

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

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

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

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є.О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; В.К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук, проф.; М.Е. Держинський, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН.; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук, доц.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.; М.Ю. Макарчук, д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.
Адреса редколегії	03187, Київ-33, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12, біологічний факультет; ☎ (38044) 522 17 95
Затверджено	Вченою радою біологічного факультету 16 лютого 2010 року (протокол № 7)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.99
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації КВ № 16053-4525 ПР від 09.11. 2009
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ЗМІСТ

Собко В., Мартинюк В.

Вплив електромагнітного поля частотою 8 Гц на клітинні ушкодження

та запрограмовану клітинну загибель

Матвєєва Н., Берегова Т., Кваско О.

Біосинтез пребіотика інуліну в рослинах цикорію в культурі in vitro

Зикова М., Джаган В.

Дискоміцети національного природного парку "Голосіївський"

Кравченко В., Дубовик В., Максимович К., Макаруч М.

Електрична активність головного мозку чоловіків

при перегляді афективних та нейтральних зображень

Бурхан А., Семчук Л., Ромашев С.

Експериментальна коеволюція бактеріофагу 8573 sm

з фітопатогенним хазяїном *Pseudomonas fluorescens*

Клиш Ю., Верьовка С.

Асоційовані з мембранами компоненти ендогенної інтоксикації та їх роль в онтогенезі

Малиновська І., Домбровська І.

Стан мікробіоценозу сірого лісового ґрунту за різноцільового використання

Сенін С., Дворщенко К., Бородіна Т., Остапченко Л.

Фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин слизової оболонки шлунка щурів

за умов тривалої гіпоацидності

Карбовська Л., Горенко З., Бабан В., Весельський С.

Вміст ліпідних компонентів в жовчі щурів під впливом окситоцину

Куценко Т., Костенко С.

Інтерференція між подразниками першої та другої сигнальних систем у жінок і чоловіків

Майданюк А.

Визначення сумарного вмісту аденінових компонентів тимочитів спектрометричними методами

Сорокіна Л., Білюк А., Хижняк С.

Вплив натрій дихлорацетату на перебіг проокисно-антиоксидантних процесів

в організмі мишей з саркомою 37

Фурзікова Т., Сорокулова І., Лутченко В., Путніков А.

Ростова активність складових біосорину при використанні відварів лікарських рослин

Смоля А., Чудовська О., Таран Н.

Розробка практично-ігрового заняття з біотехнології рослин англійською мовою

Терлецький Б., Мінченко Д., Губеня О., Мінченко О.

Вплив гіпоксії, дефіциту глюкози або глютаміну на експресію генів GAS,

що специфічно пригнічують ріст, у клітинах гліоми U87 залежить

від функції гена ендоплазматичний ретикулум-ядро-1

Карпюк Т., Футорна О.

Паліноморфологічна характеристика родів *AECHMEA* Ruiz. & Pav.,

BILLBERGIA Thunb, *NEOREGELIA* L.B.Smith, *NIDULARIUM* Lem. родини *BROMELIACEAE* Juss

Торгало Є., Остапченко Л.

Вплив різних форм кверцетину на пероксидне окиснення ліпідів

при експериментальній цереброваскулярній патології (геморагічному інсульті)

CONTENTS

Sobko V., Martynyuk V.	
Effects of electromagnetic field with frequency of 8 Hz on the cell injury and programmed cell death.....	
Matvieieva N, Beregova T, Kvasko O.	
Biosynthesis of prebiotic inulin in <i>in vitro</i> chicory plants.....	
Zykova M., Dzhagan B.	
Discomycetes of the National Nature Park "Golosiiv"	
Kravchenko V., Dubovic V., Maksymovych K., Makarchuk M.	
Brain electric activity of men during presentation of affective and neutral pictures	
Makarchuk M, Fedorchuk S, Chikina L, Martynchuk O, Krivoruchko L, Trushina V.	
Does human communication asymmetry temperature changes left and right ear drum	
to the nature of psycho-physiological stress?	
Burhan A., Semchuk L., Romashev S.	
Experimental coevolution with bacteriophage 8573 sm host pathogenic <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Klys Yu., Veruyvka S.	
On the role of membrane-associated components of endogenous intoxication in cancer.....	
Malinovskaya I. Dombrovskaya I.	
The state of gray forest soil microflora by using different	
Senin S., Dvorshchenko K., Borodina T., Ostapchenko L.	
Phospholipid and fatty acid composition of the gastric mucosa cells of rats under the conditions	
of long-term hypoacidity.....	
Karbovska L., Gorenko Z., Baban V., Veselsky S.	
Lipid composition of the bile at the influence of oxytocin	
Kutsenko T., Kostenko S.	
Interference between verbal and color information for women and men	
Maidanuyk A.	
Spectrometric assay of level adenine row components of thymocytes.....	
Sorokina L.	
Influence of sodium dihydrochloride the course of oxidation-antioxidant processes	
in the body of mice with sarcoma 37	
Furzikova T., Sorokulova I. Lutchenko V., Putnikov A.	
Rostov activity components biosynony using decoctions of medicinal plants	
Terletsky B., Minchenko D., Hubenya O., Minchenko O.	
Effect of hypoxia, glucose and glutamine deprivation on the expression of GAS, growth arrest genes,	
in glioma U87 cells depends from endoplasmic reticulum – nuclei-1 gene function.....	
Karpiuk T., Futorna O.	
Pollen morphology of the <i>GENERA AECHMEA RUIZ. & PAV.</i> ,	
<i>BILLBERGIA THUNB, NEOREGELIA L.B.SMITH, NIDULARIUM LEM</i> of the family <i>BROMELIACEAE JUSS</i>	
Torgalo E., Ostapchenko L.	
Influence different form quercetin and lipoflavon and lipid peroxidative under hemorrhage apoplexy progress	

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ ЧАСТОТОЮ 8 ГЦ НА КЛІТИННІ УШКОДЖЕННЯ ТА ЗАПРОГРАМОВАНУ КЛІТИННУ ЗАГИБЕЛЬ

Методом подвійного прижиттєвого фарбування клітин за допомогою флуоресцентних барвників – Hoechst-33258 та пропідіум йодид, – досліджували вміст живих, некротичних та апоптуючих клітин, а також їх морфологічні особливості у суспензії ізольованих тимоцитів щурів після годинної та трьохгодинної інкубації з 0,1 мМ пероксидом водню та при впливі електромагнітного поля, як при окремому, так і комбінованому впливі. Виявлено апоптогенний ефект пероксиду водню, як моно впливу, так і в поєднанні з дією 8 Гц, встановлена динаміка некротичних та апоптичних процесів, зокрема динаміка конденсації хроматину, фрагментації ядра та утворення апоптичних тілець. Знайдено, що вплив електромагнітного поля частотою 8 Гц у комбінації з дією пероксиду водню на суспензію тимоцитів призводить до збільшення загальної кількості апоптуючих клітин в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином. Зроблено припущення, що вплив 8 Гц в певній мірі активує запуск механізмів апоптозу, але як захисну відповідь на перекисне пошкодження.

Using the method of double cell staining by fluorescent dyes (Hoechst-33258 and propidium iodide) content of alive, apoptic and necrotic cells in suspension of isolated rat thymocytes and also their morphological features after one and three hour of incubation with 0.1 mM hydrogen peroxide and exposure to electromagnetic fields, considering both individual and combined effects, were studied. The apoptic effect of hydrogen peroxide as the monoinfluence and in combination with the action of 8 Hz was detected; the dynamics of apoptic and necrotic processes were installed, including the dynamics of chromatin condensation, nucleus fragmentation and formation of apoptic bodies. It was found that the exposure of the suspension of thymocytes to electromagnetic fields with frequency of 8 Hz combined with the action of hydrogen peroxide led to the increased number of apoptic cells mainly due to cells with condensed chromatin. It was supposed that the influence of 8 Hz in some way activates apoptosis execution mechanisms, but as a protective response to peroxide damage.

Вступ. Тривалий час увагу дослідників привертають електромагнітні поля низьких частот, що обумовлено декількома причинами. По-перше, виявлена їхня екологічна важливість, в тому числі природних геомагнітних варіацій, які присутні в біосфері з початку її існування, які, без сумніву, відіграють важливу роль при розвитку онтогенезі. Ще в 50-х роках німецьким вченим Уінфредом Отто Шуманом визначена резонансна частота Землі – 7,83 Гц, яка пізніше була названа резонансом Шумана [8]. Електромагнітні коливання на цій частоті постійно існують в навколишньому середовищі і модулюються космічною і земною погодою [3]. По-друге, в процесі розвитку цивілізації людина все більше ізолює себе від природного низькочастотного електромагнітного впливу, перебуваючи в бетонних спорудах, автомобілях, літаках та інших екрануючих об'єктах, та, використовуючи електронні пристрої, людство піддає себе дуже широкому спектру електромагнітних впливів, штучного походження, що може впливати на фізіологічні процеси та гомеостаз організму, еволюційно сформованого при впливі постійного природного електромагнітного фону Землі. По-третє, одним з актуальних питань сучасної біофізики є оцінка можливості електромагнітних полів низьких частот індукувати і модулювати (модифікувати) загибель клітин, зокрема апоптоз. Оскільки апоптоз являє собою активну форму клітинної загибелі, яка є фізіологічним механізмом усунення надлишкових та (чи) фізіологічно неповноцінних клітин, то дослідження впливу електромагнітних хвиль низькочастотного діапазону на апоптоз має велике значення як для розробки нових методів, як в експериментальній біології і біотехнології, так і в медицині. Це питання є також важливим для вирішення проблем екології людини. Аналіз літератури показує, що це дискусійне питання, однак підставою для дослідження проблеми є окремі результати, які свідчать саме про такий вплив [9].

Зручною моделлю для дослідження апоптозу є суспензія ізольованих тимоцитів – неповністю диференційованих клітин, які характеризуються високою нестабільністю геному, порівняно з іншими клітинами, та низькою активністю систем репарації одноланцюгових розривів ДНК, що полегшує активацію різних шляхів апоптозу за дії різноманітних чинників. Використання ізольованих тимоцитів для дослідження апоптозу *in vitro* дозволяє здійснювати морфологічний контроль стану

тимоцитів і виявляти клітини з фрагментованим хроматином та апоптичні тілця, тоді як *in vivo* останні швидко поглинаються фагоцитами.

Проблема впливу електромагнітних хвиль низькочастотного діапазону на життєдіяльність тимоцитів та інших клітин є мало дослідженою, що потребує ретельного вивчення. Тому метою роботи було дослідити особливості впливу магнітного поля наднизьких частот (МП ННЧ) на морфологічні зміни структури хроматину та оцінити рівень фрагментації ДНК в тимоцитах при їх пошкодженні пероксидом водню.

Об'єкт та методи досліджень. Тимоцити отримували з тимусу щурів лінії Вістар масою 120-150 г., котрі утримувалися на стандартному раціоні виварію. Виділений тимус перетирали через ситечко із синтетичного волокна ($\varnothing = 0,1$ мм) в буферному розчині наступного складу (г/л): NaCl – 6,796; KCl – 0,274; CaCl₂ – 0,288; NaHCO₃ – 2,091; KH₂PO₄ – 0,299; MgSO₄ – 0,144; глюкоза – 1,8; (рН 7.4). Кількість клітин підраховували за допомогою світлового мікроскопа у камері Горяєва з використанням барвника (0,4 % р-н трипанового синього).

Інкубацію тимоцитів ($2-4 \times 10^6$ кл/мл) здійснювали у водному термостаті при 37°C в стаціонарному середовищі RPMI-1640 з додаванням 2,05 мМ глутаміну. Інкубація проводилася протягом 3 годин.

Клітини (тимоцити) у вигляді суспензії піддавали дії досліджуваних чинників, після чого спостерігали морфологічні зміни, виявлені методом подвійного прижиттєвого фарбування клітин за допомогою флуоресцентних барвників. Зокрема Hoechst-33258, який вільно проникає через клітинні мембрани, зв'язується в ядрі з ДНК із зовнішнього боку спіралі, зумовлюючи при цьому флуоресценцію в синій (блакитній) області спектра [6]. Пропідіум йодид проникає лише в некротичні клітини та інтеркалює у спіраль ДНК, зумовлюючи флуоресценцію в червоній області спектра [7].

Окисний стрес є одним з типових механізмів пошкодження клітин шляхом індукції некрозу та апоптозу, саме тому було обрано цю робочу модель. Поширеним методологічним підходом дослідження клітин при окисному стресі є вплив на культуру клітин екзогенних активних форм кисню (АФК). В нашому експерименті в ролі такого агенту виступав пероксид водню в кінцевій концентрації 0,1 мМ [4].

Зразки піддавали магнітній обробці імпульсним магнітним полем, яке створювали за допомогою кільця Гельмгольца. Імпульси були прямокутної форми та різної полярності. Частота магнітного поля складала 8 Гц, індукція – 25 мкТл. Частота магнітного поля вибрана на основі її екологічної та геофізичної значущості. Вектор індукції створюваного магнітного поля був паралельним вектору геомагнітного поля. Досліджувані зразки поміщували в кільця Гельмгольца. Контрольні проби знаходились в умовах фонових значень МП ННЧ, характерних для даної лабораторії (20-65 нТл). Для оцінки можливого впливу різниць у рівні фонових магнітних полів в місцях розташування дослідних та контрольних зразків проводили експерименти з псевдовпливом магнітного поля. В цьому випадку досліджувані зразки поміщали в кільця Гельмгольца, не піддаючи дії магнітного поля. Для оцінки достовірності впливу МП ННЧ використовували t-критерій Стюдента для незалежних попарно зв'язаних вибірок.

В даному експерименті використовували наступні умови: контрольна суспензія клітин; клітинна суспензія, котра піддавалася впливу електромагнітних хвиль частотою 8 Гц протягом інкубації; з додаванням перексиду водню до кінцевої концентрації 0,1 мМ в інкубаційне середовище; комбінація електромагнітного впливу з перексидом водню в середовищі інкубації.

Для оцінки вмісту життєздатних, некротичних та апоптичних клітин у суспензії застосовували метод подвійного прижиттєвого фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst-33258 (фірма SIGMA – Німеччина) та пропідіум йодид (фірма SIGMA – Німеччина) (кінцева концентрація барвників у суспензії 10 мкМ). Від середовища інкубації клітини відмивали буфером, після чого їх фарбували флуоресцентними барвниками протягом 15 хв у темряві при кімнатній температурі. Забарвлені клітини знову відмивали та фіксували в темряві 4% забуференим розчином формаліну (рН 7.4) протягом 5 хв і відмивали від формаліну тим же буфером. Аліквоту клітинної суспензії наносили на предметне скло, робили мазок та висушували у темряві. Морфологічну оцінку стану клітин проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Leica DM1000 (окуляр×10, об'єктив×100). У кожному зразку аналізували не менше 2000 клітин (4 підрахунку по 500 клітин).

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, використовуючи t-критерій Стюдента (оцінки достовірності різниць між статистичними вибірками).

Результати та їх обговорення. В результаті проведення серії експериментів було отримано дані щодо кількісної оцінки вмісту живих, некротичних та апоптичних клітин у суспензії тимоцитів у контролі та після дії досліджуваних чинників. Апоптичні клітини було розді-

лено та класифіковано за морфологічними ознаками в результаті прижиттєвого фарбування клітин із застосуванням двох флуоресцентних барвників (рис.1). Така класифікація використовується у дослідженнях процесів апоптозу [1, 6, 8].

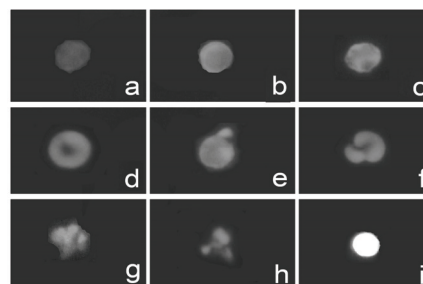


Рис. 1. Ядра тимоцитів за даними флуоресцентної мікроскопії (флуоресцентні барвники Hoechst-33258, пропідіум йодид). а – нормальна клітина; b,c,d – клітини з конденсованим хроматином; e,f,g – клітини з фрагментованим ядром; h – апоптичні тільця; i – некротична клітина

Дані, наведені на рис.2а, свідчать, що після годинної та трьохгодинної експозиції при впливі електромагнітного поля (ЕМП) частотою 8 Гц кількість життєздатних клітин майже не змінюється у порівнянні з контролем. При впливі 0,1 мМ H_2O_2 кількість життєздатних клітин зменшується на 12,1% та 23,9% відповідно у порівнянні з контролем, а при комбінованому впливі з ЕМП кількість життєздатних клітин зменшується відповідно на 15% та 28,4% у порівнянні з контролем. Кількість некротичних клітин суттєво не змінюється відносно контролю як при годинній, так і трьохгодинній експозиції тимоцитів при впливі ЕМП 8 Гц, 0,1 мМ H_2O_2 та при комбінованому впливі (рис.2б). Як видно з даних, представлених на рис.2в, кількість апоптичних клітин при впливі ЕМП 8 Гц як при годинній, так і трьохгодинній експозиції майже не змінюється у порівнянні з контролем, тоді як при впливі 0,1 мМ H_2O_2 та комбінованому впливі 0,1 мМ H_2O_2 й ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин збільшується на 11% та 14,3% відповідно після годинної експозиції у порівнянні з контролем та на 22,5% і 27,2% відповідно після трьохгодинної експозиції у порівнянні з контролем. Отже, варто звернути увагу на те, що при комбінованому впливі апоптичних клітин достовірно більше, ніж при дії лише перексиду водню, що може вказувати на важливу роль МП ННЧ в ініціації каскадів захисних механізмів клітини, а також на зміну інших фізіологічних функцій, що спричинюється ЕМП 8 Гц саме у відповідь на пошкоджуючі фактори.

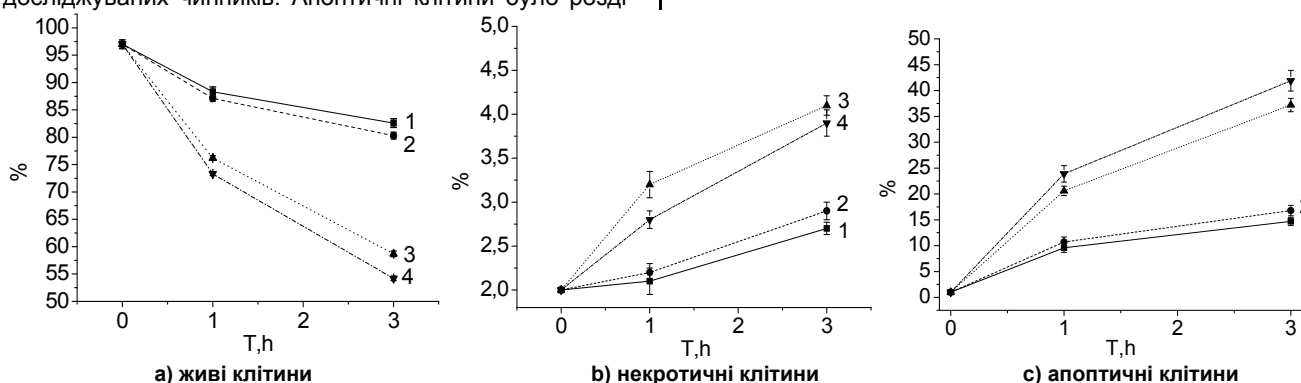


Рис.2. Життєздатність клітин.
1) контроль; 2) 8 Гц; 3) H_2O_2 ; 4) 8 Гц + H_2O_2

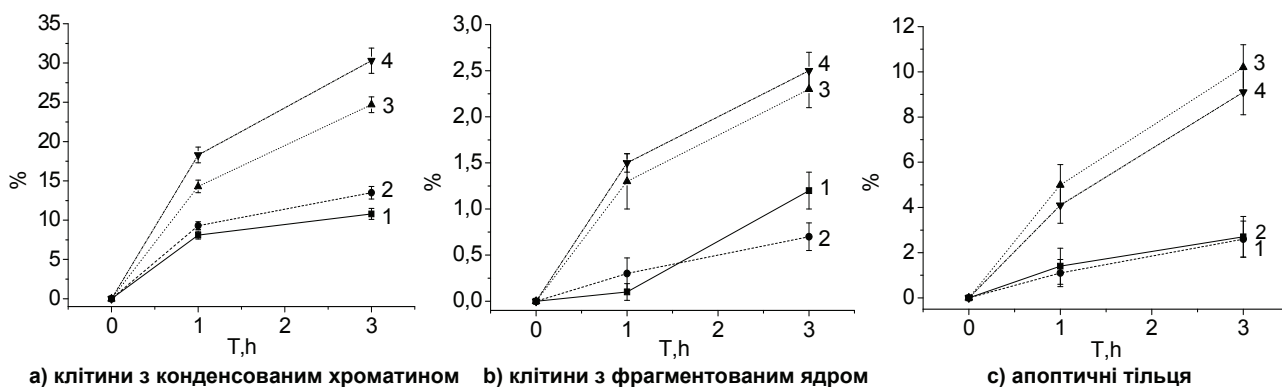


Рис.3. Апоптичні клітини у процентах від загальної кількості клітин.

1) контроль; 2) 8 Гц; 3) H_2O_2 ; 4) 8 Гц+ H_2O_2

Основною морфологічною ознакою апоптозу тимоцитів, спричиненого дією H_2O_2 у відповідній концентрації, є збільшення кількості клітин із конденсованим хроматином. А як відомо, конденсація хроматину – це проміжний етап апоптозу, який у випадку, коли спостерігається значна кількість розривів ДНК, супроводжується її фрагментацією та появою апоптичних тілець [2]. Таку ж тенденцію ми спостерігали і в нашому експерименті, коли кількість апоптичних клітин збільшується в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином (рис. 3а). У зразках, що піддавалися впливу 8 Гц не спостерігалось суттєвого коливання показника апоптичних клітин, тоді як при дії H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин з конденсованим хроматином достовірно збільшується на 6,5% та 10,7% ($p < 0,05$) відповідно після годинної експозиції у порівнянні з контролем та на 14,4% і 19,9% ($p < 0,05$) відповідно після трьохгодинної експозиції у порівнянні з контролем.

Після годинної та трьохгодинної експозиції тимоцитів при дії трьох варіантів досліджуваних чинників кількість апоптичних клітин з фрагментованим ядром та апоптичними тільцями майже не змінюється відносно контролю, за винятком трьохгодинної експозиції тимоцитів при впливі H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП 8 Гц, коли кількість клітин з апоптичними тільцями зростає на 7,5% та 6,4% відповідно у порівнянні з контрольними зразками.

З отриманих результатів можна зробити висновок, що вплив 8 Гц в певній мірі активує запуск механізмів апоптозу, але, ймовірно, як захисну відповідь на перекисне пошкодження. Оскільки після трьохгодинної експозиції тимоцитів при комбінованому впливі 0,1 mM H_2O_2 і ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин збільшується на 4,7% ($p < 0,05$) у порівнянні з кількістю апоптичних клітин після трьохгодинної експозиції тимоцитів при моновпливі 0,1 mM H_2O_2 .

Загалом треба відмітити, що механізми біологічної дії ЕМП ННЧ вивчені недостатньо, але незважаючи на цей факт, магнітні поля досить ефективно застосовують у сучасній медичній практиці. Зокрема їх використовують для протизапальної терапії, прискорення регенерації тканин та поліпшення мікроциркуляції. Вважа-

ють, що фізичною основою цієї дії є координація руху заряджених частинок [5]. Результатом цієї взаємодії є перш за все зміна мембранного потенціалу та активності процесів перекисного окислення ліпідів. Крім того, магнітне поле впливає на фізико-хімічні властивості води, вільно-радикальні хімічні реакції, макромолекули великих анізотропних діаманітних сполук [5].

Висновки.

1. При дії перекису водню спостерігається збільшення кількості апоптуючих клітин у порівнянні з контролем, а при комбінованому впливі з ЕМП частотою 8 Гц цей ефект посилюється.

2. Збільшення кількості апоптуючих клітин при впливі перекису водню та комбінованому впливі з ЕМП частотою 8 Гц відбувається в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином.

3. Збільшення кількості апоптичних клітин при комбінованому впливі H_2O_2 і ЕМП 8 Гц у порівнянні з моновпливом H_2O_2 , ймовірно, свідчить про посилену активацію механізмів ініціації апоптозу при впливі 8 Гц в присутності перекису водню.

1. Гринюк І.І., Корнійчук Г.М., Капранов О.О., Матишевська О.П. Зміни структурного стану хроматину в тимоцитах на ранньому етапі апоптозу за індукції перекисом водню і радіацією // Укр. біохім. журн. – 2004. – том 76, №5. – С. 90-95.
2. Коваль Т.В., Назарова О.О., Матишевська О.П. Зміна вмісту глутатіону в тимоцитах щурів за індукції апоптозу під впливом H_2O_2 або радіації // Укр. біохім. журн. – 2008. – том 80, №2. – С. 114-119.
3. Мартынюк В.С., Темурьянц Н.А., Владимирский Б.М. У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни. – Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2008. – 179 с.
4. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Е.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе // Цитология – 2009. – том 51, №4. – С. 329-334.
5. Холодов Ю.А. Способы использования магнитных полей в медицине и пути воздействия этих полей на организм // Магнитология – 1991. – № 1. – С. 6-11.
6. Hawley R., Hawley T. Flow Cytometry Protocols // Methods in Molecular Biology – 2004. – Vol. 263. – P. 34-37.
7. Moore A., Donahue C., Bauer K., Mather J. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death // Methods Cell Biol. – 1998. Vol. 57. – P. 265-78.
8. Schlegel K., Füllekrug M. Weltweite Ortung von Blitzen: 50 Jahre Schumann-Resonanzen // Physik in unserer Zeit – 2002. Vol. 33, №6. – P. 256-261.
9. Vysotskii V., Komilova A. Physical Model and Direct Experimental Observation of Water Memory and Biophysical Activity of Magnetic-Activated Water // Journal of Scientific Exploration – 2009. Vol. 23, №4. – P. 500-505.

Надійшла до редколегії 20.09.10

УДК 575.222.7:581.1

Н. Матвєєва, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук,
О. Кваско, інж.

БІОСИНТЕЗ ПРЕБІОТИКА ІНУЛІНУ В РОСЛИНАХ ЦИКОРІЮ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Визначено умови культивування *in vitro* цикорію *Cichorium intybus* L., які сприяють впливають як концентрація збільшенню маси коренів і підвищенню концентрації в них інуліну. Показано, що на ріст кореневої системи цикорію та вміст інуліну впливають як концентрація мікроелементів, так і присутність індолілмасляної кислоти. Зменшення концентрації мікроелементів і додавання ІМК приводило до значного збільшення питомого вмісту інуліну в коренях цикорію (до 92 мг/г сухої маси), що у 5 разів перевищує вміст інуліну при культивуванні рослин на середовищі MS.

The *in vitro* conditions which results in increase of roots weight and concentration of inulin in *Cichorium intybus* L. were investigated. On the MS medium with the reduced concentration of macroelements and 0,5 mg/l indolilbutiric acid inulin concentration in roots were 92 mg/g (dry weight), on the MS medium – 17 mg/g.

Вступ. Інунін належить до фруктанів, основою яких є трисахарид ізокестоза. Це запасний полісахарид, що синтезується мікроорганізмами [1], а також цілим рядом рослин, в тому числі, родини Asteraceae (*Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus*) [2]. Молекула інуліну (C₆H₁₀O₅)_n містить залишки фруктози, з'єднані між собою β-1, 2-глюкозидними зв'язками, та термінальну молекулу глюкози [3]. Інунін є сировиною для промисловості, наприклад, для одержання фруктози, спирту, а також технологічним інгредієнтом у виробництві харчових продуктів (йогуртів, морозива).

Завдяки своїм лікарським властивостям інунін застосовується у медичній практиці. Він виконує функцію сорбенту, зв'язуючи та виводячи з організму токсичні речовини. Ця сполука є пребіотиком, тобто сприяє росту корисної кишкової мікрофлори, зокрема, лакто- і біфідобактерій [4, 5]. Фруктани, в тому числі інунін, використовують як дієтичну добавку при порушеннях вуглеводного обміну, а також як лікувальний засіб при дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях [6]. Інунін є повноцінним замінником глюкози, позитивно впливаючи на обмін речовин. Сполука має гіпоглікемізуючий ефект, знижуючи рівень цукру, суттєво знижує вміст холестерину та тригліцеридів в крові хворих на діабет [7]. Інунін може застосовуватися як допоміжний засіб при лікуванні деяких форм онкологічних захворювань [8-10]. Вживання інуліну сприяє нормалізації обміну кальцію та магнію [11], а також ліпідів [12-14]. Завдяки останній властивості інунін використовують як дієтичну харчову добавку у раціоні хворих зі збільшеною вагою.

Інунін накопичується в коренях цикорію, причому кількість його може становити 15-20% і більше сирої ваги [15]. Показано, що в культурі *in vitro* також відбувається синтез інуліну. Так, для сорту цикорію Lucknow Local визначено, що при вирощуванні *in vitro* концентрація інуліну в коренях може удвічі перевищувати концентрацію *in vivo* [16].

Оскільки відомо, що *in vitro* ріст кореневої системи цикорію регулюється складом живильного середовища та наявністю/концентрацією регуляторів росту [17], становить інтерес вивчення впливу складу середовища на синтез запасного полісахариду інуліну в рослинах цикорію та порівняння вмісту інуліну у коренях та листках.

Матеріали й методи. Як вихідний матеріал використовували насіння цикорію *C. intybus* сорту Пала росса. Насіння стерилізували протягом 1 хв. в 70%-ном етанолі, 10 хв. в 25%-ному розчині препарату "Білізна", тричі по 10 хв. промивали дистильованою водою та пророщували на агаризованому безгормональному середовищі Мура-сиге і Скуга (MS) [18] у темряві при температурі 26°C.

У 12-денних проростків відділяли корені та культивували на агаризованих середовищах MS, MS із вдвічі зменшеною концентрацією макроелементів (1/2MS) і на тих же середовищах з додаванням 0,5 мг/л індолілмасляної кислоти (MS-ІМК і 1/2 MS-ІМК).

Вміст інуліну визначали за методикою, основою на здатності кетосахарів забарвлюватися резорцином у кислому середовищі [19]. Через 45 діб корені та листки висушували при 100°C протягом 10 хв., досушували при кімнатній температурі. До 100 мг сухого матеріалу додавали 5 мл дистильованої води. Потім до 5 мл проби додавали 5 мл 0,1% спиртового розчину резорцину та 5 мл концентрованої соляної кислоти, нагрівали на водяній бані 20 хв. Після цього розчину охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК (КФК-2) із зеленим світлофільтром (540 нм). Концентрацію інуліну визначали за калібрувальною прямою (калібрування по фруктозі).

Результати і обговорення.

Відомо, що інунін синтезується не тільки в рослинах, що ростуть у природних умовах у ґрунті, але також і в умовах стерильної культури, як у калюсних тканинах, так і в листках та коренях рослин [16, 20]. Склад живильного середовища суттєво впливає на ріст надземної частини та кореневої системи рослин у стерильній культурі. Факторами, які впливають на цей процес, являються концентрація макро- і мікроелементів, присутність і концентрація регуляторів росту. Останні, зокрема, ауксини, можуть у значній мірі прискорювати ріст коренів у культурі *in vitro*, а також збільшувати масу кореневої системи.

Нами показано, що зменшення концентрації макроелементів удвічі (1/2MS) призводить до збільшення через 45 діб маси кореневої системи в 2,12 рази. Додавання індолілмасляної кислоти до середовища MS збільшує масу коренів в 2,15 рази. Найбільша маса кореневої системи (в 3 рази більше, ніж на середовищі MS) спостерігалася при культивуванні цикорію на середовищі зі зменшеним удвічі концентрацією макроелементів та 0,5 мг/л ІМК.

Порівнянні вмісту інуліну у коренях та листках в культурі *in vitro* показує, що на середовищі MS синтез інуліну більш активно здійснюється саме у листках (рис. 1). Зменшення концентрації макроелементів (середовище 1/2 MS) призводить до збільшення вмісту інуліну у коренях та зменшення у листках. Додавання до живильного середовища ІМК має аналогічний ефект. Найбільша концентрація інуліну в листках (у середньому 45 мг/г сухої маси) спостерігалася при рості рослин на середовищах MS та MS-0,5 ІМК, найменша (15 мг/г) – на середовищі 1/2 MS-0,5 ІМК.

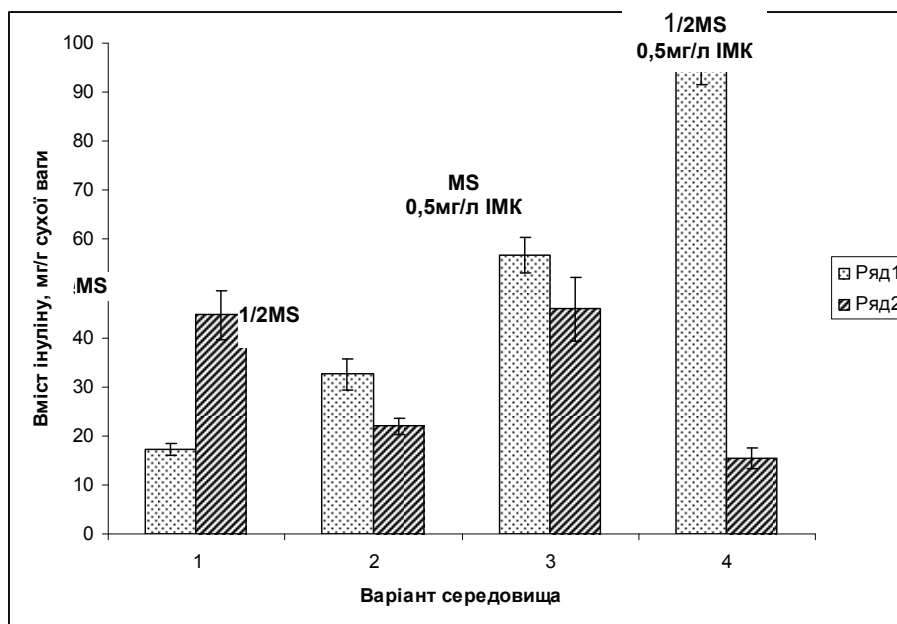


Рис. Залежність вмісту інуліну у коренях (ряд 1) та листках (ряд 2) цикорію від складу живильного середовища

У коренях максимальний вміст інуліну спостерігався при рості рослин на середовищі 1/2MS-0,5ІМК, мінімальний – на середовищі MS. Зменшення вдвічі концентрації макроелементів і додавання до середовища 0,5 мг/л ІМК сприяло значному (більш ніж в 5 разів) збільшенню накопичення інуліну в коренях цикорію, концентрація якого при оптимальному складі середовища склала 92 мг/г сухої маси коренів. Очевидно, що значне збільшення вмісту інуліну у коренях на середовищі 1/2 MS-0,5 ІМК корелює зі збільшенням маси кореневої системи. Однак, такий результат, очевидно, обумовлений не тільки більшою масою коренів, оскільки спостерігалось збільшення саме відносного змісту інуліну в перерахуванні на 1 г сухої маси коренів.

Висновки. Визначено умови культивування *in vitro* цикорію *Cichorium intybus* L., які сприяють збільшенню маси коренів і підвищенню концентрації в них інуліну. На ріст кореневої системи цикорію в культурі *in vitro* впливають як концентрація макроелементів, так і присутність індолілмасляної кислоти. На середовищі MS зі зменшеним змістом макроелементів і 0,5 мг/л ІМК маса кореневої системи в 3 рази перевищувала масу коренів, які утворювалися на середовищі MS. Концентрація інуліну у листках цикорію (до 45 мг/г) виявилася меншою, ніж у коренях. Зменшення концентрації макроелементів і додавання ІМК приводило до значного збільшення питомого вмісту інуліну в коренях цикорію. Цей показник становив 92 мг/г сухої маси коренів, що майже в 5 разів перевищує вміст інуліну, що спостерігався при культивуванні рослин на середовищі MS.

