genes, as well as the reference gene GAPDH, using the BLAST software. Validation was performed using one-step PCR with reverse transcription on the CFX96 amplifier with fluorescence detection of the Fam sample. A matrix RNA sample was isolated from the muscle and urothelial layers of the urinary bladder and dorsal root ganglia (DRG) of healthy Wistar rats using a commercial nucleic acid extraction column kit (Biocorp, Ukraine).***

R e s u l t s . ***In our samples, Piezo1 and TREK-1 channels were shown to be expressed in the urothelial and muscle layers of the bladder, whereas TRPV4 was only expressed in the urothelium. Piezo2 gene expression was not detected.***

C o n c l u s i o n s . ***The selected sequences of primers for TREK-1, Piezo1, TRPV4, and the "housekeeping" gene GAPDH are effective for studying the expression of these genes in rats. The synthesized sequences correspond to the expected fragment sizes. The genes of three mechanosensitive channels are expressed in the urinary bladder: TREK-1, Piezo1, and TRPV4.***

K e y w o r d s : ***mechanosensation; urinary bladder; smooth muscle cells, expression.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 618.146:576.08:576.385.5
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.24-31

Марина НОВОХАТСЬКА[1], магістр
ORCID ID: 0009-0008-5829-8248
e-mail: nvhtsk.mary@gmail.com

Олеся КАЛМИКОВА[1], д-р філософії, асист.
ORCID ID: 0000-0001-5025-0938
e-mail: olesiakalmukova@knu.ua

Наталія СКРИПНИК[1], канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0009-0003-8074-9547
e-mail: nataliia.skrypnyk@knu.ua

Оксана НЕБИЛЬЦОВА[2], канд. мед. наук
e-mail: oksana.nebyltsova@synevo.ua

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
[2]Медична лабораторія ТОВ "Сінево Україна", Київ, Україна

ДЕТЕКЦІЯ МАРКЕРІВ P16/KI-67 ПРИ ВИЯВЛЕННІ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬНОЇ НЕОПЛАЗІЇ ШИЙКИ МАТКИ

В с т у п . ***За останні роки в Україні було виявлено несприятливу епідеміологічну ситуацію щодо захворювань, які передаються статевим шляхом. Однією із найпоширеніших є генітальна папіломовірусна інфекція. Наразі отримано переконливі результати досліджень, які підтверджують, що вірус папіломи людини (ВПЛ) є однією із причин виникнення злоякісних трансформацій шийки матки. Вивчення молекулярного патогенезу асоційованих із ВПЛ новоутворень дозволило знайти біомаркери, які допомагають діагностувати інтраепітеліальну неоплазію шийки матки HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion). Включення біомаркерів p16/Ki-67 у дослідження дає можливість підвищити чутливість виявлення HSIL у жінок. Також актуальним є подальший аналіз ефективності використання додаткової напівкількісної шкали для оцінювання результатів імуноцитохімічного виявлення p16/Ki-67.***

М е т о д и . ***Дослідження проводили на мазках із шийки матки, зроблених із використанням методики рідинної цитології з подальшим фарбуванням за Папаніколау, виявленням ВПЛ, імуноцитохімічним фарбуванням антитілами проти p16/Ki-67. Вибірку становили 90 жінок, які були поділені на 3 групи за віком. У кожній групі їх поділяли за такими критеріями: наявність / відсутність ВПЛ, ступінь дисплазії за класифікацією Бетесда й негативний / позитивний результат на p16/Ki-67 з подальшим розподілом інтенсивності фарбування за бальною шкалою у відповідній локалізації позитивної реакції у ядрі або цитоплазмі.***

Р е з у л ь т а т и . ***Виявлення під час дослідження імуноцитохімічних маркерів p16 та Ki-67 дозволило виокремити жінок з інтраепітеліальними ураженнями за позитивного результату ВПЛ і відсутності диспластичних змін у ПАП-тесті, а також при сортуванні спірних результатів ПАП-тесту. Показано, що інтенсивність імуноцитохімічного забарвлення p16 та Ki-67 змінювалась у прямій залежності від виявленого ступеня дисплазії.***

В и с н о в к и . ***Виявлено прямий взаємозв'язок ступеня тяжкості дисплазії, установленого за класифікацією Бетесда, та інтенсивністю імуноцитохімічного забарвлення p16 та Ki-67. Отримані результати дають змогу надалі вивчати інтенсивність забарвлення при виявленні імуноцитохімічних маркерів p16 та Ki-67 задля їхнього попереднього застосування у комплексній інтерпретації результатів ПАП-тесту й виявлення точного ступеня дисплазії у неоднозначних діагностичних зразках.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***дисплазія шийки матки, внутрішньоепітеліальний рак, імуноцитохімія, ПАП-тест, p16/Ki-67, класифікація Бетесда, вірус папіломи людини.***

Вступ

Одним із найважливіших захворювань жіночої репродуктивної системи є патологія шийки матки (Sung et al., 2021). За статистичними даними щодо раку шийки матки (РШМ) в Україні за 2021 рік воно посідає друге місце за частотою смертності (після раку молочної залози) (Федоренко, 2023).

РШМ дуже рідко виникає на неушкодженому епітелії, йому передують зміни, серед яких диспластичні зміни багатошарового плоского епітелію. Вони характеризуються порушенням нормального диференціювання через гіперплазію парабазальних і базальних клітин, зміною ядерно-цитоплазматичного співвідношення, анеуплоїдією тощо (Вовк, Горбань, & Борисюк, 2016; Pennant, 2008).

Вірус папіломи людини (ВПЛ) є фактором розвитку РШМ, його виявлення в організмі може вказувати на ймовірність цієї онкологічної патології. Через високу розповсюдженість цього вірусу, особливо в молодому віці, тестування на ВПЛ не має високої діагностичної специфічності (Porras et al., 2009; Walboomers et al.,1999). У таких випадках є важливим тестування на маркери проліферації, що дає змогу відобразити експресію онкобілків. Виявлення у клітині маркерів проліферації вказує на відсутність контролю над клітинним діленням, що призводить до онкогенної трансформації (Roelens et al., 2012).

Аналіз на детекцію p16/Ki-67 призначений для виявлення жінок із цервікальними інтраепітеліальними ураженнями високого ступеня в популяції скринінгового дослідження, а також пацієнток із позитивними результатами тестування на ВПЛ високого ступеня ураження (Kim, & Sharpless, 2006).

У клітинах еукаріотів контроль розвитку циклу клітинного ділення здійснюється за допомогою комплексної моделі контрольованої експресії та посттрансляційних модифікацій білків, що регулюють клітинний цикл. Білок p16 відіграє важливу роль у регуляції клітинного циклу. Він бере участь у контролі переходу між фазами G1-S та є ініціатором зупинки клітинного циклу під час клітинної диференціації. Таким чином, він має антипроліферативний ефект при розвитку клітинного циклу. Експресія білка p16 пригнічується в остаточно диференційованих клітинах, отже, виявлення його за допомогою імуногістохімічного аналізу неможливе (Cuschieri, & Wentzensen, 2008).

© Новохатська Марина, Калмикова Олеся, Скрипник Наталія, Небильцова Оксана, 2023

ISSN 1728-3817 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

Дуже часто буває так, що пухлини не проявляються протягом тривалого часу, оскільки імунна система організму їх виявляє і руйнує, що, своєю чергою, доводить ключову проонкогенну роль клітин імунної системи й запалення. У відповідь на сигнали, отримані з пухлини, організм активно продукує такі клітини, як Т- і В-лімфоцити, нейтрофіли, макрофаги та ін. Можливо, що вони спочатку спрямовані до пухлини як протипухлинна відповідь, але в її мікрооточенні скеровуються на проонкогенну відповідь (Smith et al., 2002).

Загалом запальні процеси грають велику роль у розвитку пухлини. Різновиди цитокінів, що стимулюють проліферацію і виживаність передзлоякісних клітин, визначаються рівнем запалення. Пухлиноасоційовані запалення можуть пригнічувати імунну відповідь, що, своєю чергою, стимулює проонкогенну дію (замість антионкогенної). Запальні процеси стимулюють ангіогенез пухлини й метастазування (Jeon, Allen-Hoffmann, & Lambert, 1995; Karin, 2006; Tesniere et al., 2008).

При цервікальній дисплазії надекспресія p16 є біомаркером трансформувальних ВПЛ-інфекцій, тому спочатку її пропонували розглядати як додатковий маркер при діагностуванні жінок з аномальними результатами ПАП-тесту й позитивними – ВПЛ-тесту. Згодом було виявлено, що p16-специфічне забарвлення може спостерігатися в окремих метапластичних або ендоцервікальних клітинах, де експресія p16 виникає для виконання його нормальних клітинних функцій під час пригнічення росту, тому почали виконувати комбінований одночасний пошук p16 і маркера проліферації Ki-67 в одній клітині для ідентифікації диспластичних цервікальних клітин у цитологічних препаратах.

Ki-67 є ядерним і ядерцевим білком, що строго пов'язаний із проліферацією клітин і не виявляється за допомогою стандартних методів імунофарбування у сплячих клітинах у фазі G0. За нормальних фізіологічних умов експресія проліферативно асоційованого білка Ki-67 та антипроліферативного білка p16 взаємовиключні.

Отже, виявлення у цервікальних гістологічних препаратах окремих клітин, що одночасно експресують p16 та Ki-67, може служити незалежним від морфологічного аналізу індикатором клітин із порушенням регулювання клітинного циклу, а також індикатором присутності трансформувальних інфекцій ВПЛ на тлі цервікальної інтраепітеліальної неоплазії.

Інтерпретація предметних скелець із цервікальними цитологічними препаратами при імунофарбуванні на одночасне виявлення експресії регулючого клітинний цикл білка p16 та маркера проліферації Ki-67 допомагає ідентифікувати жінок із цервікальною інтраепітеліальною неоплазією високого ступеня ураження (Ikenberg et al., 2013; Schmidt et al., 2011; Wentzensen, & von Knebel Doeberitz, 2007).

Проблема ранньої діагностики диспластичних змін шийки матки наразі остаточно не розв'язана. Підвищити чутливість методики імуноцитохімічного виявлення p16/Ki-67 може додатковий аналіз результатів із використанням напівкількісної бальної шкали. Тому *метою* нашої роботи було порівняти результати подвійної детекції маркерів p16/Ki-67, використовуючи подальший розподіл інтенсивності забарвлення за напівкількісною шкалою, з результатами досліджень забарвлення мазків за Папаніколау й аналізом на ВПЛ для виявлення інтраепітеліальної неоплазії високого ступеня ураження шийки матки та проаналізувати залежність інтенсивності імуноцитохімічного виявлення p16/Ki-67 від ступеня захворюваності при інтраепітеліальній неоплазії шийки матки.

Методи

В експерименті було обстежено 90 жінок віком від 18 до 75 років. Усі пацієнтки проходили гінекологічне й цитологічне дослідження. Стан шийки матки було оцінено за допомогою цитологічного дослідження на базі ТОВ "Сінево-Україна" згідно із клінічними протоколами. Патології шийки матки виявляли центрифугуванням отриманого матеріалу з подальшим його забарвленням методом Папаніколау за допомогою аналізатора "Prep Stain Slide Processor" ("Becton Dickinson", США) і мікроскопії препаратів за допомогою мікроскопа "ZEIZZ Primo Star" ("Carl Zeizz", Німеччина).

Метод забарвлення за Папаніколау є найкращим для гінекологічних мазків, оскільки дозволяє оцінити ступінь зрілості цитоплазми (від синього кольору в недозрілих клітинах до рожевого у зрілих або помаранчевого у клітинах зі зроговінням) (Raju, 2016). Завдяки вологій фіксації ядра клітинна мембрана та хроматин добре зберігають свою структуру. Для отримання повноцінного матеріалу із шийки матки за технологією "BD Prep Stain" (Becton Dickinson, США) застосовують спеціальний інструмент для забору матеріалу – пластикову цервікальну щіточку. Консервувальна рідина зберігає клітинний матеріал, запобігає його пошкодженню, дозволяє уникнути бактеріального забруднення і в оптимальних умовах доставити клітини до лабораторії. Процедура виготовлення препаратів включає отримання гомогенної суспензії за допомогою шейкера. Пристрій для струшування пробірок струшує клітини зі щіточки. Завдяки пристрою "Prep Mate" (Becton Dickinson, США), який призначений для автоматичного виготовлення клітинної суспензії, виконується її початкове збагачення (очищення суспензії від еритроцитів, детриту й елементів запалення). Пристрій перемішує зразок і витягує його із пробірки з консервантом, потім наносить зразок на щільний реагент у центрифужній пробірці. Проколювання корка дозволяє змішувати й наносити зразок без зняття корка для зниження контамінації зразка. Пристрій "Prep Stain" переносить клітинні зразки із центрифужної пробірки до осадової камери, яка поміщена на предметне скло мікроскопа. Потім цей самий пристрій автоматично забарвлює і промиває кожен мікропрепарат. На кожне скло наноситься біоматеріал із пробірки, розбавляється буфером TRIS buffered, фарбується барвниками OG6 та EA50, по завершенню фіксується розчином BD Alcohol Blend Rinse (Source BioScience, Ноттінгем) (Nishikawa et al., 2022).

Генітальну папіломавірусну інфекцію виявляли за допомогою детектувального ампліфікатора CFX-96 ("BioRad", США) (Schiffman et al., 2011; Gupta et al., 2022), онкомаркерні білки p16/Ki-67 – за допомогою тест-системи "CINtec PLUS" ("Roche", Швейцарія). Під час імуноцитохімічного зафарбовування проводили контроль якості (позитивний і негативний). Позитивне забарвлення свідчить про правильні підготовку зразків і методику фарбування. У кожному циклі фарбування обов'язково має бути один позитивний зразок. Якщо контрольний зразок не давав відповідного позитивного забарвлення, то результати з пофарбованої партії досліджуваних зразків вважали недійсними. Інтерпретація результатів має починатися з оцінювання контрольних позитивних і негативних зразків. Позитивним результатом імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67 є наявність однієї або кількох клітин епітелію шийки матки з одночасно коричневим забарвленням цитоплазми й червоним забарвленням ядра в межах однієї клітини. Присутність клітин, що демонструють імунореактивність тільки до одного із двох

маркерів, не вважають позитивним результатом тесту "CINtec PLUS" (Li et al., 2022).

Діагнози змін стану шийки матки встановлювали згідно із класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я за системою Бетесда (Frappart et al., 2004) і клінічними протоколами, регламентованими наказами МОЗ України від 15.03.2003 № 582 та від 31.12.2004 № 676. Цитологічні терміни зазвичай засновані на гістологічних класифікаціях. Однак тривалий час у багатьох країнах для формулювання результатів цитологічного дослідження використовували класифікацію Папаніколау: I – норма, II – доброякісна атипія, III – дисплазія, IV – підозра на рак, V – рак (Hoda et al., 2019).

У нашому дослідженні було утворено такі групи: А – 30 жінок віком від 18 до 30 років; Б – 30 жінок віком від 30 до 45 років; С – 30 жінок віком від 45 до 75 років.

Критерії, за якими відбирали досліджуваних: діагноз ураження шийки матки, вік від 18 до 75 років, відсутність протипухлинного ефекту лікування.

Роботи виконували на базі ТОВ "Сінево-Україна" з дотриманням усіх вимог для проведення комплексного дослідження.

Обсяг діагностичних процедур включав:

- онкоцитоморфологічне дослідження мазків шийки матки з ендо- й екзоцервіксу;
- обстеження на ВПЛ із визначенням онкогенного потенціалу вірусу;
- ПАП-тест для виявлення патологій шийки матки;
- проведення імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67.

Підготовка до забору матеріалу включала: утримання сечовипускання впродовж 3 годин; утримання від статевих контактів упродовж 3 днів; виключення антибактеріальних і протимікробних препаратів упродовж 14 днів; уникання вагінальних свічок, тампонів і спринцювання упродовж 3 днів. Проводили забір матеріалу з 10 по 20 день менструального циклу.

Матеріал поміщали в консервувальний розчин на основі етанолу BD SurePath Preservative Fluid ("Becton, Dickinson and Company", США), після чого передавали до лабораторії для постановки діагнозу. З отриманого матеріалу брали проби для аналізу на ВПЛ, ПАП-тесту та імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67. Результати імуногістохімічного зафарбовування p16/Ki-67 оцінювали два незалежні дослідники з використанням світлового мікроскопа за напівкількісною бальною шкалою за інтенсивністю сигналу, який надходив з ядерного або цитоплазматичного компартментів клітин. Оцінювали від 0 до 3 балів із кроком 0,5 бала: 0 – відсутність реакції, 0,5–1 бал – слабка, 1–2 бали – помірна, 2–3 бали – сильна реакція.