1. Van Balken J.A.M., Van Dooren J.G.M., Van den Tweel W.J.J. et al. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1-fructosyltransferase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1991. – Vol. 35, № 2. – P. 216-221. 2. Baert J.R.A., Van Bockstaele E.J. Cultivation and breeding of root chicory for inulin production // *Industrial Crops and Products.* – 1992. – Vol.1, № 2-4. – P. 229-234. 3. Van den Ende, Michiels W., A., De Roover J., Van Laere A. Fructan biosynthetic and breakdown

enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development. // *Sci. World J.* – 2002. – vol. 11 № 2. – P. 1273–1287. 4. Kelly G. Inulin-type prebiotics-a review: part 1 // *Altern. Med. Rev.* – 2008. – vol. 13, № 4. – P. 315-329. 5. Özer D., Akin S., Özer B. Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in *Acidophilus-Bifidus* Yoghurt // *Food Sci. and Technol. International.* – 2005. – vol. 11, № 1. –P. 19-24. 6. Roberfroid M.B. Introducing inulin-type fructans // *Br. J. Nutr.* – 2005. – Vol.93, № 1. – P.13-25. 7. Kaur N., Gupta A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // *J. Biosci.* – 2002. – Vol. 27, № 7. – P. 703–714. 8. Pool-Zobel B. L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data // *British J. of Nutr.* – 2005. – Vol. 93, № 1. – P. 73–90. 9. Taper H.S., Lemort C., Roberfroid M.B. Inhibition effect of dietary inulin and oligofructose on the growth of transplantable mouse tumour // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol. 18, № 6. – P. 4123–4126. 10. Taper H.S., Roberfroid M.B. Nontoxic potentiation of cancer chemotherapy by dietary oligofructose or inulin // *Nutr. Cancer.* – 2000. – Vol. 38, № 1. – P.1–5. 11. Abrams S. A, Griffin I. J., Hawthorne K. M. et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 82, № 2. – P. 471-476. 12. Kok N.N., Taper H.S., Delzenne N.M. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats // *J. Appl. Toxicol.* – 1998. – Vol. 18, № 1. – P. 47-53. 13. Delzenne N.M., Kok N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism // *Am. J. Clin Nutr.* – 2001. – Vol. 73, № 1-2. – P. 456 – 458. 14. Delzenne N.M., Daubioul C., Neyrinck A. et al. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects // *Br. J. Nutr.* – 2002. – Vol. 87, № 2. – P. 255-259. 15. Figueira G. M., Park K.J., Reis Brod F. P., Honório S. L. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation // *J. Food Engineer.* – 2004. – vol.63. – P. 273-380. 16. Ranjitha Kumari B.D., Velayutham P., Anitha S.A. Comparative Study on Inulin and Esculin Content of *in vitro* and *in vivo* Plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow Local) // *Advances in Biol. Res.* – 2007. – vol. 1, № 1-2. – P. 22-25. 17. Park E., H. Lim Establishment of an efficient *in vitro* plant regeneration system in chicory (*Cichorium intybus* L. var. *Sativus*) // *International symposium on vegetable quality of fresh and fermented vegetables.* – 2006. – № 4. – P. 115. 18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – vol.15, № 3. – P. 473–496. 19. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др.. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С.143. 20. Baert J. R. A. The effect of sowing and harvest date and cultivar on inulin yield and composition of chicory (*Cichorium intybus* L.) roots // *Industrial Crops and Products.* – 1997. – vol 6, № 3-4. – P. 195-199.

Надійшла до редколегії 14.07.10

УДК 582.282.16(477)

М. Зикова, асп.,
В. Джаган, канд. біол. наук

ДИСКОМІЦЕТИ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ "ГОЛОСІЇВСЬКИЙ"

Представлено дані досліджень видового складу дискосміцетів Національного природного парку "Голосіївський". На території парку відмічено 75 видів, що належать до 44 родів 19 родин 6 порядків класів Leotiomycetes, Pezizomycetes та Orbiliomycetes. Домінуючими за кількістю видів виявились порядки Helotiales (32 види) та Pezizales (29 видів). Проаналізовано субстратну приуроченість виявлених видів та розподіл їх за основними деревним породами парку.

Species diversity of the discomycetes from the National Nature Park "Golosiiv" was investigated. 75 species from 44 genera 19 families 6 orders that belong to the Leotiomycetes, Pezizomycetes and Orbiliomycetes were recorded. Helotiales and Pezizales have been found to dominate by the number of species. The substrate analysis of the species found and their distribution over the main wood species was analysed.

Вступ. Найбільш великою, проте досі недостатньо вивченою групою серед усіх грибів є сумчасті (відділ Ascomycota), які відіграють важливу роль у деградації рослинних субстратів, зокрема, деревини та листового опаду. Дискосміцети не є окремим таксоном в межах Ascomycota, під цією назвою поєднані декілька еволюційно незалежних груп грибів, яка характеризується відкритими плодовими тілами – апотеціями та специфічним апікальним апаратом сумок [10, 12].

Для більшості регіонів України відомості про видовий склад дискосміцетів відсутні, або мають фрагментарний характер та потребують критичного перегляду. Це стосується і Національного природного парку "Голосіївський" (далі по тексті – Голосіївський НПП), на території якого цілеспрямовані дослідження дискосміцетів проводились понад 80 років тому. Отже, метою нашої роботи було встановити видовий склад дискосміцетів Голосіївського НПП, провести їх систематичний та еколого-субстратний аналіз. Отримані нами дані дозволять в майбутньому проаналізувати функціональну роль дискосміцетів в природних екосистемах та з'ясувати закономірності їх розповсюдження на зазначеній природоохоронній території.

Голосіївський НПП було створено Указом Президента України 27 серпня 2007 року № 794/2007 на площі 4525,52 га. Він розташований в південній частині міста Києва, в Голосіївському районі. Парк знаходиться на межі двох природних ландшафтів – лісостепового та заплавного, з чим пов'язана унікальність даної природно-заповідної території як регіону. На території парку переважає лісова рослинність. Велику частину парку (2730,4 га) займають соснові ліси, що знаходяться переважно в його південній частині. Дубові ліси (560,2 га) переважають в північній частині, найбільше їх зосереджено в Голосіївському лісі. Значно менші площі припадають під чорновільхові (263,6 га), грабові (197,7 га), ясеневі (143,4 га), чорнотополеві (75,9 га), березові (60,9 га), липові (52,6 га) та вербові (верби козячої, 35,6 га) ліси [3, <http://www.nppg.gov.ua>].

Перші згадки про дискосміцети парку відносяться до початку ХХ століття, коли З.К. Гіжицька вивчала мікобіоту лісів навколо Києва, і, зокрема, велику увагу звертала на дискосміцети [1]. Згодом ґрунтовному вивченню дискосміцетів були присвячені дослідження М.Ф. Сміцької. Слід зазначити, що її увага була прикута не лише до певної обмеженої території, а збір матеріалу і дослідження проводились по всій території України. В цей час було підготовлено низку робіт, які значно доповнили список дискосміцетів країни [5]. Деякі відомості щодо дискосміцетів містяться в роботах І.О. Дудки. Так, вивчаючи флору водних грибів України, на території Голосіївського лісу були відмічені дискосміцети, що зростали в дуже зволжених умовах, зокрема на деревині, зануреній у воду [2].

Отже, за наявними літературними даними до наших досліджень для парку було відомо всього 35 видів дискосміцетів. Таким чином, дослідження видового складу дискосміцетів Голосіївського НПП, а також детальне вивчення всієї мікобіоти даної природоохоронної території, є актуальним і необхідним.

Об'єкт та методи досліджень. Збір зразків дискосміцетів проводили протягом вегетаційних сезонів 2007-2010 рр. у різних частинах парку, зокрема, найбільша кількість зразків була зібрана в великому лісовому масиві Голосіївський ліс, а також у парку ім. М. Рильського, заказнику "Лісники" та урочищі Теремки. Зібрані зразки плодівих тіл дискосміцетів інсеровані до гербарію Київського національного університету імені Тараса Шевченка (KWU).

Для ідентифікації зразків були залучені роботи та визначники Р. Денніса (Dennis, 1978), М.Ф. Сміцької (1980), А.Г. Райтвійра (1991), а також атлас "Fungi of Switzerland", деякі регіональні монографії, зокрема Nordic Macromycetes, vol. 1, Ascomycetes [4, 5, 7, 9, 11]. Виявлені види грибів розміщені відповідно до системи, прийнятої Д.С. Гіббеттом зі співавторами [10]. Обсяг порядків та сучасні назви грибів узгоджено з 10-м виданням "Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi" [12] та номенклатурною базою даних "CABI Bioscience Databases. Index fungorum" [<http://indexfungorum.org/Names/Names.asp>].

Результати та їх обговорення. За результатами здійснених нами власних зборів, аналізу літератури, із врахуванням матеріалів мікологічних гербаріїв (KW, KWU), для території парку на сьогодні відомо 75 видів дискосміцетів, що належать до 44 родів 19 родин (дві родини не мають точного систематичного положення – incertae sedis) 6 порядків (один порядок також з невизначеним систематичним положенням) та 3 класів відділу Ascomycota.

Домінуючим за кількістю видів є порядок *Helotiales*, що включає 7 родин (1 родина з невизначеним систематичним положенням) і відповідно 32 види. Меншою кількістю видів, а саме 29 видами з 8 родин, представлений порядок *Pezizales*. Порядки *Rhytismatales*, *Orbiliiales* та *Leotiales* включають досить незначну кількість видів (від 1 до 3). Серед родового спектру найбільшу кількість видів налічують роди *Hymenoscyphus* (7 видів), *Mollisia* та *Peziza* (по 5 видів); решта родів представлена 1-3 видами.

Для території парку ми вперше наводимо 37 видів дискосміцетів, серед яких є рідкісні види, що відомі лише за кількома місцезнаходженнями на території України. Так, апотеції *Caloscypha fulgens*, знайдені у парку в штучному насадженні ялини, представляють третю знахідку даного виду в Україні. Варто зазначити, що цей вид є рідкісним і в країнах Європи, де трапляється спорадично на всій частині свого ареалу. Також у парку

нами було знайдено *Gyromitra slonevskii* – рідкісний вид, занесений до Червоної книги України [6].

Видовий склад дискосміцетів Голосіївського НПП характеризується значною різноманітністю, що, безперечно, пов'язано з варіабельністю субстратів, на яких вони розвиваються. Відповідно до субстратної приуроченості дискосміцети парку розподілені на ряд еколого-трофічних груп, серед яких домінуючою є група сапротрофних дискосміцетів (70 видів), що поділена на групи кортико- та лігнофілів (30 видів), едафофілів (18), філофілів (11), меншу кількість видів налічують карбофіли (4), копрофіли (4) та гербофіли (3). На території парку також відмічені симбіотрофні (3) та паразитичні (3) види дискосміцетів.

Щодо розподілу дискосміцетів-сапротрофів за деревними породами парку, то найбільшу їх кількість було виявлено на грабі (10 видів). На деревині берези було знайдено 7 видів, 4 з яких також відмічені і на деревині граба. На плодах бука був виявлений лише *Phaeohelotium fagineum*, а на гілковому опаді цієї дерев-

ної породи дискосміцети не були відмічені взагалі. На опалих голках та гілках сосни були знайдені 3 види (*Heyderia pusilla*, *Cyclaneusma minus* та *Therrya pini* var. *pini*), що характерні виключно для цієї породи. На деревині вільхи не було відмічено жодного виду дискосміцетів, проте на її шишках та сережках знайдено 2 цікаві ранньовесняні види – *Mollisia amenticola* та *Ciboria amentacea*. На дубі відмічені 6 видів дискосміцетів, що були знайдені на плодах, опалому листі та на опалих гілках. На листовому опаді клена були знайдені такі самі види, як і на опалому листі дуба (*Crocicreas dolosellum*, *Lanzia luteovirescens*, *Phaeohelotium epiphyllum* тощо), а вид *Rhytisma acerinum* щорічно уражував листя клену.

Нижче подано анований список видів дискосміцетів, зареєстрованих у Голосіївському НПП. Підкресленням позначені види, що вперше зареєстровані на території парку, * – види, які були відомі для парку з літературних джерел, а також були відмічені і нами.

Царство Fungi T. L. Jahn & F. F. Jahn ex R. T. Moore
Відділ Ascomycota Bold ex Caval.-Sm.
Клас Leotiomycetes O. E. Erikss. & Winka
Порядок Helotiales Nannf.

Родина Dermateaceae Fr. (1849)

Рід Chlorociboria Seaver ex C.S. Ramamurthi, Korf & L.R. Batra

C. aeruginascens (Nyl.) Kanouse ex C.S. Ramamurthi, Korf & L.R. Batra, *Mycologia* 49(6): 858 (1958) [1957]

На стовбурах повалених дерев, гниючій деревині [1].

Рід Fabraea Sacc.

***F. cerastiorum* (Wallr.) Rehm**

На листі *Cerastium triviale* Link [1].

Рід Mollisia (Fr.) P. Karst.

M. amenticola (Sacc.) Rehm, in Rabenhorst, *Rabenh. Krypt.-Fl.* (Leipzig) 1(3): 540 (1891) [1896]

На жіночих шишках *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.

**M. cinerea f. cinerea* (Batsch) P. Karst., *Mycoth. fenn.* (Helsinki) 1: 189 (1871)

На стовбурах повалених дерев, гниючій деревині [1, KW].

**M. cinerea f. minutella* Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 8: 337 (1889)

На деревних рештках [1].

M. ligni (Desm.) P. Karst., *Mycoth. fenn.* (Helsinki) 2: 204 (1871)

На стовбурах повалених дерев, гниючій деревині.

M. melaleuca (Fr.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 8: 337 (1889)

На деревних рештках [KW].

Родина Helotiaceae Rehm (1892) [1896]

Рід Crocicreas Fr.

C. dolosellum (P. Karst.) S.E. Carp., *Brittonia* 32(2): 270 (1980)

На листовому опаді.

Рід Hymenoscyphus Gray

H. albidus (Gillet) W. Phillips, *Man. Brit. Discomyc.* (London): 138 (1887)

На рослинних рештках.

H. caudatus (P. Karst.) Dennis, *Persoonia* 3(1): 76 (1964)

На листовому опаді.

H. fructigenus (Bull.) Fr., *British Plants* 1: 673 (1821)

На горішках *Carpinus betulus* L., жолудях *Quercus robur* L.

H. repandus (W. Phillips) Dennis, *Persoonia* 3(1): 75 (1964)

На гілковому опаді.

H. lutescens (Hedw.) W. Phillips, (1887)

На гілковому опаді.

H. scutula (Pers.) W. Phillips [as 'scutulus'], *Man. Brit. Discomyc.* (London): 136 (1887)

На деревині *Carpinus betulus* L.

H. serotinus (Pers.) W. Phillips, (1887)

На деревині *Carpinus betulus* L.

Рід Phaeohelotium Kanouse

Ph. epiphyllum var. *epiphyllum* (Pers.) Hengstm., *Mycotaxon* 107: 272 (2009)

На листовому опаді.

Ph. fagineum (Pers.) Hengstm., *Mycotaxon* 107: 273 (2009)

На плодах *Fagus sylvatica* L.

Родина Hemiphacidiaceae Korf (1962)

Рід *Heyderia* (Fr.) Link

H. pusilla (Alb. & Schwein.) Link, *Handbuck zur Erkennung der Nutzbarsten und am Häufigsten Vorkommenden Gewächse* 3: 312 (1833)

На опалих голках *Pinus sylvestris* L.

Родина *Hyaloscyphaceae* Nannf. (1932)

Рід *Dasyscyphella* Tranzschel

D. nivea (R. Hedw.) Raitv., *Akad. Nauk Estonskoi S.S.R., Inst. Zool. Bot., Tartu*: 72 (1970)

На гілковому опаді [1].

Рід *Hyaloscypha* Boud.

H. albohyalina var. *tigillaris* (P. Karst.) Huhtinen, *Karstenia* 29(2): 105 (1990) [1989]

На поваленому стовбурі *Carpinus betulus* L.

Рід *Lachnum* Retz.

L. clandestinum P. Karst., *Bidr. Känn. Finl. Nat. Folk* 19: 178 (1871)

На гілковому опаді [1].

Родина *Rutstroemiaceae* Holst-Jensen, L.M. Kohn & T. Schumach. (1997)

Рід *Lanzia* Sacc.

L. luteovirescens (Roberge ex Desm.) Dumont & Korf, *Mycotaxon* 7(2): 185 (1978)

На листовому опаді.

Рід *Rutstroemia* P. Karst.

R. bolaris (Batsch) Rehm, *Discom. Deutschl.*: 765 (1893)

На опалих гілках.

R. firma (Pers.) P. Karst., *Mycoth. fenn. (Helsinki)* 1: 108 (1871)

На гілковому опаді *Carpinus betulus* L., *Quercus robur* L.

R. sydowiana (Rehm) W.L. White, *Lloydia* 4: 200 (1941)

На листовому опаді.

Родина *Sclerotiniaceae* Whetzel (1945)

Рід *Ciboria* Fuckel

C. amentacea (Balb.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 311 (1870) [1869-70]

На опалих чоловічих сережках *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.

C. betulae (Woronin ex Navashin) W.L. White, *Lloydia* 4: 171 (1941)

На опалих сережках берези *Betula pendula* Roth [1].

Рід *Dumontinia* L.M. Kohn

D. tuberosa (Bull.) L.M. Kohn, *Mycotaxon* 9(2): 432 (1979)

На ґрунті [KWU].

Рід *Monilinia* Honey

**M. fructigena* Honey, in Whetzel, *Mycologia* 37(6): 672 (1945)

На минулорічних плодах *Malus* sp., *Pyrus* sp. [KW].

Родина *Insertae sedis*

Рід *Ascocoryne* J.W. Groves & D.E. Wilson

A. cyllichnium (Tul.) Korf, *Phytologia* 21(4): 202 (1971)

На гнилій деревині.

A. sarcoides (Jacq.) J.W. Groves & D.E. Wilson, *Taxon* 16(1): 40 (1967)

На гнилій деревині.

Рід *Bisporella* Sacc.

**B. citrina* (Batsch) Korf & S.E. Carp., *Mycotaxon* 1(1): 58 (1974)

На гнилій деревині [3].

B. sulfurina (Qué.) S.E. Carp., in Korf & Carpenter, *Mycotaxon* 1(1): 59 (1974)

На гнилій деревині.

Рід *Pyrenopeziza* Fuckel

P. arundinacea (DC.) Boud., *Hist. Class. Discom. Eur. (Paris)*: 133 (1907)

На відмерлих стеблах *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., занурених у воду [2].

P. atrata (Pers.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 294 (1870) [1869-70]

На гілковому опаді [1].

P. rubi (Fr.) Rehm, *Ascomyceten*: no. 416 (1878)

На гілковому опаді [1].

Рід *Tapesia* (Pers.) Fuckel

T. fusca (Pers.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 302 (1870) [1869-70]

На гілковому опаді [1].

T. rosae (Pers.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 301 (1870) [1869-70]

На гілковому опаді [1].

Порядок *Leotiales* Carpenter (1988)

Родина *Bulgariaceae* Fr. (1849)

Рід *Bulgaria* Fr.

B. inquinans (Pers.) Fr., *Syst. mycol. (Lundae)* 2(1): 167 (1822)

На опалих гілках *Betula pendula* Roth (KWU).

Порядок *Rhytismatales* M.E. Barr ex Minter (1986)

Родина *Rhytismataceae* Chevall. (1826)

Рід *Colpoma* Wallr.

**C. quercinum* (Pers.) Wallr., *Fl. crypt. Germ.* (Nürnberg) 2: 423 (1833)

На гілковому опаді *Quercus robur* L. [1].

Рід *Rhytisma* Fr.

**Rh. acerinum* (Pers.) Fr., *K. svenska Vetensk-Akad. Handl.*: 104 (1819)

На листі *Acer platanoides* L. [KW].

Рід *Therrya* Sacc.

Th. pini var. *pini* (Alb. & Schwein.) Höhn., *Ber. dt. bot. Ges.* 35: 422 (1917)

На гілковому опаді *Pinus sylvestris* L. [1].

Порядок *Incertae sedis*

Родина *Incertae sedis*

Рід *Cyclaneusma* DiCosmo, Peredo & Minter

C. minus (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter, *Eur. J. For. Path.* 13(4): 208 (1983)

На опалих голках *Pinus sylvestris* L.

Клас *Pezizomycetes* O. E. Erikss. & Winka

Порядок *Pezizales* J. Schröt in Engler & Prantl (eds)

Родина *Ascobolaceae* Boud. ex Sacc. (1884)

Рід *Ascobolus* Pers.

A. albidus P. Crouan & H. Crouan, *Annls Sci. Nat., Bot., sér.* 4 10: 1-6 (1858)

На копромах коня.

A. immersus Pers., *Neues Mag. Bot.* 1: 115 (1794)

На копромах коня.

A. sacchariferus Brumm., *Persoonia*, Suppl. 1: 122 (1967)

На копромах косулі.

Родина *Caloscyphaceae* Harmaja 2002

Рід *Caloscypha* Boud.

C. fulgens (Pers.) Boud., *Bull. Soc. mycol. Fr.* 1: 103 (1885)

На ґрунті, серед моху, в штучному насадженні ялини.

Родина *Discinaceae* Benedix 1962

Рід *Gyromitra* Fr.

**G. slonevskii* Heluta

На ґрунті серед листового опадку [6].

Родина *Helvellaceae* Fr. (1822)

Рід *Helvella* L.

H. monachella (Scop.) Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) 2(1): 18 (1822)

На ґрунті [6].

Родина *Morchellaceae* Rchb. (1834)

Рід *Mitrophora* Lév.

M. semilibera (DC.) Lév., *Annls Sci. Nat., Bot., sér.* 3 5: 249 (1846)

На ґрунті.

Рід *Morchella* Dill. ex Pers.

**M. esculenta* (L.) Pers., *Syn. meth. fung.* (Göttingen) 2: 618 (1801)

На ґрунті [5].

Родина *Pezizaceae* Dumort. (1829)

Рід *Iodophanus* Korf

I. carneus (Pers.) Korf, in Kimbrough & Korf, *Am. J. Bot.* 54: 19 (1967)

На копромах коня.

Рід *Peziza* Dill. ex Fr.

P. badia Pers., *Observ. mycol.* (Lipsiae) 2: 78 (1800) [1799]

На ґрунті.

P. chrysopela Cooke (1877)

На ґрунті [5].

P. repanda Pers., *Icones Pictae Rariorum fungorum* 4: 49 (1808)

На ґрунті [5].

P. varia (Hedw.) Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) 2(1): 61 (1822)

На деревині занурений в ґрунт.

P. violacea Pers., *Syn. meth. fung.* (Göttingen): 639 (1801)

На ґрунті, на місці старого вогнища.

Рід *Plicaria* Fuckel

P. endocarpoides (Berk.) Rifai, *Verh. K. ned. Akad. Wet., Afd. Natuurkunde, Tweede Reeks* 57(3): 255 (1968)

На згарищі.

Родина *Pyronemataceae* Corda (1842)

Рід *Aleuria* Fuckel

A. aurantia (Pers.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 325 (1870) [1869-70]

На ґрунті [5, KW].

Рід *Ciliaria* Qué.

***C. confusa* (Cooke) Boud., *Icon. Mycol.* (Paris) 2: pl. 379 (1907)**

На ґрунті, на місці старого вогнища [5].

Рід *Flavoscypha* Harmaja

***F. cantharella* (Fr.) Harmaja, *Karstenia* 14: 107 (1974)**

На ґрунті [5].

Рід *Geopora* Harkn.

***G. arenosa* (Fuckel) S. Ahmad, *Monogr. Biol. Soc. Pakistan* 7: 176 (1978)**

На піщаному ґрунті [5].

Рід *Humaria* Fuckel

***H. appplanata* (Hedw.) Rehm, *Rabenh. Krypt.-Fl.*, Zweite Auflage. Vol. 1. 3. Abth: Ascomyceten: Hysteriaceen und Discomyceten (Leipzig): 1019 (1896)**

На ґрунті [5].

****H. hemisphaerica* (F.H. Wigg.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 322 (1870) [1869-70]**

На ґрунті [5].

Рід *Otidea* (Pers.) Bonord.

***O. grandis* (Pers.) Rehm, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 9: 111 (1893)**

На ґрунті [5].

****O. leporina* (Batsch) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 329 (1870) [1869-70]**

На ґрунті [5].

***O. onotica* (Pers.) Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 330 (1870) [1869-70]**

На ґрунті [5].

Рід *Scutellinia* (Cooke) Lambotte

****S. scutellata* (L.) Lambotte, *Mém. Soc. roy. Sci. Liège, Série 2* 1: 299 (1887)**

На занурений в ґрунт деревині [5].

***S. setosa* (Nees) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) 2: 869 (1891)**

На занурений в ґрунт деревині [5].

Рід *Tarsetta* (Cooke) Lambotte

***T. catinus* (Holmsk.) Korf & J.K. Rogers, *Phytologia* 21(4): 206 (1971)**

На ґрунті, на місці старого вогнища.

***T. cupularis* (L.) Svrček, *Česká Mykol.* 35(2): 88 (1981)**

На ґрунті [5].

Родина *Sarcoscyphaceae* Le Gal ex Eckblad (1968)

Рід *Microstoma* Bernstein

***M. protractum* (Fr.) Kanouse, *Mycologia* 40(4): 486 (1948)**

На ґрунті [1, 5].

Рід *Sarcoscypha* (Fr.) Boud.

****S. coccinea* (Jacq.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 8: 154 (1889)**

На занурений в ґрунт деревині [1, 5].

Клас *Orbiliomycetes* O. E. Erikss. & Baral

Порядок *Orbiliales* Baral, O. E. Erikss., G. Marson & E. Weber

Родина *Orbiliaceae* Nannf. (1932)

Рід *Orbilina* Fr.

***O. microclava* Velen. (1934)**

На відмерлій деревині.

***O. delicatula* (P. Karst.) P. Karst. (1870)**

На відмерлій деревині.

Висновки. На сьогодні Голосіївський НПП є єдиним природоохоронним об'єктом в Україні, на території якого проводились цілеспрямовані багаторічні дослідження видової різноманітності дискосміцетів, та який містить узагальнюючий список всіх відомих для його території представників цієї групи організмів – 75 видів, що належать до 44 родів 19 родин 6 порядків класів *Leotiomycetes*, *Pezizomycetes* та *Orbiliomycetes* відділу *Ascomycota*. Нами вперше для парку знайдено 37 нових для паку дискосміцетів, серед яких є рідкісні види (*Caloscypha fulgens* та *Gyromitra slonevskii*). Подальші дослідження дискосміцетів парку можуть поповнити цей список за рахунок видів певних еколого-трофічних груп, зокрема, едафофільних, копрофільних дискосміцетів, а також періодичних видів, плодоношення яких з'являються лише з певними часовими інтервалами.

1. Гіжицька З.К. Матеріали до вивчення дискосміцетів України та інших місцевостей. – Вісн. Київ. ботан. саду, – 1929. – С.52- 67. 2. Дудка І.О. Матеріали до флори водних грибів УРСР.III. Водні аскоміцети з околів м. Києва // Укр. ботан. журн. – 1963 – Т.20, №6. – С.86- 91. 3. Любченко В.М., Падун І.М. Сучасний стан рослинності Голосіївського лісу// Укр. ботан. журн. – 1985 – Т.42, №1. – С.66- 70. 4. Райтвир А.Г. Порядок *Helotiales* // Низш. раст., грибы и мохообразные Советского Дальнего Востока. Грибы. Т.2: Аскомицеты: Эризифальные, клавиципитальные, гелотииальные Л.: Наука, 1991. – С. 254- 363. 5. Смицкая М.Ф. Флора грибов Украины. Оперкулярные дискосмицеты. К.: Наукова думка, 1980. – 222 с. 6. Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с. 7. Dennis R.W.G. *British Ascomycetes*. 2nd edition. Vaduz: J. Cramer, 1978. –485 p. 8. Ellis M.B., P. Ellis. *Microfungi on land plants. An identification handbook. New enlarged edition.*/ The Richmond Publishing Co. Ltd. – 1997. – 869p. 9. *Fungi of Switzerland* Vol. 1. *Ascomycetes* / Ed. J. Breitenbach, F.Kranzlin.. Luzern: Mycologia, 1984. – 310 p. 10. Hibbett D.S. et al. (67 authors) *A higher level phylogenetic classification of the fungi.*/ *Mycol. Res.* – 2007. – 111. – P.509-547. 11. *Nordic Macromycetes* Vol. 1 *Ascomycetes*/ Ed. L. Hansen, H.Knudsen.- Denmark, 2000 – 308 p. 12. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* / Ed. P.M. Kirk et al. 10th ed. Wallingford (UK): CAB International, 2008. – 485 p.

Надійшла до редколегії 27.10.2010.

УДК 612.82/83; 612.821

В. Кравченко, канд. біол. наук., В. Дубовик, магістр.,
К. Максимович, асп., М. Макачук, д-р біол. наук

ЕЛЕКТРИЧНА АКТИВНІСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЧОЛОВІКІВ ПРИ ПЕРЕГЛЯДІ АФЕКТИВНИХ ТА НЕЙТРАЛЬНИХ ЗОБРАЖЕНЬ

Досліджено мозкову нейродинаміку підчас перегляду зорових стимулів Міжнародної системи афективних зображень (IAPS) у чоловіків. Показано, що найбільш активуюче впливали на мозок чоловіків еротичні зображення, ЕЕГ-кореляти емоційного напруження спостерігалися лише при перегляді неприємних зображень. Перегляд картин, що здатні викликати позитивні емоції, супроводжувався зростанням високочастотних компонентів спектру ЕЕГ в лобних зонах неокортексу, що може відображувати когнітивну оцінку та гедонічний компонент сприйняття таких стимулів. Отримані результати проаналізовані у порівнянні з аналогічними даними, отриманими раніше за участю жінок в різні фази менструального циклу та з урахуванням суб'єктивної оцінки обстежуваними застосованих стимулів.

Electrical activity of brain during presentation of visual stimuli of the International Affective Picture System images (IAPS) in men was investigated. It was shown that erotica images influenced on the brain of men the most activating, the EEG-correlates of emotional tension were observed only at the revision of unpleasant images. The revision of pictures which are able to cause positive emotions was accompanied with growth of high-frequency components of EEG-spectrum in the cortical frontal areas which can represent the cognitive estimation and gедonical component of perception these stimulus. These results analysed in comparison to analogical data, obtained earlier with participation of women in the different phases of menstrual cycle and taking into account a subjective estimation of the applied stimuli.

Вступ. Дослідження нейрофізіологічних механізмів сприйняття та аналізу емоційно забарвленої інформації в головному мозку на сьогодні є одним з актуальних завдань психофізіології. Емоції відіграють дуже важливу роль в житті людини, оскільки виникаючи у відповідь на певні події, вони допомагають обрати таку стратегію поведінки, що приведе до отримання винагороди (досягнення бажаної цілі) або уникнення небезпеки чи покарання. Зважаючи на таку вирішальну роль позитивних і негативних емоцій у плануванні поведінки, обробка інформації в мозку на предмет її можливої значущості для індивіда відбувається на початкових стадіях паралельно з обробкою інших параметрів сигналу, і їй надається пріоритет при розподілі ресурсів уваги. Відомо, що чоловіки і жінки різняться в емоційному реагуванні на ті чи інші події, що може бути як наслідком соціальних усталених норм гендерної поведінки, так і особливостями мозкової обробки емоціогенних стимулів [1]. Накопичено чимало даних про специфіку корково-підкоркових взаємодій при сприйнятті стимулів, що здатні викликати емоції у представників різних статей. Все більше уваги в англійській нейрофізіологічній літературі приділяється гендерній різниці в реагуванні на еротичні візуальні стимули [2, 3], зважаючи на їх масове використання в кіноіндустрії та рекламі. У вітчизняній психофізіології ці питання досі лишаються незаслужено малодослідженими, не зважаючи на активну зацікавленість в такого роду зорових стимулах представників обох статей. Порівняння особливостей обробки різного типу емоціогенних стимулів в мозку допомогло б з'ясувати причини і наслідки поведінки, що розгортається у відповідь на події, що оцінюються представниками обох статей як емоційно значущі.

Метою даної роботи було оцінити за показниками спектральної потужності особливості мозкової нейродинаміки при сприйнятті зорових стимулів, що здатні викликати емоції (нейтральні, приємні, неприємні, еротичні) у чоловіків і порівняти ці дані з результатами, отриманими в попередньому дослідженні, проведеному за аналогічною схемою у жінок [4].

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні як обстежувані взяли участь 14 студентів університету чоловічої статі, віком 18-21 рік. Всі обстежувані були здорові, тобто на момент дослідження не вживали ліків, не хворіли на неврологічні чи психічні захворювання. Кожен обстежуваний брав участь в дослідженні тричі з інтервалом у 9-10 днів, що було зумовлено необхідністю порівняти результати з даними жінок, що брали

участь в аналогічному дослідженні в різні фази менструального циклу (ці дані представлені нами раніше [4]). Всього було отримано 42 записи ЕЕГ, сумарні дані по яким проаналізовано і представлено в даній статті.

У всіх обстежених чоловіків впродовж кожного дослідження реєстрували ЕЕГ за наступною схемою: в стані спокою із закритими очима (початок) – 3 хв; при пред'явленні зображень, що здатні викликати позитивні емоції – 1,5 хв; при пред'явленні нейтральних стимулів – 1,5 хв; при пред'явленні зображень еротичного характеру – 1,5 хв; при пред'явленні зображень, що здатні викликати негативні емоції – 1,5 хв; в стані спокою із закритими очима (кінець) – 3 хв. Між кожним із цих етапів також реєструвалася ЕЕГ (1,5 хв) при пред'явленні беззмістовних зображень сірого кольору двох типів, які почергово змінювали одна одну. У якості зорових стимулів на екрані монітора комп'ютера демонстрували фотографії Міжнародної системи афективних зображень (IAPS) [5], відібрані за нормативними значеннями гедонічної оцінки емоцій. В кожній серії було пред'явлено по 15 зображень певної гедонічної категорії. Час пред'явлення одного стимулу становив 6 с. Наприкінці дослідження обстежувані чоловіки давали оцінку кожному побаченому зображенню за рівнем приємності та рівнем збудження (активації) за 9-бальною шкалою.

ЕЕГ реєстрували монополярно за допомогою діагностичного комплексу "Нейрон-Спектр" (ООО "Нейро-софт", Росія), як референтний використовувався імпіталеральний вушний електрод. Електроди розміщувалися за міжнародною системою 10/20 у 14 симетричних точках лівої і правої півкулі головного мозку: середньофронтальних (F3/F4), латеральнофронтальних (F7/F8), центральних (C3/C4), передніх скроневих (T3/T4), задніх скроневих (T5/T6), тім'яних (P3/P4) і потиличних (O1/O2).

Для аналізу ЕЕГ-показників використовувались тільки безартефактні фрагменти. За допомогою швидкого перетворення Фур'є визначалась спектральна потужність (мкВ^2) для ряду частотних діапазонів: тета (4,0-7,9 Гц), альфа (8,0-12,9 Гц), бета низькочастотний (13,0-19,9 Гц) та бета високочастотний (20,0-35,0 Гц). Епоха аналізу становила 2,56 с, перекриття – 1,28 с. Смуга пропускання – 1-35 Гц.

Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету STATISTICA 7.0 (Statsoft, USA, 2004). Оскільки розподіл майже всіх показників був відмінним від нормального (за критерієм Лілієфора), то для порівняння залежних вибірок застосовували критерій знакових рангів

Вілксона. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p=0,05$.

Результати та їх обговорення. Аналіз змін електричної активності головного мозку чоловіків в основних ЕЕГ-діапазонах під час перегляду зображень показав, що здатні викликати емоції порівняно з переглядом беззмістовних зорових стимулів сірого кольору, що передували кожній серії із зображеннями IAPS. Як видно з рис.1, зональна картина змін спектральної потужності

при перегляді стимулів різного типу відрізнялася. Спільним для всіх типів змістовних стимулів було зниження потужності альфа-ритму в лівих тім'яній і потиличній ділянках, що очевидно пов'язано з аналізом візуальних стимулів, не пов'язаним з емоційним компонентом, який відбувається в асоціативних зонах екстрастріарної кори, розташованій на "стику" тім'яної, потиличної і скроневої часток кори великих півкуль.