На всіх етапах статистичного аналізу для групування ознак використовували стандартні функції програмного пакету Excel 2013 (Microsoft, USA) для оцінювання відмінності відсотків різних груп методом генеральних часток. При аналізі даних потрібно було виявити, як часто зустрічаються показники в заданих інтервалах значень. Функція "частота" робочого аркуша аналізу MS Excel належить до категорії статистичних і повертає розподіл частот у вигляді вертикального масиву. Для зазначеної множини значень і заданої множини кишень (інтервалів) частотний розподіл підраховує, скільки значень потрапляє у кожний інтервал. Масив даних може бути одно- або двомірним. Для частотного аналізу використовували команду "Сервіс/Аналіз даних". Аналізували відносні діагностичні показники – співвідношення істинно позитивних і хибно позитивних фракцій. Відмінності порівняно з нульовою гіпотезою вважали достовірними за $p < 0,05$.

Результати

Рак шийки матки найчастіше розвивається саме в зоні трансформації, до нього виявляється дисплазія. Через те, що дисплазія може утворюватися на невеликих ділянках, дуже важливим є правильний забір матеріалу. Його треба робити з усієї поверхні шийки матки, особливо із зони трансформації. Кількість патологічно змінених клітин у цитологічному препараті може відрізнятися і, якщо їх замало, їх можуть пропустити на скринінгу.

Для того, щоб цитологічне дослідження було ефективним, необхідно дотримуватися усіх правил забору матеріалу: правильної фіксації та забарвлення, ретельного огляду всього клітинного матеріалу й правильної його інтерпретації. Велику роль грає і метод забарвлення, у кожного з них є переваги й недоліки. Мазки для цитологічних досліджень отримують із поверхні слизової оболонки, тому їхній склад становлять злущені клітини, що містяться на поверхні епітеліального пласта. Чим більша здатність епітелію до дозрівання, тим легше зрілі клітини потрапляють до мазка. При атрофічних змінах на поверхні епітеліального пласта розміщуються менш зрілі клітини (Smith et al.,2002).

Із 90 свіжих цитологічних препаратів 6 належали жінкам із дисплазією важкого ступеня (CIN III – 7 %), 20 – жінкам із дисплазією середнього ступеня (CIN II – 22 %) і 20 – жінкам із дисплазією легкого ступеня (CIN I – 22 %). 44 жінки отримали діагноз "без особливостей". У групі С кількість жінок із виявленим позитивним результатом на ВПЛ була на 36 % більше порівняно із групою А, водночас кількість ВПЛ-негативних – на 36 % менше, ніж у групі С. Кількість виявлених діагнозів CIN II у групі В була на 26 % більше, ніж у групі А, водночас у групі С було виявлено на 20 % більше випадків порівняно із групою А (табл. 1).

Таблиця 1

Клініко-патогістологічна характеристика отриманих зразків шийки матки

Група/ діагноз	А (18–30 років)	В (30–45 років)	С (45–75 років)
ВПЛ (–)	22 (73 %)	14 (47 %)	11 (37 %)*
ВПЛ (+)	8 (27 %)	16 (53 %)	19 (63 %)*
CIN I	6 (20 %)	7 (23 %)	7 (23 %)
CIN II	2 (7 %)	10 (33 %)*	8 (27 %)*
CIN III	-	1 (3 %)	5 (17 %)

Примітка: * – оцінка генеральних часток порівняно із групою А.

Було проведено статистичну обробку щодо залежності інфікування ВПЛ від віку пацієнток. Отримані дані вказують на зв'язок між наявністю захворювання і віком жінок.

Результати імуноцитохімічного фарбування для виявлення p16 та Ki-67 оцінювали під мікроскопом двоє незалежних дослідників. Інтенсивність імуногістохімічної

експресії оцінювали за шкалою від 0 до 3 балів таким чином: 0 – відсутність забарвлення, 1 – слабка інтенсивність, 2 – помірна інтенсивність і 3 – висока інтенсивність. На рис. 1 представлена імуноцитохімічна експресія p16 та Ki-67 залежно від ступеня дисплазії. Спостерігається більш інтенсивне забарвлення при дисплазії важкого ступеня порівняно із дисплазією легкого ступеня.

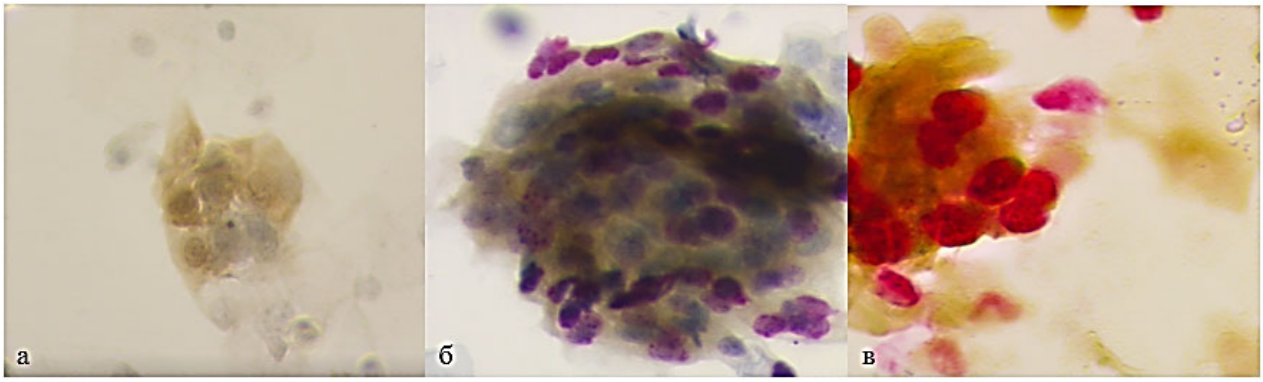


Рис. 1. Мікрофотографія мазка епітелію шийки матки. Інтенсивність імуноцитохімічного забарвлення на виявлення p16 (цитоплазматична локалізація, коричневий колір – позитивна реакція) та Ki-67 (ядерна локалізація, червоний колір – позитивна реакція) відповідно до розподілу за бальною шкалою:
а – 1 бал, б – 2 бали, в – 3 бали (Об.х40, Ок.х10)

Паралельно з обстеженням на виявлення p16 та Ki-67 робили стандартний ПАП-тест щодо розподілу дисплазії легкого, середнього або важкого ступеня.

Було проведено статистичну обробку для виявлення p16 та Ki-67 залежно від віку при діагностуванні дисплазії і ступеня важкості патології. Виявлено, що у групі С кількість позитивних результатів за обома маркерами проліферації була на 37 % більше порівняно із групою А (табл. 2).

Таблиця 2

Виявлення p16/Ki-67 залежно від віку при діагностуванні дисплазії

Група/ діагноз	A (18–30 років)	B (30–45 років)	C (45–75 років)
p16	2 (25 %)	2 (18 %)	-
p16 та Ki-67	5 (63 %)	15 (88 %)	19 (100 %)*

Примітка: *– оцінка генеральних часток порівняно із групою А.

Було проведено статистичну обробку щодо інтенсивності забарвлення p16 та Ki-67 залежно від ступеня виявленої дисплазії (табл. 3).

Таблиця 3

Інтенсивність забарвлення p16 та Ki-67 залежно від ступеня дисплазії

Ступінь дисплазії	CIN I	CIN II	CIN III
Інтенсивність результатів виявлення p16/Ki-67	1,5 ± 0,25	2,2 ± 0,02	2,8 ± 0,15*

Примітка: * – достовірна різниця між CIN I та групами CIN II, CIN III, $p \leq 0,05$.

Представлено результат імуноцитохімічного фарбування при діагнозі за ПАП-тестом "CIN I. Дисплазія легкого ступеня" (рис. 2 а, б) і, для порівняння, – негативний контроль (рис. 2 в). Спостерігаємо задовільну кількість матеріалу, позитивний результат на p16 та Ki-67 у різних клітинах на мікрофотографії (рис. 2 а, б). Позитивним результатом вважаємо наявність однієї або кількох клітин коричневого кольору в цитоплазмі та червоного – у ядрі в одній клітині; негативний результат (рис. 2 в) демонструє клітини плоского епітелію без виявлених маркерів проліферації.

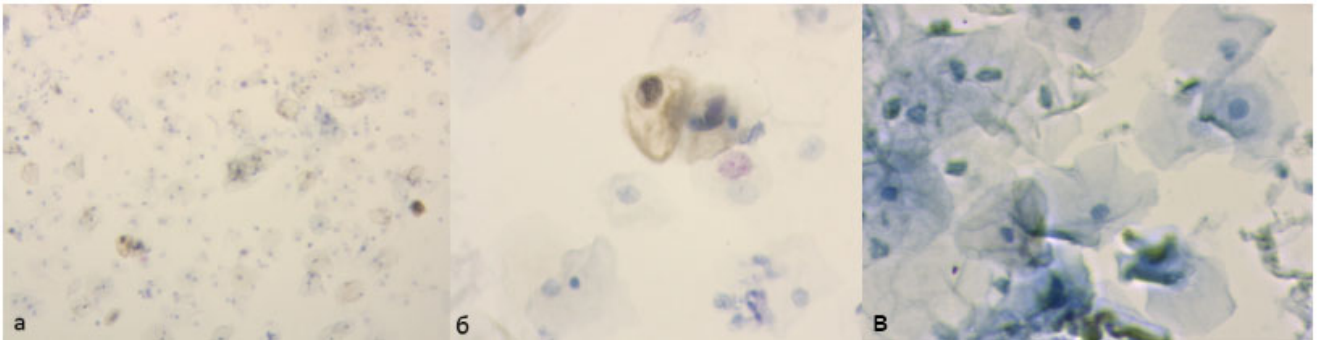


Рис. 2. Мікрофотографія мазка епітелію шийки матки. CIN I (а, б) і негативний контроль (в) (метод імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67, контрастування гематоксиліном: а – Об.х20, Ок.х10; б – Об.х40, Ок.х10; в – Об.х40, Ок.х10)

На рис. 3 представлено результат імуноцитохімічного фарбування при поставленому за ПАП-тестом діагнозі "CIN III. Дисплазія важкого ступеня". Спостерігаємо задовільну кількість матеріалу, велику кількість клітин з одночасною сильною експресією p16 та Ki-67.

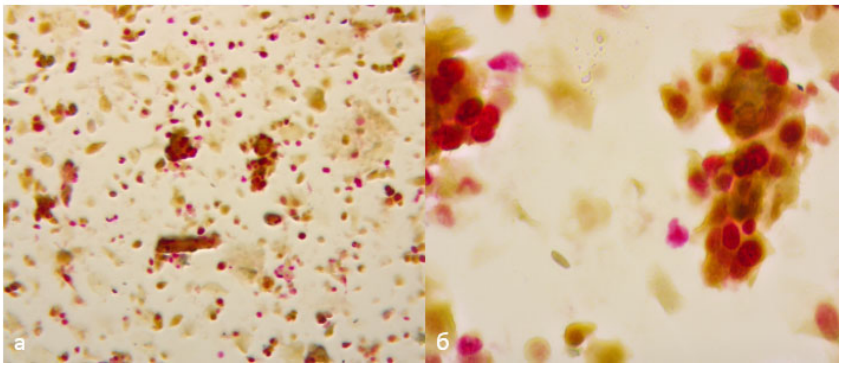


Рис. 3. Мікрофотографія мазка епітелію шийки матки, CIN III (метод імуноцитохімічного фарбування p16/Ki-67: а – Об.х20, Ок.х10; б – Об.х40, Ок.х10)

Дискусія і висновки

Надійний метод скринінгу має вирішальне значення для виявлення жінок із групи ризику. Метод фарбування за Папаніколау є найкращим для гінекологічних мазків, оскільки він дозволяє оцінити ступінь зрілості цитоплазми (від синього кольору в недозрілих клітинах до рожевого у зрілих або помаранчевого у клітинах зі зроговінням): завдяки вологій фіксації ядра клітинна мембрана та хроматин добре зберігають свою структуру (Martinez-Mas et al., 2020). Проблему відносного суб'єктивного оцінювання ПАП-тестування нині пропонують розв'язувати з використанням програм цифрових мікрофотографій і штучного інтелекту, проте вони мають певні недоліки (Maurya, Pandey, & Dutta, 2023). Біомаркери p16 і Ki-67 використовують як допоміжні інструменти в діагностиці дисплазій, асоційованих із ВПЛ високого ризику, щоб доповнити морфологічні характеристики клітин додатковими колориметричними характеристиками (Silva et al., 2017). Це дозволяє з високою чутливістю виявляти атипові клітини в мазках і діагностувати ранні передракові зміни епітелію і раку шийки матки, проте існує безліч підходів до інтерпретації їх імуноцитохімічного виявлення, крім якісної характеристики позитивної та негативної реакції (Wright et al., 2022). Найбільш поширеною шкалою для аналізу імуногістохімічних результатів є напівкількісна, яка може враховувати інтенсивність забарвлення і локалізацію у тканині позитивної реакції (Han et al., 2020). Проте для імуноцитохімічних результатів така шкала потребує оптимізації для кожного антигена залежно від специфіки зразка (Celewicz et al., 2018).

Скринінг на рак шийки матки є сферою, де наявні технології можуть бути поліпшені для оптимізації точності виявлення неоплазії високого ступеня ураження, наприклад врахування аналізу таких результатів ПАП-тесту, як ASC-US (атипові клітини плоского епітелію неясного значення), LSIL (плоскоклітинне інтраепітеліальне ураження низького ступеня) або жінок старше 30 років, що пройшли ПАП і ВПЛ-тестування, де ПАП-тест показав негативні, а ВПЛ-тест – позитивні результати. У таких випадках тестування на виявлення онкогенних маркерів p16 та Ki-67 є уточнювальним маркером при постановці кінцевого діагнозу (White et al., 2016).

Розглянутий метод можна використовувати для клітинних блоків, що готуються з остаточного матеріалу для рідинної цитології, оскільки він демонструє високу чутливість при виявленні HSIL порівняно з біопсією (Martins et al., 2022). Подвійне фарбування на p16/Ki-67 має таку саму чутливість при виявленні HSIL, як і ВПЛ-тестування та фарбування на p16 окремо, воно більш специфічне порівняно із цитологічним дослідженням (El-ZeinM et al., 2021). Цитологічний скринінг із подвійним фарбуванням можна проводити в молодих жінок, для яких ВПЛ-тестування з якихось причин обмежене. Тестування на ВПЛ на базі ПАП-тесту є загальновизнаним альтернативним підходом до скринінгу на рак шийки матки й попередні ураження. Нині тестування на

ВПЛ застосовується або спільно із ПАП-тестом у жінок 30 років і старше, або як первинний скринінговий тест у жінок від 25 років. Після застосування трьох тестів імовірність невиявлення захворювання майже дорівнює нулю, тому можна оцінити абсолютні показники діагностичної точності (Dovnik, & Repše Fokter, 2023).

Ураження шийки матки були поширенішими у віковій групі 45–75 років, з віком зростав і ступінь важкості захворювання, що узгоджується з іншими дослідженнями (Wentzensen et al., 2019). Позитивні результати на ВПЛ також зустрічалися частіше у пацієнток старшої вікової групи порівняно з молодшими за віком (Lewitowicz et al., 2020). Сильна експресія p16 та Ki-67 була найбільше пов'язана з тяжкістю дисплазії, що визначалась імуногістохімічно на біопсійному матеріалі (Sarma, Sarma, & Rabha, 2023).

Було порівняно результати подвійної детекції маркерів p16 та Ki-67 з результатами досліджень забарвлення мазків за Папаніколау й аналізом на ВПЛ. За результатами порівняння зазначимо, що застосування імуноцитохімічного аналізу для одночасного якісного виявлення білків p16 та Ki-67 дозволяє знаходити жінок з інтраепітеліальними ураженнями під час скринінгового дослідження без необхідності у морфологічній інтерпретації, а також при сортуванні діагнозів, якщо відсутні виражені диспластичні зміни у препаратах ПАП-тесту, але наявний позитивний результат на ВПЛ із високими ступенями ризику.

Отже, знайдена залежність інтенсивності імуноцитохімічного виявлення p16 та Ki-67 від ступеня захворюваності при інтраепітеліальній неоплазії шийки матки. При дисплазії легкого ступеня забарвлення цитоплазми та ядра було менш інтенсивним порівняно із дисплазією важкого ступеня, де забарвлення спостерігалося в більшості клітин препарату й було більш насиченого кольору.

Отримані результати дають нам змогу вивчати більш детально імуноцитохімічне фарбування p16 та Ki-67 для використання не лише при виявленні неопластичних змін у жінок або сортуванні спірних результатів, а також для ранньої діагностики ступеня тяжкості диспластичних змін.

Внесок авторів: Марина Новохатська – формальний аналіз, методологія, обробка результатів, написання (оригінальна чернетка); Олеся Калмикова. – концептуалізація, написання (перегляд і редагування); Наталія Скрипник – написання (перегляд і редагування); Оксана Небильцова. – програмне забезпечення, написання (перегляд і редагування).

Список використаних джерел

Вовк, І. Б., Горбань, Н. Е., & Борисюк, О. Ю. (2016). Гіперплазія ендометрію (клінічна лекція). ДУ "Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України". *Жіноче здоровья,* 7(63), 177–181. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdzh_2016_5_3.

Федоренко, З. П., Сумкін, О. В., Зуб, В. О., Горох, Є. Л., Гулак, Л. О., Рижов, А. Ю., & Єфіменко, О. В. (2023). *Бюлетень національного канцер-реєстру України*, № 24 А.Ю., 53. https://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF/66-shm.pdf

Celewicz, A., Celewicz, M., Wężowska, M., Chudecka-Głaz, A., Menkiszak, J., & Urasińska, E. (2018). Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer. *Polish Journal of Pathology*, 69(1), 42–47. https://doi.org/10.5114/pjp.2018.75335

Cuschieri, K, & Wentzensen, N. (2008). Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.,* 17(10), 2536–2545. https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0306

Dovnik, A., & Repše Fokter, A. (2023). The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(10), 8476–8491. https://doi.org/10.3390/cimb45100534

El-Zein, M., Gotlieb, W., Gilbert, L., Hemmings, R., Behr, M. A., & Franco, E. L. (2021). Dual staining for p16/Ki-67 to detect high-grade cervical lesions: Results from the Screening Triage Ascertaining Intraepithelial Neoplasia by Immunostain Testing study. *International Journal of Cancer*, 148(2), 492–501. https://doi.org/10.1002/ijc.33250

Franks, I. M., & Teich, N. M. (1997). Intrduction to the Cellular and molecular biology of cancer (3rd digital ed). *Oxford University Press.*

Frappart, L., Fontaniere, B., Lucas, E., & Sankaranarayanan, R. (2004). Histopathology and Cytopathology of the Uterine Cervix – Digital Atlas. IARC Cancer Base. https://screening.iarc.fr/atlascyto.php

Gupta, S. M., Warke, H., Chaudhari, H., Mavani, P., Katke, R. D., Kerkar, S. C., & Mania-Pramanik, J. (2022). Human Papillomavirus E6/E7 oncogene transcripts as biomarkers for the early detection of cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 94(7), 3368–3375. https://doi.org/10.1002/jmv.27700

Han, C., Zhao, F., Wan, C., He, Y., & Chen, Y. (2020). Associations between the expression of SCCA, MTA1, P16, Ki 67 and the infection of high risk HPV in cervical lesions. *Oncology Letters*, 20(1), 884–892. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11634

Hoda, R. S., Finer, E. B., Arpin III, R. N., Rosenbaum, M., & Pitman, M. B. (2019). Risk of malignancy in the categories of the Papanicolaou Society of Cytopathology system for reporting pancreaticobiliary cytology. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 8(3), 120–127. https://doi.org/10.1016/j.jasc.2019.01.002

Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K., Hariri, J., Keller, T., von Knebel Doeberitz, M., Neumann, H. H., Puig-Tintore, L. M., Sideri, M., Rehm, S., & Ridder, R. (2013). Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl Cancer Inst.*, 105, 1550–7. https://doi.org/10.1093/jnci/djt235

Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Viro*, 69(5). https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995

Karin, M. (2006). NF-κB and cancer: mechanisms and targets. *Mol. Carcinog.*, 355–361. https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995

Kim, W. Y., & Sharpless, N. E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell,* 127(2), 265–275. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003

Lewitowicz, P., Nasierowska-Guttmejer, A., Rokita, W., Adamczyk-Gruszka, O., Gluszek, S., Chrapek, M., & Misiek, M. (2020). HPV genotyping and p16/Ki-67 test significantly improve detection rate of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion. *Archives of Medical Science*, 16(1), 87–93. https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80697

Li, Y., Fu, Y., Cheng, B., Xie, X., & Wang, X. (2022). A comparative study on the accuracy and efficacy between dalton and CINtec® PLUS p16/Ki-67 dual stain in triaging HPV-positive women. *Frontiers in Oncology*, 11, 815213. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.815213

Martinez-Mas, J., Bueno-Crespo, A., Martinez-Espana, R., Remezal-Solano, M., Ortiz-Gonzalez, A., Ortiz-Reina, S., & Martinez-Cendan, J. P. (2020). Classifying Papanicolaou cervical smears through a cell merger approach by deep learning technique. *Expert Systems with Applications*, 160. https://doi.org/10.1016/j.eswa.2020.113707

Martins, D., Schmitt, F., Frattini, M., & Fulciniti, F. (2022). Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma on LBC Samples and Cell Blocks. In: Hirai, Y., Fulciniti, F. (eds). *The Yokohama System for Reporting Endometrial Cytology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5011-6_16

Maurya, R., Pandey, N. N., & Dutta, M. K. (2023). VisionCervix: Papanicolaou cervical smears classification using novel CNN-Vision ensemble approach. *Biomedical Signal Processing and Control*, 79. https://doi.org/10.1016/j.bspc.2022.104156

Nishikawa, T., Suzuki, H., Takeuchi, M., Tatsumi, S., Tachibana, Y., Ohbayashi, C., & Norimatsu, Y. (2022). A study on preserving endometrial glandular architecture during preparation using BD SurePath™ liquid-based cytology reagents: Cellular fixation with preservative fluid requires at least 18 h. *Cytopathology*, 33(3), 357–361. https://doi.org/10.1111/cyt.13087

Pennant, S. (2008). Endometrial atypical hyperplasia and subsequent diagnosis of endometrial cancer. *Obstet Gynaecol*, 28 (6), 632–633. https://doi.org/10.1080/01443610802355817

Porras, C., Rodriguez, A. C., Hildesheim, A., Herrero, R., González, P., Wacholder, S., & Schiffman, M. (2009). Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.,* 850–863. https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0951

Raju, K. (2016). Evolution of Pap Stain. *Biomed. Res. Ther.,* 3, 6. https://doi.org/10.7603/s40730-016-0006-8

Roelens, J., Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., Wentzensen, N., Bergeron, C., & Arbyn, M. (2012). p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol,* 120(5), 294–307. https://doi.org/10.1002/cncy.21205

Sarma, U., Sarma, P., & Rabha, D. (2023). Staining Intensity of P16INK4a and Ki-67 Determine the Grade of Cervical Lesion: An Experience from Single Tertiary Care Centre. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 8(4), 327–333. https://doi.org/10.31557/apjcb.2023.8.4.327-333

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human papillo-mavirus testing in prevention of cervical cancer. *Cancer Inst*, 368-83. https://doi.org/10.1093/jnci/djq562

Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol,* 119(3), 158–166. https://doi.org/10.1002/cncy.20140

Silva, D. C., Goncalves, A. K., Cobucci, R. N., Mendonca, R. C., Lima, P. H., & Júnior, G. C. (2017). Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions-A systematic review. *Pathology-Research and Practice*, 213(7), 723–729. https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003

Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., & Ashley, R. (2002). Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1604–1614. https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 209-49. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*, 15(1), 3–12. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., & Muñoz, N. (1999). Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J. Pattol*, 189. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f

Wentzensen, N., & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers,* 23(4), 315–330. https://doi.org/10.1155/2007/678793

Wentzensen, N., Clarke, M. A., Bremer, R., Poitras, N., Tokugawa, D., Goldhoff, P. E. & Lorey, T. S. (2019). Clinical evaluation of human papillomavirus screening with p16/Ki-67 dual stain triage in a large organized cervical cancer screening program. *JAMA internal medicine*, 179(7), 881–888. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.0306

White, C., Bakhiet, S., Bates, M., Keegan, H., Pilkington, L., Ruttle, C., & Martin, C. M. (2016). Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*, 27(4), 269–276. https://doi.org/10.1111/cyt.12317

Wright, Jr. T. C., Stoler, M. H., Ranger-Moore, J., Fang, Q., Volkir, P., Safaeian, M., & Ridder, R. (2022). Clinical validation of p16/Ki-67 dual-stained cytology triage of HPV-positive women: Results from the IMPACT trial. *International journal of cancer*, 150(3), 461–471. https://doi.org/10.1002/ijc.33812

References

Celewicz, A., Celewicz, M., Wężowska, M., Chudecka-Głaz, A., Menkiszak, J., & *Urasińska, E.* (2018). Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer. *Polish Journal of Pathology*, 69(1), 42–47. https://doi.org/10.5114/pjp.2018.75335

Cuschieri, K., & Wentzensen, N. (2008). Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.,* 17(10), 2536–2545. https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0306

Dovnik, A., & Repše Fokter, A. (2023). The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(10), 8476–8491. https://doi.org/10.3390/cimb45100534

El-Zein, M., Gotlieb, W., Gilbert, L., Hemmings, R., Behr, M. A., & Franco, E. L. (2021). Dual staining for p16/Ki-67 to detect high-grade cervical lesions: Results from the Screening Triage Ascertaining Intraepithelial Neoplasia by Immunostain Testing study. *International Journal of Cancer*, 148(2), 492–501. https://doi.org/10.1002/ijc.33250

Fedorenko, Z. P., Sumkin, O. V., Zub, V. O., Horokh, E. L., Gulak, L. O., Ryzhov, A. Yu., & Yefimenko, O. V. (2023). *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine*, 24, 53. https://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF/66-shm.pdf [in Ukrainian].

Franks, I. M., & Teich, N. M. (1997). Intrduction to the Cellular and molecular biology of cancer (3rd digital ed.). *Oxford University Press*.

Frappart, L., Fontaniere, B., Lucas, E., & Sankaranarayanan, R. (2004). Histopathology and Cytopathology of the Uterine Cervix – Digital Atlas. IARC Cancer Base. https://screening.iarc.fr/atlascyto.php

Gupta, S. M., Warke, H., Chaudhari, H., Mavani, P., Katke, R. D., Kerkar, S. C., & Mania-Pramanik, J. (2022). Human Papillomavirus E6/E7 oncogene transcripts as biomarkers for the early detection of cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 94(7), 3368–3375. https://doi.org/10.1002/jmv.27700

Han, C., Zhao, F., Wan, C., He, Y., & Chen, Y. (2020). Associations between the expression of SCCA, MTA1, P16, Ki 67 and the infection of high risk HPV in cervical lesions. *Oncology Letters*, 20(1), 884–892. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11634

Hoda, R. S., Finer, E. B., Arpin III, R. N., Rosenbaum, M., & Pitman, M. B. (2019). Risk of malignancy in the categories of the Papanicolaou Society of Cytopathology system for reporting pancreaticobiliary cytology. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 8(3), 120–127. https://doi.org/10.1016/j.jasc.2019.01.002

Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K., Hariri, J., Keller, T., von Knebel Doeberitz, M., Neumann, H. H., Puig-Tintore, L. M., Sideri, M., Rehm, S., & Ridder, R. (2013). Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J. Natl Cancer Inst.*, 105, 1550–7. https://doi.org/10.1093/jnci/djt235

Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Viro,* 69(5). https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995

Karin, M. (2006). NF-κB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*, 355–361. https://doi.org/10.1128/jvi.69.5.2989-2997.1995

Kim, W. Y., & Sharpless, N. E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*. 127(2), 265–275. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003

Lewitowicz, P., Nasierowska-Guttmejer, A., Rokita, W., Adamczyk-Gruszka, O., Gluszek, S., Chrapek, M., & Misiek, M. (2020). HPV genotyping and p16/Ki-67 test significantly improve detection rate of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion. *Archives of Medical Science*, 16(1), 87–93. https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80697

Li, Y., Fu, Y., Cheng, B., Xie, X., & Wang, X. (2022). A comparative study on the accuracy and efficacy between dalton and CINtec® PLUS p16/Ki-67 dual stain in triaging HPV-positive women. *Frontiers in Oncology*, 11, 815213. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.815213

Martinez-Mas, J., Bueno-Crespo, A., Martinez-Espana, R., Remezal-Solano, M., Ortiz-Gonzalez, A., Ortiz-Reina, S., & Martinez-Cendan, J. P. (2020). Classifying Papanicolaou cervical smears through a cell merger approach by deep learning technique. *Expert Systems with Applications*, 160. https://doi.org/10.1016/j.eswa.2020.113707

Martins, D., Schmitt, F., Frattini, M., & Fulciniti, F. (2022). Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma on LBC Samples and Cell Blocks. In: Hirai, Y., Fulciniti, F. (eds). *The Yokohama System for Reporting Endometrial Cytology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5011-6_16

Maurya, R., Pandey, N. N., & Dutta, M. K. (2023). Vision Cervix: Papanicolaou cervical smears classification using novel CNN-Vision ensemble approach. *Biomedical Signal Processing and Control*, 79. https://doi.org/10.1016/j.bspc.2022.104156

Nishikawa, T., Suzuki, H., Takeuchi, M., Tatsumi, S., Tachibana, Y., Ohbayashi, C. & Norimatsu, Y. (2022). A study on preserving endometrial glandular architecture during preparation using BD SurePath™ liquid-based cytology reagents: Cellular fixation with preservative fluid requires at least 18 h. *Cytopathology*, 33(3), 357–361. https://doi.org/10.1111/cyt.13087

Pennant, S. (2008). Endometrial atypical hyperplasia and subsequent diagnosis of endometrial cancer. *Obstet Gynaecol*, 28(6), 632–633. https://doi.org/10.1080/01443610802355817

Porras, C., Rodriguez, A. C., Hildesheim, A., Herrero, R., González, P., Wacholder, S., & Schiffman, M. (2009). Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 850–863. https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0951

Raju, K. (2016). Evolution of Pap Stain. *Biomed. Res. Ther.*, 3, 6. https://doi.org/10.7603/s40730-016-0006-8

Roelens, J., Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., Wentzensen, N., Bergeron, C., & Arbyn, M. (2012) p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol.*, 120(5), 294–307. https://doi.org/10.1002/cncy.21205

Sarma, U., Sarma, P., & Rabha, D. (2023). Staining Intensity of P16INK4a and Ki-67 Determine the Grade of Cervical Lesion: An Experience from Single Tertiary Care Centre. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 8(4), 327–333. https://doi.org/10.31557/apjcb.2023.8.4.327-333

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human papillo-mavirus testing in prevention of cervical cancer. *Cancer Inst.*, 368-83. https://doi.org/10.1093/jnci/djq562

Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.*, 119(3),158–166. https://doi.org/10.1002/cncy.20140

Silva, D. C., Goncalves, A. K., Cobucci, R. N., Mendonca, R. C., Lima, P. H., & Júnior, G. C. (2017). Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions–A systematic review. *Pathology-Research and Practice*, 213(7), 723–729. https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003

Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., & Ashley, R. (2002). Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1604–1614. https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 209–49. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*, 15(1), 3–12. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269

Vovk, I. B., Horban, N. E., & Borysyuk, O. Yu. (2016). Endometrial hyperplasia (clinical lecture). Kyiv: State University "Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine". *Women's Health*, 7(63), 177–181. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdzh_2016_5_3 [in Ukrainian].