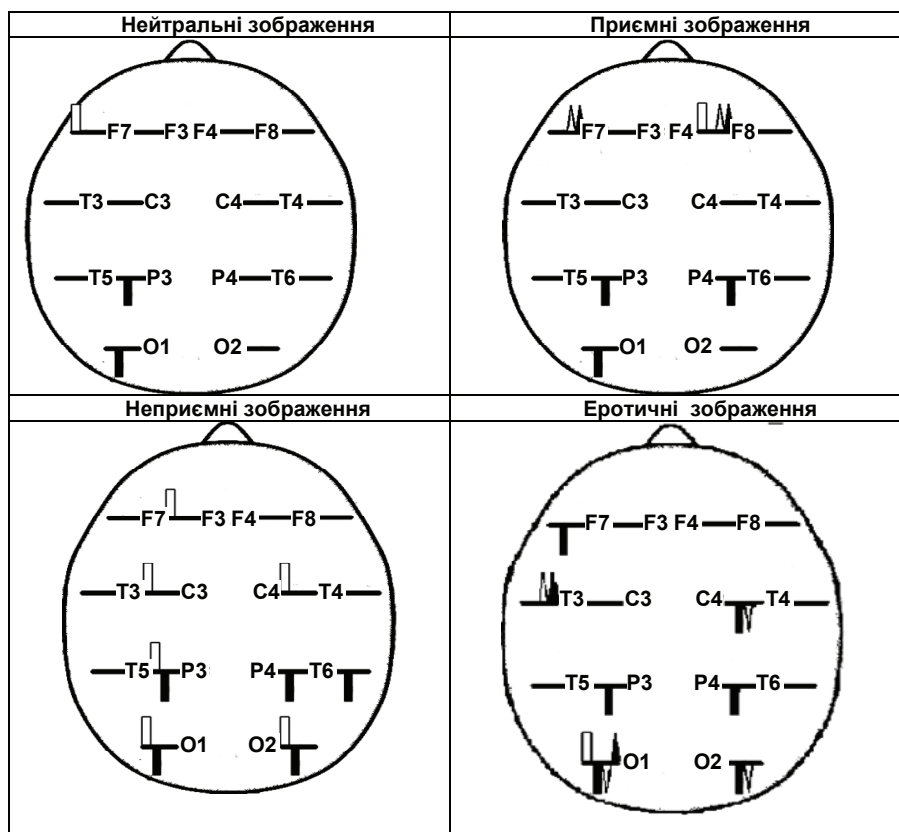


Рис.1. Топокарти відмінностей спектральної потужності основних ритмів ЕЕГ чоловіків під час перегляду змістовних зображень (нейтральні, позитивні, еротичні, негативні) IAPS по відношенню до перегляду беззмістовних зображень

Примітки: $\square$ – потужність тета, $\blacksquare$ – потужність альфа, $\triangle$ – потужність бета низькочастотного, $\blacktriangle$ – потужність бета високочастотного діапазонів. Знак над рисочкою відображає значуще ($p<0,05$) збільшення, знак під рисочкою – зниження показника ($n=42$).

Передусім ми проаналізували зміни електричної активності мозку при перегляді **нейтральних зображень**. За шкалою ступеню гедонічності ці зображення мали вірогідно вищі бали за негативні зображення і вірогідно нижчі бали за позитивні і еротичні, тобто дійсно були емоційно нейтральними (див. рис.2). В цілому, перегляд емоційно нейтральних зображень викликав меншу активацію тім'яно-потиличних ділянок мозку чоловіків порівняно з афективними зображеннями всіх 3-х видів, що підтверджує думку про те, що мотиваційна релевантність стимула залучає більше уваги та підлягає ретельнішій обробці в екстрастріарній корі [6]. Відзначимо, що у жінок перегляд нейтральних зображень супроводжувався суттєво більшою порівняно з чоловіками (за кількістю зон) активацією обох півкуль головного мозку [4], і суттєво різнився в різні фази менструального циклу.

Перш ніж перейти до аналізу наших експериментальних даних щодо впливу перегляду зображень з різним емоційним навантаженням на характеристики ЕЕГ чоловіків, відмітимо, що, згідно з нейрологічною моделлю, описаною Хейлманом [7], сприйняття емоційних стимулів у цілому складається з трьох компонентів, які

забезпечуються різними мозковими структурами. По-перше, під час дії таких стимулів відбувається оцінка знаку емоційного стимулу (приємний/неприємний). Провідну роль у такій оцінці відіграють лобні частки кори, причому збудження лівої фронтальної кори переважає при обробці позитивних стимулів, а правої – негативних. По-друге, здійснюється активаційне забезпечення сприйняття емоційного сигналу (arousal). Вважається, що воно опосередковане в основному залученням тім'яних часток у регуляцію впливів активуючих систем мозку. І нарешті, по-третє, за певних обставин емоційне переживання продукує моторний компонент, що може проявлятися у відстороненні від певного стимулу чи наближенні до нього. Регуляція таких реакцій відбувається переважно через впливи орбітофронтальної кори та правої тім'яної частки на лімбічні структури та базальні ганглії.

Перегляд **зображень, що здатні викликати позитивні емоції** супроводжувався характерним лише для цього виду стимулів зростанням потужності високочастотних компонентів ЕЕГ в передніх лобних ділянках. Відомо, що збільшення частки бета-ритму розглядається як прояв оцінки значущості та уваги до стимулу,

як це описано в моделі Хейлмана [7], і анатомічним субстратом таких вищих когнітивних функцій є передні відділи лобних часток. У обстежених нами чоловіків такі зміни були більш локальними, порівняно із змінами EEG-показників при перегляді приємних зображень у жінок, у яких спостерігалася масштабна активація всього неокортексу при підвищенні бета-ритму в симетричних відведеннях лобних та передньо-скроневих та центральних ділянках неокортексу [1]. Причому такі зміни у жінок були найбільш виражені в фолікулярну

фазу менструального циклу з мінімальним вмістом естрогенів, тоді як в інші фази характер змін EEG-показників суттєво відрізнявся від таких у чоловіків. Відзначимо, що зростання тета-ритму при перегляді позитивних стимулів (характерний "EEG-маркер" емоційного переживання) відбувалось лише в правому лобному відведенні, що свідчить про те, що ці зображення не викликали сильних емоційних реакцій у обстежуваних, особливо порівняно з негативними картинками.

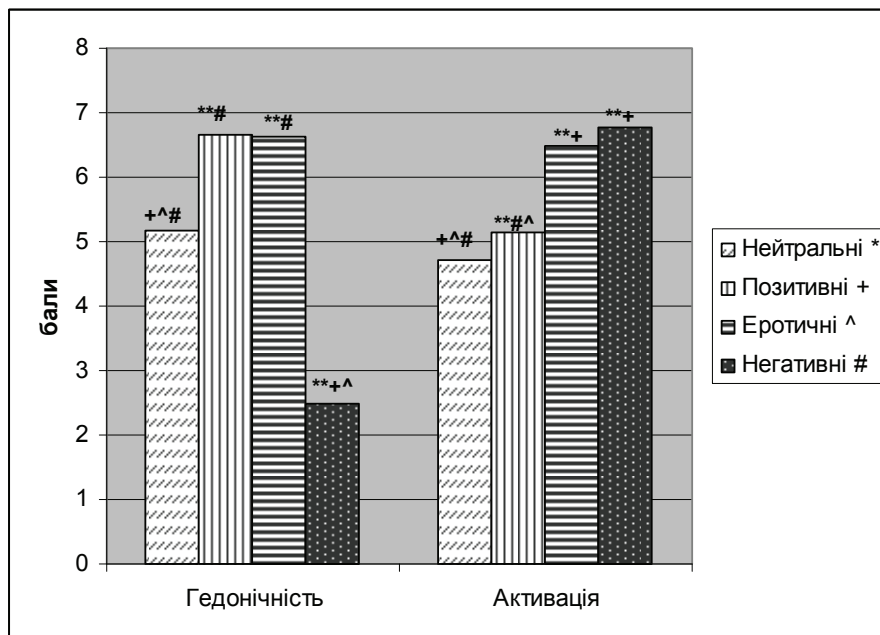


Рис. 2. Суб'єктивна оцінка за шкалами гедонічності (приємний-неприємний) та активації (збуджуючий – розслаблюючий) зображень IAPS різного типу у чоловіків (n=42)

Примітка: ** – значущі ($p < 0,01$) відмінності оцінки відносно нейтральних зображень;
 + – значущі ($p < 0,01$) відмінності оцінки відносно позитивних зображень;
 ^ – значущі ($p < 0,01$) відмінності оцінки відносно еротичних зображень;
 # – значущі ($p < 0,01$) відмінності оцінки відносно негативних зображень.

Розглянемо особливості електричної активності мозку чоловіків під час демонстрації **неприємних зображень**. Як бачимо з рис. 1, найбільш характерними EEG-корелятами перегляду цього виду стимулів було збільшення спектральної потужності тета-ритму в передньо-центральної та задніх ділянках неокортексу із деяким переважанням в лівій півкулі. Оскільки зростання тета-ритму традиційно розглядається як кореляція емоційного напруження, можна зробити висновок, що неприємні зображення найбільш залучали емоційні системи мозку, можливо викликаючи співпереживання через відображення побаченого системою дзеркальних нейронів, розташованих переважно в премоторній та тім'яній корі (лобно-тім'яна та лімбічні дзеркальні системи) [8]. При цьому відбувається зниження потужності альфа-ритму в симетричних тім'яно-потиличних ділянках та правій задньо-скроневої, що відображає більш потужне активаційне забезпечення негативних стимулів порівняно з приємними картинками. Характерно, що перегляд неприємних зображень не супроводжувався зростанням високочастотних EEG-компонентів в лобних зонах, тобто для цих стимулів когнітивні системи оцінювання не "вмикались". Можливо, це пов'язано з тим, що неприємні емоції є більш потужними і виникають майже миттєво при появі "загрозливих" стимулів, які є генетично закарбованими (сцени кровопролиття, гниття, людські обличчя з виразом жаху чи відрази тощо), тому

вони одразу розпізнаються і "вмикають" емоційні структури мозку (посилення потужності тета-ритму). Надзвичайно цікавим є те, що у жінок перегляд негативних зображень супроводжувався тільки активаційними змінами без зростання тета-ритму [1], за виключенням фолікулярної фази менструального циклу, коли відзначалося зростання потужності тета-ритму в лівих лобній і потиличних зонах. Це доводить відмінність реагування на емоційні стимули представників різної статі і дозволяє зробити припущення, що найбільш подібно мозок жінки реагує до чоловічого у фолікулярну фазу, коли концентрація естрогену в крові мінімальна.

Еротичні зображення були виділені нами в окрему категорію, хоча за класифікацією IAPS вони належать до зображень, що здатні викликати приємні емоції. При створенні бази зображень IAPS ці види стимулів найбільше відрізнялися за шкалами суб'єктивної оцінки серед чоловіків і жінок [9]. Так, представники сильної статі оцінювали їх як більш приємні і активуючі, ніж прекрасна половина, тоді як останні описували свої відчуття при перегляді такі фотографії як такі, що викликають "ніяковість" та "збентеження". В наших дослідженнях суб'єктивна оцінка еротичних зображень вірогідно не відрізнялася у представників різної статі (рівень збудження: жінки $M=6.21$, чоловіки $M=6.49$; рівень суб'єктивної приємності: жінки $M=6.52$, чоловіки $M=6.64$). Аналіз основних EEG-ритмів показав, що мозкова нейродина-

міка при спогляданні еротичних зображень у чоловіків не схожа на таку при перегляді інших видів емоційно-забарвлених стимулів (див.рис.1). Еротичні стимули активували потилично-тім'яно-центральної зони мозку чоловіків (депресія альфа- та низькочастотного бета-діапазону та зростання потужностей високочастотного бета-діапазонів), що відображає обробку в екстрастріанній зоровій корі на фоні потужної неспецифічної активації. Тільки для цього типу стимулів було характерно підвищення потужності бета-ритму в лівій передньоскроневої зони кори, що, ймовірно, відображає обробку в лівій мигдалині, яка, за даними томографічного дослідження [10] найбільш активна в чоловіків при перегляді стимулів еротичного характеру. Варто відзначити, що таке ж зростання потужності бета-ритму в зоні Т3 відмічалось нами у жінок при перегляді приємних зображень [4], тоді як при перегляді еротичних картин у жінок спостерігалася тільки потужна активація в симетричних задньоскроневих і потиличних ділянках, а також зменшення потужності альфа- і тета-ритмів в правій скроневій зоні (Т4). Слід зазначити, що у чоловіків суб'єктивні оцінки ступеня приємності еротичних і позитивних зображень не відрізнялися (еротичні: $M=6.64$ бали, позитивні: $M=6.65$, $r=0.79$). А от у жінок, хоч обидві типи стимулів були віднесені до приємних, середній рівень балів, що давався цим типам зображення статистично достовірно ($p=0.000045$) відрізнявся (позитивні: $M=7.35$ бали, еротичні: $M=6.52$). Іншими словами, ті зображення, що описувалися жінками як найбільш приємні супроводжувалися ЕЕГ-зміними, подібними до таких при перегляді чоловіками еротичних зображень. Таким чином, порівняння мозкової нейродинаміки дає підстави припустити, що еротичні зображення найбільше активували мозок чоловіків серед інших видів стимулів, але при цьому когнітивна оцінка таких зображень здійснюється в тих же ділянках кори, що і приємні картини нееротичного змісту у жінок.

Загалом, співставлення суб'єктивних оцінок стимулів обстежуваними (рис. 2) із змінами, що супроводжують їх перегляд на ЕЕГ (рис.1) показує, що рівень суб'єктивного збудження (arousal) відображується на ЕЕГ в депресії альфа-ритму. Відчуття неприємності, відрази при перегляді аверсивних зображень супроводжувалося зростанням потужності тета-ритму, який очевидно пов'язаний саме з емоціями негативного знаку. Рівень суб'єктивної приємності зображення не мав таких чітких корелятивів на ЕЕГ. Проте, можна помітити, що під час перегляду зображень, що оцінювалися чоловіками як

найбільш приємні за шкалою гедонічності (позитивні і еротичні) спільним для них було зростання потужності бета-коливань в лобних (позитивні) і лівій передньоскроневій (еротичні) ділянках, що можливо і відображає гедонічний компонент сприйняття зображення.

Висновки. Перегляд афективних зображень супроводжується більшою активацією асоціативної зорової кори чоловіків порівняно з переглядом емоційно нейтральних зображень, що відображає ретельнішу мозкову обробку емоційно забарвлених стимулів.

Позитивні зображення викликали зростання потужності високочастотних компонентів спектру в передніх відділах лобних часток неокортексу, що відображає когнітивну оцінку змісту зображень та гедонічний компонент сприйняття.

Найбільше емоційне напруження викликали аверсивні стимули, що відбивалось у зростанні спектральної потужності тета-ритму центрально-тім'яно-потилічних ділянок кори великих півкуль на фоні неспецифічної активації, що узгоджувалось із суб'єктивною оцінкою таких стимулів.

Перегляд еротичних зображень супроводжувався найбільш поширеною зональною активацією мозку чоловіків на фоні зростання високочастотних компонентів ЕЕГ у лівій передньоскроневій зоні, що відповідає паттерну змін ЕЕГ при перегляді позитивних зображень у жінок.

1. Gard M.G., Kring A.M. Sex differences in the time course of emotion // *Emotion*. 2007. – V.7, №2. – P.429-437. 2. Lykins A.D., Meana M., Strauss G.P. Sex differences in visual attention to erotic and non-erotic stimuli // *Arch Sex Behav*. – 2008 V.37, №2. – P.219-228. 3. Rupp H.A., Wallen K. Sex differences in response to visual sexual stimuli: a review // *Arch Sex Behav*. 2008. – V.37, №2. – P. 206-218. 4. Максимович К., Кравченко В., Крижановський С., Макачук М. Мозкова нейродинаміка у жінок в різні фази менструального циклу при перегляді афективних зображень // *Вісник КНУ. Серія "Біологія"* Вип. 56. 2010. – С.41-45. 5. Lang P.J., Bradley M.M., Cuthbert B.N. International affective picture system (IAPS): Affective ratings of pictures and instruction manual. – NIMH Center for the Study of Emotion & Attention. University of Florida, Gainesville. – 2005. 6. Sabatinelli D., Flaisch T., Bradley M.M., Fitzsimmons J.R., Lang P.J. Affective picture perception: gender differences in visual cortex? // *Neuroreport*. 2004. – V.15, №7. – P.1109-1112. 7. Heilman K. M. The neurobiology of emotional experience // *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.* 1997. – V.9, № 3, P.439-448. 8. Cattaneo L., Rizzolatti G. The mirror neuron system // *Arch Neurol*. – 2009. – V. 66, №5. – P.557-560. 9. Bradley M.M., Lang P.J. The International affective picture system (IAPS) in the study of emotion and attention // *Handbook of emotion elicitation and assessment* edited by J.A. Coan, J.J.B. Allen. Oxford Univ. Press. – 2007. – P.29-46. 10. Hamann S., Herman R.A., Nolan C.L., Wallen K. Men and women differ in amygdala response to visual sexual stimuli // *Nat Neurosci*. – 2004. – V.7, №4. – P.411-416.

Надійшла до редколегії 25.10.10

УДК 578.81

А. Бурхан, студ.,
Л. Семчук, канд. біол. наук, С. Ромашев, пров. інж.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА КОЕВОЛЮЦІЯ БАКТЕРІОФАГУ 8573 SM З ФІТОПАТОГЕННИМ ХАЗЯЇНОМ PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Після зараження хазяїна фагом виявлені резистентні клони, які мають різну здатність до реінфекції. Вони утворювали відмінні за числом і морфологією бляшки. Цей факт представляє значний науковий інтерес, оскільки виявляє нові особливості коєволюційної системи.

After phage infection are revealed resistant hosts clones, which have different ability to repeated infection. They also form various on number and morphology plaque. This circumstance represents significant scientific interest as reveals new features to coevolutionary system.

Вступ. Згідно із сучасними оцінками, фаги є найбільш численними біологічними об'єктами на Землі, кількість яких досягає 10^{31} часток [7], що вказує на їх важливу роль в природі. В той же час, вивченню особливостей їх циркуляції в окремих екосистемах, зокрема рослинних, не приділяється достатньої уваги. При цьому, враховуючи значення рослин для людини, як дже-

рела продуктів харчування та технічної сировини, дослідження впливу в них фагів, зокрема активних проти фітопатогенних бактерій, збудників хвороб рослин, має значну наукову значимість. Фаги, виявляють регулюючий вплив на чисельність мікрофлори. Сучасні засоби боротьби з фітопатогенними бактеріями є, зазвичай, хімічними. Їх не можна назвати екологічно чистими та

© Бурхан А., Семчук Л., Ромашев С., 2011

цілком безпечними для природи. В той же час, фаги, для яких властива висока специфічність, вибірково лізують бактерії, що мають ознаки патогенності та не порушують балансу в екосистемі. Це зумовлює важливість створення препаратів захисту рослин від бактеріальних патогенів із застосуванням їх природних антагоністів – вірусів бактерій (фагів). Однак, їх використання, як регуляторів чисельності бактеріальних патогенів в природі, ускладнюється через можливість змін властивостей хазяїна. Як відомо, при інфікуванні бактерій фагами, частина із них залишається стійкою до інфекції та дає початок розвитку резистентної популяції. Паралельно в популяціях фагів утворюються різні типи їх мутантів, в тому числі і h-мутанти, що здатні інфікувати змінені бактерії. Такі взаємовідносини обумовлюють їх спільну коєволюцію, що виражається у прийнятному щодо них виразі, "змагання у гонці озброєнь" антагоністів [1]. При експериментальному дослідженні коєволюції фагів та фітопатогенних бактерій зручною модельною системою є використання штаму *Pseudomonas fluorescens* та активних проти нього фагів. Для цієї системи процес коєволюції проходить із достатньо високою ефективністю. Використовуючи їх, Brockhurst M.A at. al., зокрема, показали, що вже в популяції фагу, яка містить $2 \cdot 10^5$ часток, можна виявити h-мутанти, здатні інфікувати резистентні клони *P. fluorescens* [6]. Іншими дослідниками, показано, що коєволюція *P. fluorescens* і його фагу, Ф2, відбувається постійно, а мутації дозволяють антагоністам швидше пристосовуватись до співснування [2]. Однак, далеко не всі існуючі аспекти коєволюції вже виявлені та досліджені. У зв'язку з чим, особливостей взаємовпливу та взаємного пристосування до виживання бактерій та фагів в природі є актуальною науковою задачею.

Метою роботи було дослідити коєволюцію польового фагу 8573 sm, шляхом дослідження особливостей процесу інфікування ним набору резистентних клонів, що утворились в результаті першого циклу зараження ними штаму *P. fluorescens*.

Об'єкт та методи досліджень. В роботі використовували фітопатогенний штам *P. fluorescens* IMV 8573, отриманий з колекції музею Інституту мікробіології та вірусології ім. акад. Д.К.Заболотного НАН України, відділу фітопатогенних бактерій.

Використаний в роботі дикий тип фагу був виділений в нашій лабораторії із природи. Він утворював прозорі, з чіткими краями негативні колонії, діаметром до 3 мм. Згідно із правилами, що застосовуються в лабораторії, у назву фагів включали номер штаму першого хазяїна, використаного при виділенні із природи *P. fluorescens* IMV 8573, що був названий 8573sm (small plaque – дрібні пляшки). Титування проводили по Грація [4]. Для отримання резистентних клонів бактерій проводили інфікування хазяїна в концентрації 10^7 кл/мл, використовуючи суспензію фагу 8573 sm, з титром 10^9 БУО/мл. Порівняння поліпептидного складу утворених клонів бактерій із вихідним штамом проводили методом електрофорезу у ПААГ, за Леммлі [5]. Накопичення фагів проводили у колбах з бульйоном з аерацією при інкубації.

Результати та їх обговорення. Після висівання з надлишком фагу 8573sm чутливої культури *P. fluorescens* IMV 8573 спостерігали утворення значного числа колоній хазяїна, що не були інфіковані і представляли собою резистентні мутанти використаних бактерій. На третю добу, вони утворювали добре сформовані колонії, серед яких відбирали десять випадкових клонів. Кожному із варіантів бактерій були присвоєні назви : 8573 Fsm 1^r – 10^r. Їх використання потребувало проведення контролів, які б давали можливість бути

впевненими в тому, що всі отримані мутанти походять від батьківської культури і не містять контамінантних бактерій. Для цього отримані резистентні бактерії порівнювали за картоною розділення їх сумарних поліпептидів із вихідним штамом *P. fluorescens* 8573 (рис.1). Як видно з рисунку 1 профілі розділення поліпептидів хазяйського штаму та отриманих клонів повністю співпадали, що свідчило, про відсутність серед них сторонніх бактерій.

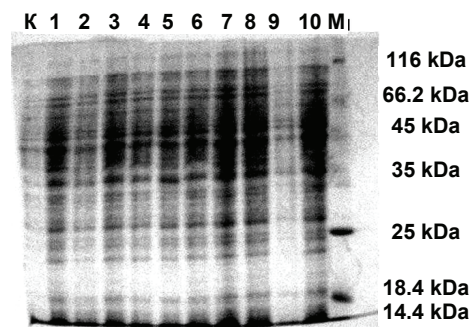


Рис.1. Профілі розділення поліпептидів у утворених мутантних клонів,

1 – *P. fluorescens* 8573sm Fon^r, 2 – *P. fluorescens* 8573sm Ftw^r, 3 – *P. fluorescens* 8573sm Fth^r, 4 – *P. fluorescens* 8573sm Ffo^r, 5 – *P. fluorescens* 8573sm Ffi^r, 6 – *P. fluorescens* 8573sm Fsi^r, 7 – *P. fluorescens* 8573sm Fse^r, 8 – *P. fluorescens* 8573sm Fei^r, 9 – *P. fluorescens* 8573sm Fni^r, 10 – *P. fluorescens* 8573sm Fte^r та штаму *P. fluorescens* 8573 M – використані маркери молекулярної маси, значення яких подано справа від треку, К – контроль

При аналізі здатності фагу 8573 sm переборювати бар'єр стійкості, його висівали із клонами субпопуляцій хазяїна. Отримані результати показали, що ефективність подолання утвореного бар'єра фагами для кожного варіанту мутантів бактерій є різною. Даний факт представляє інтерес з тої точки зору, що нам не відомі роботи, де б досліджували етапи коєволюції фага та хазяїна, відносно різних резистентних клонів бактерій. В роботі, виявлено індивідуальні особливості формування негативних колоній на газонах десяти типів резистентних субпопуляцій бактерій (рис 2). Фаг мав різну здатність до інфекції, а утворені негативні колонії відрізнялись за морфологією. Вказаний факт потребував пояснень, оскільки, морфологія негативних колоній є їх стабільною фенотиповою характеристикою. Особливості формування фагових пляшок дозволяли припустити вірогідність того, що їх походження може мати різну природу, а саме це:

1. h-мутанти фагів 8573 sm, що здатні репродукуватись на використаному мутантному клоні хазяїна. Популяція фагів містить мутанти, що здатні лише вибірково інфікувати використані резистентні клони. Це пояснює відмінності за ефективністю зараження зміненого хазяїна, однак не пояснює великий діапазон варіацій морфології їх негативних колоній ;

2. Рекombінанти, що утворились при абортівній інфекції фагу 8573 sm та профагу. Відмінності морфології утворених на кожному клоні негативних колоній вказує на те, що імовірно, популяція фагів приймає участь у процесі генетичних рекомбінацій з різними профагами, а використаний штам є полілізогенним.;

3. Серед виявлених на газонах резистентних бактерій частина фагів є продуктами унікальної "фаг – фагової" індукції. Таке явище показано для інших систем, зокрема при опосередкованій індукції, тобто опроміненні популяції фагу P1, як проміжної, із наступним її використанням для інфікування, констатували продукцію помірного фагу (λ). При цьому, пряме опромінення

профагу не було обов'язковою умовою продуктивної інфекції λ [2]. Для фагів фітопатогенних бактерій подібний ефект був описаний Ф. І. Товкачем, однак, і в цьому

випадку, обов'язковою умовою індукції була присутність мутагену [3]. У представленому нами випадку, сторонній вплив фізичних та хімічних факторів відсутній.

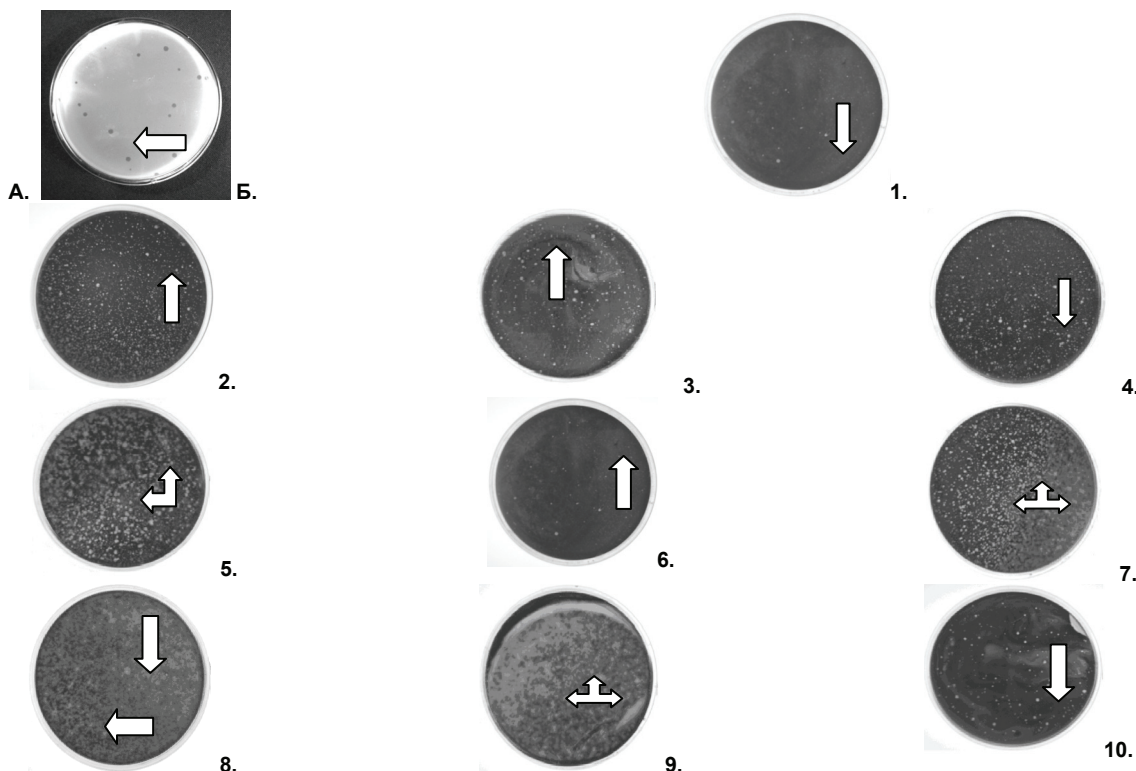


Рис.2. Різні морфології негативних колоній, при інфікуванні десяти клонів резистентних мутантів фагом дикого типу 8573 sm .

А – контроль. Негативні колонії 8573 sm на штамі *P. fluorescens* 8573.

Б – негативні колонії на резистентних мутантах *P. fluorescens* 8573, 1 – *P. fluorescens* 8573sm Fon^r, 2 – *P. fluorescens* 8573sm Ftw^r, 3 – *P. fluorescens* 8573sm Fth^r, 4 – *P. fluorescens* 8573sm Ffo^r, 5 – *P. fluorescens* 8573sm Ffi^r, 6 – *P. fluorescens* 8573sm Fsi^r, 7 – *P. fluorescens* 8573sm Fse^r, 8 – *P. fluorescens* 8573sm Fei^r, 9 – *P. fluorescens* 8573sm Fni^r, 10 – *P. fluorescens* 8573sm Fte^r

Висновки. Таким чином, представлені результати свідчать, що один генотип фага та один генотип бактерії, використані на початку експерименту, дають початок субпопуляціям резистентних мутантів хазяїна, що суттєво відрізняються за своїми властивостями, щодо здатності підтримувати репродукцію вірусу. Отримані дані створюють наукове підґрунтя для досліджень, які були б направлені на вивчення характеристик потомства фагів, утворених на резистентних клонах. Вони є важливими, як для висвітлення процесів коєволюції антагоністів, так і для виявлення існуючого різноманіття процесів взаємовпливу між ними. Наступне поглиблення досліджень дозволить більш повно зрозуміти еволюційні

шляхи та механізми, що забезпечують в природі різні стратегії захисту антагоністів від взаємознищення.

1. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. Биология: Учебник. – М.: 1989. 2. Лурія С., Данелл Дж., Батимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. – М.: Мир, 1981. 260 с. 3. Товкач Ф. І. Лізогенний стан фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora*. Київ: Доповіді НАН України, 2002. 170-173 с. 4. Brockhurst M. A., Morgan A. D. A. Fenton, and A. Buckling. 2007. Experimental coevolution with bacteria and phage. The *Pseudomonas fluorescens*-Phi2 model system. *Infect. Genet. Evol.* 7:547-552. 5. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. – 1970. – P.680-685. 6. Paterson S. et al. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. *Nature*. – 2010. 7. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64. 69-114.

Надійшла до редколегії 27.10.10

УДК 616-006; 616-07; 577.2

Ю. Клись, наук. співроб.,
С. Верьовка, д-р біол. наук

АСОЦІЙОВАНІ З МЕМБРАНАМИ КОМПОНЕНТИ ЕНДОГЕННІ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ЇХ РІЛЬ В ОНТОГЕНЕЗІ

Розглянуто молекулярні механізми утворення пептидних компонентів ендогенної інтоксикації та закономірності їх взаємодії з подвійним фосфоліпідним шаром клітинних мембран. Обґрунтовано положення про участь асоційованих з мембранами неконститутивних пептидів та білків в функціонально необумовлених активаційних процесах, що становлять невід'ємну складову онкологічного процесу.

Formation of peptide components of endogenous intoxication and regularities of their interaction with phospholipide membrane bilayer have been analyzed. The possible role of membrane-associated non-constitutive peptides and proteins as integral part of cancer is suggested.

Формування зворотнього зв'язку між окремими ланками функціональних порушень становить необхідну умову перебігу будь-якої патології. З'ясування подібно-

го роду причинно-наслідкових залежностей становить вкрай складну, але необхідну задачу, оскільки дає змогу не лише з'ясувати етіологію захворювання, але ство-

рити ефективні терапевтичні підходи на основі розриву "порочного кола" патологічного процесу. Співвіднесення власних дослідницьких даних з літературним матеріалом зі споріднених галузей біохімії, фізіології та медицини дало змогу зробити певні висновки та узагальнення щодо ролі пептидних компонентів ендогенної інтоксикації та протеолітично деградованих білків в перебізі онкологічного процесу.

Надмірна протеолітична активність становить невід'ємну рису онкологічних захворювань та зумовлена надмірною активацією проформ протеолітичних ферментів [1, 2]. При цьому, згідно як аналізу даних літератури, так і наших власних досліджень [1-3], загальний вміст білкових інгібіторів протеїназ не зазнає драматичних змін і лишається на достатньо високому рівні (Таблиця 1).

Таблиця 1. Рівень загальної трипсин-подібної протеолітичної активності та вміст основних інгібіторів протеїназ в плазмі хворих на рак гортані II та III стадії порівняно до практично здорових осіб

Групи обстежених	Вміст α_2 -МГ, г/л	Вміст α_1 -ІП, г/л	Вміст АТ III, % від норми	Загальна трипсин-подібна протеолітична активність за гідролізом протаміну, нмоль вивільненого аргініну/(хв·мл)
Практично здорові люди (n = 24)	2,00±0,09	2,00±0,08	100,0±2,7	55,5±3,2
Хворі на рак гортані II стадії (n = 9)	1,60±0,20*	1,75±0,16*	107,0±5,0	72,1±5,1* P<0,01
Хворі на рак гортані III стадії (n = 20)	1,60±0,08* P<0,01	2,50±0,22* P<0,05	117,0±7,7*	77,8±4,1* P<0,001

Примітки:

*P – вірогідність різниць між показниками у хворих і здорових осіб

α_2 -МГ – α_2 – макроглобулін; α_1 – ІП – α_1 – інгібітор протеїназ;

АТ III – анти тромбін III.

Тобто онкологічним процесам властиве формування активаційних механізмів, по відношенню до яких наявні в кровообізі білкові інгібітори неефективні. Ця обставина зумовлює підвищений інтерес як до механізмів білкової активації взагалі, так і до особливостей їх перебігу за онкогенезу.

Як відомо, більшість функціонально активних білків синтезується в організмі в формі функціонально неактивних проформ – проферментів, профакторів, тощо. Найпоширеніший шлях перетворення неактивного білка-попередника в активну форму опосередковано конформаційними змінами, зумовленими високоспецифічними ферментативним розщепленням. В більшості випадків в ролі ферментів-активаторів виступають протеолітичні ферменти трипсинового ряду [4]. Основним ферментом фібринолітичної системи є плазмін (К.Ф.3.4.21.7), що циркулює в кровообізі у формі свого проферменту – плазміногену. Основний шлях активації плазміногену в плазмі опосередковано сорбцією на фібриновому згустку, де відбувається протеолітичне розщеплення зв'язку Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ сорбованим же на фібриновій сітці тканинним активатором плазміногену (К.Ф.3.4.21.68) [5]. Проактивованій плазміні забезпечує ферментативне розщеплення фібринового згустку, при чому саме сорбція на фібрині захищає плазмін від інактивації циркулюючим в кровообізі інгібітором – α_2 -антиплазміном. Плазміноген/плазмін є поліфункціональним білком, задіяним в регуляції найрізноманітніших фізіологічних та патофізіологічних процесів. Тож постійне зростання уваги до молекулярних механізмів регуляції протеолітичної та активаційної дії цього ферменту є цілком зрозумілим [4]. Зокрема, за онкологічних захворювань функціонально необумовлена активація плазміногену та активаційна дія утвореного плазміну визначаються за важливу, якщо не ключову, ланку патофізіологічного процесу [5].