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., & Muñoz, N. (1999). Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J. Pattol*., 189. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f

Wentzensen, N., & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*. 23(4), 315–330. https://doi.org/10.1155/2007/678793

Wentzensen, N., Clarke, M. A., Bremer, R., Poitras, N., Tokugawa, D., Goldhoff, P. E. & Lorey, T. S. (2019). Clinical evaluation of human papillomavirus screening with p16/Ki-67 dual stain triage in a large organized cervical cancer screening program. *JAMA internal medicine*, 179(7), 881–888. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.0306

White, C., Bakhiet, S., Bates, M., Keegan, H., Pilkington, L., Ruttle, C., & Martin, C. M. (2016). Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*, 27(4), 269–276. https://doi.org/10.1111/cyt.12317

Wright, Jr., T. C., Stoler, M. H., Ranger-Moore, J., Fang, Q., Volkir, P., Safaeian, M., & Ridder, R. (2022). Clinical validation of p16/Ki-67 dual-stained cytology triage of HPV-positive women: Results from the IMPACT trial. *International journal of cancer*, 150(3), 461–471. https://doi.org/10.1002/ijc.33812

Отримано редакцією журналу / Received:16.10.23
Прорецензовано / Revised: 17.11.23
Схвалено до друку / Accepted: 17.11.23

Maryna NOVOKHATSKA[1], Master's Student
ORCID ID: 0009-0008-5829-8248
e-mail: nvhtsk.mary@gmail.com

Olesia KALMUKOVA[1], PhD (Biol.), Assist.
ORCID ID: 0000-0001-5025-0938
e-mail: olesiakalmukova@knu.ua

Nataliia Skrypnyk[1], PhD (Biol.), Assoc. Prof.
ORCID ID: 0009-0003-8074-9547
e-mail: nataliia.skrypnyk@knu.ua

Oksana NEBYLTSOVA[2], PhD (Med.)
e-mail: oksana.nebyltsova@synevo.ua

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
[2]Medical Laboratory LLC "Synevo Ukraine", Kyiv, Ukraine

DETECTION OF P16/KI-67 MARKERS IN THE DETECTION OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

B a c k g r o u n d . ***In recent years, Ukraine has experienced an unfavorable epidemiological situation concerning sexually transmitted diseases. One rapidly spreading infection is genital human papillomavirus (HPV). Convincing research has identified human papillomavirus (HPV) as a significant factor in the development of malignant transformations in the cervix. The study of the molecular pathogenesis associated with HPV-related neoplasms has led to the discovery of biomarkers aiding in the diagnosis of High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) of the cervix. Including the biomarkers p16/Ki-67 in the investigation enhances sensitivity in detecting HSIL in women. Additionally, it is pertinent to further analyze the effectiveness of using an additional semi-quantitative scale to assess the results of immunocytochemical detection of p16/Ki-67.***

M e t h o d s . ***The research was conducted on biological material from cervical smears using liquid-based cytology. Techniques included Papanicolaou staining, HPV detection, and immunocytochemical staining against p16/Ki-67. The sample comprised 90 women divided into three age groups, each categorized based on criteria such as HPV presence/absence, Bethesda classification of dysplasia, and negative/positive p16/Ki-67 results. Intensity of staining was further scored on a scale in the corresponding location of positive reactions in the nucleus or cytoplasm.***

R e s u l t s . ***The study revealed that immunocytochemical markers p16 and Ki-67 identified women with intraepithelial lesions, especially in cases with positive HPV results and no dysplastic changes in the Pap test. The intensity of immunocytochemical staining for p16 and Ki-67 varied directly with the detected degree of dysplasia.***

C o n c l u s i o n s . ***A direct correlation was observed between the severity of dysplasia established by Bethesda classification and the intensity of immunocytochemical staining for p16 and Ki-67. These findings provide an opportunity for further exploration of staining intensity in the presence of immunocytochemical markers p16 and Ki-67 for their potential use in the comprehensive interpretation of Pap test results and the precise identification of dysplasia in ambiguous diagnostic samples.***

K e y w o r d s : ***cervical dysplasia, intraepithelial cancer, immunocytochemistry, Pap test, p16/Ki-67, Bethesda classification, human papillomavirus.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 616.894-053.8; 611.4; 571.27
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.32-38

Анастасія НЕФЬОДОВА[1], асп.
ORCID ID: 0000-0003-3440-3687
e-mail: nefodova.av@gmail.com

Марія РУДИК[1], канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0000-0003-1252-885X
e-mail: rudyk_marie@knu.ua

Роман ДОВГИЙ[1], канд. біол. наук, асист.
ORCID ID: 0000-0003-1189-4479
e-mail: romandovgiy@gmail.com

Лариса СКІВКА[1], д-р біол. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0002-2171-1085
e-mail: realmed@ukr.net

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОРГАНОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ У ЩУРІВ ІЗ РІЗНИМИ МОДЕЛЯМИ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В с т у п . ***Хвороба Альцгеймера (ХА) – це прогресуючий нейродегенеративний розлад, який уражає мільйони людей у всьому світі. Усе більше стає доказів того, що антигени центральної нервової системи можуть взаємодіяти з лімфоцитами й антигенпрезентуючими клітинами через менінгеальні лімфатичні шляхи. Це свідчить про те, що як уроджені, так і адаптивні імунні реакції можуть брати участь у розвитку нейродегенеративних захворювань. Однією з ознак старіння імунної системи є інволюція тимуса. Зниження функції тимуса призводить до зменшення продукції наївних Т-лімфоцитів, впливаючи на адаптивну імунну відповідь, що призводить до погіршення імунного нагляду. Відсутня ефективна імунна відповідь провокує розвиток нейрозапалення через тривалу активацію імунних клітин, що і є головною ознакою ХА.***

Метою представленої роботи було порівняльне оцінювання реакції лімфоїдних органів у щурів із двома найбільш широко застосовуваними інтервенційними моделями ХА, індукованими інтрагіпокампальним уведенням Aβ1-40 та Aβ25-35.

М е т о д и . ***У дослідженні використовували самців щурів лінії Wistar. За контроль брали інтактних і псевдооперованих тварин. Розвиток захворювання підтверджували харчовою поведінкою, вимірюванням ваги тіла й органів, оцінкою когнітивних порушень у поведінковому тесті "Лабіринт Барнса", а також за рівнем загибелі дофамінергічних нейронів (ДА). Показники гемограми досліджували на момент завершення експерименту (37-й день). Оцінювали відносну кількість лімфоцитів. Провели кореляційний аналіз Спірмена між органометричними показниками тимуса й селезінки та кількісними змінами циркулюючих лімфоцитів у тварин із різними моделями ХА.***

Р е з у л ь т а т и . ***У щурів з Aβ1-40-ХА зареєстровано підвищення спленічного індексу, що свідчить про помірну спленомегалію. Зареєстровано статистично вірогідне збільшення абсолютної кількості лімфоцитів зі зменшенням їхньої відносної кількості й виразним моноцитозом, а також сильну негативну кореляцію між спленічним індексом і кількістю циркулюючих лімфоцитів. У тварин з Aβ25-35-ХА показники спленічного індексу не відрізнялися від таких у тварин контрольних груп.***

В и с н о в к и . ***Розвиток хвороби Альцгеймера супроводжується зміною вагових індексів органів лімфатичної системи, залучених у презентацію антигену й генерацію адаптивної імунної відповіді, а також у кліренс антигенного матеріалу з головного мозку, зокрема й спричиненого нейродегенерацією і нейрозапаленням. Порушення кореляційних зв'язків між кількісними характеристиками циркулюючих лімфоцитів і ваговими індексами первинних і вторинних лімфоїдних органів може бути пов'язане з порушеннями процесів імунопоезу й імуногенезу.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***хвороба Альцгеймера, нейрозапалення, лімфоїдні органи, тимус, селезінка.***

Вступ

Хвороба Альцгеймера (ХА) – це хронічний нейродегенеративний розлад, пов'язаний із прогресуючим зниженням когнітивних функцій, синаптичною дисфункцією, втратою пам'яті. ХА стала серйозною глобальною проблемою охорони здоров'я, оскільки вражає мільйони людей у всьому світі. Нейропатологічні ознаки ХА включають позаклітинне накопичення бета-амілоїдних (Aβ) бляшок і внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків, що складаються із гіперфосфорильованого білка тау (Rostagno, 2022). Зростаюча кількість доклінічних і клінічних досліджень переконливо доводить, що як уроджений, так і адаптивний компоненти імунної системи відіграють важливу роль у етіології та патогенезі ХА. Розпізнавання неправильно складених Aβ і тау-ефекторами вродженого імунітету може викликати серію складних імунних реакцій, наслідком яких є нейрозапалення як одна із причин нейродегенерації (Wu et al., 2021). Однак шляхи презентації антигенів головного мозку ефекторам адаптивного імунітету й реакція лімфатичної системи в цілому в умовах розвитку ХА залишаються недослідженими.

Лімфатична система – це розгалужена і складна мережа судин і організованих лімфоїдних утворів, яка відіграє ключову роль у підтримці гомеостазу, імунному нагляді та сприяє очищенню позаклітинного простору від тканинного дебрису (Ding et al., 2021). Традиційно мозок вважали імунологічно привілейованим органом, захищеним від взаємодії із позамозковими компонентами імунної системи гематоенцефалічним бар'єром (ГЕБ). Однак останні дослідження виявили динамічну взаємодію між мозком та імунною системою на периферії від нього. Розвиток нейрозапалення, а саме активація мікроглії та астроцитів, ключових імунних клітин у ЦНС, сприяє виникненню запального середовища, провокуючи каскад подій, які впливають на захисну функцію лімфи. Результати численних експериментальних спостережень свідчать про існування гліально-лімфатичної системи в мозкових оболонках (Natale et al., 2021). Ця система, що

© Нефьодова Анастасія, Рудик Марія, Довгий Роман, Сківка Лариса, 2023

ISSN 1728-3817 (Print), ISSN 2308-8036 (Online)

включає менінгеальні лімфатичні судини, відіграє вирішальну роль у скавенджингу та імунному нагляді в центральній нервовій системі (ЦНС) (Aspelund et al., 2015; Mesquita et al., 2018).

Підкреслюється потенційна участь активації астроцитів у модулюванні менінгеального лімфатичного дренажу. Така дренажна система сприяє видаленню потенційно нейротоксичних речовин, включаючи аномально згорнуті білки, причетні до патофізіології ХА. Результати нещодавніх досліджень свідчать про те, що менінгеальні лімфатичні шляхи сприяють обміну імунними клітинами між ЦНС і периферичними лімфоїдними тканинами, впливаючи на нейрозапальні реакції (Louveau et al., 2018; Mesquita et al., 2021). Це свідчить на користь залучення первинних і вторинних лімфоїдних органів у патофізіологію ХА. Проте літературні дані стосовно цього питання досить обмежені. Відомо, зокрема, що майже 40–60 % мозкового Аβ витікає у периферичну систему для очищення.

Однак де і як циркулюючий Аβ очищується на периферії, залишається незрозумілим. Висловлюється припущення, що кліренс периферичного Аβ може здійснювати селезінка, яка функціонує одночасно як вторинний лімфоїдний орган і фільтр крові. Показано, що спленектомія посилює когнітивні розлади у мишей із ХА (Yu et al., 2021). На генетичній моделі ХА показано, що розвиток когнітивних порушень у тварин супроводжувався спленомегалією (Muntsant, & Gimñnez-Llort, 2022). Участь первинних лімфоїдних органів, таких як тимус, у патофізіології ХА практично не досліджена, хоча в численних оглядових публікаціях підкреслюється виняткова роль старіння тимуса в підвищенні ризику розвитку ХА. З віком кількість наївних Т-клітин зменшується, а частка Т-клітин пам'яті зростає. Цитокіни, що виділяються старими Т-клітинами, збільшують проникність ГЕБ, що посилює прозапальну активацію інших локальних імунних клітин або їх надходження в мозок. Саме серед старих Т-клітин пам'яті виявляють велику кількість так званих сенільних клітин, або клітин-зомбі, які є джерелом прозапальних цитокінів та ініціаторами вікового мета-запалення (Guo et al., 2023).

Тваринні моделі є незамінним інструментом для дослідження патофізіології ХА (Peng et al., 2020; Canet et al., 2023). *Метою* цієї роботи було порівняльне оцінювання реакції лімфоїдних органів у щурів із двома найширше застосовуваними інтервенційними моделями ХА, індукованими інтрагіпокампальним уведенням Аβ1-40 та Аβ25-35.

Методи

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Wistar віком 14 місяців (300–500 г) розведення віварію Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварин утримували у стандартних умовах із доступом до води та їжі *ad libitum*. Протокол утримання тварин був затверджений Комітетом з біоетики Університету відповідно до вказівок Закону про захист тварин. Усі дослідження на тваринах проводили відповідно до норм, установлених Законом України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження", а також стандартів Конвенції з біоетики Ради Європи "Європейська конвенція для захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (1997), загальних етичних принципів роботи з дослідними тваринами, затверджених Першим національним конгресом із біоетики України (вересень 2001 р.), та інших міжнародних угод і національного законодавства у цій галузі.

Перед початком експерименту тварини були рандомно розподілені на 4 групи: I (n = 10) – інтактні тварини, що утримувались у стандартних умовах віварію й не піддавались жодним маніпуляціям; II (n = 10) – хибнооперовані; III (n = 10) – щури з Аβ1-40-індукованою ХА (Аβ1-40-ХА); IV (n = 10) – щури з Аβ25-35-індукованою ХА (Аβ25-35-ХА). Рандомізацію виконували за допомогою функції "RAND ()" в Microsoft Excel.

Наркотизацію щурів проводили сумішшю кетаміну (75 мг/кг), розведеного у стерильній воді для ін'єкцій ("Sigma", США), і 2 %-го розчину ксилазину (100 мкл/щур, "Alfasan Interntional B.V", Нідерланди). Суміш вводили інтраперитонеально загальним об'ємом 1 мл. Інтрагіпокампальне введення Аβ виконували у стереотаксі. Для ін'єкцій попередньо робили трепанацію черепа для введення ін'єкційної голки. Трепанацію проводили від точки перетину сагітального шва і брегми: 2 мм дистально, 2 мм латерально і 3,5 мм углиб. Розчинені агрегати Аβ1-40 або Аβ25-35 набирали у мікроін'єктор і опускали його кінчик у трепанаційний отвір. Загальний об'єм суспензії становив 10 мкл на тварину. Інфузія відбувалась протягом 5 хв зі швидкістю 0,5 мкл/хв (кожні 5 секунд). Після введення Аβ кінчик мікроін'єктора залишався у тканині мозку 4 хв, потім його діставали й накладали кожній тварині шви на м'які тканини голови. Контрольним тваринам (хибнооперованим) проводили аналогічну хірургічну операцію, проте замість дослідної суспензії Аβ1-40 або Аβ25-35 вводили розчинник у тому самому об'ємі.

Розвиток хвороби різного ступеню констатували у тварин з обома моделями за результатами оцінювання короткотривалої та довготривалої просторової пам'яті, а також когнітивної гнучкості у лабіринті Барнса, і за рівнем загибелі дофамінергічних нейронів, який оцінювали методом імуногістохімії (Nefodova, 2023).

Концентрацію розчинної форми Аβ (Cloud Clone Corporation, Houston, TX, США) і тау-протеїну (Elabscience, Houston, TX, США) у гомогенатах гіпокампу щурів із ХА визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем (R & D Systems, USA) відповідно до рекомендацій виробників. Для уникнення протеолітичної деградації бета-амілоїду в гомогенаті використовували комплекс інгібіторів протеаз і фосфатаз (Sigma, США).

Гематологічні показники визначали за допомогою аналізатора "Particle Counter Model PCE 210" (ERMA, Японія), адаптованого для експериментів із використанням клітин крові щурів і мишей.

Реакцію органів імунної системи щурів – селезінки, тимуса – оцінювали за відносною масою органа (ваговим індексом), який розраховували за формулою:

маса органа / загальна маса тварини.

Нормальність розподілу даних перевіряли з використанням тесту Шапіро – Вілка. У випадку нормального розподілу дані представляли як середнє ± SD, у випадку розподілу, відмінного від нормального, – як M (25 %; 75 %), де M – медіана; (25 %; 75 %) – інтерквартильний інтервал між 25-м і 75-м процентилями. Статистичні відмінності між групами порівняння у разі нормального розподілу даних були розраховані за допомогою дисперсійного аналізу із постхок-тестом Тьюкі. У разі розподілу, відмінного від нормального, для порівняння застосовували тест Краскела – Уолліса. При $p < 0,05$ відмінності вважали достовірними.

Кореляційний тест Спірмена використовували для визначення статистичних зв'язків між значеннями вагових індексів селезінки, тимуса і значеннями відносної кількості лімфоцитів.

Результати

Раніше ми повідомляли, що порівняльне оцінювання когнітивних характеристик у тварин з Аβ1-40-ХА та Аβ25-35-ХА виявило значно виразніше відтворення патологічних змін, притаманних клінічному перебігу захворювання на моделі Аβ1-40-ХА (Nefodova, 2023). Порівняльний аналіз органометричних показників селезінки й тимуса у тварин із зазначеними моделями проводили за їхньою харчовою і питною поведінкою та змінами ваги на момент завершення експерименту, оскільки ХА на пізніх стадіях може бути властива кахексія (Minaglia et al., 2019). Кахексія, своєю чергою, супроводжується змінами імунометаболізму, які позначаються на органометричних характеристиках первинних і вторинних лімфоїдних органів (Baazim et al., 2021).