Подібно до більшості функціонально обумовлених взаємодій, комплексоутворення плазміногену з комплементарними білками опосередковано високоспецифічними ділянками зв'язування, при чому основні зв'язуючі ділянки плазміногену/плазміну розміщені в так званому важкому ланцюзі, утвореному п'ятьма крингловими структурами. Саме в кринглах розміщені лізин-

зв'язуючі ділянки (ЛЗД), що відіграють провідну роль в опосередкованих плазміногеном та плазміном функціональних взаємодіях [4,5]. Природними лігандами ЛЗД є дипольні пари, подібні до С-кінцевого лізину чи аргініну, а також позитивно та негативно заряджені групи, що не належать одній амінокислоті [6]. Останнє пояснює участь ЛЗД у взаємодії плазміногену з фібрином, який не містить С-кінцевих залишків лізину чи аргініну, однак експонує на поверхні щонайменше три дипольні групи, утворені розмежованими одним амінокислотним залишком парами позитивно та негативно заряджених амінокислот [7]. Подібні за принципом будови групи складають так званий 1-Х-3-мотив міжбілкового комплексоутворення, задіяний в регуляції найрізноманітніших фізіологічних та патофізіологічних процесів [8].

Лізин-зв'язуючими ділянками опосередковані ключові стадії фібринолізу – сорбцію на фібрині плазміногену, його тканинного активатора, а також практично миттєву інактивацію вивільнюваного по мірі лілізу фібринового згустку плазміну α_2 -антиплазміном [4]. Водночас вони відіграють важливу роль в перебізі онкологічного процесу. Доведено, що клітини онкологічних пухлин здатні сорбувати розчинний плазміноген, при чому ця сорбція ефективно пригнічується ω -амінокарбовими кислотами – лігандами ЛЗД [9]. Попередня обробка клітин специфічною до С-кінцевих залишків лізину та аргініну карбоксипептидазою В приблизно вдвічі зменшує цю сорбцію, а попередній обмежений протеоліз поверхні клітин трипсином чи плазміном навпаки, призводить до значного її зростання [10,11]. Ці дані добре узгоджуються з даними щодо лігандної специфічності лізин-зв'язуючих ділянок плазміногену. Так, карбоксипептидаза В здатна відщеплювати С-кінцеві залишки лізину чи аргініну, однак неефективна по відношенню до лігандних пар 1-Х-3 мотиву. З іншого боку, обмежений гідроліз трипсином чи плазміном мембранних білків призводить до збільшення на поверхні С-кінцевих залишків лізину чи аргініну. Наведені дані дають свого роду ключ до розуміння причинно-наслідкових зв'язків, що лежать в основі притаманих онкологічним процесам активаційних процесів, зокрема – ролі в них пептидних компонентів ендогенної інтоксикації.

Ендогенною (чи метаболічною) інтоксикацією називають зумовлене дискоординацією метаболічних процесів підвищення концентрації природно існуючих метаболітів, проміжних та кінцевих продуктів як нормального, так і порушеного обміну [12]. Зумовлено цей стан деструктивними процесами, внаслідок яких в рідинах та тканинах організму накопичуються в нефізіологічних концентраціях проміжні та кінцеві продукти нормально-го обміну речовин, а також продукти порушеного метаболізму сполучної тканини та компоненти деградації її нормальних структур, що зумовлюють токсичний вплив та дисфункцію різних органів та систем. Ендогенна інтоксикація становить обов'язкову ланку шоку будь-якого походження, сепсису, опіків та травматичних захворювань, уремії, онкологічних процесів [13]. Чи не найважливішою складовою різноманітних за хімічною природою компонентів ендогенної інтоксикації визнаються пептидні середньомолекулярні пептиди (СМП) молекулярною масою 500 – 5000 Да. Описано понад 300 окремих СМП, що віднесені до 20 груп відповідно до їх хімічної структури та фізіологічної активності [12]. СМП ефективно взаємодіють з клітинами крові, зокрема – з еритроцитами, призводячи до істотних їх змін фізико-хімічних властивостей [14, 15]. Тобто певна частина продуктів притаманного ендогенній інтоксикації надмірного та функціонально необумовленого протеолізу здатна до вбудови до клітинних мембран.

Відомо, що взаємодія неструктурованих пептидів та білків з клітинними мембранами носить регулярний та закономірний характер, утворюючи структури, вельми подібних до інтегральних мембранних білків. Розміщені на поверхні позамембранних доменів позитивно заряджені амінокислотні залишки найчастіше експоновані всередину цитозоля (правило positive-inside [16]), в той час як за їх компенсації негативно зарядженими спостерігається орієнтація в позаклітинний бік [17]. Розміщені всередині подвійного фосфоліпідного шару структуровані сегменти виявляють схильність до агрегації як між собою, так і з інтегральними мембранними білками [18]. Тобто наявні вагомі передумови для інкорпорації частини утворених внаслідок функціонально необумовленого протеолізу білків та пептидів в клітинні мембрани. Тож співпадіння патологій, пов'язаних з ендогенною інтоксикацією, та патологій, пов'язаних з порушенням нормального функціонування клітинних рецепторів та інших трансмембранних білків, навряд чи випадкове.

Оскільки за притаманного онкологічним захворюванням "протеолітичного спалаху" значну частину функціонально необгрунтовано проактивованих протеїназ становлять протеїнази трипсинового ряду, та очевидно, що значну частину утворюваних пептидів мають становити пептиди з С-кінцевими залишками лізину чи аргініну. Ці ж самі залишки утворюються за протеолітичного uszkodження трипсин-подібними протеїназами конститутивних мембранних білків. Варто підкреслити, що за дрібноклітинного раку легень склад асоційованих в мембрани еритроцитів білків настільки відрізняється від норми, що може слугувати за маркери перебігу захворювання [19].

Отже, наявні молекулярні механізми забезпечують накопичення на поверхні мембран клітин крові та ендотелію судин значних кількостей пептидів та протеолітично uszkodжених білків з експонованими на поверхні С-кінцевими залишками лізину чи аргініну, тобто лігандних груп, пристосованих до зв'язування ЛЗД плазміногену та тканиного активатора плазміну. Сорбований стан утвореного плазміну забезпечує його від інактивації циркулюючим в кровобізі α_2 -антиплазміном [9], однак не перешкоджає його протеолітичній та, що особливо важливо, активаційній дії по відношенню до різноманіт-

них проформ протеїназ, що становить вагому складову молекулярних основ онкологічного процесу [1, 2].

Наведені міркування дають змогу усвідомити причини високої антиметастичної дії ангіостатинів – крингль-вміщуючих фрагментів плазміногену, утворюваних внаслідок притаманного онкологічним захворюванням "спалаху протеолізу" [20]. В цих фрагментах здатність ЛЗД до комплексоутворення істотно вища, ніж у інтактного плазміногену. Присутність білків, здатних ефективно конкурувати за ділянки зв'язування, не лише зменшує сорбцію розчинених плазміногену та тканинного активатора плазміногену, перешкоджає необхідному для активації міжмолекулярному контакту між ними, обмежує рухливість на поверхні мембрани [21]. Тим самим гальмуються подальші активаційні процеси, що видається значно ефективнішим підходом до пригнічення онкогенезу, ніж інгібування утворюваних внаслідок зазначеної активації протеїназ.

Підсумовуючи наведене, можна зробити висновок про вагомий патофізіологічний роль утворення, накопичення та вбудови до клітинних мембран неконститутивних пептидів та протеолітично uszkodжених білків в функціонально необумовленій сорбції та активації плазміногену. Водночас зумовлене дисрегуляцією протеолізу накопичення в клітинних мембранах протеолітично uszkodжених білків та неконститутивних пептидів становить важливу, якщо не невід'ємну, складову молекулярних основ онкологічного процесу.

1. Mc Intyre J., Matrisian L. Molecular imaging of proteolytic activity in cancer // *J. Cell. Biochem.* – 2003. – Vol. 90, № 6. – P.1087-1097.
2. Карамышева А.Ф. Механизмы ангиогенеза // *Биохимия.* – 2008. – Т. 73, № 7. – С.935-948.
3. Верьовка С.В., Голобородько О.П., Кизим О.И., Клиш Ю.Г., Зайцева Н.В. Дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу в плазмі крові хворих зі злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів до та після хірургічного втручання // *Журн. вушних, носових і горлових хвороб.* – 2010. – № 3. – С.2-9.
4. Система фибринолиза плазмы крови / в кн.: Г.Л. Волков, Т.Н. Платонова, А.Н. Савчук, О.В. Горничная, Т.М. Чернышенко, Е.Н. Краснобрыкая. Современные представления о системе гемостаза. К.: Наукова думка, 2005, С.141-174.
5. Robbins K., Summaria L., Hsieh B., Shah R. The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin // *J. Biol. Chem.* – 1967. – Vol. 242, № 10. – P.2333-2342.
6. Кудинов С.А., Веревка С.В., Гриненко Т.В. Лигандная специфичность участков белкового взаимодействия молекулы плазминогена человека // *Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови: Сб. науч. Работ.* – Минск, 1985. – С.116-121.
7. Nieuwenhuizen W. Sites of fibrin involved in the acceleration by t-WA. Possible role of fibrin polymerization // *Thromb. Res.* – 1994. – Vol. 75, № 3. – P.343-347.
8. Verevka S.V., Miroshnichenko O.S. 1-X-3 motif in inter-protein recognition: structures, widespread and possible practical application // *J. Mol. Recognit.* – 2001. – Vol. 14, № 5. – P.315-318.
9. Syrovets T., Simmet Th. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – 61, № 7-8. – P.873-885.
10. Miles L., Dahlberg C., Plescia J. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of α -enolase as a candidate plasminogen receptor // *Biochemistry.* – 1991. – Vol. 30, № 6. – P.1682-1691.
11. Camacho M., Fondaneche M.-C., Burtin P. Limited proteolysis of human cells increases their plasmin-binding ability // *FEBS Lett.* – 1989. – Vol. 245, № 1-2. – P.21-24.
12. Громашевська Л.Л. "Середні молекули" як один з показників "метаболічної інтоксикації" // *Лабораторна діагностика.* – 1997. – № 1. – С.11-16.
13. Владыка А.С., Левицкий Э.Р., Поддубная Л.П., Габриэлян Н.И. Средние молекулы и проблемы эндогенной интоксикации при критических состояниях различной этиологии // *Анестезиология и реаниматология.* – 1987. – № 2. – С.37-42.
14. Лифшиц Р.И., Сашенков С.Л., Вальдман Б.М. и др. Среднемолекулярные пептиды крови как факторы модификации мембран эритроцитов при ожоговой болезни // *Бюл. эксп. биол. и мед.* – 1988. – Т. 106, № 12. – С.666-668.
15. Бессмельцев С.С., Царапкин И.М., Федорова З.Д. Новый способ оценки реологических свойств эритроцитов у хирургических больных с эндогенной интоксикацией // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова.* – 1997. – 156, № 4. – С.32-36.
16. von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 225, № 2. – P.487-492.
17. Bogdanov M., Xie J., Dowhan W. Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with positive inside rule // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, № 15. – P.9637-9641.
18. McKenzie K., Engelman D. Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycoporphin A dimerization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, № 7. – P.3583-3590.
19. Ocak S., Stuart S., Ausborn J. Identification of membrane-associated proteins as a new candidate biomarkers of small-cell lung cancer

// Eur. Respiratory Journ. – 2010. – Vol. 36, Suppl. 54. – № 1944. 20. Doll J., Soff G. Angiotensin. Generation, structure and function of isoforms // Cancer Treat. Res. – 2005. – Vol. 126. – P.175-204. 21. Dudani A., Ben-Tchavchavadze M., Porter S., Tackberry E. Angiotensin and lasminogen

share binding to endothelial surface actin // Biochem. Cell Biol. – 2005. – Vol. 83, № 1. – P.28-35.

Надійшла до редколегії 22.10.10

УДК 631.46.631.445.41:631.84

І. Малиновська, д-р с.-г. наук, С. Верьовка, д-р біол. наук,
І. Домбровська, канд. біол. наук

СТАН МІКРОБІОЦЕНОЗУ СІРОГО ЛІСОВОГО ҐРУНТУ ЗА РІЗНОЦІЛЬОВОГО ВИКОРИСТАННЯ

Досліджували стан мікробіоценозів варіантів сірого лісового ґрунту за довготривалого різноцільового використання. Встановлено, що на початку вегетаційного періоду більшою чисельністю і фізіологічною активністю мікроорганізмів характеризується мікробіоценоз багаторічного перелогу. Фітоценоз малорічного перелогу, який має менший вміст ефемерів, забезпечує більш пізній розвиток мікробіоценозу своєї ризосфери. Варіант інтенсивного використання агрозему характеризується максимальною, а варіант екстенсивного агрозему – мінімальною чисельністю мікроорганізмів. За біологічною токсичністю на початку вегетаційного періоду варіанти використання ґрунту розміщуються в ряду: багаторічний перелог < інтенсивний агрозем < малорічний перелог < екстенсивний агрозем; в середині вегетації: багаторічний перелог < малорічний перелог < інтенсивний агрозем < екстенсивний агрозем.

Studied state microbiocenosis options gray forest soil long diversified use. Established that in the early growing season and greater number of physiological activity of microorganisms characterized microbiocenosis long fallow. Phytocenosis short-period fallow, which has less content ephemers provides a later development microbiocenosis its ryzosfery. Option tillage characterized by intensive use of maximum, and from extensive tillage – the minimum number of microorganisms. For biological toxicity in the early growing season using variations of soil placed in series: long fallow < intensive tillage < short-period fallow < extensive tillage, in the midst of vegetation: long fallow < short-period fallow < intensive tillage < extensive tillage.

Вступ. Залучення ґрунтів у сільськогосподарське використання з поглибленням інтенсифікації сільськогосподарського виробництва впливає практично на всі їх властивості: хімічний склад, фізичну структуру, вміст і якісний склад гумусу, що, у свою чергу, відображається на функціонуванні мікробної складової ґрунту. На прикладі аналізу широкого спектру дерново-підзолистих і дерново-карбонатних ґрунтів показано зниження мікробіологічної активності в орному шарі порівняно з фоновими аналогами (ліс), розбалансування процесів мінералізації і синтезу органічної речовини, зміна домінуючої форми азоту [10, 11]. Зі зростанням періоду сільськогосподарського використання у ґрунтах збільшується чисельність амоніфікуючих, нітрифікуючих бактерій, спорових і міцеліальних форм, що свідчить про посилення трансформації гумусу, зростання вмісту його пасивних форм.

Протилежний процес – виведення ґрунтів із сільськогосподарського використання і переведення їх у перелоговий стан залишається маловивченим з точки зору мікробіології. Процес проходить декілька стадій (сукцесій), основною ознакою яких є зміна фітоценозів, яка супроводжується змінами у стані мікробіоценозу даного ґрунту. Відомо, що перехід у стан збалансованості супроводжується заміщенням R-стратегів, які здатні до швидкої іmobilізації субстратів і розмноженню з високою швидкістю, K-стратегіями, які характеризуються повільним ростом, високоефективним використанням джерел живлення, ускладненим життєвим циклом, більш високою здатністю до виживання в оліготрофних умовах [9].

Метою нашого дослідження була оцінка характеру і масштабів змін чисельності і співвідношення мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп, напрямку і інтенсивності мінералізаційних процесів при виведенні ґрунтів із сільськогосподарського використання і переведення їх у перелоговий стан.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження були проведені на прикладі сірого лісового ґрунту на територіально близьких ділянках: 1 – ґрунт, виведений із сільськогосподарського використання у 2000 році (малорічний перелог); 2 – ґрунт, виведений із сільськогосподарського використання у 1987 році (багаторічний перелог); 3-4 – агроземи стаціонарного досліді, закладеного в 1987 році: 3 – контроль, польова сівозміна без використання мінеральних і органічних добрив (екстенсивний

агрозем); 4 – польова сівозміна з насиченістю мінеральними добривами $N_{96}P_{108}K_{112,5}$ по фоні заорювання побічної продукції рослинництва (інтенсивний агрозем).

Відбір ґрунтових зразків проводили двічі – 25 травня 2005 року (перша третина вегетаційного періоду), в період затяжних дощів, коли ґрунт був перезволожений, і 12 липня (друга третина вегетаційного періоду) – впродовж посушливого періоду тривалістю 14 діб. Чисельність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп оцінювали методом посіву на відповідні поживні середовища [5]. Показник інтенсивності процесу мінералізації сполук азоту розраховували за Є.Н. Мішустіним і Е.В. Руновим [7], індекс педотрофності – за Д.І.Нікітіним та В.С.Нікітіною [8], активність процесу мінералізації гумусу – за І.С.Демкіною та Б.Н. Золотарьовою [1].

Кількість колоній мікроорганізмів підраховували впродовж 21 доби в залежності від швидкості росту і фізіологічних особливостей культури. Вірогідність формування бактеріальних колоній (ВФК) визначали за методом S.Ishikuri and T.Hattori, який описано П.А. Кожевіним з співавтором [2].

Фітотоксичні властивості ґрунту визначали з використанням рослинних біотестів (озима пшениця) за Н.А.Красильниковим [4].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням сучасних програм *Microsoft Excel*.

Результати та їх обговорення. Порівняння мікробіологічних показників ґрунту перелогів різного строку виведення з обробітку дозволяє припустити, що багаторічний перелог має у своєму фітоценозі більше ефемерів і активний період розвитку мікробіоценозу припадає на кінець травня-початок червня, коли фітоценоз досягає свого максимального розвитку і маса кореневих виділень також стає максимальною. Тому, у перший період спостережень мікробіоценоз багаторічного перелогу характеризується більшою чисельністю мікроорганізмів практично всіх вивчених груп порівняно з малорічним перелогом: амоніфікаторів – на 104%, іmobilізаторів мінерального азоту – на 23, олігонітрофілів – на 110, нітрифікаторів – на 65, педотрофів – на 295, целюлолітиків – на 125, стрептоміцетів – на 87, мікроміцетів – на 62, мобілізаторів органічних фосфатів – на 62%, мобілізаторів мінеральних фосфатів – в 4,3, азотобактеру – у 8,2 рази (табл.1).

Таблиця 1. Чисельність мікроорганізмів в сірому лісовому ґрунті різноцільового використання, млн. КУО*/ г абсолютно сухого ґрунту

№	Варіант	Амоніфікатори	Імобілізатори мінерального азоту	Оліго-нітро-філи	Азото-бактер, % оброст грудочок ґрунту	Нітрифікатори	Денітрифікатори	Педотрофи	Целюполітики	Полісахаридсинтезу ючі	Автохтон ні	Стрептоміцети	Мікромі-цети	М-и, які мобілізують мінеральні фосфати	М-и, які мобілізують орґано- фосфати
Перший відбір, 25.05.2005 р.															
1	Перелог 2000 року	13,5	66,5	54,9	6,00	39,9	79,2	34,6	30,0	**	10,7	8,55	0,060	11,4	4,20
2	Перелог 1987року	27,5	81,9	115,3	49,3	65,8	83,1	136,6	67,5	**	27,8	16,0	0,038	49,3	6,80
3	Екстенсивний агрозем	14,2	39,5	49,6	94,7	65,8	31,4	33,5	28,6	**	17,4	6,80	0,035	10,9	6,90
4	Інтенсивний агрозем	47,7	238,1	117,8	22,7	92,6	97,5	121,1	107,6	**	117,4	27,2	0,054	136,3	16,0
Другий відбір, 12.07.2005 р															
1	Перелог 2000 року	54,4	82,6	406,6	0	7,80	22,2	57,4	45,8	2,2	29,8	8,90	0,088	33,0	15,0
2	Перелог 1987 року	24,8	42,7	449,8	38,0	8,80	32,0	33,5	27,7	1,46	9,52	6,00	0,042	16,0	6,23
3	Екстенсивний агрозем	71,3	157,0	235,0	99,3	3,46	53,2	144,8	81,0	16,0	30,8	8,90	0,043	59,6	12,8
4	Інтенсивний агрозем	105,1	225,7	353,0	8,70	6,83	122,0	154,0	206,5	12,2	25,7	6,60	0,046	99,5	25,1

Примітка: КУО* – колонієутворююча одиниця, ** – не визнач.

Процеси денітрифікації протікають приблизно з однаковою інтенсивністю у ґрунтах обох перелогів. Перевищення кількості автохтонної мікрофлори (в 2,6 рази) не свідчить, на нашу думку, про більш активне розкладання гумусу у ґрунті багаторічного перелогу. Можливо, зростання кількості автохтонної мікрофлори обумовлене появою у цей період інших субстратів для мікроорганізмів цієї групи. Це підтверджується аналізом такого показника як активність мінералізації гумусу: в ґрунті багаторічного перелогу вона на 51 і 83% нижча за інтенсивність деструкції гумусу у ґрунті малорічного пере-

логу у перший і другий періоди спостережень відповідно (табл. 2). Максимальною активністю мінералізації гумусу на початку вегетаційного періоду характеризується інтенсивний агрозем, в якому гумус деструктується на 87% активніше порівняно з екстенсивним агроземом і в 4,75 разів активніше – порівняно з багаторічним перелогом. У другий період спостережень внаслідок заорювання ріпаку на зелене добриво активність мінералізації гумусу в обох варіантах агрозему стає приблизно однаковою і нижчою за перелогову (табл.2).

Таблиця 2. Показники інтенсивності мінералізаційних процесів і фітотоксичні властивості сірого лісового ґрунту за тривалого різноцільового використання

№	Варіант	Індекс педотрофності	Коефіцієнт опідзоленості	Коефіцієнт мінералізації-іммобілізації азоту	Активність мінералізації гумусу, %	Маса 100 рослин тест-культури – озимої пшениці, г		
						стебел	коренів	загальна маса
Перший відбір, 25.05.2005 г								
1	Перелог 2000 року	2,56	4,06	4,93	30,8	4,18	2,40	6,58
2	Перелог 1987року	4,97	4,19	2,98	20,4	5,31	3,70	9,01
3	Екстенсивний агрозем	2,56	3,49	2,78	51,9	3,35	2,77	6,12
4	Інтенсивний агрозем	4,61	2,47	4,99	96,9	4,16	3,29	7,45
Другий відбір, 12.07.2005								
1	Перелог 2000 року	1,06	3,80	1,52	51,9	7,60	5,42	13,0
2	Перелог 1987року	1,35	18,2	1,72	28,4	8,00	7,26	15,3
3	Екстенсивний агрозем	2,03	3,29	2,20	21,2	6,60	3,76	10,4
4	Інтенсивний агрозем	1,47	3,36	2,15	17,7	6,89	3,90	10,8

У другий період спостережень фітоценоз малорічного перелогу досягає максимуму у своєму розвитку і відповідно, чисельність мікроорганізмів у ґрунті його ризосфери перевищує відповідні показники ґрунту багаторічного перелогу, фітоценоз якого вже характеризується процесами дозрівання насіння і частковим в'яненням вегетативної біомаси. Так, чисельність амоніфікаторів у ґрунті малорічного перелогу перевищує відповідний показник багаторічного перелогу на 119%, імобілізатори

рів мінерального азоту – на 93,4, педотрофів – на 71,3, целюполітиків – на 65,3, стрептоміцетів – на 48,3, мікроміцетів – на 110,7, мобілізаторів орґанофосфатів – на 141,0, мобілізаторів мінеральних фосфатів – на 106,3, автохтонної мікрофлори – на 213 % (табл.1).

Як показано Скурятиним Ю.М. [12], протягом певного часу спостерігається ущільнення ґрунту, виведеного з сільськогосподарського обробітку. Цим може бути пояснена більш висока активність денітрифікації у ґрунті ба-

гаторічного перелогу. Крім того, вміст азоту у ньому вищий, ніж у ґрунті малорічного перелогу внаслідок більшої густоти рослин на одиниці площі, а отже, і більшої актив-

ності процесів асоціативної азотфіксації у ризосфері злакових трав і симбіотичної азотфіксації, яку здійснюють бобові компоненти травосумішок (табл.3).

Таблиця 3. Агрохімічна характеристика сірого лісового ґрунту за тривалого різноцільового використання

№	Варіант	Вміст легкогідролізованого азоту, мг N/kg ґрунту	Вміст фосфору $\text{mgP}_2\text{O}_5/100\text{g}$ ґрунту	Вміст калію, $\text{mg K}_2\text{O}/100\text{g}$ ґрунту	Ступінь рухомості фосфору, $\text{mgP}_2\text{O}_5/100\text{g}$	Вміст гумусу, %	pH	Вологість, %	
								Перший відбір	Другий відбір
1	Перелог 2000 року	67,2	13,7	12,8	0,249	1,68	5,30	17,0	10,0
2	Перелог 1987року	74,0	16,4	12,8	0,287	1,93	5,30	18,5	9,00
3	Екстенсивний агрозем	71,4	13,4	9,00	0,906	1,68	6,05	15,0	8,60
4	Інтенсивний агрозем	96,6	35,0	18,3	2,90	1,91	5,70	15,0	10,0

У ґрунті багаторічного перелогу кількість вільноіснуючих мікроорганізмів (азотобактер) у перший відбір перевищує показник малорічного перелогу у 8,2 рази. У другий період досліджень азотобактер у ґрунті перелогу 2000 року не виявлений, тоді як у ґрунті багаторічного перелогу його кількість оцінюється 38% (табл.1). Всі ці процеси: симбіотична, асоціативна і незалежна від рослин азотфіксація призводять до зростання вмісту сполук азоту у ґрунті багаторічного перелогу і на кінцевому етапі циклу азоту можуть бути субстратами для проходження більш інтенсивної денітрифікації.

Найбільш активно денітрифікація протікає у ґрунті інтенсивного агрозему внаслідок внесення екзогенного легкодоступного азоту мінеральних добрив. У ґрунті екстенсивного агрозему чисельність денітрифікаторів нижча за відповідні показники ґрунту перелогу і інтенсивного агрозему в 2,5 і 3,1 рази (перший період спостережень).

Порівняння ґрунту багаторічного перелогу з агроземами показало, що у ґрунті інтенсивного варіанту чисельність мікроорганізмів вища за показники ґрунту перелогу: амоніфікаторів – на 73%, іmobilізаторів мінерального азоту – на 190, целюлолітиків – на 59, стрептоміцетів – на 70, мікроміцетів – на 42, мобілізаторів органофосфатів – на 135% (табл.1). В обох вищевказаних варіантах з однаковою інтенсивністю проходять процеси освоєння органічної речовини ґрунту: і кількість педотрофів і їх фізіологічна активність приблизно однакові (табл. 1,4).

Істотно відрізняється за кількісними показниками від інтенсивного агрозему мікробіоценоз ґрунту екстенсивного варіанту: в ньому у 6,0 разів менше іmobilізаторів мінерального азоту, в 3,6 разів – педотрофів, в 2,4 рази – олігонітрофілів, в 3,4 рази – амоніфікаторів, в 1,5 рази – мікроміцетів, в 3,8 разів – целюлолітиків, в 12,5 разів – мобілізаторів мінеральних фосфатів, в 4,0 рази – стрептоміцетів, в 2,4 рази – мобілізаторів органофосфатів і в 1,4 рази – нітрифікаторів (табл.1). У другому періоді спостережень чисельність мікроорганізмів досліджених груп у ґрунті екстенсивного варіанту також була нижчою за відповідні показники ґрунту інтенсивного варіанту. При цьому, ґрунт екстенсивного варіанту містив більше азотобактеру (в 11,4 рази) і полісахаридсинтезуючих бактерій – на 31%. Оскільки бактеріальні полісахариди інтенсифікують мобілізацію мінеральних елементів із нерозчинних форм [3], то зростання чисельності полісахаридсинтезуючих бактерій можна розглядати як пристосування мікро- і фітоценозів до нестачі мінеральних елементів.

Аналіз динаміки появи колоній у перший період спостережень дозволяє зробити висновок про те, що мікроорганізми багаторічного перелогу знаходяться у більш активному стані, ніж мікроорганізми малорічного перелогу (табл. 4).

Таблиця 4. Вірогідність формування колоній мікроорганізмів у сірому лісовому ґрунті різноцільового використання, λ , год⁻¹ · 10⁻²

№	Варіант	Амоніфікатори	Іmobilізатори мінерального азоту	Оліго-ніт-рофіли	Нітрифікатори	Денітрифікатори	Педо-трофи	Целюлолітики	Мікроміцети	Автохтонні	М-и, які мобілізують мінеральні фосфати
Перший відбір, 25.05.2005 г											
1	Перелог 2000 року	3,37	3,35	3,58	0,65	0,24	3,94	6,35	8,22	Не виз	1,09
2	Перелог 1987року	4,51	3,68	3,72	1,25	0,28	5,66	5,88	8,16	Не виз	0,95
3	Екстенсивний агрозем	3,12	5,73	3,07	1,69	0,15	6,81	6,96	3,32	Не виз	1,23
4	Інтенсивний агрозем	4,18	3,91	3,93	1,30	0,36	7,17	9,23	4,64	Не виз	1,58
Другий відбір, 12.07.2005											
1	Перелог 2000 року	1,48	2,95	5,81	Не виз	0,17	2,00	2,25	6,50	0,696	1,62
2	Перелог 1987року	2,40	2,31	9,51	Не виз	0,11	2,59	0,93	3,81	0,703	1,09
3	Екстенсивний агрозем	3,15	1,81	2,16	Не виз	0,12	0,79	1,09	3,93	0,478	1,74
4	Інтенсивний агрозем	4,20	2,07	5,33	Не виз	0,25	2,11	0,89	4,45	0,618	1,85

Так, ВФК амоніфікаторів ґрунту багаторічного перелогу перевищує відповідний показник малорічного перелогу на 33,8%, ВФК імобілізаторів мінерального азоту – на 9,9, олігонітрофілів – на 4,0, нітрифікаторів – на 92,3, педотрофів – на 43,7%. Фізіологічна активність целюлозоруйнівних мікроорганізмів і мікроміцетів у ґрунті малорічного перелогу вища, при цьому мікроміцетів кількісно більше, а целюлолітиків – менше (табл.1,4). Раніше для деяких груп мікроорганізмів нами було встановлено, що між величиною ВФК і чисельністю мікроорганізмів існує зворотна залежність: чим менша чисельність мікроорганізмів, тим вища їх фізіологічна активність. Однак, ця закономірність має місце лише за деяких умов: наявність і доступність субстратів, оптимальність фізико-хімічних умов, стадії дослідженого процесу і т.і.

Максимальною фізіологічною активністю у перший період спостережень характеризуються мікроорганізми інтенсивного агрозему, їх ВФК перевищує відповідні показники всіх вивчених варіантів, за виключенням ВФК мікроміцетів: їх фізіологічна активність у ґрунтах перелогів була вищою приблизно у 2,0 рази (табл.4).

У другий період спостережень, коли чисельність мікроорганізмів у ґрунті перелогу 2000 року перевищує чисельність мікроорганізмів багаторічного перелогу, ситуація з ВФК цих мікроорганізмів стає не настільки однозначною: тільки частка їх фізіологічно більш активна – це імобілізатори мінерального азоту, денітрифікатори, целюлозоруйнівні бактерії, мікроміцети, мобілізатори мінеральних фосфатів. Високою ВФК характеризуються олігонітрофіли обох перелогових ділянок і інтенсивного агрозему. В цілому, мікроорганізми інтенсивного агрозему, також як і у перший період спостережень, характеризуються високою фізіологічною активністю.

Вивчення біологічної токсичності ґрунту різних варіантів використання показало, що ґрунт багаторічного перелогу відрізняється мінімальною токсичністю як у перший, так і у другий періоди спостережень (табл.2). Маса 100 тест-об'єктів, вирощених з використанням ґрунту багаторічного перелогу, перевищує відповідні показники у перший період: перелогу 2000 року – на 36,9%, екстенсивного агрозему – на 47,2, інтенсивного агрозему – на 20,9%. Відповідні показники для другого періоду спостережень склали 17,7, 47,1 і 41,7%. Найбільш токсичним є ґрунт екстенсивного варіанту, в який мінеральні і органічні добрива не вносилися з 1987 року. Цей висновок в деякому ступені суперечить уявленням про те, що елементи інтенсивних технологій: внесення мінеральних добрив, меліорантів, пестицидів – сприяють зростанню біологічної токсичності ґрунтів [6]. У другому періоді спостережень різниця в токсичності між варіантами агрозему була мінімальною, можливо, через проведене зорювання ріпаку на зелене добриво в інтенсивному варіанті і переорювання ґрунту в екстенсивному варіанті. Кисень, який поступив при оранці, окислив токсичні речовини і знизив рівень токсичності.

Ефективність і напрямок мікробіологічних процесів у ґрунті залежать як від чисельності мікроорганізмів, так і від специфіки функціональних зв'язків між ними. На основі даних про динаміку розвитку мікроорганізмів в досліджених ґрунтах нами розраховані коефіцієнти кореляції між показниками чисельності мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп і побудовані кореляційні матриці за методом П.Терент'єва [14]. Проведений аналіз свідчить, що за загальною кількістю значимих кореляційних зв'язків ($r = 0,667-0,999$) перше місце належить мікробіоценозу багаторічного перелогу – 72, потім інтенсивного агрозему – 56, малорічного перелогу

– 44, екстенсивного агрозему – 29. При цьому, кількість позитивних зв'язків складає відповідно 64, 51, 40 і 29.

Для мікробіоценозу багаторічного перелогу найбільш характерні і значимі зв'язки між амоніфікуючими мікроорганізмами і мобілізаторами мінерального азоту ($r = 0,840$), олігонітрофілами ($r = -0,706$), нітрифікаторами ($r = 0,951$), денітрифікаторами ($r = 0,884$), педотрофами ($r = 0,959$), целюлолітиками ($r = 0,977$), стрептоміцетами ($r = 0,925$), мікроміцетами ($r = 0,962$), мобілізаторами мінеральних фосфатів ($r = 0,888$), мобілізаторами органофосфатів ($r = 0,984$) і т.і. В мікробіоценозі малорічного перелогу ці кореляційні залежності відсутні, що свідчить про розбалансованість зв'язків між блоками: зимогеним, автохтонним, евтрофним і оліготрофним. Характерним є також наявність тісних кореляційних зв'язків зі всіма групами мікроорганізмів автохтонної мікрофлори ($r = 0,774-0,998$). Крім перелогу 1987 року, подібна закономірність спостерігається у мікробіоценозі малорічного перелогу (10 значущих зв'язків, з них 9 – позитивних), інтенсивного агрозему – 9 зв'язків, всі позитивні, екстенсивного агрозему – 3 позитивних зв'язки.

Висновки.

1. На початку вегетаційного періоду більшою чисельністю і фізіологічною активністю мікроорганізмів характеризується мікробіоценоз багаторічного перелогу. Фітоценоз малорічного перелогу, який містить меншу кількість ефемерів, забезпечує більш пізній розвиток мікробіоценозу своєї ризосфери.

2. Варіант інтенсивного використання агрозему характеризується максимальною, а варіант екстенсивного агрозему – мінімальною чисельністю мікроорганізмів.

3. За біологічною токсичністю на початку вегетаційного періоду варіанти використання ґрунту розміщуються в ряду: багаторічний перелог < інтенсивний агрозем < малорічний перелог < екстенсивний агрозем; в середині вегетації: багаторічний перелог < малорічний перелог < інтенсивний агрозем < екстенсивний агрозем.

4. Найбільш стабільним і стійким є мікробіоценоз багаторічного перелогу, потім – інтенсивного агрозему, малорічного перелогу, і – нарешті – екстенсивного агрозему, куди з 1987 року не вносились екзогенні речовини, а з врожаєм відчувувалися основні макро- і мікроеlementи.

1. Демкина Т.С., Золотарева Б.Н. Микробиологические процессы в почвах при различных уровнях интенсификации земледелия // Микробиологические процессы в почвах и урожайности сельскохозяйственных культур. – Вильнюс, 1986. – С.101-103. 2. Кожевин П.А., Кожевина Л.С., Болотина И.Н. Определение состояния бактерий в грунте // Доклады АН СССР. – 1987. – т.297., № 5. – С.1247-1249. 3. Малиновська І.М. Агроекологічні основи мікробіологічної трансформації біогенних елементів ґрунту / Автореф. дис. д-ра с.г.наук. – К., 2003. 4. Методи изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / Под ред. Н.А. Красильникова. – М.: МГУ, 1966. – 162 с. 5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с. 6. Минеев В.Г., Ремпе Е.Х. Агрохимия, биология, экология почвы. – М.: Росагропромиздат, 1990. – 206 с. 7. Мишустин Е.Н., Рунов Е.В. Успехи разработки принципов микробиологического диагностирования состояния почв // Успехи современной биологии. – М.: АН СССР, 1957. – Т.44. – С. 256-267. 8. Никитин Д.И., Никитина В.С. Процессы самоочищения окружающей среды и паразиты растений. – М.: Наука, 1978. – 205 с. 9. Одум Ю. Основы экологии. – М.: Мир, 1975. – 740 с. 10. Паринкина О.М., Ключева Н.В. Микробиологические аспекты уменьшения естественного плодородия почв при их сельскохозяйственном использовании // Почвоведение. – 1995. – №5. – С. 573-581. 11. Раскова Н.В. Биохимическая оценка интенсивности процесса гумификации дерново-подзолистых почв при их окультуривании // Агропочвоведение и плодородие почв. – Л., 1986. – С.68. 12. Скурятин Ю.М. Оптимизация физического stanu ґрунту перелогів // Вісник аграрної науки. – 2003. – №8. – С.14-16. 13. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с. 14. Терентьев П.В. Метод корреляционных плеяд // Вестн. Ленинградского ун-та. – 1959. – №9. – С.137-143.

Надійшла до редколегії 23.09.10

УДК 577.125.8

С. Сенін, асп., К. Дворченко, канд. біол. наук,
Т. Бородіна, студ., Л. Остапченко, д-р біол. наук

ФОСФОЛІПІДНИЙ ТА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ

Показано, що в умовах тривалого гіпоацидного стану змінюється фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин слизової оболонки шлунка щурів. Мультипробіотик "Симбітер" ацидофільний нормалізував вміст досліджуваних показників практично до контрольних значень.

It is shown that under conditions of long-term hypoacidity state was changes the phospholipid and fatty acid composition of the gastric mucosa cells of rats. Multiprobiotic "Symbiter" acidophilis normalized the content of the study parameters to near control values.

Вступ. В Україні однією з основних нозологій, що формує розповсюдженість і захворюваність хвороб органів травлення є виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки [2]. В клінічній практиці для лікування таких кислотозалежних захворювань широко застосовують інгібітори протонної помпи (ІПП): омепразол, ланзопразол та інші. Останні знижують шлункову секрецію шляхом пригнічення активності мембранозв'язаного ферменту H^+ , K^+ – АТФази парієтальних клітин шлунка, що призводить до розвитку гіпоацидності. Тривале застосування ІПП викликає гіпергастринемію, яка як відомо призводить до розвитку колоректального раку, морфо-функціональних змін в шлунку та кишечнику. Враховуючи широке використання ІПП в медичній практиці, надзвичайно важливим є пошук шляхів корекції її небажаних наслідків. Одним із таких шляхів є застосування пробіотиків, оскільки відомо, що гіпоацидність шлункового соку сприяє розвитку дисбіозу у шлунково-кишковому тракті. Нині мультипробіотики групи "Симбітер" вже визнані як універсальні препарати для профілактики та усунення дисбіозів різного ступеню тяжкості у дітей та дорослих всіх вікових груп [4].

Відомо, що важливу роль в протіканні та прогресуванні патологічного процесу відіграють структурно-функціональні зміни клітинних мембран. Фосфоліпіди виконують не тільки структурну роль у мембранних структурах, а і забезпечують оптимальні умови для функціонування поліферментних систем, які активно впливають на внутрішньоклітинний обмін речовин. Крім того, ці ліпіди в мембранах є найбільш лабільною складовою, особливо інтенсивно поновлюється їхній жирнокислотний спектр, який є основою для біосинтезу низки біологічно-активних молекул, зокрема простагландинів, простаглінінів, тромбоксанів, лейкотрієнів та ізопростанів [9].

Метою даної роботи було оцінити фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов тривалої гіпоацидності та за умов введення тваринам мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях вагою 180-200 г, які були розділені на три групи та утримувались в стандартних умовах виварію. Перша група тварин (контрольна) отримувала 0,2 мл внутрішньочеревинно (в/ч) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкції протягом 28 діб. До другої групи тварин відносились щури, в яких викликали тривалий гіпоацидний стан шляхом в/ч введення 0,2 мл омепразолу (Sigma, виробництва США), розчиненого у воді для ін'єкції, у дозі 14 мг/кг ваги один раз на добу упродовж 28 діб. Третю групу складали щури, яким одночасно з омепразолом вводили мультипробіотик "Симбітер" ацидофільний (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") перорально у дозі 0,14 мл/кг, розчиненого у 0,5 мл води для ін'єкції.

Ліпіди екстрагували за методом Фолча хлороформ – метанольною сумішшю (2:1, за об'ємом) [6]. Аналіз фосфоліпідного складу проводили методом двомірної тонкошарової хроматографії у системах розчинників: перший напрямок – хлороформ : метанол : бензол : аміак (65 : 30 : 10 : 6), другий напрямок – хлороформ : метанол : бензол : ацетон : крижана оцтова кислота : вода (70 : 30 : 10 : 5 : 4 : 1). Ідентифікацію індивідуальних фосфоліпідів здійснювали за допомогою відповідних стандартів. Результати виражали у відсотках від сумарної кількості фосфоліпідів [7].

Жирні кислоти метилювали, використовуючи 2М КОН в метанолі. Газохроматографічний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили на хроматографі Thermo Finnigan Trace GC ultra (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Розділення метилових похідних жирних кислот здійснювали на кварцовій капілярній колонці RTX-Wax з довжиною 60 м, внутрішнім діаметром – 0,25 мм та товщиною плівки нерухомої фази – 0,25 мкм. Хроматографічні умови: газ носій – гелій; швидкість потоку газу на колонку – 1,2 мл /хв.; температура термостату програмувалась від 50 до 230 °С; температура інжектора – 240 °С; температура детектора – 250 °С; об'єм введеної проби – 1 мкл. Для визначення кількісного складу жирних кислот використовували метод внутрішньої нормалізації [8].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [3]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнювальними показниками при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Фосфоліпідний склад клітинних мембран – один з головних факторів, який визначає її структурну організацію та функціональний стан. Аналіз отриманих результатів свідчить, що в клітинах слизової шлунка контрольних тварин найбільше міститься фосфатидилхоліну (ФХ) і фосфатидилетаноламіну (ФЕА) відповідно в середньому 38 і 32 % від загальної суми фосфоліпідів (ФЛ). Найменший вміст складали лізофосфатидилхолін (ЛФХ) та фосфатидилсерин (ФС) відповідно 1,6 і 3,7% від суми усіх ФЛ.

За умов розвитку тривалого гіпоацидного стану спостерігались суттєві зміни у фосфоліпідному складі клітин СОШ щурів. Зокрема, відбувалось достовірне зменшення вмісту окремих фракцій ФЛ: ФХ (у 1,6 рази), ФЕ (у 1,7 рази), ФС (у 2 рази) та фосфатидилінозиту (ФІ) – у 1,5 рази порівняно з контрольною групою тварин. За цих же умов відбувалось підвищення вмісту ЛФХ та сфінгомієліну (СМ) у 3 та 1,3 рази відповідно (рис. 1).

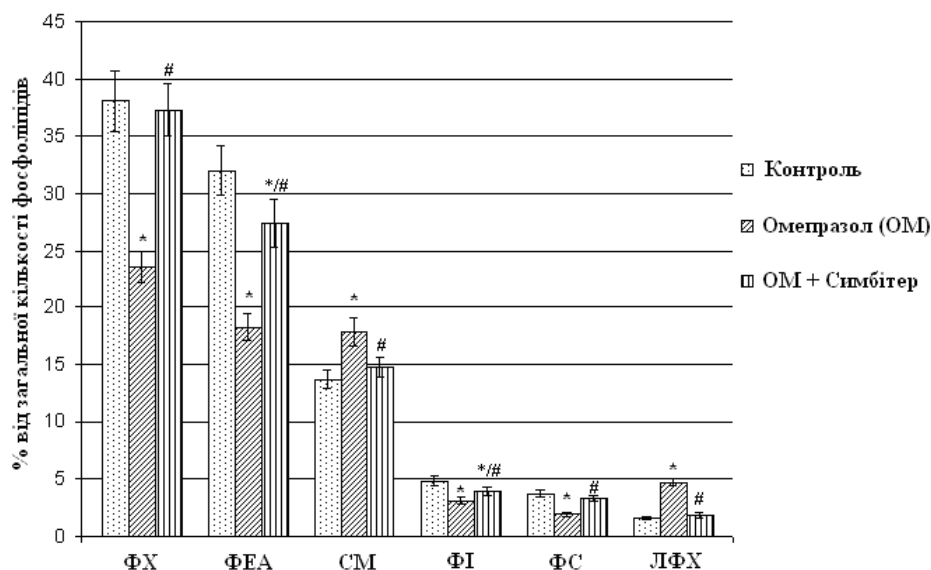


Рис. 1. Вміст фосфоліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів.

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем;

#- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Зниження рівня фосфоліпідів (ФХ, ФЕ, ФІ та ФС), може бути обумовленим активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) або зниженням синтезу у клітинах СОШ за умов 28-денного введення омепразолу. Зменшення вмісту ФХ та ФІ може бути викликано активацією фосфоліпаз. Відомо, що продукти гідролізу ФХ та ФІ модулюють активність протеїнкази С, яка може відігравати суттєву роль у розвитку досліджуваної патології [9]. Необхідно також зазначити, що зниження

ФС на фоні зростання СМ, може свідчити про пригнічення сфінгомелінового циклу і керамід-індукованого апоптозу відповідно [1]. В умовах тривалої гіпоацидності це може бути додатковим ініціюючим фактором розвитку гастроканцерогенезу під впливом гіпергастринемії.

При дослідженні спектру жирних кислот (ЖК) ліпідів клітин СОШ контрольних щурів було встановлено, що вони складаються з кислот числом вуглецевих атомів від 12 до 22, насичених та ненасичених (рис. 2).

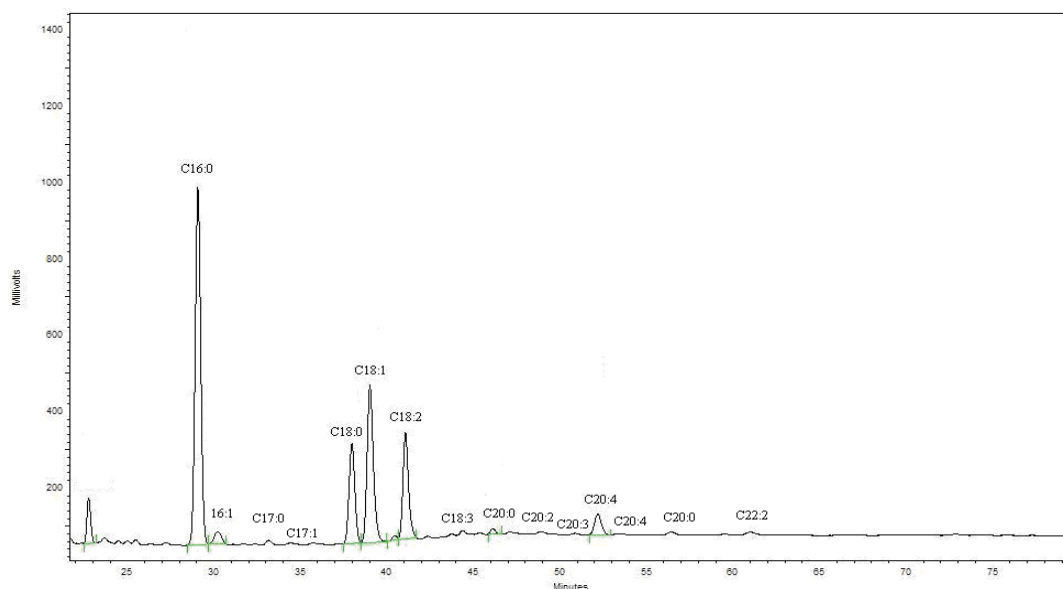


Рис. 2. Хроматограма метилових ефірів жирних кислот ліпідів клітин слизової оболонки шлунка контрольних щурів.

Встановлено, що за умов тривалого впливу омепразолу у клітинах СОШ щурів знижувався вміст основних насичених ЖК: лауринової ($C_{12:0}$) – у 7,5 рази, міристинової ($C_{14:0}$) – у 3,3 рази та пальмітинової ($C_{16:0}$) – у 1,2 рази. За цих же умов відбувалось збільшення рівня таких насичених ЖК, як маргаринової ($C_{17:0}$) – у 1,7 рази, стеаринової ($C_{18:0}$) – у 1,7 рази, арахінової ($C_{20:0}$) – у 2,7 рази та бегенової ($C_{22:0}$) – у 3 рази відносно контролю (табл. 1).

Також спостерігалось зменшення рівня мононенасичених ЖК: пальмітолеїнової ($C_{16:1}$) та олеїнової ($C_{18:1}$) відповідно у 1,7 та у 1,4 рази порівняно з контрольною групою щурів. Було зафіксовано значне збільшення вмісту гондоїнової ЖК ($C_{20:1}$) з 0,30% від загальної суми жирних кислот у контролі до 1,14% за умов гіпоацидного стану (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст жирних кислот ліпідів (% від загальної кількості) клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов тривалої гіпоацидності, (M ± m, n=10)

Умовне позначення жирної кислоти	Назва жирної кислоти згідно тривіальної номенклатури	Контроль	Омепразол (ОМ)	ОМ + Симбітер
C _{12:0}	Лауринова	2,04 ± 0,16	0,27 ± 0,02*	1,69 ± 0,14 [#]
C _{14:0}	Міристинова	3,46 ± 0,28	1,04 ± 0,08*	1,49 ± 0,12 [#]
C _{16:0}	Пальмітинова	39,63 ± 4,11	32,42 ± 3,12*	35,56 ± 3,16
C _{16:1}	Пальмітолеїнова	2,09 ± 0,15	1,19 ± 0,11*	1,53 ± 0,13 [#]
C _{17:0}	Маргарінова	0,56 ± 0,05	0,98 ± 0,08*	0,73 ± 0,07 [#]
C _{17:1}	Гептадецена	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,03
C _{18:0}	Стеаринова	11,86 ± 1,06	20,57 ± 1,69*	15,91 ± 1,27 [#]
C _{18:1}	Олеїнова	19,42 ± 1,67	13,89 ± 1,03*	17,49 ± 1,68 [#]
C _{18:2 ω6}	Лінолева	12,11 ± 1,07	17,59 ± 1,19*	15,51 ± 1,11 [#]
C _{18:3 ω3}	Ліноленова	0,49 ± 0,04	0,51 ± 0,04	0,48 ± 0,04
C _{20:0}	Арахідова	0,61 ± 0,06	1,64 ± 0,13*	1,20 ± 0,11 [#]
C _{20:1}	Гондоїнова	0,30 ± 0,03	1,14 ± 0,08*	0,73 ± 0,07 [#]
C _{20:2}	Ейкозадієнова	0,21 ± 0,02	1,99 ± 0,21*	1,11 ± 0,19 [#]
C _{20:3 ω6}	Ейкозатрієнова	0,19 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,36 ± 0,03 [#]
C _{20:4 ω6}	Арахідонова	4,88 ± 0,22	2,53 ± 0,37*	3,10 ± 0,28 [#]
C _{20:5 ω3}	Ейкозопентаєнова	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,02
C _{22:0}	Бегенова	0,53 ± 0,05	1,58 ± 0,14*	1,27 ± 0,12 [#]
C _{22:2}	Докозадієнова	0,20 ± 0,02	0,51 ± 0,05*	0,36 ± 0,03 [#]
C _{22:3}	Докозатрієнова	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,01 [#]
C _{22:4}	Докозатетраєнова	0,14 ± 0,01	0,30 ± 0,02*	0,19 ± 0,01 [#]
C _{22:5 ω3}	Докозапентаєнова	0,23 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,27 ± 0,02 [#]
C _{22:6 ω3}	Докозагексаєнова	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,38 ± 0,03

*- p<0,05 порівняно з контролем;

#- p<0,05 порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

Було також показано, що за умов омепразол-індукованого гіпоацидного стану у клітинах СОШ щурів відмічено значне зростання кількості таких поліненасичених ЖК: лінолевої (C_{18:2 ω6}) – у 1,4 рази, ейкозадієнової (C_{20:2}) – у 9 разів, ейкозатрієнової (C_{20:3 ω6}) – у 2,2 рази, та докозадієнової (C_{22:2}) – у 2,5 рази. Паралельно з цим спостерігалось збільшення рівня докозатрієнової ЖК (C_{22:3}), докозатетраєнової ЖК (C_{22:4}) та докозапентаєнової ЖК (C_{22:5 ω3}) відповідно у 1,6, 2 та у 1,4 рази в порівнянні з контролем. Вміст арахідонової ЖК (C_{20:4 ω6}) знижувався з 4,88% у контролі до 2,53% за умов тривалого введення омепразолу.

Зростання вмісту ненасичених ЖК у ліпідах СОШ, може збільшувати плинність клітинних мембран, що може призвести до пригнічення активності мембранозв'язаного фермента H⁺, K⁺ – АТФази парієтальних клітин, і, тим самим, суттєво вплинути на подальший перебіг досліджуваної патології [5]. Зниження пальмітинової ЖК (C_{16:0}) може свідчити про деструктивні зміни лецитинової фракції фосфоліпідів клітин СОШ. Зменшення олеїнової ЖК (C_{18:1}), може вказувати про виснаження системи антиоксидантного захисту клітин, оскільки відомо, що ця кислота є інгібітором процесів ПОЛ. Зниження рівня арахідонової ЖК (C_{20:4 ω6}) у складі ліпідів клітин СОШ може бути пов'язано з активацією цитозольної фосфоліпази A₂ у відповідь на біологічний стимул. У результаті цієї реакції розривається складноєфірний зв'язок у другому положенні молекули фосфатидилхоліну і фосфатидилетаноламіну, що призводить до утворення вільного арахідолату і відповідних лізофосфоліпідів. В умовах розвитку тривалої гіпоацидності вільна арахідонова кислота може бути джерелом синтезу цілої низки прозапальних біологічно-активних речовин: простагландинів (ПГЕ₂ та ПГФ_{2α}) та лейкотрієнів (LTB₄, LTC₄, LTD₄ та LTE₄). З іншого боку, при окисненні ЖК, особливо арахідонової, можуть утворюватись продукти вільнорадикального окиснення ліпідів: F₂-ізопростани (5-, 8-, 12-, 15-серії), дієнові кон'югати та малоновий діальдегід. [10].

При введенні тваринам мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний на тлі тривалої гіпоацидності, спостерігалось відновлення вмісту фосфоліпідів та жирних кислот у клітинах СОШ щурів майже до контрольних значень, порівняно з групою тварин, яким вводили

омепразол 28 днів без корекції. Такий корегуючий ефект мультипробіотику на фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин СОШ щурів в умовах тривалої гіпоацидності може бути зумовлений широким спектром його пробіотичних ефектів. Відомо, що окремі штами бактерій у складі мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний здатні синтезувати вітаміни групи В, в тому числі кобаламіни (в середньому 120 мкг/кг), екзополісахарида та коротколанцюгові жирні кислоти, які проявляють мембраностабілізуючі, протизапальні та антиоксидантні властивості [4].

Висновки. Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень встановлено, що за умов тривалої гіпоацидності змінюється фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин СОШ щурів, що свідчить про порушення структурного та функціонального статусу епітеліоцитів шлунка. При введенні тваринам мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний за умов розвитку гіпоацидного стану, зафіксовано відновлення рівня фосфоліпідів та жирних кислот практично до контрольних значень.

1. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С., Халилов Э.М. Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе // Биохимия. – 2006. – №7. – С. 882-891. 2. Нейко С.М., Маяковська Н.Р. До питання етіології і патогенезу виразкової хвороби на сучасному етапі // Галицький лікарський вісник -2006. – №1. – с.122-128. 3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. 4. Сухомлин А.А., Непорада К.С. Экспериментальная коррекция мультипробiotиком "Симбітер" ацидофільний оксидативного стрессу та протеїназно-інгібіторного дисбалансу слинних залоз в умовах гіпергастринемії // Світ медицини та біології. – 2010. – №2. – С. 169-171. 5. Calder P. N-3 fatty acids, inflammation and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients // Lipids. – 2004. Vol. 39. – P.1147–1161. 6. Folch J., Lees M. and Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509. 7. Kates M. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam: Elsevier, 1986. – 464 p. 8. Maxwell R., Marmer W. Systematic protocol for the accumulation of fatty acid data from multiple tissue samples: Tissue handling, lipid extraction and class separation and capillary gas chromatographic analysis // Lipids. – 1983. Vol.18. – P. 453-459. 9. Poulsen C., Moughan J. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Regulation of Bone Metabolism // Experimental Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 232. – P.1275–1288. 10. Tilley S., Coffman T., Koller B. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes // J Clin Invest. – 2001. Vol.108. – P.15–23.

Надійшла до редколегії 25.09.10

УДК 612.35+591.132.5

Л. Карбовська, канд. біол. наук, З. Горенко, канд. біол. наук,
В. Бабан, інж., С. Весельський, д-р біол. наук**ВМІСТ ЛІПІДНИХ КОМПОНЕНТІВ В ЖОВЧІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ОКСИТОЦИНУ**

В гострих спробах на щурах з канюльованою жовчною протокою вивчали зміни рівня холерезу і ліпідного складу жовчі. Встановлено, що екзогенний окситоцин в дозах 5,0 та 10,0 Од/кг маси тіла тварини практично не змінює як об'єм секретованої жовчі, так і її ліпідний склад, збільшуючи незначною мірою виділення з секретом ефірів холестеролу та зменшуючи вміст вільних жирних кислот і тригліцеридів в жовчі.

We studied changes of the level of choleresis and chemical composition of the bile in acute experiments on the rats with biliary duct cannulated. We have shown that exogenous Oxytocin at the doses 5.0 and 10.0 unit/kg body weight don't changes volume of bile secretion and lipid composition of the bile. Oxytocin insignificantly increases secretion of cholesterol esters and reduces free fatty acids and triglycerides content in the bile.

Вступ. Окситоцин (ОТ) – перший нейрогіпофізарний гормон, що був синтезований в біологічно активній формі, структурну формулу якого вдалось повністю визначити. ОТ разом з іншим гормоном нейрогіпофізу – вазопресиноном, був виявлений у 1895 році Олівером та Шафером, які продемонстрували його вплив на кров'яний тиск [1, 2]. Починаючи з 1950-х років кількість досліджень, що проводились з метою вивчення впливу ОТ на фізіологічні функції організму значно збільшилась. Поява специфічних агоністів та антагоністів ОТ рецепторів дозволила пояснити особливу роль ОТ у регуляції фізіологічних процесів організму. За сучасними уявленнями великі нейросекреторні клітини паравентрикулярних та супраоптичних ядер синтезують ОТ у вигляді великої молекули препо-окситоцину нейрофізину I, в подальшому комплекс розщеплюється з утворенням ОТ, котрий секретується в кров задньою часткою гіпофізу. Дія ОТ реалізується шляхом взаємодії з окситоциновим рецептором (ОТР). ОТР відносяться до групи окситоцин-вазопресинових рецепторів, що включає ОТР, вазопресинові рецептори V1- α , V1- β та V2, що відносяться до надродини рецепторів, пов'язаних з G-білком [3]. Система ОТ-ОТР, крім репродукції, бере участь в регуляції розслаблення серця і судин, поведінкових функцій, зумовлених дією нервової системи, а саме статеву поведінку, поведінку в суспільстві, формування материнських почуттів, пам'яті, прийом рідини та їжі [4, 5].

Значний інтерес викликають дослідження ролі ОТ в регуляції функцій печінки. Впродовж останніх років були отримані дані про вплив ОТ на енергетичні процеси в тканині печінки, кровопостачання залози. Разом з тим, в літературі практично відсутні експериментальні роботи, присвячені дослідженню жовчоутворювальної функції печінки під впливом ОТ. Поодинокі суперечливі повідомлення з цього приводу не дозволяють скласти певну думку про значення ОТ в нейро-гуморальних механізмах регуляції рівня холерезу і якісного складу жовчі.

Об'єкт та методи досліджень. Гострі експерименти проводили під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г маси тіла тварини, внутрішньоочередово) на білих щурах-самцях масою 180-250 г з канюльованою загальною жовчною протокою. Перед дослідом тварини голодували впродовж 18 годин з вільним доступом до води. Впродовж 3 годин досліду збирали 6 півгодинних проб жовчі, враховуючи її об'єм в мікролітрах. У кожній пробі отриманої жовчі тонкошаровою хроматографією визначали кількісний і якісний вміст ліпідної фракції секрету (фосфоліпідів – ФЛ, холестерину – ХС, його ефірів –

ЕХС, вільних жирних кислот – ВЖРК, тригліцеридів – ТГ) [6]. Тваринам дослідної групи вводили окситоцин ("Sigma", США) внутрішньопортально в дозах 5 і 10 Од/кг маси тіла тварини, розчинений у фізіологічному розчині (з розрахунку об'єму 0,1 мл/100 г маси тіла тварини). Контролем для цих досліджень слугували спроби із внутрішньопортальним введенням тваринам такого ж об'єму фізіологічного розчину.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Statistika 6.0, використовуючи t-критерій Стюдента, оскільки дані мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважались відмінності між контролем та дослідом при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Як відомо, печінка є важливим центром біохімічної трансформації речовин, які потрапляють в кров з травного тракту та іншими шляхами, тобто вона забезпечує необхідний для організму людини і тварин рівень білкового, вуглеводного, ліпідного, пігментного та інших видів метаболізму. Слід відмітити, що печінка відіграє важливу роль в обміні ліпідів, зокрема в ній розщеплюється близько 60% усіх жирних кислот організму, синтезуються і трансформуються фосфоліпіди, утворюються з вуглеводів тригліцериди.

Печінка є основним місцем синтезу і етерифікації холестеролу в організмі. Частина синтезованого в печінці холестеролу виділяється печінкою у складі жовчі, решта надходить в кров через лімфу [7], а також трансформується в жовчні кислоти. Холестерол мало розчинний у воді, його розчинність залежить від концентрації ліпідів та співвідношення молярних концентрацій жовчних кислот (головним чином ХК, ДХК та ХДХК) і фосфоліпідів (головним чином лецитину). Якщо концентрація цих компонентів в жовчі нижча за критичний рівень, або вміст холестеролу зростає, то створюються сприятливі умови для кристалізації і випадання його в осад, що призводить до утворенням конкрементів. Наші досліді показали, що екзогенний окситоцин, застосований у дозах 5 і 10 Од/кг маси тіла тварини незначно змінював вміст ліпідів в жовчі щурів. При цьому аналіз змін солюбілізуючих властивостей жовчі за співвідношенням вмісту в ній сумарних жовчних кислот та холестеролу (холато/холестероловий коефіцієнт) показав, що окситоцин у застосованих нами дозах практично не впливає на цей показник [Табл.1].

Таблиця 1. Зміни холато/холестеролового коефіцієнту під впливом окситоцину ($M \pm m$; $n=24$)

	Час, хв	Контроль	Окситоцин 5 Од/кг	Окситоцин 10 Од/кг
Сумарні жовчні кислоти, мг%	30	447,88 $\pm$ 6,93	443,55 $\pm$ 7,39	457,98 $\pm$ 4,74
	60	439,45 $\pm$ 6,90	449,33 $\pm$ 7,77	462,30 $\pm$ 4,74*
	90	425,30 $\pm$ 5,46	431,93 $\pm$ 8,62	455,85 $\pm$ 4,90**
	120	410,55 $\pm$ 6,97	417,13 $\pm$ 7,95	438,85 $\pm$ 2,54**
	150	396,45 $\pm$ 6,73	405,05 $\pm$ 9,45	421,48 $\pm$ 2,86*
	180	383,10 $\pm$ 6,46	401,68 $\pm$ 6,18	413,30 $\pm$ 4,70**
Вільний холестерол, мг%	30	28,10 $\pm$ 1,52	27,89 $\pm$ 1,29	27,43 $\pm$ 1,70
	60	27,83 $\pm$ 1,16	30,18 $\pm$ 1,63	30,13 $\pm$ 1,70
	90	26,40 $\pm$ 1,10	29,03 $\pm$ 1,34	28,08 $\pm$ 2,04
	120	25,30 $\pm$ 1,11	27,43 $\pm$ 1,29	29,25 $\pm$ 2,19
	150	24,28 $\pm$ 1,13	26,25 $\pm$ 0,86	26,15 $\pm$ 2,02
	180	23,50 $\pm$ 0,69	26,25 $\pm$ 1,02	25,68 $\pm$ 1,85
Холато/холестероловий коефіцієнт	30	15,94	15,90	16,70
	60	15,79	14,89	15,34
	90	16,11	14,88	16,23
	120	16,23	15,21	15,00
	150	16,33	15,43	16,11
	180	16,30	15,30	16,09

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ щодо контролю

Відомо, що в організмі людини і тварин холестерол присутній в усіх клітинах та тканинах. Він відіграє важливу роль у забезпеченні процесів життєдіяльності і є важливим компонентом різних біохімічних реакцій. Так, наприклад, за участю холестеролу відбувається утворення вітаміну D, стероїдних гормонів кори наднирників, жіночих та чоловічих статевих гормонів, здійснюється транспорт речовин через мембрану клітин, підтримується рівень води в клітинах. До того ж холестерол – це головний попередник при синтезі жовчних кислот в гепатоцитах. Тому, становило інтерес дослідити вплив окситоцину на секрецію холестеролу та його ефірів з жовчю.

При порівнянні вмісту ХС та ЕХС в контрольних та дослідних пробах жовчі нами показано, що окситоцин практично не змінюючи біосинтезу холестеролу, посилював його етерифікацію в клітинах печінки щурів. Оскільки за коефіцієнтом етерифікації можна судити про рівень утворення вільного холестеролу та його ефірів, було доцільно дослідити зміни цього показника під впливом застосованих нами доз окситоцину [Табл.2].

При порівнянні вмісту ХС та ЕХС в контрольних та дослідних пробах жовчі нами показано, що окситоцин практично не змінюючи біосинтезу холестеролу, посилював його етерифікацію в клітинах печінки щурів. Оскільки за коефіцієнтом етерифікації можна судити про рівень утворення вільного холестеролу та його ефірів, було доцільно дослідити зміни цього показника під впливом застосованих нами доз окситоцину [Табл.2].

Таблиця 2. Вплив окситоцину на коефіцієнт етерифікації холестеролу у жовчі щурів ($M \pm m$; $n=24$)

	Час, хв	Контроль	Окситоцин 5 Од/кг	Окситоцин 10 Од/кг
Вільний холестерол, мг%	30	28,10 $\pm$ 1,51	27,87 $\pm$ 1,29	27,43 $\pm$ 1,70
	60	27,82 $\pm$ 1,16	30,17 $\pm$ 1,62	30,13 $\pm$ 1,70
	90	26,40 $\pm$ 1,10	29,02 $\pm$ 1,33	28,01 $\pm$ 2,04
	120	25,30 $\pm$ 1,10	27,42 $\pm$ 1,29	29,25 $\pm$ 2,19
	150	24,70 $\pm$ 1,10	26,25 $\pm$ 0,85	26,15 $\pm$ 2,02
	180	24,27 $\pm$ 1,12	26,25 $\pm$ 1,02	25,68 $\pm$ 1,85
Ефіри холестеролу, мг%	30	2,50 $\pm$ 0,29	2,60 $\pm$ 0,26	2,43 $\pm$ 0,35
	60	2,57 $\pm$ 0,21	2,82 $\pm$ 0,28	2,68 $\pm$ 0,30
	90	2,57 $\pm$ 0,26	2,70 $\pm$ 0,26	2,93 $\pm$ 0,32
	120	2,27 $\pm$ 0,23	2,60 $\pm$ 0,31	2,73 $\pm$ 0,26
	150	2,02 $\pm$ 0,21	2,40 $\pm$ 0,31	2,53 $\pm$ 0,26
	180	1,90 $\pm$ 0,27	2,37 $\pm$ 0,26	2,48 $\pm$ 0,23
Коефіцієнт етерифікації	30	11,24	10,72	11,29
	60	10,82	10,70	11,24
	90	10,27	10,75	9,56
	120	11,14	10,55	10,71
	150	12,01	10,93	10,34
	180	12,37	11,08	10,35

З'ясувалось, що коефіцієнт етерифікації після застосування окситоцину, як і у контрольних дослідах, зменшувався впродовж всього періоду спостереження. Однак, після гормонального навантаження організму щурів значення даного показника були меншими від контрольних. Це вказує на те, що окситоцин змінює співвідношення вільного холестеролу та його ефірів на користь останніх, шляхом активації тих ферментних систем, котрі відповідають за етерифікацію холестеролу в клітинах печінки.

Результати наших дослідів показали, що концентрація фосфоліпідів під впливом окситоцину в дозі 5 Од/кг маси тіла тварини впродовж дослідів різко зростає на другій півгодинній пробі, але вже до кінця експерименту цей показник зменшується, хоча й лишається вищим у порівнянні з контрольними значеннями. Так, у першому півгодинному відрізку часу концентрація таких лишилась незмінною щодо контролю; в другій пробі – зросла на 8,3%; в третій – на 5,3%; в четвертій – на 12,3%; в п'ятій на 8,3% і в шостій на – 7,7%. Проте ці

зміни виявились статистично невірогідними ($p < 0,05$) щодо відповідних показників у контролі. Окситоцин в дозах 5 та 10 Од/кг маси тіла тварини призводив до зменшення вмісту вільних жирних кислот в жовчі, хоча статистично значущими такі зміни не були. Значення концентрацій та дебітів тригліцеридів під впливом ОТ у зазначених дозах впродовж досліджу також зменшувались, однак статистично вірогідних змін щодо показників у контролі при цьому не виявилось.

Отже, результати наших досліджень свідчать, що нейрогіпофізарний гормон окситоцин, введений щурам внутрішньопортально в дозах 5 та 10 Од/кг маси тіла тварини практично не впливає на рівень жовчоутворення і ліпідний склад жовчі, справляючи незначний стимулюючий вплив на виділення з секретом ефірів холестеролу та зменшуючи вміст вільних жирних кислот і тригліцеридів.

УДК 612.82/.83; 612.821

1. Kiss A., Mikkelsen J.D. Oxytocin – anatomy and functional assignments: a minireview // *Endocrine regulation*. – 2005. – Vol.39 (3). – P.97-105.
2. Brownstein M.J. Biosynthesis of vasopressin and oxytocin // *Annual Review of Physiology*. – 1983. – Vol.45 (10). – P.129-135.
3. Gimpl G., Fahrenholz F. et al. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation // *Physiol.Rev.* – 2001. – Vol.81, №2. – P.629-683.
4. Bussolati G., Cassoni P. Editorial: the oxytocin/oxytocin receptor system-expect the unexpected // *Endocrinology*. – 2001. – Vol.142, №4. – P.1377-1379.
5. Shoji H., Kaneko Y. et al. Characterization and expression of oxytocin and the oxytocin receptor // *Mol.Genet.Metab.* – 2000. – Vol.71, №4. – P.552-558.
6. Патент 99031324 Україна, МБІ А61 В5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи: Пат. 99031324 Україна, МБІ А61 В5/14 / С.П. Весельський, П.С. Лященко, С.І. Костенко, З.А. Горенко, Л.Ф. Куровська. – №33564А; Заявл. 05.10.1999; Опубл. 15.02.2001; Біол. №1.7.Ганиткевич Я.В., Карбач Я.И. Исследование желчи. Биохимические и биофизические методы. – К.: Вища школа, 1985. – 136 с.

Надійшла до редколегії 05.11.10

Т. Куценко, канд. біол. наук, доц.,
С. Костенко, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ МІЖ ПОДРАЗНИКАМИ ПЕРШОЇ ТА ДРУГОЇ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ У ЖІНОК І ЧОЛОВІКІВ

Виявлено, що ефект Струпа у жінок виражений краще, ніж у чоловіків, що є проявом сильнішої інтерференції між показниками першої та другої сигнальних систем і пояснюється більшою активацією лівої півкулі у жінок, пов'язаною із процесами вербалізації інформації.