Харчову поведінку аналізували за середньодобовим об'ємом спожитого корму й води. Спостерігали незначне зменшення об'ємів спожитого корму й води у тварин з індукованою ХА, наслідком чого стало зменшення середньої ваги дослідних тварин, статистично вірогідне лише у випадку 1-40-Аβ-індукованої моделі (табл. 1).

Таблиця 1

Харчова й питна поведінка у тварин з Аβ 1-40- та Аβ 25-35-індукованою хворобою Альцгеймера

Критерій	Інтактні тварини, n = 10	Хибно оперовані тварини (плацебо), n = 10	1-40-Аβ-індукована модель, n = 10	25-35-Аβ-індукована модель, n = 10
1	2	3	4	5
Зміна ваги на момент завершення дослідження (32 доба після операції), %	106,3 ± 1,5	104,5 ± 4,8	94,3 ± 3,9[1,2]	98,7 ± 3,9
Харчова поведінка				
Середній об'єм споживаного корму за добу, мг	22,3 ± 1,1	27,5 ± 3,5[1]	21,2 ± 2,5[2]	24,3 ± 2,7
Середній об'єм споживаної води за добу, мл	39,3 ± 3,8	44,1 ± 3,1	37,1 ± 2,2[2]	39,1 ± 3,2

Примітка: [1] – p < 0,05 порівняно з показником інтактних тварин; [2] – p < 0,05 порівняно з показником хибно оперованих тварин.

Одним із критеріїв відтворення патологічного стану у тварин з інтервенційними моделями ХА є присутність Аβ і тау-протеїну у гіпокампі. За результатами наших досліджень у тварин з обома моделями на момент закінчення експерименту цей показник характеризувався значною індивідуальною варіабельністю, що може пояснюватися штучним походженням аномальних протеїнів, на відміну від їх накопичення внаслідок мутацій у генетичних моделях хвороби. Концентрація Аβ і тау-протеїну була статистично вірогідно підвищена у щурів з обома моделями ХП (рис. 1).

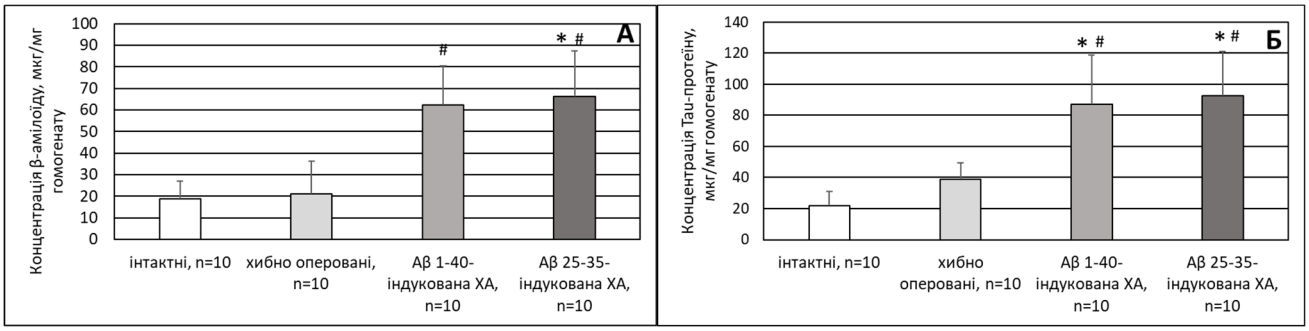


Рис. 1. Концентрація β-амілоїду (А), тау-протеїну (Б) в гомогенаті гіпокампа щурів з Аβ 1-40-індукованою ХА та Аβ 25-35-індукованою ХА, n = 10 у кожній групі тварин

Примітка: * – p < 0,05 порівняно з показником інтактних тварин, # – p < 0,05 порівняно з показником хибно оперованих тварин.

Селезінка є найбільшим вторинним (периферичним) лімфоїдним органом, який служить депо для еритроцитів, характеризується переважанням індукції гуморальної адаптивної імунної відповіді й залучений, як зазначено вище, у кліренс Аβ. Збільшення ваги селезінки може свідчити про активацію гуморальної імунної відповіді, зокрема й автоімунного генезу, а також про посилений кліренс імунних комплексів, до складу яких потенційно може входити Аβ. Зменшення ваги селезінки може вказувати на зміни в її клітинному складі з експортом клітин у сусідні тканинні компартменти, передусім у черевну порожнину, за наявності запального процесу. У щурів з Аβ1-40-ХП зареєстровано підвищення спленічного індексу, що свідчить про помірну спленомегалію і узгоджується з експериментальними даними, отриманими іншими дослідницькими групами (Yu et al., 2021; Muntsant, & Gimйnez-Llort, 2022). У тварин з Аβ25-35-ХП показники спленічного індексу не відрізнялися від таких у тварин контрольних груп, що свідчить про меншу релевантність цієї моделі щодо відтворення реакції лімфоїдних органів в умовах розвитку ХА (рис. 2 А).

Незначне зменшення вагового індексу тимуса спостерігалося у хибно оперованих тварин і в обох групах щурів із ХА (рис. 2 Б). Зменшення маси та клітинності тимуса асоціюється з віковим зменшенням генерації Т-клітин, а також характерне для процесів системного запалення, асоційованих із посиленням експорту зрілих Т-клітин на периферію (Zhang et al., 2022).

У тварин з Аβ25-35-ХП показники спленічного індексу не відрізнялися від таких у тварин контрольних груп, що свідчить про меншу релевантність цієї моделі щодо відтворення реакції лімфоїдних органів в умовах розвитку ХА.

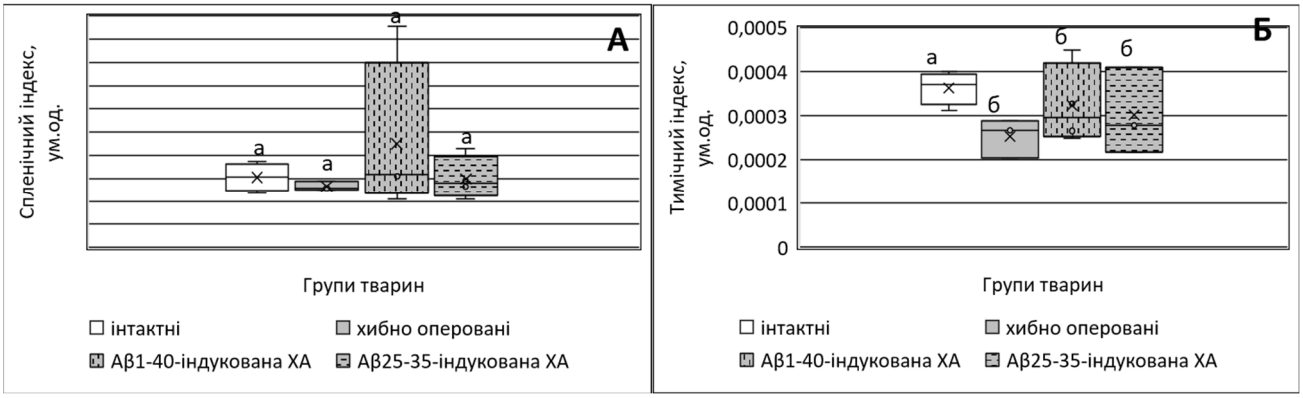


Рис. 2. Вагові індекси селезінки (А), тимуса (Б) у щурів з Аβ1-40- та Аβ25-35-індукованою хворобою Альцгеймера, n = 10 у кожній групі тварин

Примітка: різні літери позначають статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності між групами порівняння.

Гематологічні зміни, властиві клінічній формі спорадичної ХА, також, згідно з результатами наших досліджень, відтворювалися більшою мірою у щурів з Аβ1-40-ХА і полягали у статистично вірогідному зменшенні абсолютної і відносної кількості лімфоцитів і моноцитів з одночасною виразною нейтрофілією. У тварин з Аβ1-40-ХА ми зареєстрували статистично вірогідне збільшення абсолютної кількості лімфоцитів зі зменшенням відносної їх кількості й виразним моноцитозом. Коливання кількості лімфоцитів периферичної крові напряму пов'язані з функцією селезінки й тимуса. Збільшення загальної кількості лімфоцитів може відбуватися за рахунок міграції із селезінки В-клітин та/або експорту на периферію зрілих тимоцитів. Зменшення кількості лімфоцитів може бути асоційованим із порушенням дозрівання Т-клітин та/або рециркуляції зрілих В-клітин селезінки (Berrón-Ruiz et al., 2016).

Для аналізу взаємозв'язку між органометричними показниками тимуса й селезінки та кількісними змінами циркулюючих лімфоцитів у тварин з різними моделями ХА ми провели кореляційний аналіз Спірмена (рис. 3), який виявив таке. У інтактних тварин виявлено сильний позитивний зв'язок між тимічним індексом і відносною кількістю лімфоцитів периферичної крові, що ілюструє фізіологічну залежність збільшення кількості лімфоцитів від проліферації тимоцитів (рис. 3 А). Залежність між спленічним індексом і кількістю циркулюючих лімфоцитів була сильною і негативною, що ілюструє відсутність у нормі активації адаптивної гуморальної імунної відповіді, пов'язаної з посиленим хомінгом циркулюючих наївних В-клітин у білій пульпі селезінки зі збільшенням її ваги (рис. 3 Д). У хибно оперованих тварин кореляційна залежність між тимічним індексом і кількістю лімфоцитів не відрізнялася від такої в інтактних тварин (рис. 3 Б), однак спостерігалася втрата залежності між спленічним індексом і часткою циркулюючих лімфоцитів (рис. 4 Е). Це явище можна пояснити віддаленими наслідками нейрохірургічного втручання у цих тварин у формі низькоінтенсивного системного запалення, які були описані нами раніше (Nefodova et al., 2022). У тварин з Аβ1-40-ХА спостерігали сильний негативний кореляційний зв'язок між тимічним індексом і часткою циркулюючих лімфоцитів (рис. 3 В), що може засвідчувати посилену жирову дегенерацію органа, зумовлену розвитком патологічного стану, яка не спричиняє зміну ваги органа, але супроводжується зменшенням проліферації та експорту тимоцитів на периферію. Зв'язок кількості лімфоцитів із ваговим показником селезінки втрачався, що може бути пов'язане зі змінами ваги, зумовленими її залученням у кліренс антигенного матеріалу з головного мозку (рис. 4 Ж). У щурів з Аβ25-35-ХА спостерігалися кореляційні закономірності, подібні до таких у тварин з Аβ1-40-ХА, але менш виразні.

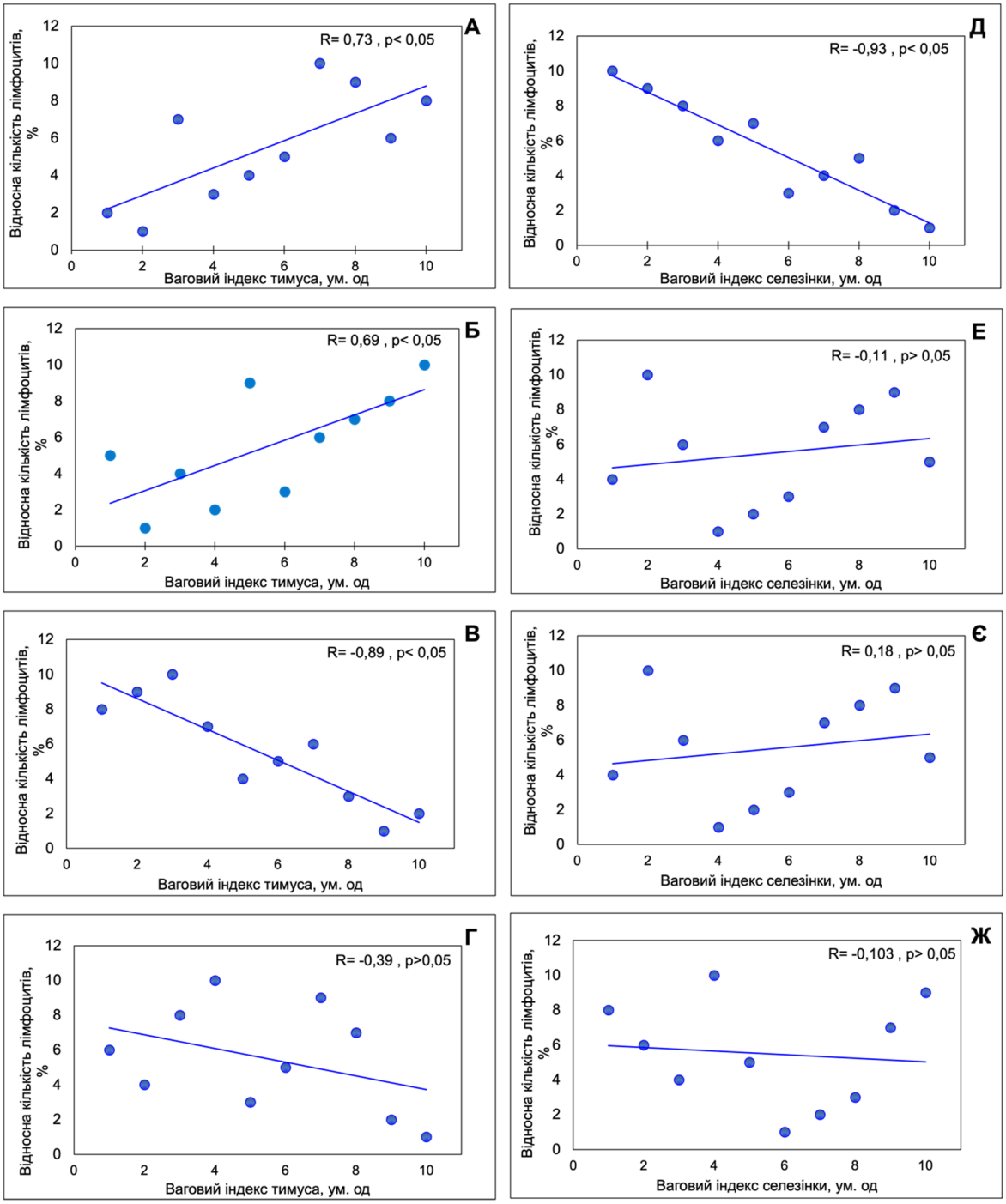


Рис. 3. Кореляція між відносною кількістю лімфоцитів і ваговим індексом тимуса й селезінки:
А – контрольна група; Б – хибно оперовані тварини; В – щури з Аβ1-40-індукованою ХА;
Г – щури з Аβ25-35-індукованою ХА;
Д – контрольна група; Е – хибно оперовані тварини; Є – щури з Аβ1-40-індукованою ХА;
Ж – щури з Аβ25-35-індукованою ХА

Дискусія і висновки

Отже, за результатами наших спостережень розвиток хвороби Альцгеймера супроводжується зміною вагових індексів органів лімфатичної системи, залучених у презентацію антигену й генерацію адаптивної імунної відповіді, а також у кліренс антигенного матеріалу з головного мозку, зокрема й спричиненого нейродегенерацією і нейрозапаленням. Порушення кореляційних зв'язків між кількісними характеристиками циркулюючих лімфоцитів і ваговими індексами первинних і вторинних лімфоїдних органів, яке було притаманне інтактним тваринам, у щурів із ХА вказує на те, що розвиток цього патологічного стану може бути асоційований із порушеннями процесів імунопоезу (утворення зрілих наївних клітин імунної системи) та імуногенезу (активації імунної відповіді). Виявлений феномен демонструє нові трансляційні можливості тваринних моделей ХА і потребує додаткового вивчення.

Внесок авторів: Анастасія Нефьодова – виділення лімфоїдних органів; Марія Рудик – імуноферментний аналіз і статистична обробка результатів дослідження; Роман Довгий – оцінка харчової і питної поведінки тварин; Лариса Сківка – формулювання концепції дослідження, аналіз та узагальнення результатів, написання рукопису.

Подяки, джерела фінансування. Автори висловлюють подяку студентам-бакалаврам і магістрам ННЦ "Інститут біології та медицини", які взяли участь у цьому дослідженні, а також Віталіні Святецькій за допомогу в проведенні хірургічних маніпуляцій.

Дослідження проведено в рамках НДР № 19ДП036-03.