It is appeared that Stroop effect is more prominent for women than for men due to the stronger interference between verbal information and information about color and could be explained by more potent activation of the left, connected with processes of verbalization, hemisphere of women.

Вступ. Накопичується все більше даних про відмінності у функціонуванні чоловічого і жіночого мозку [4]. Проте, механізми таких відмінностей дотепер залишаються недостатньо вивченими. В одному із попередніх досліджень нами були отримані дещо парадоксальні, на перший погляд, результати відносно більшої латералізації мозку жінок у порівнянні з мозком чоловіків під час оброблення інформації про літери і, особливо, про цифри у оперативній пам'яті [2]. Адаже відомо, що функції мозку жінок більше розподілені між обома півкулями, ніж у чоловіків, у яких півкулі більше спеціалізовані [8,9]. Для уточнення відмінностей у функціональній асиметрії мозку в залежності від статі вирішено було дослідити ефект Струпа, який, зокрема, відображає взаємодію (інтерференцію) між подразниками першої та другої сигнальних систем. Важливість такого дослідження полягає ще й у тому, що в літературі відмічається відсутність гендерних відмінностей ефекту Струпа [6]. Але в переважній більшості досліджень реєструються реакції лише домінантною рукою, за якими неможливо оцінити міжпівкульну функціональну асиметрію і взаємодію, тоді як використана нами методики таку можливість надає, оскільки під час її застосування реєструються реакції обох рук, а, отже, враховуються відповіді обох півкуль.

Об'єкт та методи досліджень. Ефект Струпа (за ім'ям автора) полягає у тому, що обстежуваному подається слово, яке означає певний колір, написане або відповідним кольором – конгруентне (напр., "червоне" червоним), або білим кольором (нейтральне), або невідповідним кольором – неконгруентне ("червоне" зеленим). Під час співпадіння семантичного значення і кольору реакції здійснюються найшвидше, під час неспівпадіння – найповільніше, під час реагування на нейтральні подразники латентний період реакції (ЛП) займає проміжне значення. При прямому тесті Струпа обстежуваний має реагувати на колір, яким написане слово, нехтуючи його семантичним значенням, при

зворотному тесті Струпа (який використовують рідше) релевантним є значення слова, а копії має ігноруватись [5]. Обстеження 60 осіб обох статей, правшів (39 жінок і 21 чоловіка, студентів біологічного факультету віком від 18 до 23 років) проводились за допомогою комп'ютерної методики тестування прямого і зворотного ефектів Струпа [1]. Пред'являлась серія із 120 подразників, котрі являють собою слово ("ЗЕЛЕНИЙ" або "КРАСНИЙ"), яке може бути висвітлено червоним або зеленим кольором у центрі екрану комп'ютерного монітору. Враховувались ЛП реакцій на подразники. Послідовність виконання була наступною: тест 1 (зворотний ефект Струпа): на слово "ЗЕЛЕНИЙ" потрібно було реагувати лівою рукою, на слово "КРАСНИЙ" – правою; тест 2 (зворотний ефект Струпа): на слово "ЗЕЛЕНИЙ" потрібно було реагувати правою рукою, на слово "КРАСНИЙ" – лівою; тест 3 (прямий ефект Струпа): на зелений колір потрібно було реагувати правою рукою, на червоний колір – лівою; тест 4 (прямий ефект Струпа): на зелений колір потрібно було реагувати лівою рукою, на червоний колір – правою. Тести виконувались у вказаній послідовності, проміжок між їх виконанням складав близько 5-ти хвилин. Використання чотирьох тестів обумовлене намаганням дослідити як прямий, так і зворотний ефект Струпа, а також врахувати можливий вплив кольору. В подальшому можна використовувати лише один із варіантів прямого тесту Струпа, як найбільш інформативного. Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA, 2001). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Вілка. Оскільки всі тести проходили одні і ті ж самі обстежувані в різні моменти часу, а розподіл практично всіх параметрів за критерієм Шапіро-Вілка був відмінний від нормального ($p < 0,05$), для порівняння двох залежних вибірок було застосовано критерій Вілксона. Для опису вибіркового розподілу вказували Me [25; 75] (Me – медіана; 25 і 75 – нижній і верхній квартилі). Критичний рівень значущості при перевір-

© Куценко Т., Костенко С., 2011

ці статистичних гіпотез приймався рівним $p=0,05$ і на графіках позначався "*".

Результати та їх обговорення. Ефект Струпа чутливий до зміни функціонального стану. Загалом відомо, що за повторного проходження тестів ефект Струпа зменшується. В нашому дослідженні обстежувані проходили тест Струпа чотири рази підряд. Але особливістю є те, що вони виконували спочатку зворотний (релевантний подразник – слово), а потім прямий (релевантний подразник – колір) тести Струпа. Загальні закономірності результатів під час такої схеми проходження цих тестів були нами представлені в іншому досліджен-

ні [3]. За абсолютними значеннями усіх досліджуваних показників не отримано відмінностей між групами жінок і чоловіків, що узгоджується із даними літератури про відсутність відмінностей ефекту Струпа для жінок і чоловіків [6]. Проте такі відмінності виявляються, коли враховувати особливості міжпівкульної взаємодії у межах кожної групи окремо. Так, у групі жінок під час першого проходження тесту ефект Струпа був отриманий для реакцій лівої руки (рис., позначення відмінностей під стовпчиками). За великими розкидами значень зрозуміло, що під час першого проходження тесту відбувається впрацювання.

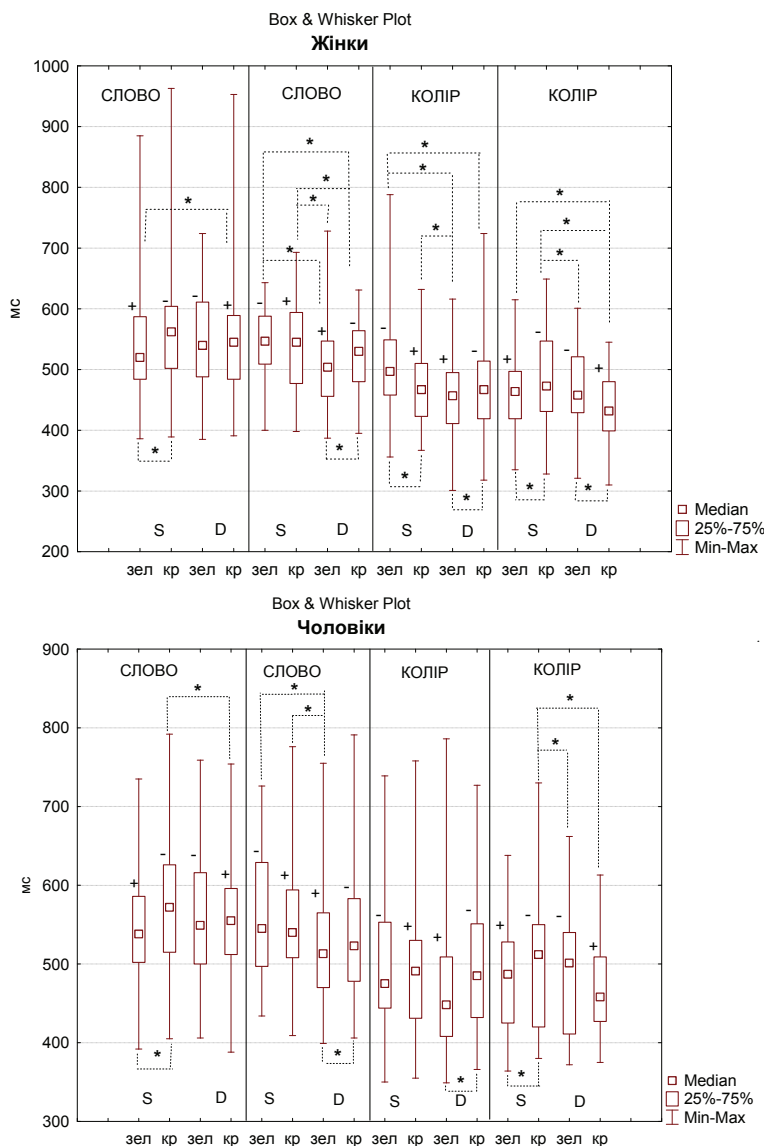


Рис. Латентні періоди реакцій на зворотній та прямий тести Струпа в групі жінок (n=39) та в групі чоловіків (n=21)

Примітки: на осі абсцис Зел – слово "зелений" або зелений колір, Кр – слово "красный" або червоний колір, S – ліва рука, D – права рука, "+" – конгруентний подразник, "-" – неконгруентний подразник, СЛОВО, КОЛІР – тип релевантного подразника.

Під час другого проходження тесту наростає міжпівкульна асиметрія з переважанням активації лівої півкулі (рис., позначення відмінностей над стовпчиками), і ефект Струпа проявляється для правої руки (лівої півкулі). Під час проходження третього і четвертого тестів ефект Струпа отриманий для обох рук (рис., позначення відмінностей під стовпчиками), а також чітко представлена міжпівкульна асиметрія з переважанням активації лівої півкулі, тобто, ЛП реакцій правої руки коротші (рис., позначення відмінностей над стовпчиками), що

узгоджується із інформацією про більшу вербалізацію когнітивних функцій у жінок (вербальна інформація обробляється переважно у лівій півкулі). Те, що ефект Струпа краще виражений під час проходження прямих тестів Струпа (релевантний подразник – колір), підтверджує відомий з літератури факт про те, що вербальна інформація сильніше втручається в оброблення інформації про колір, ніж інформація про колір – у оброблення вербальної інформації [5].

У групі чоловіків під час першого проходження тесту ефект Струпа також був отриманий для реакцій лівої руки (рис.). Міжпівкульна асиметрія фактично не представлена, оскільки про неї можна судити лише за відмінностями однотипних (конгруентних або неконгруентних) подразників для правої та лівої руки. Розкид значень, на відміну від жінок, не відрізняється від наступних тестів, що може свідчити про менше напруження чоловіків під час врацьовування. Під час проходження наступних тестів ефект Струпа виражений або лише справа, або зліва, а міжпівкульна асиметрія виражена значно менше, ніж в групі жінок. Так, під час проходження тестів 2 і 4 отримані відмінності для конгруентних і неконгруентних подразників відповідно (рис., позначення відмінностей над стовпчиками), а під час виконання тесту 3 вони відсутні взагалі. Отже, під час проходження даних тестів у чоловіків функціональна асиметрія, як і ефект Струпа, виражені значно менше, ніж у жінок.

Як під час дослідження оперативної пам'яті [2], так і під час дослідження ефекту Струпа, нами отримані аналогічні результати, які вказують на більшу латералізацію мозку жінок із переважанням активації лівої півкулі у порівнянні із мозком чоловіків. Наші результати узгоджуються із даними, отриманими із застосуванням фМРТ, за якими під час дослідження оперативної пам'яті у чоловіків спостерігалась або білатеральна активація мозку, або правопівкульне домінування, тоді як у жінок виявилась активація переважно лівої півкулі [7]. Мозок чоловіків більше латералізований за своєю природою, і тому, ймовірно, інформаційні процеси протікають в ньому із залученням більшою мірою паралельних нейронних мереж у порівнянні з мозком жінок, півкулі якого більше зв'язані між собою, що і веде до сильнішої інтерференції інформаційних процесів. Ймовірно, функціональна латералізація мозку жінок пов'язана із типом навантаження, застосованим в наших тестах, які включають вербальні подразники: сильніша вербалізація → сильніше втручання вербальної інформації в оброблення інформації про колір → більше виражений ефект Струпа. В принципі, отримані результати можна розглядати як експериментальне підтвердження відомої думки про те, що "жінки люблять вухами". З іншого боку, наші результати не узгоджуються із відомостями про те, що більші розміри мозолистого тіла (а, за більшістю даних, у жінок воно більше) ведуть до меншої

інтерференції і меншої функціональної латералізації [10]. Розбіжності можуть бути пов'язані з тим, що авторами досліджувалась інша сенсорна модальність та була застосована інша методика (дихотичне прослуховування). Зважаючи на це, хоча отримані нами результати і вказують на більшу латералізацію мозку жінок у порівнянні з мозком чоловіків під час функціонального навантаження, вони потребують подальших досліджень. Також в наступних публікаціях ми плануємо представити результати ефективності виконання ефекту Струпа жінками і чоловіками за аналізом кількості помилок.

Висновки. За абсолютними значеннями усіх досліджуваних показників не отримано відмінностей між групами жінок і чоловіків, що узгоджується із даними літератури про відсутність відмінностей ефекту Струпа для жінок і чоловіків. Відмінності ефекту Струпа між жінками і чоловіками виявляються за умов урахування особливостей міжпівкульної взаємодії. Ефект Струпа у жінок виражений краще, ніж у чоловіків, що є проявом сильнішої інтерференції між подразниками першої та другої сигнальних систем і пояснюється більшою активацією лівої півкулі у жінок, пов'язаної із процесами вербалізації інформації.

1. Куценко Т.В., Філімонова Н.Б., Костенко С.С. Прояв прямого та зворотнього ефекту Струпа при відповідях обома руками та кожною рукою окремо // Вісник Черкаського університету (серія Біологічні науки). – 2009. – Вип. 156. – С.55-61.
2. Т.В. Куценко Дослідження оперативної пам'яті на літери та цифри у жінок і чоловіків // Вісник Черкаського університету (серія Біологічні науки). – 2010. – Вип.184 – С.59-65.
3. Куценко Т. В. Прояв міжпівкульної асиметрії при повторному проходженні прямого і зворотного тестів Струпа // Вісник Київського університету (серія Біологія). – 2010. – Вип. 56. – С.63-65.
4. Разумникова О.М. Мышление и функциональная асимметрия мозга. – Новосибирск: Изд-во СО РАМН. – 2004. – 272 с.
5. Atkinson, C.M., Drysdale, K.A., Fulham, W.R. Event-related potentials to Stroop and reverse Stroop stimuli // International Journal of Psychophysiology 47 (1). – Jan 2003. – p.1-21.
6. Kaplan O., Lubow R.E. Ignoring irrelevant stimuli in latent inhibition and Stroop paradigms: The effects of schizotypy and gender // Psychiatry Research – 2010 (in press).
7. Speck O., Ernst T., Braun J., Koch C., Miller E., Chang L. Gender differences in the functional organization of the brain for working memory // Brain imaging. – 2000. – Vol.11, №11. – P. 2581-2585.
8. Valera E. M., Brown A., Biederman J. Sex differences in the functional neuroanatomy of working memory in adults with ADHD // Am J Psychiatry. – 2010. – 167. – P. 86-94.
9. Van Strein J.W., Valstar L.H. The lateralized emotional Stroop task: left visual field interference in women // Emotion, 2004. – Vol.4, No.4. – P. 403-409.
10. Yazgan Y., Wexler B., Kinsbourne M., Peterson B., Leckman F. Functional significance of individual variation in callosal area // Neuropsychologia. – 1995. – 33. – P.769-779.

Надійшла до редколегії 04.11.10

УДК 577.543.426

А. Майданюк, канд. біол. наук

ВИЗНАЧЕННЯ СУМАРНОГО ВМІСТУ АДЕНІНОВИХ КОМПОНЕНТІВ ТИМОЦИТІВ СПЕКТРОМЕТРИЧНИМИ МЕТОДАМИ

Спектрофлуориметрією етеноаденіну та його похідних і спектрофотометрично визначено зниження сумарного вмісту аденінових компонентів в тимоцитах через 2,5 години після їх рентгенівського опромінення в дозі 4,5 Гр.

The reaction of chloroacetaldehyd with adenine derivatives leads to the formation of highly fluorescent ethanoadenosine has been used by us a convenient method for their fluometric analysis. Decrease of level adenine row components in 2,5 hour after an X-irradiation of thymocytes in a doze 4,5 Gy is established.

Вступ. Процеси апоптозу (запрограмованої загибелі клітин) стимулюються як зовнішніми сигналами (гормони, опромінення, стрес, оксидативний стрес і інше), так і внутрішніми сигналами серед яких – зміни метаболізму аденілових нуклеотидів за відповідної зміни активності ферментів пуринового обміну. Пуринові нуклеозиди – аденозин, дезоксиаденозин та дезоксиуанозин індують загибель клітин тимусу за механізмом апоптозу. Порушення пуринового обміну після опромінення, являється одним із ранніх і характерних процесів апоптозу тимоцитів [4]. Дослідженню вмісту АТФ та

інших вільних рибонуклеотидів у тимусі опромінених тварин присвячена велика кількість публікацій, проте суперечливих. Так за даними деяких авторів не спостерігається змін у концентрації АТФ через 15 хвилин та 1 годину після рентгенівського опромінення щурів в дозі 10 Гр за потужності дози 0,7 Гр/хв. Проте, за їх же результатами, в ці терміни уже відбуваються статистично значимі порушення обміну пуринів. Так, через 15 і 60 хвилин після опромінення дозою 258 мКл/кг концентрація АДФ зменшується від 0,69 до 0,52 і 0,39 мкмоль/г; АМФ – з 0,59 до 0,46 і 0,34 мкмоль/г; су-

марна кількість аденілових нуклеотидів – від 2,88 до 2,44 і 2,40 мкмоль/г тканини (тимуса) відповідно. Через 4 години після загального рентгенівського опромінення в дозі 8 Гр сумарна кількість нуклеозидмонофосфатів зменшується на 16,5 %, а вміст АТФ на 13 % із розрахунку на 1 г/тканини. Згідно [1] рівень АТФ в тимусі щурів, опромінених в дозі 10 Гр в цей час складає біля 81 % від контрольного рівня, а за іншими даними за опромінення в дозі 225,75 мКл/кг він знижується більш ніж в 2 рази. Н.В. Ермолаєва і Н.А. Водолазская [3] не виявили достовірних змін концентрації АТФ у тимусі через 30 хвилин – 1 годину після у – опромінення щурів у дозах 154,8 – 258 мКл/кг. Мабуть, це пояснюється невдалим перерахунком експериментальних результатів на 1 мг ДНК, оскільки післяпроменевої зміни кількості ДНК і АТФ у цей час мають однакову спрямованість. Висновок про сталу концентрацію аденілових нуклеотидів після опромінення значною мірою обумовлений використанням різних способів перерахунку їх вмісту або активності ферментів. Так одні дослідники розраховують вміст нуклеотидів на одиницю маси тканини, другі – на одиницю маси білка, треті – на вміст ДНК або фосфору ДНК, ще інші – на весь орган. Очевидно, що результати, а відповідно і висновки із цих робіт часто виявляються протилежними. Порівняльний аналіз наявних результатів дозволяє зробити висновок проте, що більш об'єктивні результати, особливо по відношенню до радіочутливих тканин і у ранні терміни їх дослідження, одержують при перерахунку вільних нуклеотидів на клітин(у;и) або на одиницю маси білка чи тканини. Встановлено, що у радіочутливих тканинах, через незначний проміжок часу після дії іонізуючого випромінювання, знижується концентрація не тільки пуринових, але і піримідинових нуклеотидів. У відповідності із зміною вмісту аденіну нуклеотидів реакція клітин (timoцитів) на опромінення ділиться на три періоди: деенергізація, стабільність, посилений катаболізм пуринів. Виявлені зміни у проникності мембран тимоцитів заключаються у втраті опроміненими клітинами Na^+ , K^+ , нуклеотидів і нуклеозидів, а також різних ферментів [6]. Таким чином, внутрішньоклітинний сумарний фонд аденілових нуклеотидів у тканинах опромінених тварин може зменшуватися в результаті радіаційного порушення біосинтезу нуклеотидів, окисного фосфорилування, нейрогуморальної регуляції, а також загибелі клітин. Проаналізовані експериментальні дані свідчать про те, що зміни концентрації аденіну нуклеотидів і їх сумарного вмісту в клітинах і тканинах після опромінення можна вважати показником порушення обміну нуклеотидів і їх включення у процеси біосинтезу нуклеїнових кислот та інші метаболічні реакції.

Метою роботи було дослідити спектрометричними методами сумарний вміст аденінових компонентів у тимоцитах через 2,5 години після їх рентгенівського опромінення дозою 4,5 Гр.

Об'єкт та методи досліджень. Для досліджень використовували білих щурів обох статей масою 120-150 г. Щурів утримували на стандартному раціоні виварію. Після декапітації тимоцити отримували м'яким продавлуванням через капронове сито тимусу у буфері, що містив, ммоль/л: Na_2HPO_4 -3, KCl , HEPES -5, NaCl -120, глюкоза -10, NaHCO_3 , CaCl_2 , MgCl_2 -1 рН=7,0. Цей буфер використовували для інкубації та опромінення суспензії тимоцитів. Опромінення проводили од-

нократно на установці РУМ -17 у дозі 4,5 Гр за умов: потужність дози – 0,4 Гр/хв, напруга – 200 кВ, сила струму – 10 мА, фокусна відстань – 50 см. Для кількісного аналізу суспензію тимоцитів центрифугували 10-15 хв при 1500 об/хв. (центрифуга ОПН -3У42), осад тимоцитів використовували для екстракції вільних компонентів аденінового ряду протягом 25-30 хв при температурі 0 – 4 °С, шляхом розтирання в охолоджену розчині 0,8 н HClO_4 . Одержані кислотні екстракти нейтралізували K_2CO_3 до значень рН 7,0-7,5 і після центрифугування за вищевказаних умов відбирали верхню фазу, визначали її об'єм і певні аліквати використовували для визначення екстинції $E_{260} - 290$ спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Scinco SUV – 2120 (ФРН), або проводили реакцію з хлорацетальдегідом (Fluka) для утворення флуоресцентних етеніпохідних аденіна згідно [7] з деякими модифікаціями та вимірювали інтенсивність флуоресценції (em) за 420 нм при збудженні (ex) на 312 нм на спектрофлуориметрі RF-510 фірми Shimadzu (Японія). Для побудови калібрувальних графіків використовували аденозин-5-трифосфорної кислоти динатрієву сіль (АТФ) виробництва фірми Reanal (Угорщина).

Результати та їх обговорення. Макроергічні сполуки являються джерелом енергії для здійснення всіх фізіологічних функцій клітин (організму). Крім цього аденілові нуклеотиди відіграють особливу роль у регуляції обміну речовин оскільки являються найважливішими факторами, які забезпечують спряження між процесами генерації енергії і її використання і тим самим зв'язують різні шляхи обміну. Рівень сумарного вмісту аденіну нуклеотидів здійснює визначальний вплив на інтенсивність та шляхи ресинтезу АТФ і метаболізму в цілому, тому його аналіз в клітинах являється важливою задачею при дослідженні енергетичних процесів за розвитку апоптозу. У відповідності з одержаними експериментальними результатами одним із найбільш ранніх проявів променевого ураження метаболічних процесів у клітинах являється розвиток у часі дефіциту макроергічних сполук. Більш різко це проявляється при одноразовому опроміненні тварин летальними і сублетальними дозами у тимусі, селезінці, кишечнику, шлунку. У відносно радіорезистентних тканинах: головний мозок, серце, скелетні м'язи, печінка, нирки, дефіцит аденілових нуклеотидів або зовсім не проявляється, або носить тимчасовий характер [6]. Концентрація АТФ у тимусі протягом 1 години після опромінення щурів мінімальною абсолютно летальною дозою -232,2 Кл/кг знижується на 10 %. Через 3 години рівень АТФ складає 79 % і продовжує знижуватись. За допомогою високоспецифічного для АТФ люциферин – люциферазного методу також показано зниження рівня АТФ на 11 % у селезінці через 4 години після загального рентгенівського опромінення в дозі 8 Гр. Детальний аналіз змін вмісту аденілових нуклеотидів в тимусі виявляє тенденцію до зниження фонду всіх нуклеозидмоно, ди – і три фосфатів вже через 30 хвилин після загального опромінення в дозі 206,4 мКл/кг. Достовірне зменшення вмісту АТФ у цьому органі виявлене через 2 години після опромінення дозою 8,75 Гр і через 3 години – в дозах 4,80, 8,75 Гр. Через 3 години визначено мінімальну концентрацію АМФ [6].

Таблиця 1. Сумарний вміст аденінових компонентів в тимоцитах через 2,5 години після їх рентгенівського опромінення в дозі 4,5 Гр визначений спектрометричними методами (n=10)

Метод визначення	% від контрольних значень
спектрофотометричний	65
Спектрофлуориметричний	74

Встановлене нами (Табл. 1) спектрофотометричним методом зменшення сумарного вмісту аденінових компонентів на 35 % і спектрофлуориметричним методом на 26 %, а в середньому для двох методів – 30 % зниження від контрольних значень сумарного вмісту компонентів аденінової системи через 2,5 години після рентгенівського опромінення суспензії тимоцитів в дозі 4,5 Гр добре узгоджується з наведеними вище даними і раніше одержаними нами експериментальними результатами [2, 5].

Висновки. Спектрофотометричним методом та спектрофлуориметричним визначенням етеноаденіну та його похідних встановлено зниження сумарного вмісту аденінових компонентів на 30 % через 2,5 години після рентгенівського опромінення суспензії тимоцитів в дозі 4,5 Гр.

УДК 577.151.64+616-006

Л. Сорокіна, асп., А. Білюк, студ.,
С. Хижняк, д-р біол. наук

ВПЛИВ НАТРІЙ ДИХЛОРАЦЕТАТУ НА ПЕРЕБІГ ПРООКСИДНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ПРОЦЕСІВ В ОРГАНІЗМІ МИШЕЙ З САРКОМОЮ 37

Показано, що натрій дихлорацетат у дозі 86 мг/кг на добу інгібує ріст саркоми 37. Виявлена здатність даного препарату підвищувати інтенсивність вільнорадикальних процесів та знижувати активність супероксиддисмутази і каталази у пухлині, а також впливати на окисно-відновну рівновагу сироватки крові мишей з саркомою 37.

It was shown that sodium dichloroacetate in the dose 86 mg/kg per day inhibits sarcoma 37 growth. The use of DCA leads to the increase of lipid peroxidation intensity and to the decrease of superoxide dismutase and catalase activities in tumor but don't sufficiently influence on these indices in hepatocytes and blood serum of mice with sarcoma 37.

Вступ. Використання мішенних препаратів для лікування пухлинних захворювань вважається одним із найбільш багатообіцяючих підходів у сучасній онкологічній практиці [4]. Перспективним шляхом метаболічного таргетінгу пухлинних клітин є посилення в них ситуації метаболічної катастрофи [6]. Так, на відміну від нормальних клітин, мікрооточення злоякісних клітин характеризується нестачею поживних речовин, енергетичних субстратів та надлишком продуктів розпаду пухлинних клітин. За даних умов вплив на мітохондрії з метою досягнення метаболічної катастрофи може досягатися при використанні натрій дихлорацетату (ДХАН), здатного виступати інгібітором кінази піруватдегідрогенази, активної в пухлинних клітинах [5, 9]. Цей фермент характеризується здатністю фосфорилувати піруватдегідрогеназний комплекс, який трансформуює піруват до ацетил-КоА, та пригнічувати його активність. У зв'язку з цим при дії натрію дихлорацетату забезпечується активація піруватдегідрогеназного комплексу, а отже і посилення процесів енергетичного обміну в мітохондріях. Використання даної сполуки призводить до інгібування процесів аеробного гліколізу в пухлинних клітинах з гіперполяризованою внутрішньою мітохондріальною мембраною та сприяє утворенню в клітинах активних форм оксигену за участі комплексів дихального ланцюга. У зв'язку з цим актуальними є дослідження впливу ДХАН на стан пероксидних процесів та функціональну активність ферментів антиоксидантного захисту в організмі тварин з пухлинами за введення даної таргетної сполуки.

Метою даної роботи було оцінити вплив дихлорацетату натрію на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові, печінці та пухлинах мишей із саркомою 37.

1. Байсхатов Р., Хансон К.П. Исследование содержания адениловых нуклеотидов в селезенке крыс в норме и после рентгеновского облучения // Радиобиология – 1978. – Т.18, вып. 5. – С.738-739. 2. Дворченко К. О., Матишевська О.П., Майданюк А.В. Дослідження вмісту аденіну нуклеотидів аденозину й аденіну у опроміненних тимоцитах щурів // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т.Шевченка. Біологія – 2005 – вип. 45-46. – С.52-53. 3. Ермолаева Н.В., Водолазская Н.А. Взаимосвязь между уровнем распада ядерного хроматина и падением содержания АТФ в тимусе крыс после γ -облучения, введения дегранола и гидрокортизона // Радиобиология – 1980 – Т.20, вып. 2. – С.169-172. 4. Радіаційно-індукована структурно-метаболічна модифікація еритроцитів та лімфоїдних клітин / під редакцією Кучеренка М.Є. К. 2006 – 211 с. 5. Майданюк А. Участь аденілових нуклеотидів в індукції апоптозу // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія – 2008 – вип. 52-53. – С.66-67. 6. Романцев Е.Ф., Блохина З.И., Жуланова и др. Молекулярные механизмы лучевой болезни. – М. Медицина 1983. – 208 с. 7. G. Avigad., S. Damle Fluorimetric assay of adenine and its derivatives // Analytical Biochemistry – 1972. – 50 – p.321 – 323.

Надійшла до редакції 29.10.10

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження виконані з використанням мишей-самців віком 2-2,5 міс. масою 18-23 г лінії Balb/c. Тварини були розподілені на 4 групи: 1 – контрольні тварини (n=10), 2 – тварини без пухлин, які отримували ДХАН (n=10), 3 – тварини з перещепленою підшкірно саркомою 37 (С37) у кількості 5×10^6 клітин/тварину (n=10), які отримували внутрішньоочеревинно 0,9 % натрію хлорид замість ДХАН (контроль пухлинного росту); 4 – тварини із саркомою 37, яким вводили препарат ДХАН (n=10). Експериментальні процедури на тваринах проводили з дотриманням вимог Конвенції з біоетики. ДХАН вводили внутрішньоочеревинно у дозі 86 мг/кг на добу протягом 18 днів після появи пухлини. Декапітацію тварин проводили на 20-у добу пухлинного росту, що відповідає стадії пухлинної прогресії. Екстракти пухлин та печінки отримували шляхом центрифугування грубих гомогенатів при +4°C 20 хв при 4000 об/хв. В екстрактах пухлин, печінки та сироватці крові визначали вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), активність загальної супероксиддисмутази (СОД), каталази (Кат). Вміст ТБК-АП (малонового діальдегіду) визначали в реакції з тіобарбітуровою кислотою згідно [3]. Активність загальної СОД оцінювали за відсотком інгібування реакції перетворення нітросинього тетразолію до нітроформазану при участі супероксид-аніону, який утворюється в реакції між феназин-метасульфатом і НАДН [7]. Активність каталази оцінювали за кількістю забарвленого комплексу, утвореного в реакції залишкового гідроген пероксиду з амонію молібдатом [2]. В екстрактах тканин визначали також активність глутатіонпероксидази (ГП) за кількістю утвореного окисненого глутатіону [1]. У сироватці крові визначали активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотра-

нсфери, гамма-глутамілтранспептидази, лужної фосфатази, вміст білірубину, креатиніну та сечовини з використанням спектрофотометричного аналізатора "StatFax 2100". Статистичну обробку отриманих результатів дослідження проводили з використанням t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення. Отримані результати свідчать, що за використання ДХАН у сумарній дозі 1548 мг/кг за курс не спостерігається достовірних відмінностей у біохімічних показниках сироватки крові, які характеризують гепатотоксичність (активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, вміст білірубину, активність гамма-глутамілтранспептидази, лужної фосфатази) та нефротоксичність (вміст креатиніну та сечовини), що узгоджується з даними про відсутність токсичних ефектів цієї сполуки [8].

Результати проведених досліджень свідчать, що введення ДХАН у дозі 86 мг/кг на добу впливає на ріст саркоми 37 *in vivo* протягом усього терміну дослідження. Представлена динаміка пухлинного росту свідчить, що за введення ДХАН інгібування росту пухлини на 40 % ($p < 0,05$) відбувається вже на 12-у добу після початку введення препарату (Рис. 1). На 18-у добу введення ДХАН у термін, що відповідає етапу прогресії у розвитку пухлини, має місце суттєве пригнічення росту С37 на 64 % ($p < 0,05$). Отримані результати вказують на наявність протипухлинного ефекту даної сполуки.

При дослідженні впливу ДХАН на стан проокисно-антиоксидантних процесів в пухлинах мишей встановлено (Табл. 1), що препарат сприяє зниженню активності загальної СОД та каталази на 45 % та 35 %, відповідно, та зростанню активності ГП на 49%, можливо впливаючи на захисну систему глутатіону. При цьому інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) зростає, про що свідчить вищий на 65 % рівень вмісту ТБК-АП у пухлинах мишей, яким вводили препарат (група 4), у порівнянні з пухлинами без препарату (група 3). Отримані результати свідчать про посилення деструктивних процесів пероксидного окиснення в пухлинах саркоми 37 за дії ДХАН.

За росту саркоми 37 зростає інтенсивність ПОЛ в гепатоцитах мишей, про що свідчить збільшення на 27 % вмісту ТБК-АП та зниження на 36 % активності СОД у клітинах печінки мишей з пухлинами у порівнянні з інтактними мишами (Табл.1). Введення ДХАН мишам із саркомою 37 не впливає на ці показники (група 4) за винятком СОД, активність якої знижується і становить 30 % у порівнянні з контролем (група 1). Зареєстроване зниження активності СОД під впливом ДХАН, очевидно, обумовлено не дією пероксидних продуктів, оскільки вміст ТБК-АП і активність каталази не змінюються, а іншими факторами. Крім того, введення ДХАН інтактним тваринам (група 2) також не впливає на досліджувані показники окисного метаболізму в клітинах печінки мишей з пухлинами у порівнянні з інтактними тваринами (Табл. 1).

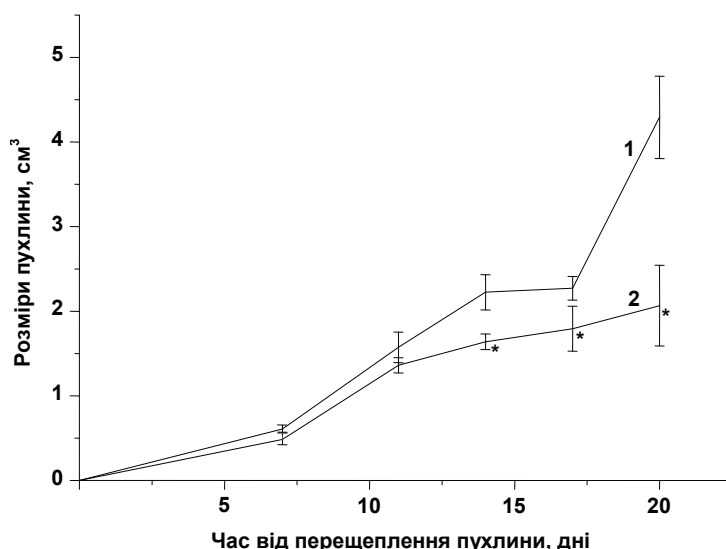


Рис. 1. Динаміка росту саркоми 37 у мишей: у групі контролю пухлинного росту (1), а також за використання натрій дихлорацетату (2).

* – $p < 0,05$ у порівнянні з групою контролю пухлинного росту.

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у пухлинах, печінці та сироватці крові мишей (n=40)

Об'єкт дослідження	Вміст ТБК-АП, нмоль/мг	Активність загальної СОД, у.о./мг білка хв	Активність Кат, у.о./мг білка хв	Активність ГП, мкмоль ГSSG/мг білка хв
С37	3,54±0,12	0,18±0,03	74,7±10,2	102,9±21,1
С37+ДХАН	5,87±0,68**	0,10±0,02**	26,3±5,3**	153,0±20,3**
Печінка Контроль	8,77±0,77	1,34±0,12	128,3±11,5	262,5±25,3
Печінка +ДХАН	7,23±0,73	1,32±0,13	132,7±13,1	280,1±27,6
Печінка + С37	11,08±1,01*	0,87±0,07*	145,8±13,4	235,6±24,2
Печінка+ С37+ДХАН	11,65±1,12*	0,40±0,03*,**	138,4±14,1	245,8±25,1
СК Контроль	2,2±0,21	0,63±0,05	239,1±22,1	НВ
СК + С37	7,9±0,68*	1,32±0,14*	225,6±23,5	НВ
СК + С37+ДХАН	4,5±0,34*,**	0,48±0,05*,**	361,3±35,4*,**	НВ

Примітка: ДХАН – натрій дихлорацетат, С37- тварини з перещепленою підшкірно саркомою 37, СК-сироватка крові, НВ – не вимірювали.