Список використаних джерел

Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S. T., Karlsen, T. V., Karaman, S., Detmar, M., Wiig, H., & Alitalo, K. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *Journal of Experimental Medicine*, 212(7), 991–999. https://doi.org/10.1084/jem.20142290

Baazim, H., Antonio-Herrera, L., & Bergthaler, A. (2021). The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00624-w

Berrón-Ruíz, L., López-Herrera, G., Ávalos-Martínez, C. E., Valenzuela-Ponce, C., Ramírez-San Juan, E., Santoyo-Sánchez, G., Mújica Guzmán, F., Espinosa-Rosales, F. J., & Santos-Argumedo, L. (2016). Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergologia Et Immunopathologia*, 44(6), 571–579. https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.05.003

Canet, G., Zussy, C., Hernandez, C., Maurice, T., Desrumaux, C., & Givalois, L. (2023). The pathomimetic oAβ25–35 model of Alzheimer's disease: Potential for screening of new therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 108398. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108398

Ding, D., Wang, X., Li, Q., Li, L., & Wu, J. (2021). Research on the glial–lymphatic system and its relationship with alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.605586

Guo, L., Li, X., Gould, T., Wang, Z.-Y., & Cao, W. (2023). T-cell aging and Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, 14. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154699

Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., Herod, S. G., Knopp, J., Setliff, J. C., Lupi, A. L., Da Mesquita, S., Frost, E. L., Gaultier, A., Harris, T. H., Cao, R., Hu, S., Lukens, J. R., Smirnov, I., Overall, C. C., . . . Kipnis, J. (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1380–1391. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0227-9

Mesquita, S. D., Louveau, A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison, R. C., Kingsmore, K. M., Contarino, C., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Raper, D., Viar, K. E., Powell, R. D., Baker, W., Dabhi, N., Bai, R., Cao, R., Hu, S., Rich, S. S., Munson, J. M., . . . Kipnis, J. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717), 185–191. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8

Mesquita, S. D., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., Brase, L., Farias, F., Wall, M., Jiang, H., Kodira, C. D., De Lima, K. A., Herz, J., Louveau, A., Goldman, D. H., Salvador, A. F., Önengüt-Gümüşcü, S., Farber, E., Dabhi, N., Kennedy, T., Milam, M. G., Baker, W., . . . Kipnis, J. (2021). Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-Aβ immunotherapy. *Nature,* 593(7858), 255–260. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03489-0

Minaglia, C., Giannotti, C., Boccardi, V., Mecocci, P., Serafini, G., Odetti, P., & Monacelli, F. (2019). Cachexia and advanced dementia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 10(2), 263–277. https://doi.org/10.1002/jcsm.12380

Muntsant, A., & Giménez-Llort, L. (2022). Crosstalk of Alzheimer's disease-phenotype, HPA axis, splenic oxidative stress and frailty in late-stages of dementia, with special concerns on the effects of social isolation: A translational neuroscience approach. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.969381

Natale, G., Limanaqi, F., Busceti, C. L., Mastroiacovo, F., Nicoletti, F., & Puglisi-Allegra, S. (2021). Glymphatic system as a gateway to connect neurodegeneration from periphery to CNS. *Frontiers in Neuroscience*, 15. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639140

Nefedova, A. (2023). Microglial phagocytosis in rats with different models of alzheimer's disease. *Biotechnologia Acta*, 16(1), 57–66. https://doi.org/10.15407/biotech16.01.057

Nefodova, A., Rudyk, M., Pasichnichenko, M., Dovhyi, R., Dovbynchuk, T., Tolstanova, G., & Skivka, L. (2022). Pro-inflammatory effects of placebo neurosurgery in rats: age-related features. *General Surgery*, 2, 56–63. https://doi.org/10.30978/gs-2022-2-56

Peng, H. B., Noh, K., Pan, S. R., Saldivia, V., Serson, S., Toscan, A., de Lannoy, I. A. M., & Pang, K. S. (2020). Human Amyloid-β40 Kinetics after Intravenous and Intracerebroventricular Injections and Calcitriol Treatment in Rats In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(10), 944–955. https://doi.org/10.1124/dmd.120.090886

Rostagno, A. A. (2022). Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 107. https://doi.org/10.3390/ijms24010107

Wu, K.-M., Zhang, Y.-R., Huang, Y.-Y., Dong, Q., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021a). The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, *70*, 101409. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101409

Yu, Z., Chen, D., Tan, C., Zeng, G., He, C., Wang, J., Bu, X., & Wang, Y. (2021). Physiological clearance of Aβ by spleen and splenectomy aggravates Alzheimer-type pathogenesis. *Aging Cell*, 21(1). https://doi.org/10.1111/acel.13533

Zhang, Y., Wang, J., Chen, S., Wang, H., Li, Y., Ou, Y., Huang, S., Chen, S., Cheng, W., Feng, J., Dong, Q., & Yu, J. (2022). Peripheral immunity is associated with the risk of incident dementia. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 1956–1962. https://doi.org/10.1038/s41380-022-01446-5

References

Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S. T., Karlsen, T. V., Karaman, S., Detmar, M., Wiig, H., & Alitalo, K. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *Journal of Experimental Medicine*, 212(7), 991–999. https://doi.org/10.1084/jem.20142290

Baazim, H., Antonio-Herrera, L., & Bergthaler, A. (2021). The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00624-w

Berrón-Ruíz, L., López-Herrera, G., Ávalos-Martínez, C. E., Valenzuela-Ponce, C., Ramírez-San Juan, E., Santoyo-Sánchez, G., Mújica Guzmán, F., Espinosa-Rosales, F. J., & Santos-Argumedo, L. (2016). Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergologia Et Immunopathologia*, 44(6), 571–579. https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.05.003

Canet, G., Zussy, C., Hernandez, C., Maurice, T., Desrumaux, C., & Givalois, L. (2023). The pathomimetic oAβ25–35 model of Alzheimer's disease: Potential for screening of new therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 108398. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108398

Ding, D., Wang, X., Li, Q., Li, L., & Wu, J. (2021). Research on the glial–lymphatic system and its relationship with alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.605586

Guo, L., Li, X., Gould, T., Wang, Z.-Y., & Cao, W. (2023). T-cell aging and Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, 14. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154699

Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., Herod, S. G., Knopp, J., Setliff, J. C., Lupi, A. L., Da Mesquita, S., Frost, E. L., Gaultier, A., Harris, T. H., Cao, R., Hu, S., Lukens, J. R., Smirnov, I., Overall, C. C., . . . Kipnis, J. (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1380–1391. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0227-9

Mesquita, S. D., Louveau, A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison, R. C., Kingsmore, K. M., Contarino, C., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Raper, D., Viar, K. E., Powell, R. D., Baker, W., Dabhi, N., Bai, R., Cao, R., Hu, S., Rich, S. S., Munson, J. M., . . . Kipnis, J. (2018). Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 560(7717), 185–191. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8

Mesquita, S. D., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., Brase, L., Farias, F., Wall, M., Jiang, H., Kodira, C. D., De Lima, K. A., Herz, J., Louveau, A., Goldman, D. H., Salvador, A. F., Önengüt-Gümüşcü, S., Farber, E., Dabhi, N., Kennedy, T., Milam, M. G., Baker, W., . . . Kipnis, J. (2021). Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-Aβ immunotherapy. *Nature,* 593(7858), 255–260. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03489-0

Minaglia, C., Giannotti, C., Boccardi, V., Mecocci, P., Serafini, G., Odetti, P., & Monacelli, F. (2019). Cachexia and advanced dementia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 10(2), 263–277. https://doi.org/10.1002/jcsm.12380

Muntsant, A., & Giménez-Llort, L. (2022). Crosstalk of Alzheimer's disease-phenotype, HPA axis, splenic oxidative stress and frailty in late-stages of dementia, with special concerns on the effects of social isolation: A translational neuroscience approach. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.969381

Natale, G., Limanaqi, F., Busceti, C. L., Mastroiacovo, F., Nicoletti, F., & Puglisi-Allegra, S. (2021). Glymphatic system as a gateway to connect neurodegeneration from periphery to CNS. *Frontiers in Neuroscience,* 15. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639140

Nefedova, A. (2023). Microglial phagocytosis in rats with different models of alzheimer's disease. *Biotechnologia Acta*, 16(1), 57–66. https://doi.org/10.15407/biotech16.01.057

Nefodova, A., Rudyk, M., Pasichnichenko, M., Dovhyi, R., Dovbynchuk, T., Tolstanova, G., & Skivka, L. (2022). Pro-inflammatory effects of placebo neurosurgery in rats: age-related features. *General Surgery*, 2, 56–63. https://doi.org/10.30978/gs-2022-2-56

Peng, H. B., Noh, K., Pan, S. R., Saldivia, V., Serson, S., Toscan, A., de Lannoy, I. A. M., & Pang, K. S. (2020). Human Amyloid-β40 Kinetics after

Intravenous and Intracerebroventricular Injections and Calcitriol Treatment in Rats In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(10), 944–955. https://doi.org/10.1124/dmd.120.090886

Rostagno, A. A. (2022). Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 107. https://doi.org/10.3390/ijms24010107

Wu, K.-M., Zhang, Y.-R., Huang, Y.-Y., Dong, Q., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021a). The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 70, 101409. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101409

Yu, Z., Chen, D., Tan, C., Zeng, G., He, C., Wang, J., Bu, X., & Wang, Y. (2021). Physiological clearance of Aβ by spleen and splenectomy aggravates Alzheimer-type pathogenesis. *Aging Cell*, 21(1). https://doi.org/10.1111/acel.13533

Zhang, Y., Wang, J., Chen, S., Wang, H., Li, Y., Ou, Y., Huang, S., Chen, S., Cheng, W., Feng, J., Dong, Q., & Yu, J. (2022). Peripheral immunity is associated with the risk of incident dementia. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 1956–1962. https://doi.org/10.1038/s41380-022-01446-5

Отримано редакцією журналу / Received:16.10.23
Прорецензовано / Revised: 17.11.23
Схвалено до друку / Accepted: 17.11.23

Anastasia NEFODOVA[1], PhD Student
ORCID ID: 0000-0003-3440-3687
e-mail: nefodova.av@gmail.com

Maria RUDYK[1], PhD (Biol.), Assoc. Prof.
ORCID ID: 0000-0003-1252-885X
e-mail: rudyk_marie@knu.ua

Roman DOVHYI[1], PhD (Biol.), Assist.
ORCID ID: 0000-0003-1189-4479
e-mail: romandovgiy@gmail.com

Larisa SKIVKA[1], DSc (Biol.), Prof.
ORCID ID: 0000-0002-2171-1085
e-mail: realmed@ukr.net
[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ORGANOMETRIC INDICATORS OF LYMPHOID ORGANS IN RATS WITH DIFFERENT MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Background. ***Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder that affects millions of people worldwide. Increasing evidence suggests that antigens of the central nervous system can interact with lymphocytes and antigen-presenting cells through meningeal lymphatic pathways, indicating that both innate and adaptive immune responses may play a role in the development of neurodegenerative diseases. Thymic involution, a characteristic of aging immune systems, leads to a reduction in naive T lymphocyte production, affecting adaptive immune responses and resulting in compromised immune surveillance. Ineffective immune response triggers neurodegeneration through prolonged activation of immune cells, a key characteristic of the disease.***

The aim of this study was to comparatively assess the reaction of lymphoid organs in rats with two widely used intervention models of Alzheimer's disease induced by intrahippocampal administration of Aβ1-40 and Aβ25-35.

Methods. ***Male Wistar rats were used in the experiments, including intact and sham-operated animals as controls. Disease progression was confirmed through feeding behavior, body and organ weight measurements, evaluation of cognitive impairments in the Barnes maze behavioral test, and assessment of dopaminergic neuron loss. Hematological parameters were analyzed at the end of the experiment (day 37), including the relative quantity of lymphocytes. Spearman's correlation analysis was performed between organometric indicators of the thymus and spleen and quantitative changes in circulating lymphocytes in animals with different Alzheimer's disease models.***

Results. ***In rats with Aβ1-40-induced Alzheimer's disease, an increase in splenic index was observed, indicating moderate splenomegaly. A statistically significant increase in the absolute quantity of lymphocytes with a decrease in their relative quantity and marked monocytosis was recorded. There was a strong negative correlation between splenic index and the quantity of circulating lymphocytes. Animals with Aβ25-35-induced Alzheimer's disease did not show differences in splenic index compared to control groups.***

Conclusions. ***The development of Alzheimer's disease is accompanied by changes in the weight indices of lymphatic organs involved in antigen presentation and the generation of adaptive immune responses, as well as in the clearance of antigenic material from the brain. Disruptions in correlation links between quantitative characteristics of circulating lymphocytes and weight indices of primary and secondary lymphoid organs may be associated with disturbances in immunopoiesis and immunogenesis.***

Keywords: ***Alzheimer's disease, neuroinflammation, lymphoid organs, thymus, spleen.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 579.64:632.25:635.21
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.39-44

Наталія ГРИЦЕВА[1], асп.
ORCID ID: 0009-0005-7983-0377
e-mail: nataliyavorobiova@ukr.net

Тетяна БАБИЧ[1], студ.
ORCID ID: 0009-0007-2864-4958
e-mail:babich.tanya3101@gmail.com

Анна АНДРІЄНКО[1], студ.
ORCID ID: 0009-0001-9068-5546
e-mail: anna1703andr@gmail.com

Ксенія РУБАНІК[2], учениця
ORCID ID: 0009-0001-4934-6390
e-mail: rubanikk236@gmail.com

Юлія ЮМИНА[1], канд. біол. наук, доц.
ORCID ID: 0000-0002-4568-1415
e-mail: juliayumyna@ukr.net

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
[2]Спеціалізована школа № 173, Київ, Україна

ОЦІНЮВАННЯ СТІЙКОСТІ СОРТІВ КАРТОПЛІ, ПОШИРЕНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ, ДО ЗБУДНИКА М'ЯКОЇ ГНИЛІ ТА ЧОРНОЇ НІЖКИ

В с т у п . ***Картоплю уражають різні хвороби, у тому числі чорна ніжка й м'яка гниль, що спричиняються Pectobacterium atrosepticum. Однією із причин швидкого поширення цього бактеріального патогену є відсутність комерційних сортів картоплі із природним імунітетом до чорної ніжки та м'якої гнилі. Хоча деякі сорти можуть виявляти часткову стійкість, однак відсутність повної стійкості сприяє широкому розповсюдженню зазначених хвороб. Метою дослідження було оцінити стійкість найбільш поширених в Україні сортів картоплі до збудника чорної ніжки та м'якої гнилі.***

М е т о д и . ***У дослідженні використовували сорти картоплі з різних регіонів України. Для оцінювання чутливості картоплі до м'якої гнилі та чорної ніжки брали 24-годинну культуру Pectobacterium atrosepticum B-1084T. Сприйнятливість картоплі до збудника м'якої гнилі оцінювали за двома критеріями: захворюваність (%) і ступінь ураження (маса та площа мацерованої тканини).***

Р е з у л ь т а т и . ***Бульби картоплі різних сортів, а також одного сорту, але вирощені в різних регіонах України, показали різний рівень стійкості до музейного штаму збудника м'якої гнилі та чорної ніжки. Захворюваність для всіх аналізованих сортів картоплі сягала 100 %. Бульби сорту Riviera, отримані з Одеської області, були значно більше уражені пектолітичними ферментами P. atrosepticum B-1084T порівняно з бульбами інших сортів: площа мацерації бульб цього сорту була в 1,5 раза більшою, ніж у сортів Queen Anne, Riviera (Чернігів) та Bellarosa (Одеса). Медіана площі мацерації бульб сортів Picasso та Bellarosa (Чернігівська) була у 2,5 раза меншою, ніж у сорту Riviera. Ці закономірності чутливості до м'якої гнилі та збудника чорної ніжки підтверджуються також результатами порівняльного оцінювання маси.***

В и с н о в к и . ***Сорт картоплі Riviera виявився найбільш сприйнятливим до ураження м'якою гниллю і збудником чорної ніжки; сорт Picasso – найменш чутливим до P. atrosepticum B-1084T. Бульби картоплі того самого сорту, вирощені в різних регіонах країни, мали різну сприйнятливість до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки, що свідчить про те, що польовий ефект переважає над впливом генотипу.***

К л ю ч о в і с л о в а : ***картопля, фітопатогени, Pectobacterium atrosepticum, Solanum tuberosum.***

Вступ

Картопля, як і будь-яка інша адаптована сільськогосподарська культура, сприйнятлива до хвороб різної етіології, що призводять до суттєвого зниження якості та кількості врожаю – від 10 % при зберіганні й до більш ніж 20 % – у вегетаційний період (Joshi et al., 2020; Тактаєв, 2020; Joshi, 2020). Чорна ніжка та м'яка гниль – поширені бактеріальні хвороби картоплі (De Boer et al., 2012). До етіологічних збудників м'якої гнилі бульб і чорної ніжки картоплі в полі відносять представників родини *Enterobacteriaceae*, родів *Dickeya* та *Pectobacterium* (Cigna et al., 2023). У світі лідируюче місце в ураженні картоплі чорною ніжкою та м'якою гниллю посідає *Pectobacterium atrosepticum*, який, на відміну від деяких інших представників, таких як *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium brasiliense* або *Dickeyadadantii*, обмежений вузьким колом господарів (Sledz et al., 2023).

Важливою причиною швидкого й масштабного поширення збудника бактеріальної гнилі картоплі є те, що комерційних сортів картоплі, які мають природний імунітет до чорної ніжки та м'якої гнилі, спричинених видами *Dickeya* та *Pectobacterium*, не існує, однак деякі сорти демонструють часткову стійкість (Czajkowski et al., 2012). Вірулентність представників роду *Pectobacterium* заснована на ферментах, що руйнують клітинну стінку рослин, чим порушують цілісність клітин господаря. Однак активація синтезу цих екзоферментів відбувається при досягненні високої щільності популяції, що координується чутливістю до кворуму через складний набір факторів транскрипції та посттранскрипційних регуляторів (Padilla-Gálvez et al., 2021). До інших факторів вірулентності відносять білки ворсинок, протеази, компоненти ліпополісахариду, регулятори утворення біоплівки й рухливості, що поширені серед штамів *Pectobacterium*, оскільки вони є незамінними для забезпечення розвитку захворювання (Van den Bosch et al., 2019).

Наразі не існує ефективного методу боротьби із захворюванням, спричиненим *P. atrosepticum*. Жодні хімічні агенти не ефективні проти патогену, а культурні

© Грицева Наталія, Бабич Тетяна, Андрієнко Анна, Рубанік Ксенія, Юмина Юлія, 2023

ISSN 1728-2748

практики й умови зберігання не можуть запобігти поширенню хвороби (Koroney et al., 2016). Чутливість бульб картоплі до ураження *P. atrosepticum* залежить не лише від генетичних характеристик сорту, а й від природних умов на території його вирощування: особливостей сівозміни, метеорологічних чинників, характеристик ґрунту, які значною мірою обумовлюють формування ендофітних угруповань тканин бульби, тощо.

Отже, метою нашого дослідження було оцінити стійкість сортів картоплі, найбільш поширених на території України, до збудників чорної ніжки та м'якої гнилі.

Методи

Характеристика сортів картоплі. Для оцінювання стійкості до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі були відібрані найпоширеніші сорти, що вирощуються на території України. Bellarosa – це ранній сорт німецької селекції (EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH) з періодом вегетації до 65 днів. У паспорті сорту не вказана стійкість до чорної ніжки. Зразки цього сорту були отримані з Чернігівської та Одеської областей. Queen Anne – ранній сорт німецької селекції (SOLANA GmbH) із періодом дозрівання до 70 днів. Отриманий з Одеської області. Згідно з характеристикою виробника сорт має високу стійкість до чорної ніжки. Сорт картоплі нідерландського походження (GEBR. HOLSTEIN) Picasso – середньопізній, з періодом вирощування до 140 днів. У паспорті сорту вказана низька стійкість до чорної ніжки. Зразки отримано з Київської області. Виведений у Нідерландах (Mts. Boerhave) сорт Riviera – один із найпоширеніших у нашій країні, його період вегетації становить від 40 до 60 днів у полі. Зразки цього сорту отримані з Одеської та Чернігівської областей. У паспорті виробника зазначено, що сорт характеризується середньовисокою стійкістю до чорної ніжки.

Культура мікроорганізмів. У дослідженні був використаний штам *Pectobacterium atrosepticum* B-1084^T = ATCC 33260, CFBP 1526, ICMP 1526, LMG 2386, NCPPB 549, люб'язно наданий із Національної колекції мікроорганізмів України (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України). Мікроорганізми культивували за 26 °C на картопляному агарі (КА г/л: гомогенізована варена картопля – 500 г, агар – 20 г, NaCl – 5 г) протягом 24–48 год. Суспензію бактеріальних клітин *P. atrosepticum* B-1084^T для інокуляції готували у стерильному фізіологічному розчині та стандартизували до концентрації 3,3 за МакФарландом ($1,0*10^9$ клітин/мл) з Densi-La-Meter (ERBA Diagnostics Mannheim, Німеччина).

Оцінювання чутливості бульб картоплі до P. atrosepticum B-1084T (Van Hall, 1902) Dye 1969. Оцінювання чутливості бульб картоплі до збудника м'якої гнилі й чорної ніжки *in vitro* проводили згідно з Lebecka et al. з деякими модифікаціями (Lebecka et al., 2020; Lebecka, 2017) за схемою, наведеною на рис. 1.

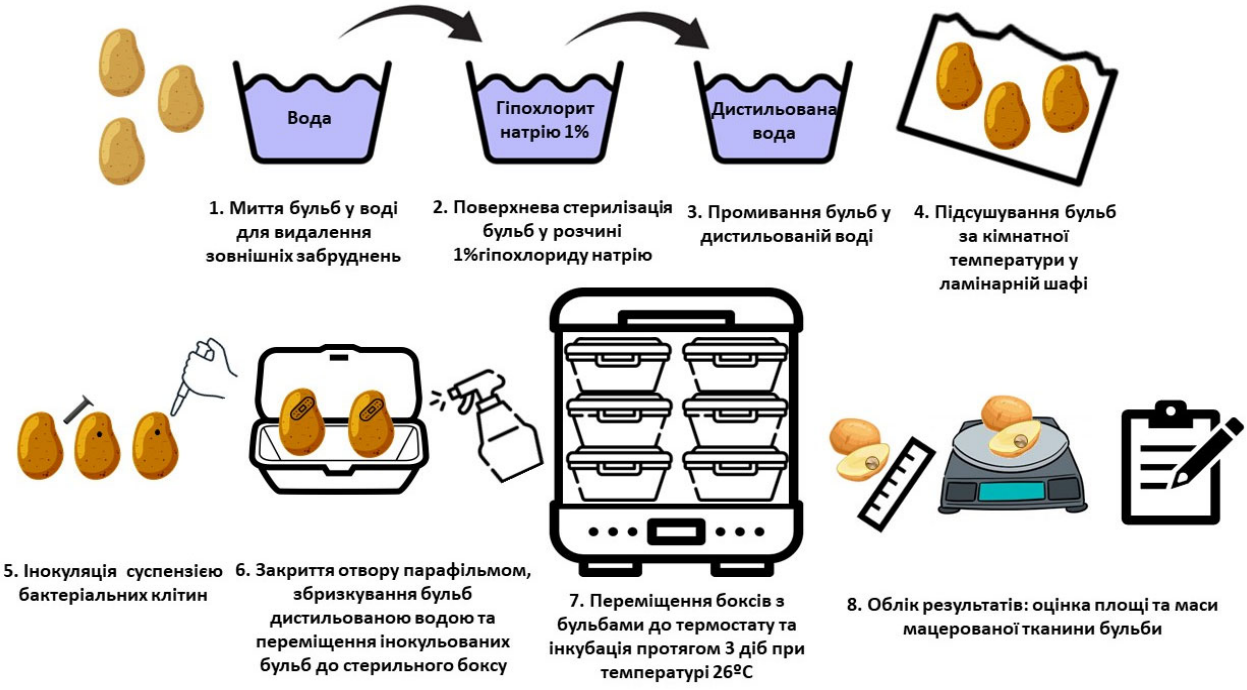


Рис. 1. Схема досліду

Бульби картоплі обраних сортів попередньо мили у водогінній воді для видалення зовнішніх забруднень, після чого поміщали у 0,1 %-й розчин активного хлору на 15 хв для поверхневої стерилізації з подальшим промиванням у дистильованій стерильній воді та підсушували за кімнатної температури в ламінарній шафі HR40-IIA2 (Qingdao Haier Biomedical Co., Ltd, Китай). У бульбах за допомогою металевого стрижня довжиною 10 мм і діаметром 2 мм робили отвір, вносили 10 мкл суспензії дозатором змінного об'єму й закривали отвір парафільмом. Як негативний контроль у отвір бульб вносили стерильний фізіологічний розчин. Інокульовані бульби поміщали у стерильні бокси й збризкували дистильованою водою, після чого бокси з бульбами закривали кришками й поміщали в термостат за 26 °C на 3 доби. Після інкубації бульби розрізали вертикально через місце інокуляції та оцінювали симптоми хвороби, а саме дві ознаки захворювання: захворюваність (частка бульб із симптомами гнилі) і тяжкість захворювання, яку оцінювали за середньою масою мацерованої тканини й середньою площею мацерації, яку розраховували за формулою

$$S = r_1 * r_2 * \pi.$$

Статистична обробка результатів дослідження. Статистичну обробку отриманих результатів проводили в Microsoft Excel з використанням методів варіаційної статистики з розрахунком M (25 %; 75 %), де M – медіана, (25 %; 75 %) – інтерквартильний інтервал між 25-м і 75-м процентилями. Статистичні відмінності між варіантами досліду розраховували за допомогою тесту Краскела – Уолліса. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати

Порівняльне оцінювання площі мацерації різних сортів картоплі, інокульованих збудником м'якої гнилі й чорної ніжки in vitro. Як показали результати досліджень, бульби картоплі різних сортів і навіть тих самих сортів, але вирощених на різних територіях України, виявили різну чутливість до ураження музейним штамом збудника м'якої гнилі та чорної ніжки (рис. 2). Захворюваність – частка бульб із симптомами ураження гниллю – для всіх досліджуваних сортів картоплі становила 100 %. Бульби сорту Riviera, отримані з Одеської області, зазнали значно більшого впливу пектолітичних ферментів *P. atrosepticum* B-1084^T порівняно з бульбами інших сортів, а також бульбами того самого сорту, але вирощеного на території Чернігівської області: значення медіани площі мацерації для сорту Riviera (Одеса) (131,9 мм^2) було в середньому в 1,5 раза вищим порівняно з аналогічним показником для сорту Queen Anne (93,8 мм^2); того самого сорту, але вирощеного в Чернігівській області – Riviera (Чернігів) (98,9 мм^2), а також іншого сорту, вирощеного в Одеській області – Bellarosa (108,6 мм^2). Медіани площі мацерації бульб сортів Picasso (49,5 мм^2) і Bellarosa (Чернігів) (65,9 мм^2) були в середньому у 2,5 раза меншими за показник для сорту Riviera з Одещини ($p \le 0,05$ у всіх випадках, рис. 3). Отримані нами дані свідчать про те, що сорт Riviera (Одеса) був більш сприйнятливим до ураження музейним штамом пектолітичної бактерії *P. Atrosepticum* B 1084^T, а сорт Picasso – найменш чутливим. Слід зазначити, що показник площі мацерації для бульб сортів Picasso та Bellarosa (Чернігів) характеризувався значною варіабельністю, що може вказувати на генетичну неоднорідність бульб у зразку, яка, своєю чергою, може бути пов'язана із тривалим використанням сорту без оновлення. Отримані нами дані узгоджуються із характеристиками сортів, наданими виробником, щодо стійкості до чорної ніжки. Важливо також зазначити, що показник площі мацерації для бульб одного сорту (Riviera та Bellarosa), але вирощених на різних територіях (Одеська й Чернігівська області), відрізнявся, і для обох сортів він був статистично вірогідно вищим у випадку вирощування на території південної області країни.

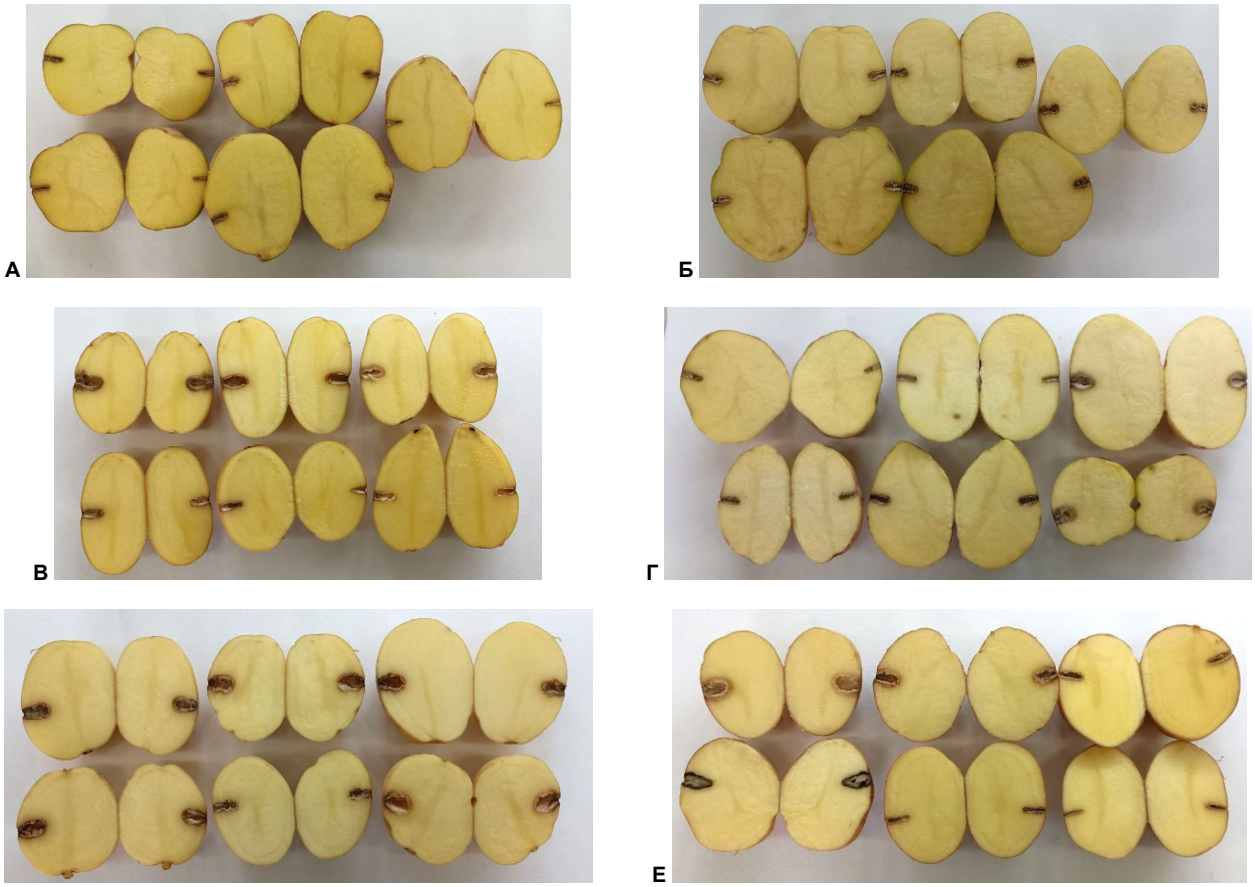


Рис. 2. Дослідні бульби інокульовані штамом P. atrosepticum B 1084T після інкубації протягом 3 діб при температурі 26°C:
А – сорт Bellarosa (Чернігів); Б – сорт Riviera (Чернігів); В – сорт Queen Anne; Г – сорт Picasso; Д – сорт Riviera (Одеса); Е – сорт Bellarosa (Одеса)

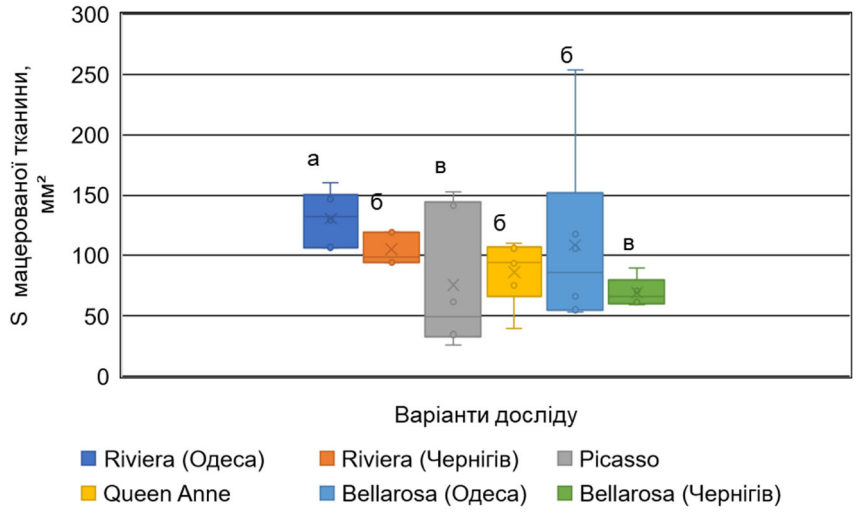


Рис. 3. Площа мацерації бульб картоплі різних сортів, інокульованих *P. atrosepticum* В 1084^{T} *in vitro*

Примітка: різні літери позначають статистичну вірогідність відмінності між варіантами досліду, p < 0,05.