* – відмінності достовірні у порівнянні з групою контрольних тварин ($p < 0,05$), ** – відмінності достовірні у порівнянні з групою мишей із С37 ($p < 0,05$).

Про зростання інтенсивності ПОЛ в умовах пухлинного процесу свідчить збільшення у 3,6 рази вмісту ТБК-АП у сироватці крові тварин із саркомою 37 у порівнянні з контролем (Табл. 1). Введення ДХАН мишам із саркомою 37 (група 4) впливає на показники окисного метаболізму сироватки крові у порівнянні з групою мишей в контролі (група 1) та із саркомою 37 (група 3). Вміст ТБК-АП знижується на 73 %, активність загальної СОД – на 64 %, а активність каталази зростає на 61 % (порівняно з групою 3). Введення ДХАН мишам із саркомою 37 впливає на ці показники в сироватці крові, наближаючи їх до рівня величин контрольної групи. Причому, активність каталази сироватки крові мишей з пухлинами за умов введення ДХАН навіть зростає на 51 % у порівнянні із сироваткою контрольних мишей.

Таким чином, виявлено вплив натрій дихлорацетату на проокисно-антиоксидантну рівновагу в організмі мишей з саркомою 37 та інтенсифікацію окисних процесів в пухлинах за дії ДХАН, що може бути складовою механізмом протипухлинного ефекту даного препарату та свідчить про можливість цілеспрямованої його дії на пухлину.

Висновок. Натрій дихлорацетат у дозі 1548 мг/кг за курс здатний інгібувати ріст саркоми 37 на 64 %. Введення препарату призводить до інтенсифікації окисних

процесів у саркомі 37, що супроводжується накопиченням ТБК-активних продуктів у пухлинах, зниженням активності загальної супероксиддисмутази та каталази. Натрій дихлорацетат сприяє наближенню показників, що характеризують інтенсивність ПОЛ, у сироватці крові мишей з саркомою 37 до значень, які спостерігаються в контролі, тоді як на стан цих процесів у печінці препарат суттєво не впливає. Встановлено переважачий вплив натрій дихлорацетату на характер проокисно-антиоксидантних процесів у пухлині, що може виступати складовою механізмом, покладеного в основу здатності даної сполуки інгібувати ріст пухлини.

1. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. // Лаб. дело. – 1990. – №8. – С. 19-22. 2. Корольок М.А., Иванова Л.И., Монтарева В.Е. и др. // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19. 3. Современные методы в биохимии / Под. ред. В.Н.Ореховича. – М., 1977. 4. Cairns R.A., Papandreou I., Sutphin P.D. et al. // PNAS. – 2007. – Vol. 104, № 22. – P. 9445-9450. 5. McMurtry M.S., Bonnet S., Wu X. et al. // Circulation Res. – 2004. – V. 15. – P. 830-840. 6. Michelakis E.D. // Circulation. – 2008. – V. 13. – P. 2431-2434. 7. Nishikimi M., Roa N.A., Yogi K. // J. Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1972. – V.46. – P. 849-854. 8. Stacpoole P., Handerson G., Yan Z. // Env Health Perspectives. – 1998. – Vol. 106, № 4. – P. 989-994. 9. Whitehouse S., Randle P. J. // Biochem. J.-1973. – V. 134. – P. 651-653.

Надійшла до редколегії 16.12.10

УДК 579.616.3:633.8

Т. Фурзікова, канд. біол. наук, І. Сорокулова, д-р біол. наук,
В. Лутченко, канд. біол. наук, А. Путніков, пров. інж.

РОСТОВА АКТИВНІСТЬ СКЛАДОВИХ БІОСПОРИНУ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ВІДВАРІВ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

В досліджах in vitro показано вплив відварів лікарських рослин на ріст та розвиток штамів Bacillus subtilis УКМ В-5007 та Bacillus licheniformis УКМ В-5514 які є складовими біоспорину. Продемонстровано, що жоден з фітотидварів не пригнічував росту пробіотичних штамів. При вирощуванні Bacillus subtilis УКМ В-5007 та Bacillus licheniformis УКМ В-5514 на рідкому середовищі Гаузе, виготовленому на основі відварів полину та м'яти тривалість lag-фази скорочувалась з 4-6 годин в контролі до 2 годин в досліді. Всі відвари лікарських рослин здійснювали стимулюючий вплив на приріст біомаси штамів бацил більш ніж на три порядки. Найбільш перспективними для подальших досліджень виявились відвари дерев'яю, полину, ромашки та м'яти.

In in vitro experiments it has been researched the effect of herbal decoction of medicinal plants on growth and development of strains of Bacillus subtilis UKM B-5007 and Bacillus licheniformis UKM B-5514 that is a component of biosporin. It has been shown that herbal decoction does not suppress the growth of probiotic strains. When Bacillus subtilis UKM B-5007 and Bacillus licheniformis UKM B-5514 has been grown in medium Gause 2, prepared on the basis of herbal decoction of wormwood and mint, the duration of lag-phase decreased from 4-6 hours for control to 2 hours in the experiment. All herbal decoctions of medicinal plants carried out a stimulating effect on biomass growth of strains of bacilli for more than three orders of magnitude. Concoctions yarrow, wormwood, chamomile and peppermint have turned out to be most promising for further investigations.

Вступ. Відомо, що будь-який патологічний процес (як інфекційної так і не інфекційної етіології) призводить до порушень гомеостазу всього організму [2, 3]. Невід'ємною складовою гомеостатичного існування організму людини є стан його мікробіоти. Мікроекологічні порушення це серйозні розлади в еволюційно сформованій системі макроорганізм-мікробіота. Дисбіози є одним з наслідків чисельних патологічних процесів в різних органах та системах організму, а також причиною їх ускладнення та хронізації.

Препарати, що містять живі культури мікроорганізмів – пробіотики – все частіше використовують у схемах терапії різних патологічних процесів, так як вони сприяють відновленню мікробіотичних порушень і гомеостазу вцілому [1, 8].

У терапії інфекційних захворювань перспективи набувають пробіотики, що містять активні штами-антагоністи патогенної мікрофлори [7]. Зокрема біоспорин досить добре зарекомендував себе у терапії інфекцій, що зумовлені сальмонелами, шигелами, стафілококами, кандидами та ін. [1].

В останнє десятиріччя суттєво переглянуто принципи та підходи до етіотропної терапії гострих кишкових інфекцій, що відобразилось в значному обмеженні показань до призначення антибіотиків. Сформувався точка зору, що перебіг легких та середньої тяжкості захворювань є більш сприятливим без використання антибіотиків [9]. Так, показано, що при гострих кишкових інфекціях та, більшою мірою в період репарації та легких формах захворювання ефективним є використання фітотерапії [4]. Найчастіше лікарські рослини призначають у вигляді відварів або настоянок висушеної сировини.

На наш погляд, перспективним є дослідити можливість сумісного використання пробіотиків з бацил та відварів лікарських рослин, що традиційно використовують при шлунково-кишкових інфекціях. Метою даної роботи було оцінити вплив відварів лікарських рослин на ростові показники штамів *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514 – складових біоспорину.

Об'єкт та методи досліджень. Об'єктом дослідження були штами бацил *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514, що входять до складу пробіотика біоспорину.

© Фурзікова Т., Сорокулова І., Лутченко В., Путніков А., 2011

В роботі були використані відвари лікарських рослин: Деревію звичайного (*Achillea millefolium*), Звіробію звичайного (*Hypericum perforatum* L.), Аїра тростинного (*Acorus calamus*), Перцевої м'яти (*Mentha piperita*), Подорожника великого (*Plantago major* L.), Полину звичайного (*Artemisia vulgaris*), Ромашки лікарської (*Matricaria recutita*) та шлункового збору №3: (Крушина ламка (*Rhamnus frangula* L.), Кропива дводомна (*Urtica dioica* L.), Перцева м'ята (*Mentha piperita*), Валеріана лікарська (*Valeriana officinalis* L.), Аїр тростинний (*Acorus calamus*)).

Досліджували тривалість адаптаційної фази росту (lag-фази) та приріст біомаси зазначених штамів на рідкому середовищі Гаузе, де замість дистильованої води було взято відвар відповідної рослини. Відвари готували згідно інструкцій щодо їх застосування. Концентрація бацил в момент засіву у всіх випадках становила 10^7 КУО/мл.

Інтенсивність приросту біомаси штамів бацил визначали методом граничних розведень, з перерахунком кількості колонієутворюючих одиниць на мл середовища (КУО).

Тривалість фаз росту визначали фотоколориметричним методом на КФК-2-УХЛ-4.2, вимірюючи величину оптичної густини [10] з паралельним висівом на щільні поживні середовища для визначення кількісного вмісту життєздатних клітин бацил.

Результати досліджень. Було показано, що при вирощуванні культури штаму *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 на рідкому середовищі Гаузе виготовленому на основі відварів лікарських рослин період адаптації мікробної популяції (lag-фаза) на середовищах з відварами полину та м'яти скорочувався з чотирьох (контроль) до двох годин. Фітовідвари аїру, ромашки, подорожника та звіробію, навпаки, сприяли збільшенню тривалості lag-фази до 5,5-8 годин (Рис.1). Тривалість lag-фази для штаму *B.licheniformis* УКМ В-5514 в контролі була дещо довшою – до 6 годин, проте загальна тенденція скорочення або збільшення тривалості адаптаційної фази в залежності від використаного фітовідвару зберігалась. Для полину та м'яти цей термін був у межах 2,5 – 3 годин, а для аїру, звіробію, подорожника збільшувався до 8-9 годин. Для інших відварів – в межах контролю.

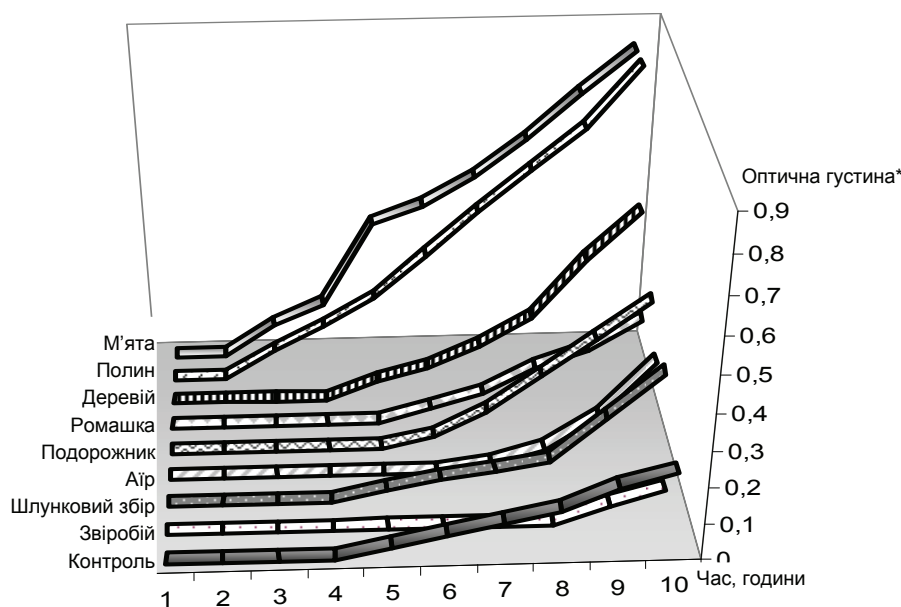


Рис 1. Вплив фітовідварів на тривалість lag-фази *Bacillus subtilis* УКМ В-5007

* $p < 0,05$

Відомо, що рослини містять величезний арсенал сполук з вираженою антимікробною дією як до грампозитивних так і грамнегативних мікроорганізмів, в той же доведено, що вони не пригнічують розвиток представників облигатної мікробіоти [6]. До найбільш відомих сполук виділених з рослин відносять – ефірні олії, органічні кислоти (хаулмутрову, гіднокарпову, галову, усні нову тощо), дубильні речовини (танін, піраголол, гідрохінон та ін.), алкалоїди та глюкозиди (анабазин, піптанін, хатин, гармін тощо) та багато інших. Показано, що одні й ті ж самі речовини за різних умов та у відношенні до різних організмів можуть здійснювати як стимулюючий, на ріст та біологічну активність, вплив, так і інгібуючий (від бактеріостатичного до бактерицидного) вплив [5].

При переході культури у log-фазу розвитку відмічали унікальний стимулюючий ефект всіх фітовідварів на приріст біомаси бактерій складових пробіотика біоспорин. В деяких випадках приріст біомаси збільшувався, в порівнянні з контролем, більш ніж на три порядки (Рис.2). Найбільш виражений приріст біомаси відмічали при вирощуванні бацил на середовищах з відварами деревію, полину та подорожника. На середовищах з відварами звіробію та шлункового збору інтенсивність росту була в межах контролю. Жоден з досліджуваних фітовідварів не здійснював інгібаторного впливу на досліджувані штами бацил.

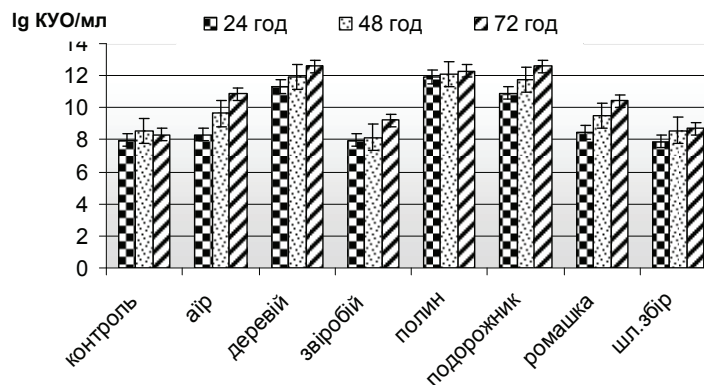


Рис 2. Вплив фітовідварів на інтенсивність росту *Bacillus subtilis* УКМ В-5007

До того ж, на середовищі з фітовідварами тривалість активного поділу клітин була значно довшою. Так, якщо у контролі культури бацил вже на 40-42 год переходили у стаціонарну фазу розвитку, а на 56-60 год спостерігали виснаження поживного середовища і відмирання клітин, то на середовищі з фітовідварами інтенсивний поділ клітин спостерігали ще на 72 год. Можна припустити, що фітовідвари в даному випадку є джерелом біологічно активних і поживних речовин і, зважаючи на їх помірну вартість, заслуговують на увагу для впровадження у виробництво пробіотиків.

Таким чином, підсумовуючи результати досліджень, можна зазначити, що жоден з досліджуваних відварів лікарських рослин не пригнічував в досліді *in vitro* інтенсивності росту складових біоспорину. Особливої уваги для подальших досліджень з перспективою сумісного використання заслуговують відвари деревію, полину, ромашки та м'яти.

Висновки.

1. Продемонстровано, що відвари лікарських рослин позитивно впливають на ростову активність штамів *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514

2. Відвари м'яти та полину сприяють скороченню тривалості lag-фази штамів бацил з чотирьох до двох годин.

3. Показано, що інтенсивність приросту біомаси *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514 на середовищах з усіма досліджуваними відварами лікарських рослин зростала більш ніж на три порядки.

УДК 372.857:881.111.1

4. Зважаючи на відносну дешевизну рослинної сировини та виражений стимулюючий вплив на інтенсивність росту *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514 відвари деревію, полину, ромашки та м'яти можуть бути рекомендовані як основа для промислового нарощення біомаси складових біоспорину.

1. Андреева И.В. Доказательное обоснование применения пробиотиков для лечения и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта // Медицинский совет – №3 – 2007 – С. 18 – 21. 2. Бережной В.В., Янковский Д.С., Крамарев С.А., Шунько Е.Е., Дымент Г.С. Нарушения микробной экологии человека, их причины, следствия и способы восстановления физиологической нормы // Здоровье женщины. – 2004. – №2(18). – С.170 – 178. 3. Воеводина Д.А., Розанова Г.Н., Стенина Н.А., Чередуев А.Н. Роль дисбактериоза в формировании хронической неинфекционной патологии у детей // ЖМЭИ – 2001 – №5 – С.68 – 70. 4. Колеснякова А.Г. Бактерицидные и иммунокорректирующие свойства некоторых растительных экстрактов // ЖМЭИ – 1986 – №3 – С. 75 – 78. 5. Куцык Р.В., Зузук Б.М., Куровец Л.М., Мизюк Р.М., Цвекун Н.П., Жолобак Н.М., Спивак Н.Я. Исследование противомикробных и иммуностимулирующих свойств лекарственных растений Карпат и Причерноморья // Новые технологии получения и применения биологически активных веществ: Тезисы докл. междунар. научно-практич. конф. – Симферополь, 2002. – С. 161-162. 6. Лесновская Е.Е., Пастушенков Л.В. Фармакотерапия с основами фитотерапии. – М.: Готтард-Мед, 2003. – 591 с. 7. Сорокулова И.Б. Теоретичне обґрунтування і практика застосування бактерій роду *Bacillus* для конструювання нових пробіотиків: Автореф. Дис. Докт.біол.наук. – К., 1999. – 37 с. 8. Хавкин А.И. Нарушения микроэкологии кишечника. Принципы коррекции. Методические рекомендации. – Москва. – 2004. – 40 с. 9. Элмер Г.В. Пробиотики: применение живых микробов для уменьшения использования антибиотиков // Клин.антибиотикотер. – 2002. – №3(17). – С.30 – 31. 10. Methods for general and molecular bacteriology / Ed. – in – Chief P. Gerhardt. – Washington: DC., Am. Society for microbiology, 1994. – 791 p.

Надійшла до редколегії 29.10.10

А. Смоля, канд. біол. наук, О. Чудовська, пров.інж, Н. Таран, д-р біол. наук,

РОЗРОБКА ПРАКТИЧНО-ІГРОВОГО ЗАНЯТТЯ З БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН АНГЛІЙСЬКОЮ МОВОЮ

Описано оригінальну методику, що поєднує вивчення біологічного матеріалу та іноземної мови. Як приклад, наведено хід практично-ігрового заняття "Біотехнологія рослин".

The original method, which combined the study of biology and foreign language, has been described. The practical lesson with the elements of game "Plant biotechnology" is presented in the article.

В останні десятиліття в усьому світі значна увага приділяється розвитку біотехнологій. Внесок біотехнології в рослинництво полягає в полегшенні традиційних методів селекції рослин, розробці нових технологій, які дозволяють підвищити ефективність сільськогосподарського виробництва. Методами генної та клітинної інженерії створені високопродуктивні й стійкі проти шкідників, хвороб та інших негативних чинників сорти сіль-

ськогосподарських рослин. Розроблена техніка оздоровлення рослин від інфекцій, що особливо важливо для культур, які розмножуються вегетативно. Ведуться дослідження з поліпшення амінокислотного складу рослинних білків, розробляються нові регулятори росту рослин, мікробіологічні засоби захисту останніх від шкідників та хвороб, бактеріальні добрива. Одним із актуальних питань біотехнології є керування процесами

азотфіксації та фотосинтезу, зокрема можливість введення відповідних генів у геном культурних рослин.

Допомогти молодим фахівцям-біологам у ретельному вивченні методів біотехнологій у рослинництві може використання в учбовому процесі різноманітних ігрових методик, які сприятимуть формуванню вмій у студентів застосовувати отримані теоретичні знання у прикладних сферах людської діяльності (медицина, агропромисловий комплекс, промисловість, біотехнологія тощо). Крім цього, в умовах всебічної інтеграції України до загальноєвропейської спільноти виникає необхідність у глибокому професійному знанні іноземної мови (перш за все, англійської) для студентів всіх вищих навчальних закладів.

Метою нашої роботи була розробка та апробація циклу ігрових занять "Біологія рослин англійською мовою" по певним темам спеціалізованих курсів ("Біохімія рослин", "Кореневе живлення рослин", "Фотосинтез" тощо). Як приклад наведемо заняття "Біотехнологія рослин". Нагадаємо, що кожне заняття складається з двох частин: біологічної та граматичної. Біологічний блок ведеться виключно англійською мовою, а, в разі необхідності, роз'яснення надається українською мовою. Блок, присвячений граматиці англійської мови, викладається українською мовою для полегшення розуміння. Кожний блок розподіляється на кроки, метою яких є логічне розкриття теми. Обидва блоки супроводжуються яскравими слайдами, фотографіями, малюнками, схемами, таблицями. Граматичний блок має бути органічно пов'язаним з лексикою першого блоку. На базі лексики біологічного блоку наводяться граматичні приклади, а також створюються оригінальні вправи в контексті лексики біологічного блоку.

Біологічний блок. STEP1/ Крок 1. На початку заняття викладач нагадує, що біотехнологія вивчає особливості використання біологічних процесів і агентів для виробничих (промислових) цілей. Біотехнологія як наука сформувалася за останні десятиліття (70–90-ті роки) на основі розвитку молекулярної біології, клітинної і генної інженерії, широкого використання методів біохімії, біоорганічної хімії та інших наук. Основою біотехнології є біологічні процеси, за допомогою яких вирішується багато практичних питань щодо збільшення виробництва продовольства, підвищення ефективності охорони здоров'я, виробництва сировини, створення і використання рентабельних відновлюваних джерел енергії, безвідходних виробництв, поліпшення екологічних умов навколишнього середовища. У багатьох розвинутих країнах уже створені і створюються промислові підприємства, які на основі методів сучасної біотехнології виробляють продукти харчування, корми і кормові добавки, медикаменти, проводять трансплантацію ембріонів, вирішують інші господарські завдання. Велике майбутнє має сільськогосподарська біотехнологія насамперед для створення нових високопродуктивних сортів і гібридів сільськогосподарських культур, біологічних засобів захисту рослин, виробництва харчових продуктів і кормів, регуляторів росту, різних біопрепаратів, утилізації побічної продукції рослинництва і виробництва з неї біогазу, бактеріального протеїну, пального, високоякісних і екологічно чистих органічних добрив.

На сучасному етапі розвитку біотехнологій у рослинництві перш за все є доцільним використання таких методів: генетична інженерія/*genetic engeneering* та культура ізольованих клітин, тканин та органів рослин/*plant tissue, cell and organ culture in vitro/micropropagation/microclonal propagation* [1].

Генетична інженерія відкриває перед селекцією рослин нові перспективи, зокрема можливість перенесення в них генів від бактерій, грибів, екзотичних рослин і навіть людини та тварини, в тому числі й генів стійкості, що є недосяжним для експериментального мутагенезу та традиційної селекції. Наприклад, актуальним є отримання транс генних рослин/*transgenic plants*, стійких до грибкових хвороб.

Прийнята програма, метою якої є вивчення впливу генів хітинази та β -глюканази на підвищення стійкості пшениці до грибкових патогенів. Два PR-білки синтезуються в пшениці в тканинах мезофілу у відповідь на інфікування борошністою россою. Створені конструкції з генами хітинази ячменю та β -глюканази під контролем промотора *r903* ячменю, що експресується в тканинах епідермісу. Після мікробомбардування калуса, який утворився з мікроспор, отримані клітини із тразієнтною експресією репортерного гену і соматичні зародки із стабільною експресією генів.

За останні десятиліття використовували різні підходи, пов'язані з протеїнами, що мають антигрибкову активність. Скринінг таких протеїнів показав їх активність проти *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae* та деяких інших грибних патогенів. Гени двох таких протеїнів були клоновані і перенесені в картоплю і пшеницю. Однак, така стійкість може бути ефективною тільки для окремої кількості патогенів і, якщо вона базується тільки на одній достатньо специфічній модифікації геному, то вона може бути доволі швидко подолана за рахунок появи нових, стійких рас патогенів. Більш тривалу стійкість до широкого спектру грибів ймовірно можна забезпечити створенням захисних механізмів, що імітують природну захисну реакцію. Захисні механізми рослин на сьогодні більш ретельно вивчені для вегетативних тканин і до останнього часу мало було відомо про захисні механізми, що працюють в насінні та проростках рослин. Найбільш критичним моментом є стадія проростання насіння, коли порушується цілісність насінневої оболонки, котра є бар'єром для мікроорганізмів. Останнім часом було відкрито новий клас антимікробних пептидів, котрі отримали назву – дефензини рослин. Дефензини розрізняються по довжині, кількості залишків цистеїну та складною тримірною структурою. Отримані трансгенні рослини тютюну з геном дефензина редьки. В здоровому непошкодженному листі та стеблах ці протеїни детектувались в незначній кількості. Однак при атаці грибних патогенів їх кількість різко зростала, як в інфікованому так і в здоровому, що свідчить про системний захист. Новим підходом у створенні трансгенних рослин, стійких до грибкових патогенів є перенос в них генів, що кодують ензими, котрі детоксифікують токсини грибів. Інший механізм стійкості до грибів знайдено у какао: у відповідь на інвазію грибного патогену в кислему синтезуються чотири фітоалексини [2].

Викладач звертає увагу студентів дві основні техніки, що використовуються у генетичній інженерії: генетична трансформація рослин з використанням агробактерії/*agrobacterium* та метод мікробомбардування. Наголошується, що революційним звершенням у генетичній трансформації рослин стало виявлення природного вектору – агробактерій для переносу генів та розробка методу мікробомбардування (біологічна балістика/біобалістика/біолістик) / *gene gun (biological ballistics / bioballistics / biolistics /biolistic particle delivery system)* рослинних об'єктів мікрочастинками металів з попередньо нанесеною чужерідною ДНК. Викладач демонструє слайд зі схематичним зображенням процесу переносу

вибраних генів агробактерією та мікробомбардування рослинних тканин мікрочастинками металів (золота та вольфраму) за допомогою "генної гармати"/ *gene gun*.

STEP 2/Крок 2. Метою цього етапу є визначення поняття "мікроклональне розмноження" та ознайомлення з основними принципами цього процесу. Звертаємо увагу студентів на те, що одним із найпоширеніших напрямів методу культури тканин є мікроклональне розмноження, при якому отримують генетично ідентичні форми, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Потім викладач просить студентів сказати завдяки чому власне можливе мікроклональне розмноження рослин. Виявляється, що завдяки тотипотентності – тотожності за генотипом усіх клітин організму рослини та їх здатності до реалізації генетичної інформації в усіх характерних для організму морфобіологічних, біохімічних та фізіологічних ознаках. Нині, нагадає викладач, існує кілька різних, детально розроблених методів мікроклонального розмноження. Різняться вони станом вихідних клітин та тканин, які беруться для отримання мікроклонів. Орган /тканини рослин для мікроклонування, який називається експлантом (експлантантом)/*explant* підбирається з врахуванням його морфогенного потенціалу. Для того, щоб клітина дала початок розвитку іншим клітинам, вона повинна втратити свою спеціалізацію, тобто має пройти процес дедиференціалізації/*dedifferentiation*.

Для того, щоб визначити, в якій частині рослини найкраще брати експлантат студентській аудиторії пропонується гра. Для цього викладач пропонує перелік частин рослини, придатних до подальшого мікроклонального розмноження, серед яких є завідомо хибні. Студентам необхідно вибрати ті частини рослини, тканини яких дійсно пройти процес дедиференціалізації. Аудиторія ділиться на дві групи. Виграє та група, котра дала найбільш повний перелік. Відповідь, що найкраще, якщо клітини беруться з меристематичної (недиференційованої) тканини: в пазусі листя/ *leaves axil*, пагона пазушної та сплячої бруньки/ *shoot and axillary dormant buds*, апікальних регіонах коріння (інокулюми/ *inoculum*)/*root apex* та стебла/*stem apex*, молодих листочках/*juvenile leaves*, міжвузлі /*internode* є вірною.

Для узагальнення викладач пропонує студентам відповісти на запитання, наприклад, чи є вірним твердження, що найчастіше мікроклональне розмноження проводять шляхом вищлення апікальної меристеми. В процесі дискусії з'ясовується, що таке твердження є абсолютно вірним. Встановлено, що апікальна частина точки росту (0,1 мм), що складається з ще недиференційованих клітин (меристема), здатна нести генетичну інформацію організму, але не містить вірусних часток, які присутні в диференційованій клітині дорослого організму. Поміщена на поживне середовище, меристема виростає з утворенням ювенільної рослини/*juvenile plant/ plantlet*, яка не містить вірусів. Таку рослину легко швидко розмножити, розділивши на пагони, які містять точки росту. Клонуванням наступних поколінь меристемних рослин одержують клон материнського організму з тією ж генетичною інформацією, але без вірусних часток.

Викладач наголошує, що основною умовою успішного культивування ізолюваних культур є дотримання стерильності поживного середовища, посуду, матеріалів, інструментів, посадкового матеріалу, приміщення для ізоляції і пересадки і т.п. Шматочок стерилізованої рослинної тканини поміщають на поживне середовище. Тканина на такому середовищі швидко розростається, утворюючи

однорідну недиференційовану біомасу, що отримала назву калус(калюс)/*callus*. Зростаючу тканину можна багаторазово ділити, й у такий спосіб одержувати її у великій кількості з первісного малюсінського експлантанта. Для того, щоб ефективність мікроклонального розмноження була високою, необхідно на всіх етапах виконання підтримувати оптимальні умови вирощування (температурний режим, освітленість, вологість повітря).

Оскільки, майбутні науковці повинні вміти узагальнювати теоретичний матеріал, то викладач оголошує конкурс на краще формулювання етапів технології мікроклонального розмноження /*the standard protocol for performing plant tissue culture experiments*. Студенти озвучують свої попозиції і й виявляється, що таких етапів чотири, а саме: введення вихідної форми в стерильну культуру, власне мікророзмноження, укорінення розмножених пагонів, переведення стерильної культури в ґрунт.

Для ретельного розкриття теми розглядаємо всі чотири етапи й перш за все зупиняємось на поживному середовищі/*nutrient medium/growth medium/planting medium/culture medium*. Викладач цікавиться думкою студентів, щодо складу поживного середовища. Для цього їм потрібно вибрати із переліку чинників, представлених на слайді, ті, котрі використовуються для створення поживного середовища. Аудиторія працює в парах. У кожній парі є свій перелік чинників і тільки один з них вірний. Після обговорення кожна пара представляє свій чинник і, таким чином, викладач узагальнює, що основою для створення поживних середовищ для вирощування культур тканин рослин є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів) і, оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводиться в склад середовища у вигляді сахарози або глюкози. Крім вуглецю, кисню і водню, для росту тканин необхідний азот у вигляді нітратної або амонійної солі, фосфор – у вигляді фосфату, сірка – у вигляді сульфату та іони K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺. Для росту і диференціалізації будь-яких рослинних клітин необхідні ауксини/*auxin* та цитокініни/ *cytokinin*, співвідношення між якими визначають експериментальним шляхом. Викладач звертає увагу студентів на те, що оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автономного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, то їх ріст в значній мірі залежить від постачання екзогенних регуляторів росту. Відмінності у потребі в екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють виділити декілька груп тканин:

- тканини, які ростуть на середовищі з ауксинами (експланти топінамбура, корені цикорію);
- тканин, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура кінчика корінця білого турнепса);
- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експланти тютюну, тканини кореня моркви);
- тканини, які ростуть на складних за вмістом компонентів середовищах;
- культури тканин пухлин, що здатні рости на середовищах без регуляторів росту.

Таким чином, зазначає викладач, успіх в культивуванні культур клітин, тканин та органів рослин визначається складом поживних середовищ. На даний час розроблено багато варіантів поживних середовищ. Найбільш використовуваними поживними середовищами є наступні: Мурасіге, Скуга – MS [Murashige, Skoog, 1962], Гамборга та ін. – B5 [Gamborg et al., 1968], Ф. Уайта – WH [White, 1963], Р. Шенка, Хільдебранта – SH [Schenk, Hildebrandt, 1972]

[2]. На окремому слайді демонструється, як приклад, склад поживного середовища Murasige, Скуга.

Далі викладач зазначає, що для культивування ізолюваних клітин і тканин вищих рослин застосовуються як *агаризовані/agar medium*, так і *суспензійні* середовища/*suspension medium*. Суспензійна культура/*suspension cell culture* – це вирощування окремих клітин або невеликих їх груп у завислому стані у рідкому живильному середовищі з використанням апаратури, що забезпечує їх аерацію і перемішування. При вирощуванні в суспензійному середовищі значно скорочується цикл технологічного процесу. Характерною особливістю суспензійних культур є їх морфологічна та біохімічна гетерогенність. Клітинна популяція містить клітини, які відрізняються за розміром і формою.

Як відомо, на підставі морфогенетичних процесів які відбуваються в культурі органів і тканин рослин, можна виділити декілька методів їхнього розмноження: диференціація калюсу/*callus culture*, активізація розвитку вже наявних у рослині меристем/*organ culture* (апекс стебла/*stem apex*, пагона пазушної та сплячі бруньки/*axillary shoot and dormant buds*); індукція та утворення адвентивних пагонів/*shoot organogenesis*; соматичний ембріогенез/*somatic embryogenesis*. Всі перераховані вище методи представляються на окремих слайдах з фотографіями, що ілюструють як процес утворення нових рослин, так і кінцевий результат.

Для кращого засвоєння цього матеріалу, після пригадування основних принципів мікроклонального розмноження, студентам пропонується гра за принципом "brain storm". Модератор, котрим виступає викладач, ставить перед "науковцями" завдання знайти нові шляхи мікроклонального розмноження. Студенти уявляють себе відомими спеціалістами в галузі культури тканин і по-черзі, біля екрану, пропонують на англійській мові, дивлячись на підготовлені викладачем слайди, "свої" методи мікроклонального розмноження. Інші студенти ставлять під сумнів їх пропозиції, задаючи запитання. Викладач, по ходу обговорення, звертає увагу студентів на термінологію, граматику та артикуляцію.

Таким чином в дискусії за "круглим столом", виявляється, що в основі регенерації рослин з калусу є здатність клітин експлантанта до диференціації. Перший "науковець" пропонує в селекційній практиці поряд із мікроклональним розмноженням рослин використовувати метод, який він назвав "метод калусних культур/*callus culture*" із експлантів різних органів, які є додатковим резервом розмноження селекційного матеріалу. При перенесенні стерильних експлантів у стерильне поживне середовище паренхімні клітини дедиференціюються, втрачають клітинну спеціалізацію, переходять до ділення, утворюючи калус. Незалежно від того, з якого органа був отриманий первинний калус, він є однотипною масою клітин, які лише частково відтворюють специфіку тканини інтактноі рослини. У природі калусоутворення зустрічається як реакція на пошкодження рослини, коли на місці поранення утворюється нарост (мозоль)/ *outgrowth (callus)*.

Інший "видатний науковець" пропонує так звану "культуру ізолюваних коренів/*hairy root culture*", як новий метод дослідження фізіології і біохімії кореневої системи та її біосинтетичної активності. В ізолюванні культурі вирощують відрізки кінчиків коренів проростків, зародків непророслого насіння, адвентивні корені, отримані від вкорінених наземних органів, що розвиваються із калусних культур, ділянки кореневих систем рослин. В останньому випадку корені невеликого діаме-

тру стерилізують, промивають стерильною водою і переносять на поживне середовище. Поділ клітин у культурі спостерігається лише тоді, коли вони прикріплюються до субстрату або перебувають у суспензії. Залежно від цього вони можуть мати витягнуту веретеноподібну або сферичну форму. На слайді демонструються фотографії різних культур ізолюваних коренів.

Наступний учасник наголошує, що особливості процесу калусогенезу залежать від епігенетичних характеристик тканин експланта, що, відповідно, є однією з причин гетерогенності калусних клітин. Тому метод калусних культур дає можливість практично використовувати в селекційному процесі новий тип мінливості – соматоклональну/*somaclonal variation*. Генетична варіабельність соматичних клітин є однією з причин неоднорідності рослин, отриманих із калусних тканин. Калусогенез – це перший етап на шляху отримання соматоклональних варіантів, що потребує перепрограмування шляхів розвитку клітини. Як ми знаємо, клітина, переведена в умови культивування *in vitro*, зберігає свою основну генетичну інформацію про цілий організм і при наявності відповідних умов може реалізувати її. Проте фізичні та хімічні фактори культивування, що мають мутагенну дію, а також генетична гетерогенність соматичних клітин експланту створюють передумови для виникнення генетично змінених рослин. Використовуючи його, можна отримати форми багатьох сільськогосподарських культур з цінними ознаками. Так, припускає "науковець" можна було б отримати сорт високорослого, стійкого до полягання, помідора (на слайді демонструється приклад отримання нового, стійкого до полягання сорту помідора, який вперше було отримано мікроклонально завдяки явищу соматоклональної мінливості). Інші "науковці" пропонують розмножувати мікроклонально, наприклад, апельсини "Навель", персики-нектарини, які теж були створені завдяки появі таких соматоклональних варіантів. Модератор підтверджує, що з соматоклональних варіантів, що виникли, наприклад, в калусній культурі рису, були виділені рослини, що сполучили скоростиглість і "довгі зерна". На їхній основі за короткий термін був створений новий сорт рису.