Порівняльне оцінювання маси мацерованої тканини різних сортів картоплі, інокульованих збудником м'якої гнилі й чорної ніжки in vitro. Що стосується маси мацерованої тканини бульб картоплі (рис. 4), то результати порівняльного оцінювання цього показника для різних сортів частково були порівнянними з результатами оцінювання площі мацерації.

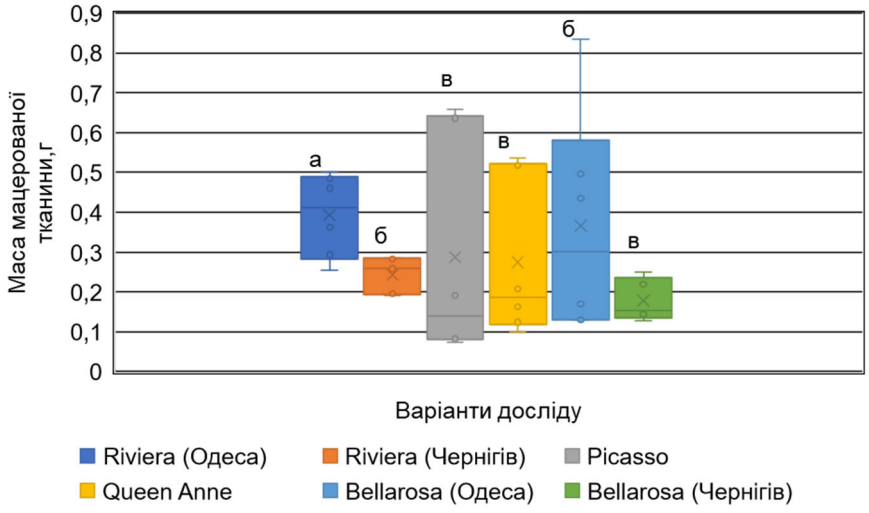


Рис. 4. Маса мацерованої тканини бульб картоплі різних сортів, інокульованих *P. atrosepticum* В 1084^{T} *in vitro*

Примітка: різні літери позначають статистичну вірогідність відмінності між варіантами досліду, p < 0,05.

Найвищу масу мацерованої тканини (медіана 0,411 г) зареєстровано для бульб сорту Riviera (Одеса), для яких спостерігалась найбільша площа мацерації. Показник для решти сортів був статистично вірогідно нижчим. При цьому для того самого сорту, але вирощеного в Чернігівській області, а також для бульб зі зразка Bellarosa з Одещини, показники були нижчими майже вдвічі, а для решти сортів – майже у 2,5 раза. Найменшу масу мацерованої тканини спостерігали в бульбах сорту Picasso, для якого зареєстровано найменшу площу мацерації. Маса мацерованої тканини для бульб того самого сорту зі зразків, отриманих з півдня України, була вищою порівняно зі зразками, отриманими із Чернігівської області. Однак слід зазначити, що маса мацерованої тканини бульб зі зразка Bellarosa (Одеса) була статистично вірогідно більшою за аналогічний показник для бульб зі зразка Queen Anne, але при цьому площа мацерації у бульбах сорту Queen Anne була більшою порівняно з аналогічним показником для бульб сорту Bellarosa (Одеса). Це свідчить про те, що маса мацерованої тканини залежить не лише від площі мацерації, а й від хімічного складу тканини бульб картоплі. Достатньо високим рівнем варіабельності характеризувалися показники маси мацерованої тканини для бульб сортів Picasso, Queen Anne та Bellarosa (Одеса).

Дискусія і висновки

Різну сприйнятливість використаних сортів картоплі до гниття, викликаного інокуляцією *P. atrosepticum* В 1084^{T}, передусім можна пояснити різними генетичними детермінантами стійкості до хвороб у цих сортів,

розроблених виробниками, оскільки показники чутливості, зареєстровані в нашому дослідженні, збігаються практично повністю із характеристиками виробника щодо стійкості до цієї хвороби. Однак той факт, що бульби одного сорту, вирощені на різних територіях країни, мали різні показники сприйнятливості до збудника м'якої гнилі й чорної ніжки, указує на те, що ефект поля переважає вплив генотипу (Weinert et al., 2009). Ґрунт може впливати на стійкість патогенів за двома основними механізмами: фізико-хімічними характеристиками, які впливають на ріст і формування механізмів стійкості до біотичних чинників, а також шляхом формування різного ендофітного угруповання мікроорганізмів у тканині бульби, оскільки склад ендофітного мікробного співтовариства материнської бульби картоплі залежить від ґрунту, де вона була вирощена (Kurm et al., 2023; Buchholz et al., 2019). Отримані нами дані зумовлюють необхідність подальшого вивчення детермінант стійкості бульб картоплі до збудника м'якої гнилі й чорної ніжки, відмінних від генетичних, зокрема особливостей ендофітного мікробного угруповання у тканині бульб, яке формується на різних ґрунтах, залежно або незалежно від генетичних характеристик сорту. Такі дані можуть бути корисними для формування рекомендацій фахівцям у галузі картоплярства щодо вибору сортів, оптимальних з погляду стійкості до бактеріальних хвороб за умов вирощування у ґрунті конкретної території.

Внесок авторів: Наталія Грицева – дизайн дослідження, інокуляція збудником, написання рукопису; Тетяна Бабич – підготовка інокуляту та статистична обробка результатів дослідження; Анна Андрієнко – підготовка зразків для аналізу, облік результатів; Ксенія Рубанік – підготовка зразків для аналізу, облік результатів; Юлія Юмина – формулювання концепції дослідження, аналіз і узагальнення результатів.

Список використаних джерел

Тактаєв, Б. А., & Подберезко, І. М. (2020). Розвиток хвороб на сортах картоплі різних груп стиглості на природному інфекційному фоні в зоні Південного Полісся України. *Картоплярство: міжвідомчий тематичний науковий збірник*, 45.

Buchholz, F., Antonielli, L., Kostić, T., Sessitsch, A., & Mitter, B. (2019). The bacterial community in potato is recruited from soil and partly inherited across generations. *Plos One*, 14(11), e0223691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223691

Cigna, J., Robic, K., Dewaegeneire, P., Hélias, V., Beury, A., & Faure, D. (2023). Efficacy of soft-rot disease biocontrol agents in the inhibition of production field pathogen isolates. *Microorganisms*, 11(2), 372. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020372

Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by Pectobacterium and Dickeya species: A review. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x

De Boer, S. H., Li, X., & Ward, L. J. (2012). Pectobacterium spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathology*, 102(10), 937–947. https://doi.org/10.1094/phyto-04-12-0083-r

Hashemi Tameh, M., Primiceri, E., Chiriacò, M. S., Poltronieri, P., Bahar, M., & Maruccio, G. (2020). Pectobacterium atrosepticum biosensor for monitoring blackleg and soft rot disease of potato. *Biosensors*, 10(6), 64. https://doi.org/10.3390/bios10060064

Joshi, J. R., Yao, L., Charkowski, A. O., & Heuberger, A. L. (2020). Metabolites from wild potato inhibit virulence factors of the soft rot and blackleg pathogen pectobacterium brasiliense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, MPMI-08-20-0224. https://doi.org/10.1094/mpmi-08-20-0224-r

Koroney, A. S., Plasson, C., Pawlak, B., Sidikou, R., Driouich, A., Menu-Bouaouiche, L., & Vicré-Gibouin, M. (2016). Root exudate ofSolanum tuberosumis enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth ofPectobacterium atrosepticum. *Annals of Botany*, 118(4), 797–808. https://doi.org/10.1093/aob/mcw128

Kurm, V., Mendes, O., Gros, J., & van der Wolf, J. (2023). Potato tuber origin and microbial composition determines resistance against soft rot Pectobacteriaceae. *European Journal of Plant Pathology*. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02763-3

Lebecka, R. (2017). Screening for Potato Resistance to Blackleg and Soft Rot. *Plant Breeding and Seed Science*, 75(1), 97–104. https://doi.org/10.1515/plass-2017-0013

Lebecka, R., Wasilewicz-Flis, I., & Mańkowski, D. (2020). Diploid Potato Germplasm with Resistance to Dickeya solani. *Potato Research*, 64(3), 375–385. https://doi.org/10.1007/s11540-020-09482-w

Padilla-Gálvez, N., Luengo-Uribe, P., Mancilla, S., Maurin, A., Torres, C., Ruiz, P., France, A., Acuña, I., & Urrutia, H. (2021). Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum L.) against Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum and Pectobacterium atrosepticum. *BMC Microbiology*, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12866-021-02393-x

Sledz, W., Motyka-Pomagruk, A., Zukowska, D., Babinska-Wensierska, W., Zoledowska, S., & Lojkowska, E. (2023). Genotypic and phenotypic uniformity among the population of Pectobacterium atrosepticum strains isolated during three growing seasons from potato fields in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02687-y

Van den Bosch, T. J. M., Niemi, O., & Welte, C. U. (2019). Single gene enables plant pathogenic Pectobacterium to overcome host-specific chemical defence. *Molecular Plant Pathology*, 21(3), 349–359. https://doi.org/10.1111/mpp.12900

Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Gomes, N. C. M., Schloter, M., Berg, G., & Smalla, K. (2009). Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3859–3865. https://doi.org/10.1128/aem.00414-09

References

Buchholz, F., Antonielli, L., Kostić, T., Sessitsch, A., & Mitter, B. (2019). The bacterial community in potato is recruited from soil and partly inherited across generations. *Plos One*, 14(11), e0223691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223691

Cigna, J., Robic, K., Dewaegeneire, P., Hélias, V., Beury, A., & Faure, D. (2023). Efficacy of soft-rot disease biocontrol agents in the inhibition of production field pathogen isolates. *Microorganisms*, 11(2), 372. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020372

Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by Pectobacterium and Dickeya species: A review. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x

De Boer, S. H., Li, X., & Ward, L. J. (2012). Pectobacterium spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathology*, 102(10), 937–947. https://doi.org/10.1094/phyto-04-12-0083-r

Hashemi Tameh, M., Primiceri, E., Chiriacò, M. S., Poltronieri, P., Bahar, M., & Maruccio, G. (2020). Pectobacterium atrosepticum biosensor for monitoring blackleg and soft rot disease of potato. *Biosensors*, 10(6), 64. https://doi.org/10.3390/bios10060064

Joshi, J. R., Yao, L., Charkowski, A. O., & Heuberger, A. L. (2020). Metabolites from wild potato inhibit virulence factors of the soft rot and blackleg pathogen pectobacterium brasiliense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, MPMI-08-20-0224. https://doi.org/10.1094/mpmi-08-20-0224-r

Koroney, A. S., Plasson, C., Pawlak, B., Sidikou, R., Driouich, A., Menu-Bouaouiche, L., & Vicré-Gibouin, M. (2016). Root exudate ofSolanum tuberosumis enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of Pectobacterium atrosepticum. *Annals of Botany*, 118(4), 797–808. https://doi.org/10.1093/aob/mcw128

Kurm, V., Mendes, O., Gros, J., & van der Wolf, J. (2023). Potato tuber origin and microbial composition determines resistance against soft rot Pectobacteriaceae. *European Journal of Plant Pathology*. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02763-3

Lebecka, R. (2017). Screening for Potato Resistance to Blackleg and Soft Rot. *Plant Breeding and Seed Science*, 75(1), 97–104. https://doi.org/10.1515/plass-2017-0013

Lebecka, R., Wasilewicz-Flis, I., & Mańkowski, D. (2020). Diploid Potato Germplasm with Resistance to Dickeya solani. *Potato Research*, 64(3), 375–385. https://doi.org/10.1007/s11540-020-09482-w

Padilla-Gálvez, N., Luengo-Uribe, P., Mancilla, S., Maurin, A., Torres, C., Ruiz, P., France, A., Acuña, I., & Urrutia, H. (2021). Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum L.) against Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum and Pectobacterium atrosepticum. *BMC Microbiology*, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12866-021-02393-x

Sledz, W., Motyka-Pomagruk, A., Zukowska, D., Babinska-Wensierska, W., Zoledowska, S., & Lojkowska, E. (2023). Genotypic and phenotypic uniformity among the population of Pectobacterium atrosepticum strains isolated during three growing seasons from potato fields in Poland. *European Journal of Plant Pathology*. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02687-y

Taktaev, B. A., Podberezko, & I. M. (2020). Development of disease in potato varieties of different ripeness groups on a natural infection background in the Southern Forest Zone of Ukraine. *Potato growing: Interdepartmental thematic scientific collection*, 45.

Van den Bosch, T. J. M., Niemi, O., & Welte, C. U. (2019). Single gene enables plant pathogenic Pectobacterium to overcome host-specific chemical defence. *Molecular Plant Pathology*, 21(3), 349–359. https://doi.org/10.1111/mpp.12900

Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Gomes, N. C. M., Schloter, M., Berg, G., & Smalla, K. (2009). Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3859–3865. https://doi.org/10.1128/aem.00414-09

Отримано редакцією журналу / Received:16.10.23
Прорецензовано / Revised: 17.11.23
Схвалено до друку / Accepted: 17.11.23

Nataliia HRYTSEVA[1], PhD Student
ORCID ID: 0009-0005-7983-0377
e-mail: nataliyavorobiova@ukr.net

Tetiana BABYCH[1], Student
ORCID ID: 0009-0007-2864-4958
e-mail: babich.tanya3101@gmail.com

Anna ANDRIIENKO[1], Student
ORCID ID: 0009-0001-9068-5546
e-mail: anna1703andr@gmail.com

Ksenia RUBANIK[2], Pupil
ORCID ID: 0009-0001-4934-6390
e-mail: rubanikk236@gmail.com

Yuliia YUMYNA[1], PhD (Biol.), Assoc. Prof.
ORCID ID: 0000-0002-4568-1415
e-mail: juliayumyna@ukr.net

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
[2]Specialized school № 173, Kyiv, Ukraine

ASSESSMENT OF RESISTANCE TO THE PATHOGEN OF SOFT ROT AND BLACKLEG COMMON IN UKRAINE POTATO VARIETIES

B a c k g r o u n d . ***The potato crop is affected by various diseases, including blackleg and soft rot caused by Pectobacterium atrosepticum. One of the reasons for the rapid spread of these bacterial pathogens is the absence of commercial potato varieties with natural immunity to blackleg and soft rot. While some potato varieties may exhibit partial resistance, the lack of complete resistance contributes to the widespread occurrence of these diseases. The study aimed to evaluate the resistance of potato varieties most common in Ukraine to blackleg and soft rot pathogens.***

M e t h o d s . ***Potato varieties from different region of Ukraine were used in the study. 24 h culture of Pectobacterium atrosepticum B-1084T was used for assessing potato sensitivity to soft rot and blackleg. Potato susceptibility to soft rot pathogen was evaluated by two criteria: disease incidence (%) and disease severity (weight and area of macerated tissue).***

R e s u l t s . ***Potato tubers of different varieties, as well as of the same varieties, but grown in different regions of Ukraine, showed different levels of resistance to the museum strain of soft rot and blackleg pathogen. The disease incidence – the proportion of tubers with symptoms of rotting for all analyzed potato varieties reached 100 %.Tubers of the Riviera variety obtained from the Odesa region were significantly more affected by the pectolytic enzymes of P. atrosepticum B-1084T as compared to tubers of other cultivars: macerated area in tubers of this variety was 1.5 times higher than those in Queen Anne, Riviera (Chernihiv) and Bellarosa (Odesa) varieties. The median of maceration area of Picasso and Bellarosa (Chernihiv) tubers were 2.5 times smaller than that in the Riviera variety. These patterns of sensitivity to soft rot and blackleg pathogen were also confirmed by the results of comparative assessment of the weight of.***

C o n c l u s i o n s . ***Thus, Riviera potato variety was most susceptible to the infection with soft rot and blackleg pathogen. Potato cultivar Picasso was the least sensitive to P. atrosepticum B-1084T. Potato tubers of the same variety grown in different regions of the country had different susceptibility rates to the soft rot and blackleg pathogen, indicating that the field effect outweighs the influence of genotype.***

K e y w o r d s : ***potato, phytopathogens, resistance, Pectobacterium atrosepticum, Solanum tuberosum.***

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

Наукове видання

ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 4(95)

Редактор *Н. Земляна*

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. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали.

Формат 60x84$^{1/8}$. Ум. друк. арк. 5,23. Наклад 300. Зам. № 223-10822.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б4.
Підписано до друку 28.12.23

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"
Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 58; (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@knu.ua; vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
https://vpc.univ.kiev.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02