Ще один "видатний науковець" припускає, що активізація росту пазушних бруньок є найефективнішим методом розмноження *in vitro*, оскільки в цьому разі немає етапу калусоутворення та зберігається генетична стабільність матеріалу. Перед тим як перейти до методу утворення адвентивних пагонів, викладач просить дати визначення терміну "органогенез". Студенти пригадують, що органогенез – це процес утворення *de novo* адвентивних пагонів з калусних клітин або безпосередньо з тканин експланта. "Науковці" припускають, що метод утворення адвентивних пагонів безпосередньо з тканин експланта ґрунтується на здатності ізолюваних частин рослин відновлювати органи і регенерувати нові рослини. Цей метод мікророзмноження передбачає два різні способи регенерації пагонів з бічних інтеркалярних меристем та редиференціації спеціалізованих клітин, утворення меристемоїдів та диференціації стеблових бруньок. Різниця між цими двома процесами полягає в тому, що регенерація рослин з меристем гарантує їхню генетичну ідентичність материнським формам.

Далі один з "науковців" зазначає, що у багатьох випадках ефективним способом розмноження *in vitro* може служити соматичний ембріогенез, тобто, процес формування зародкоподібних структур (ембріоїдів/*embryoids*), що розвиваються із соматичної клітини, і можуть дати початок цілій рослині. Ембріоїди – це біпо-

лярні структури, в яких одночасно розвиваються як кореневі, так і стеблові апекси. Головними параметрами, що визначають соматичний ембріогенез, є тип експлантанта, стадія його розвитку та взаємодія між середовищем і експлантантом. Експлантантами для соматичного ембріогенезу можуть бути листки (банан, кокосова пальма), сім'ядолі/ *cotyledon* (камелія, ліщина), ендосперм/ *endosperm* (актинідія). Утворення соматичних зародків можна спостерігати на коренях, апексі, сегментах стебла в культурі *in vitro* багатьох тропічних рослин.

Крім того, вступає в гру інший студент, для дослідження живих рослинних клітин можна використати культуру ізольованих протопластів/*protoplast culture*. Тоді можна ввести термін "соматична гібридизація"/ *somatic hybridization*, що означає процес злиття протопластів соматичних клітин. При соматичній гібридизації розвиваються гібриди, що поєднують геном обох клітин. Ізольовані протопласти/*isolated protoplasts* можна визначити як "голі" клітини /"*naked*" cells рослин, оскільки клітинна стінка видаляється механічним або ферментативним способом. Система ізольованих протопластів дає можливість вести селекцію на клітинному рівні, працювати у малому об'ємі з великою кількістю індивідуальних клітин, отримувати нові форми рослин шляхом прямого перенесення генів, отримувати соматичні гібриди між віддаленими у систематичному відношенні видами. Таку штучну гібридизацію можна здійснювати між соматичними клітками, що належать далеким в систематичному відношенні організмам і навіть між рослинними і тваринними клітками. Таким чином можна отримувати трансгенні рослини/*transgenic plants*.

Отже, підсумовує модератор (викладач) поставлена задача виконана, знайдені нові шляхи мікроклонального розмноження і для розрядки, невеликого перепочинку перед наступним кроком. студентам пропонується переглянути 7-хвилинний відеоролик по методиці мікроклонального розмноження, озвучений англійською мовою.

STEP 3/Крок 3. На цьому етапі викладач цікавиться думкою студентів про переваги мікроклонального розмноження порівняно з традиційними способами. З'ясується, що вирощування рослин із меристематичних тканин в контрольованих штучних умовах дає можливість досягти елімінації вірусів та інших патогенних мікроорганізмів і отримати здоровий посадковий матеріал; можна застосовувати для рослин, які складно або взагалі не розмножуються вегетативно або не дають життєздатного насіння; можливість вести відбір генотипів, стійких до несприятливих зовнішніх умов (екстремальні температури, засолення та закислення субстрату, пригнічуюча дія гербіцидів тощо) а також продуктивніших форм; швидкість та коефіцієнт розмноження досягає 1:1000000 і дає можливість в 2–3 рази скоротити строки відбору та отримання нових рослин в селекційних до-

слідженнях. Все це є дуже важливим для сільського господарства двадцять першого століття в умовах зростання населення, скорочення посівних площ та погіршення умов. Так, лауреат нобелівської премії, батько "зеленої революції" Норманн Боргауг сказав, що тільки нові біотехнології можуть врятувати світ від голоду та екологічних катастроф.

Далі викладач представляє зображення декоративних рослин, які в наш час отримують виключно методом мікроклонального розмноження у промислових масштабах, слайд про сучасний метод відновлення лісних насаджень та слайд про методику отримання безвірусного посадкового матеріалу.

Для закріплення вивченого матеріалу викладач пропонує завдання-гру, яке полягає в тому, щоб вибрати з наведених на слайді правильну відповідь на запитання "В яких випадках доцільно використовувати мікроклональне розмноження?". Аудиторія ділиться в залежності від кількості студентів на декілька груп, виграє та група, котра дала найбільшу кількість правильних відповідей.

Наступне завдання-гра деталізує попереднє. На слайді вже зображені різні рослини, з яких необхідно вибрати ті, котрі розмножують мікроклональним методом.

Грамматичний блок. STEP 1/ Крок 1. Другий блок заняття – граматичний, але пов'язаний з фактичним матеріалом першого блоку. Оскільки майбутні фахівці будуть як брати участь у міжнародних конференціях так і організовувати конференції, то вони повинні, зокрема, вміти складати запрошення на конференції. Як приклад на екрані демонструються принцип складання запрошення, його структура та фразеологічні блоки, з яких складається типове запрошення на конференцію. Викладач роз'яснює термінологію та порядок розташування необхідної інформації.

STEP 2/ Крок 2. Для закріплення отриманих знань студентам пропонується, користуючись наведеним на екрані алгоритмом, скласти запрошення на конференцію/конгрес з питань використання біотехнологій у рослинництві. Особливу увагу студенти мають приділити заголовкам секцій та питань, що в них розглядаються, використовуючи термінологію, засвоєну на занятті.

Таким чином, практично-ігрові заняття англійською мовою дають змогу підняти рівень англійської підготовки студентів-біологів рослин у своїй професійній сфері.

1. Кириченко Е.Б. Русско-французско-английский словарь. Физиология и биохимия растений. – М.: Наука, 2002. – 371 с. 2. Левенко Б.А. Генетически модифицированные (трансгенные) растения. – Киев: Наукова думка, 2010. – 430 с. 3. Герасименко В.Г. Биотехнология. – К.: Вища школа, 1989. – 343с.

УДК 577.112.7

Б. Терлецький, асп., Д. Мінченко, наук. співроб.,
О. Губеня, пров. інж., О. Мінченко, проф.

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ, ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ АБО ГЛЮТАМІНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ GAS1 ТА GAS6 У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ U87 ЗАЛЕЖИТЬ ВІД ФУНКЦІЇ ГЕНА ERN-1

Гіпоксія є однією із характерних рис ішемії, що індукує комплекс внутрішньоклітинних сигналів шляхом порушення фолдингу протеїнів, які сприймаються сенсорною сигнальною системою ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 (ERN-1). Ми досліджували вплив гіпоксії, а також дефіциту глюкози або глютаміну, на експресію генів, що специфічно пригнічують ріст клітин (GAS1 та GAS6), та її залежність від функції гена ERN-1 у клітинах гліоми лінії U87. Встановлено, що гіпоксія та дефіцит глюкози істотно знижують рівень експресії мРНК як GAS1, так і GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, а блокада функції гена ERN-1 в цих клітинах призводить до вираженого збільшення рівня експресії мРНК GAS1 і GAS6, а також змінює ефект гіпоксії та дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК обох генів. Крім того, було показано, що дефіцит глютаміну істотно не змінює рівень експресії генів GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, але в клітинах з пригніченою функцією гена ERN-1 спостерігається зниження рівня експресії гена GAS1 без істотних змін в експресії гена GAS6. Таким чином, результати даної роботи свідчать про істотні зміни в експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин (GAS1 та GAS6), у клітинах гліоми лінії U87 в умовах гіпоксії та дефіциту глюкози, багатократно посилюється за умов блокади функції гена ERN-1, причому величина ефекту гіпоксії, а також дефіциту глюкози або глютаміну, на рівень експресії досліджуваних генів залежить від функції гена ERN-1.

Hypoxia is an essential features of ischemia, have been shown to induce a set of complex intracellular signaling events known as the unfolded protein response which is mediated by endoplasmic reticulum – nuclei-1 signaling system (ERN-1). We studied effect of hypoxia as well as glucose or glutamine deprivation on the expression of growth arrest specific genes (GAS1 and GAS6) in U87 glioma cells and its dependence from ERN-1 signaling enzyme function. It was shown that hypoxia and glucose deprivation significantly decreased the expression of GAS1 and GAS6 mRNA levels in U87 glioma cells. Moreover, blockade of IRE-1 gene expression in this cell line is significantly increased the expression of GAS1 and GAS6 mRNA levels and change the effect of hypoxia and glucose deprivation on the expression of both genes. However, the level of GAS1 and GAS6 mRNA expression in glioma cell line U87 significantly did not change in glutamine deprivation conditions, but the suppression of GAS1 gene expression was observed in modified U87 cells without ERN-1 gene function. Thus, results of this investigation clearly demonstrated that there are significant changes in the expression of growth arrest specific genes (GAS1 and GAS6) in U87 glioma cells in hypoxia and glucose deprivation, strongly increased under blockade of ERN-1 gene expression. Moreover, effect of hypoxia and glucose or glutamine deprivation on the level of investigated genes expression is depended from ERN-1 gene function.

Вступ. Гіпоксія є однією із характерних рис злоякісних пухлин, вона значною мірою визначає інтенсивність їх росту. І якщо роль транскрипційного фактора, що індукується за гіпоксії, (HIF) в рості злоякісних пухлин достатньо добре вивчена, то роль додаткових механізмів ще недостатньо з'ясована [1, 2]. Відомо, що умовах гіпоксії, коли має місце не лише дефіцит кисню, а і АТФ, у клітинах спостерігається індукція комплексу внутрішньоклітинних сигнальних подій у відповідь на накопичення у ендоплазматичному ретикулумі неправильно згорнутих протеїнів (Unfolded Protein Response; UPR), які сприймаються трьома сенсорними сигнальними системами: активуючого транскрипційного фактора 6 (ATF6), протеїніназою ендоплазматичного ретикулуму (PERP) та залежного від сигнального фактора ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 (ERN-1), який має ще одну назву – залежний від інозитолу енім-1альфа (IRE-1альфа) [3, 4].

Найбільш важливою, ключовою сигнальною системою є ERN1, трансмембранний протеїн, N-кінцева сенсорна частина якого знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму, а C-кінцева частина – у цитоплазмі [5]. Вона має дві каталітичні ділянки, серин/треонін кіназу та ендорибонуклеазу, які є складовими ERN-1 сигналювання. ERN-1 є не лише сенсором стресу ендоплазматичного ретикулуму, а і медіатором порушення фолдингу протеїнів.

Встановлено, що зв'язування неправильно згорнутих протеїнів з сенсорною ділянкою ERN-1 ініціює його димеризацію та активацію серин/треонін кінازی, причому саме серин/треонінова кіназа відповідає за аутофосфорильовання та димеризацію даного ензиму [5]. Димеризація ERN-1 є надзвичайно важливим етапом в активації сигнальної системи ERN-1, що приводить до змін в JNK-сигналюванні та індукує ендорибонуклеазний домен ERN-1, а це, в свою чергу, ініціює сплайсинг пре-мРНК транскрипційного фактора XBP1 (Х-бокс зв'язуючого протеїну1), а також деградацію ряду мРНК [6].

Сплайс-варіант мРНК транскрипційного фактора XBP1, що експресується у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму, кодує синтез меншого за розміром фактора, який змінює експресію великої групи специфічних генів, що контролюють згортання протеїнів та посилюють виживання клітин в умовах гіпоксії або знищують їх, посилюючи апоптоз. Недавно було показано, що транскрипційний фактор XBP1 має сайти зв'язування в промоторних ділянках великої групи генів [7]. Разом з тим, є дані, що інгібітор кінازی сигнального ензиму ERN1 активує ендорибонуклеазну активність ERN1 для захисту клітин в умовах стресу ендоплазматичного ретикулуму. Встановлено, що ERN1 сигнальний каскад є важливим для індукованої ішемією експресії ендотеліального фактора росту судин А (VEGFA) і вносить свій вклад в ангіогенез та ріст злоякісних пухлин in vivo [8].

Недавно були виявлені мутації гена ERN1 у злоякісних пухлинах людини, що вказує на його важливість у контролі росту пухлин, включаючи гліоми, серед багатьох інших протеїніназ. Дослідження на двох експериментальних моделях пухлин (імплантація пухлини в мозок мишей та в ембріони курчат) показали, що ERN1 сигнальний шлях пов'язаний з процесом неоваскуляризації і росту пухлин, а також тісно пов'язаний з процесом смерті клітин [8]. Недавно було встановлено, що блокада гена ERN1 у клітинах гліоми пригнічує ріст пухлинних клітин, експресію про-ангіогенних факторів (VEGF-A, IL-1beta, IL-6 і IL-8) та посилює експресію анти-ангіогенних факторів (SPARC, декорін і тромбоспондін-1) [9].

Всі три сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулуму представлені трансмембранними протеїнами, що здатні зв'язувати неправильно згорнуті протеїни та шаперон BiP (GRP78, HSPA5) своєю сенсорною частиною, що знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму, а в цитозольній частині цих сенсорів генеруються сигнали, що передаються до ядра і опосередковують відповідь клітини на стрес, яка може бути

направлена як на виживання клітин, так і на їх загибель шляхом апоптозу [4 – 6]. Було також показано, що експресія шаперону GRP78 посилюється у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулу. Всі три сигнальні системи, що реагують на різні види стресу ендоплазматичного ретикулу не є ізольованими, вони тісно взаємодіють між собою, оскільки їх функціональна роль є спільною і полягає у зміні метаболізму клітини з метою її адаптації до умов стресу або знищення клітини. Разом з тим, стрес ендоплазматичного ретикулу є одним із факторів, що забезпечує виживання клітин злоякісних пухлин в умовах гіпоксії та активує ріст пухлин [3, 4, 8].

Група генів GAS, що специфічно пригнічують ріст клітин, є чисельною, але у даній роботі ми дослідили експресію двох із них, GAS1 та GAS6 [10 – 14]. Недавно було показано, що GAS1 відіграє важливу роль в пригніченні росту клітин, блокуючи вхід клітин в S-фазу і, відповідно, їх поділ, причому як трансформованих, так і нормальних клітин. Встановлено, що GAS1 пригнічує проліферацію гліомних клітин за відсутності Shh і індукує їх апоптоз, зменшує рівень фосфорилування протеїну Ret по тирозину 1062 і змінює опосередковане фактором GDNF внутрішньоклітинне сигналювання, а в експериментах на клітинах меланоми було встановлено, що продукт гена GAS1 пов'язаний з посиленням апоптозу і не лише пригнічує метастазування, а і посилює зворотний розвиток метастазів [11, 12]. Більше того, GAS1 може бути відповідальним за пригнічення резистентності злоякісних пухлин шлунку до антипухлинних препаратів, зокрема до епірубіцину [13].

Ген GAS6, продуктом якого є протеїн, що містить гама-карбоксиглутамінову кислоту, також відіграє важливу роль в регуляції виживання та міграцію клітин [14]. Встановлено, що він може впливати на сигнальні шляхи клітин, утворюючи комплекси з MER рецептором (в попередниках В-клітин за гострої форми лімфобластної лейкемії) або з фактором Axl (в дендритних клітинах та в клітинах карциноми нирки) [14 – 16].

Оскільки роль генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у функціонуванні сигнального шляху ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 детально не досліджувалась, то **метою даної роботи** було вивчити вплив гіпоксії та дефіциту глюкози або глютаміну на експресію генів GAS1 та GAS6, а також їх роль у функціонуванні ERN-1-сигнального шляху в клітинах гліом, найбільш злоякісних пухлин мозку, що дуже тяжко піддаються лікуванню і є найбільшою проблемою антипухлинної терапії.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведені на клітинах гліоми лінії U87 та сублінії цих клітин з пригніченою експресією гена ERN-1, яку було отримано в результаті селекції клонів, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ERN-1 у векторі pcDNA3.1+. У якості контролю були використані клітини, стабільно трансфоровані експресійним еукаріотичним вектором pcDNA3.1+. Клітини були отримані від проф. М. Moenpfer (Франція) [8]. Росли клітини у середовищі DMEM, як описано [8]. При дослідженні впливу гіпоксії, клітини гліоми витримували протягом 16-ти годин в інкубаторі, у якому підтримували концентрацію кисню та диоксиду вуглецю на рівні 3 та 5 %, відповідно. В експериментах по вивченню впливу дефіциту глюкози або глютаміну U87 клітини гліоми росли протягом 16-ти годин в середовищі без глюкози або без глютаміну для моделювання ефектів ішемії.

РНК із клітин гліоми виділяли за допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, США) згідно протоколу ви-

робника, як описано раніше [17]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Експресію генів GAS1 і GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, а також бета-актину, як контрольного гена, досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cyclex" (США), використовуючи ABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Об'єднане Королівство) та специфічні для цих генів щупа пари праймерів (Sigma, США). Для цього тотальну РНК із різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) з допомогою набору "QuantiTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короточасно (протягом 2 хвилин) інкубували з буфером gDNA Wipeout, а потім з Quantiscript зворотною транскриптазою в присутності суміші праймерів (Primers mix) та буферу, що уже містив інгібітор рибонуклеаз і набір чотирьох дезоксирибонуклеотидів при 42°C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95°C протягом 3 хвилин і отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції були використані такі пари праймерів: для GAS1: 5'-CTGACTGCATCCTTAGCTG -3' і 5'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 287-306 та 508-489 кДНК GAS1 людини (GenBank номер NM_002048); для GAS6: 5'-CTGACTGCATCCTTAGCTG -3' і 5'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 287-306 та 508-489 кДНК GAS6 людини (GenBank номер NM_000820);

Відносну кількість транскриптів GAS1 та GAS6 розраховували по кількості транскриптів бета-актину. Для ампліфікації бета-актину використовували наступні праймери: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний – 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'. Прямий праймер починається із 704-го нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – з 937-го нуклеотидного залишку (3'-позиція; GenBank номер X00351).

Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовували по три незалежно виділених препарати РНК. Аналіз результатів виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз – в Excel програмі.

Результати дослідження та їх обговорення

Як видно із даних, приведених на рис. 1, рівень експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у клітинах гліоми лінії U87 за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції знижується в умовах гіпоксії більше ніж вдвічі (на 51 та 55 %, відповідно), порівняно з контрольними клітинами, які були трансфоровані еукаріотичним вектором експресії pcDNA3.1+ без вставки. За умов блокади функції гена ERN1 (сублінія клітин гліоми лінії U87 з надекспресією мутантного ERN1 [8]) спостерігається багатократне збільшення рівня експресії як гена GAS1, так і гена GAS6: в 7,3 та 6,7 рази, відповідно, також порівняно з контрольними клітинами, які були трансфоровані вектором pcDNA3.1+ без вставки (рис. 1).

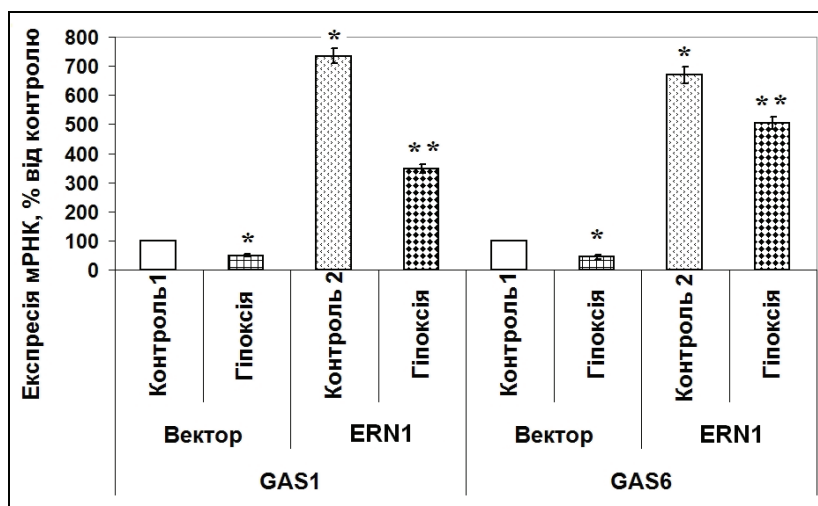


Рис. 1. Вплив гіпоксії на експресію мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфєкованих домінант/негативною конструкцією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум – ядро (dnERN1) у векторі рсDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК GAS1 та GAS6 нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії мРНК GAS1 та GAS6 за гіпоксії (3 % кисню протягом 16-ти годин) в цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; $n = 3$. Контроль 1 – клітини, трансфєковані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфєковані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2

Встановлено також, що в клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 гіпоксія також знижує рівень експресії гена GAS1 майже в такій же мірі, як і у контрольних U87 клітинах гліоми (- 53 %), а рівень експресії гена GAS6 в цих клітинах зменшується лише на 25 %, порівняно з клітинами, які були трансфєковані конструкцією мутантного ERN1 в експресійному векторі рсDNA3.1+.

На рис. 2 представлені дані про вплив одного із факторів ішемії, дефіциту глюкози, на рівень експресії генів

GAS1 та GAS6. Інкубація клітин гліоми лінії U87 в середовищі без глюкози також приводить до зниження рівня експресії мРНК GAS1 та GAS6 подібно до дії гіпоксії (- 56 та - 63 %, відповідно), порівняно з контрольними клітинами, які були трансфєковані вектором рсDNA3.1+ без вставки, але за умов блокади функції гена ERN1 ефект дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК був більш вираженим для гена GAS1 (- 70 %) і значно меншим для гена GAS6 (- 32 %) у порівнянні з клітинами, які були трансфєковані конструкцією мутантного ERN1.

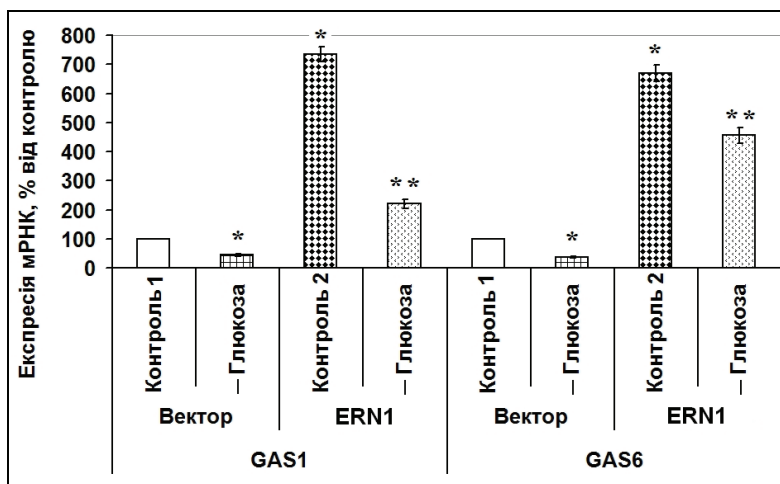


Рис. 2. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфєкованих домінант/негативною конструкцією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум – ядро (dnERN1) у векторі рсDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК GAS1 та GAS6 нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії мРНК GAS1 та GAS6 в цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; $n = 3$. Контроль 1 – клітини, трансфєковані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфєковані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2

Крім того, були проведені дослідження експресії мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87 та в сублінії клітин гліоми з пригніченою функцією гена

ERN1 за умов інкубації їх в середовищі без глютаміну, іншої моделі ішемії [8]. Результати цих досліджень представлені на рис. 3.

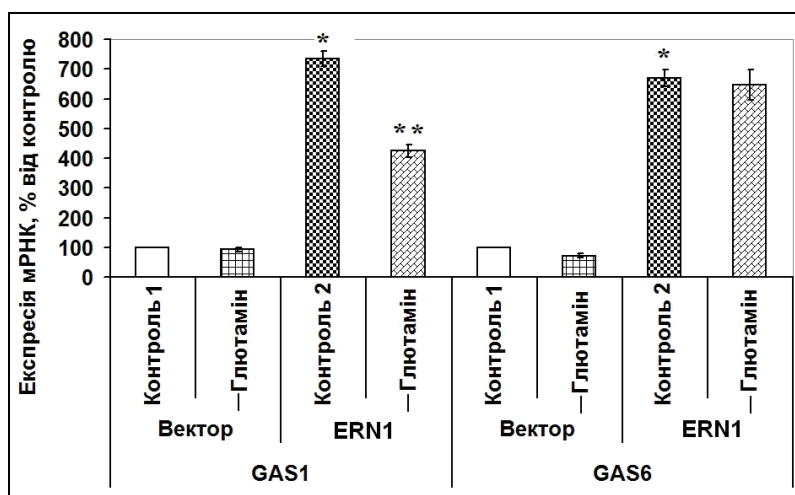


Рис. 3. Вплив дефіциту глютаміну на експресію мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфорованих домінант/негативною конструкцією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум – ядро (dnERN1) у векторі рсDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК GAS1 та GAS6 нормалізували по експресії бета-актину.

Зміни в експресії мРНК GAS1 та GAS6 в цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; $n = 3$.

Контроль 1 – клітини, трансфоровані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфоровані dnERN1;

* – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2

Було встановлено, що дефіцит глютаміну істотно не змінює рівень експресії мРНК GAS1 у клітинах гліоми лінії U87, але знижує на 28 % рівень експресії мРНК GAS6, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфоровані вектором рсDNA3.1+ без вставки. В той же час, у сублінії U87 клітин гліоми за умов блокади функції гена ERN1 дефіцит глютаміну призводить до зменшення рівня експресії мРНК GAS1 на 38 %, але не змінює істотним чином експресію гена GAS6. Таким чином, за умов блокади функції гена ERN1 у клітинах гліоми дефіцит глютаміну призводить до протилежно направлених змін у порівнянні з клітинами, які були трансфоровані вектором.

Багатократне збільшення рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у сублінії клітин гліоми з заблокованою функцією гена ERN1, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфоровані експресійним вектором рсDNA3.1+ без вставки, узгоджується з даними інших авторів [8]. Цими дослідниками було показано, що ERN1 сигнальний каскад є важливим для експресії А-форми ендотеліального фактора росту судин, що індукується ішемією, і вносить свій вклад в ангіогенез та ріст злоякісних пухлин *in vivo* і що пригнічення функції ERN1 істотно сповільнює їх ріст, зменшує рівень ендотеліального фактора росту судин та сповільнює ангіогенез. І підвищення рівня експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, GAS1 та GAS6, в клітинах з пригніченою функцією ERN1, безперечно вносить свій вагомий внесок в пригнічення росту злоякісних пухлин та посилення апоптозу пухлинних клітин, оскільки саме така дія описана для опосередкованих GAS1 та GAS6 сигнальних шляхів [10 – 15].

Відомо, що гіпоксія та ішемія є вагомими чинниками стимуляції пухлинного росту і їх вплив на ріст злоякісних пухлин опосередковується адаптивною реакцією для виживання клітин, що представляє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання протеїнів і їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі, головним чином через сенсорну сигнальну систему фактора ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 [2, 18, 19]. У зв'язку з цим, отримані нами результати по зниженню рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у клітинах гліоми лінії U87 за гіпоксії та дефіциту глюкози роз-

криває деякі сторони механізму стимуляції росту пухлинних клітин за цих умов. Більше того, сповільнення росту злоякісних пухлин за умов пригнічення функції гена ERN1 можна пояснити також і послабленням ефекту гіпоксії та дефіциту глюкози на рівень експресії генів GAS1 та GAS6.

Результати даної роботи переконливо свідчать про істотні зміни в експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, GAS1 та GAS6, у клітинах гліоми в умовах гіпоксії, за дефіциту глюкози та пригнічення функції гена ERN1, причому величина ефекту гіпоксії та дефіциту глюкози на експресію цих специфічно пригнічуючих ріст клітин генів залежить від функції гена ERN1.

Таким чином, експресія генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, GAS1 та GAS6, є важливим фактором контролю проліферації злоякісних пухлин, а сповільнення їх росту при блокаді експресії гена ERN1 асоціюється з багатократним підвищенням рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що вказує на залежність експресії цих генів від функціонування ERN1 сигнальної системи. Можна припустити, що посилена проліферація злоякісних пухлин, в яких присутні ефекти гіпоксії та ішемії, обумовлена також зниженням рівня експресії генів GAS1 та GAS6 в результаті дії цих чинників. Ці принципово нові дані щодо залежності змін в експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, від функції гена ERN1 заслуговують на подальше поглиблене дослідження з метою пошуку можливих терапевтичних мішеней для селективного блокування про-пухлинної активності IRE1 шляхом дизайну специфічних інгібіторів росту злоякісних пухлин.

Висновки.

1. Встановлено, що блокада гена ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до багатократного збільшення рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин.

2. Показано, що гіпоксія або дефіцит глюкози знижують рівень експресії мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, а за умов блокади функції гена ERN1 ефект цих чинників на рівень експресії мРНК GAS6 зменшується.

3. Встановлено, що дефіцит глютаміну істотно не змінює рівень експресії мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, але за умов блокади функції гена

ERN1 дефіцит глютаміну призводить до зменшення рівня експресії мРНК GAS1.

1. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. // *Mutat. Res.* – 2008. – Vol. 640. – P. 174 – 179. 2. Denko N. C. // *Nature Reviews Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 705 – 713. 3. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740. 4. Fels D.R., Koumenis C. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728. 5. Korenykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693. 6. Hollien J., Lin J.H., Li H. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331. 7. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // *Molecular Cell.* – 2007. – 27. – P. 53 – 66. 8. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707. 9. Auf G., Jabouille A., Guérit S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. – 107, N 35. – P. 15553 – 15558. 10. Dominguez-Monzon G., Benítez J.A., Vergara P. et al. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 27, N 4. – P. 305-

313. 11. Gobeil S., Zhu X., Doillon C.J., Green M.R. // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22, N 21. – P. 2932-2940. 12. Lopez-Ramirez M.A., Dominguez-Monzon G., Vergara P., Segovia J. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2008. – Vol. 26, N 5. – P. 497-503. 13. Zhao L., Pan Y., Gang Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 39. – P. 26273-26285. 14. Shiozawa Y., Pedersen E.A., Taichman R.S. // *Exp. Hematol.* – 2010. – Vol. 38, N 2. – P. 132-140. 15. Scutera S., Fraone T., Musso T. et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 5. – P. 3004-3013. 16. Gustafsson A., Martuszewska D., Johansson M. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, N 14. – P. 4742-4749. 17. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Ochiai A. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2005. – 280, N 1-2. – P. 227 – 234. 18. Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssegur J. // *J. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 85, N 12. – P. 1301 – 1307. 19. Moenner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634.

Надійшла до редколегії 17.12.10

УДК 581.331.2

Т. Карпюк, асп., О. Футорна, канд. біол. наук

ПАЛІНОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОДІВ *AECHMEA* RUIZ. & PAV., *BILLBERGIA* THUNB., *NEOREGELIA* L.B.SMITH, *NIDULARIUM* LEM. РОДИНИ *BROMELIACEAE* JUSS

За допомогою світлової і сканувальної електронної мікроскопії досліджено пилкові зерна 10 видів підродини *Bromelioideae* Burnett. Пилкові зерна досліджених видів сулькатні або порові, еліпсоїдальні або сфероїдальні, переважно середнього розміру, з сітчастою, ямчастою, зморшкувато-ямчастою скульптурою. Встановлено, що аперттури, форма пилкових зерен і деталі будови скульптури є важливими таксономічними ознаками на родовому та видовому рівнях.

Pollen morphology of 10 species of the subfamily Bromelioideae (Bromeliaceae) was examined using the light and scanning electron microscopy. Pollen grains are monads, elliptical or spheroidal, 1-sulcate or porate, mainly medium-size with reticulate, perforate and rugulate ornamentation. Characters of the apertures sculpture's surface are diagnostic of the genus and species level.

Вступ. У світовій флорі родина *Bromeliaceae* налічує близько 2500 видів, поширених переважно в тропічних і субтропічних зонах Нового світу [6]. Згідно останніх даних Smith & Till [14] підродина *Bromelioideae* Burnett включає 31 рід, 724 види. Найбільшими є роди: *Aechmea* Ruiz. & Pav. (185 видів), *Neoregelia* L.B.Smith (100 видів), *Billbergia* Thunb. (65 видів), *Nidularium* Lem. (50 видів), *Bromelia* L. (50 видів). Вчені не мають спільної думки щодо систем підродини та окремих її родів. Наприклад, класично рід *Aechmea* за життєвою формою, морфологією і розмірами поділявся на 8 підродів: 1. *Podaeachmea*, 2. *Lamprococcus*, 3. *Aechmea*, 4. *Orgiesia*, 5. *Platyachmea*, 6. *Pothuava*, 7. *Macrochordion*, 8. *Chevaliera* [5]. В той же час молекулярні дані Horres & Schulte [9] не змогли остаточно підтвердити ці спростувані класичну систему роду *Aechmea*.

За результатами молекулярно-філогенетичних досліджень рід *Aechmea* є сестринським до інших родів підродини *Bromelioideae*, які формують кладу *eubromelioids* (еубромеліоїдів) [12]. За даними Sass et al [12, 13] рід *Aechmea* є поліфілетичним та формує з родами *Neoregelia* і *Nidularium* невелику групу.

Відомості про будову пилкових зерен (п.з.) представників підродини *Bromelioideae* вкрай незначні.

Перші дослідження пилку бромелієвих належать Мецу [10], які він здійснив на початку минулого століття. Автор виділив три типи пилкових зерен: безапертурний, поровий і сулькатний (з однією дистальною борозною). Згідно паліноморфологічних даних він розділив родину на три підродини *Integrae*, *Poratae*, *Sulcatae*. Згодом Ердтман уточнив дані Меца, і встановив, що пилкові зерна *Bromeliaceae* завжди є дистально-однорозними [4].

На сьогодні досліджені пилкові зерна окремих родів і видів родини *Bromeliaceae*. А саме – з підродини *Tillandsioideae* Burnett під світловим (СМ) і сканувальним електронним мікроскопом (СЕМ) вивчалися п.з. представників родів *Tillandsia* L. [4, 7, 8, 10, 11], *Vriesea* Lindl., *Guzmania* Ruiz. & Pav. [7, 8, 10]. З підродини *Pitcairnioideae* Harms — п.з. видів роду *Pitcairnia* L'Her досліджувалися за допомогою СМ і СЕМ [4, 7], а п.з. видів роду *Dyckia* Schult. — лише під СМ [4, 10]. Пил-

кові зерна роду *Hechtia* Klotzsch з підродини *Hechtioideae* Givnish вивчалися під СМ [4, 10]. За допомогою світлової та сканувальної електронної мікроскопії досліджувались п.з. представників найбільшої підродини *Bromelioideae*, а саме види родів *Aechmea*, *Ananas* Mill., *Bromelia* L. – СМ і СЕМ [4, 7, 10]; п.з. родів *Neoregelia*, *Nidularium*, *Billbergia* – СМ [4, 10]. Завдяки цим дослідженням, встановлено, що сулькатний тип апертур пилкових зерен є переважним у родині, поровий тип п.з. властивий представникам підродини *Bromelioideae*, безапертурний трапляється у деяких представників підродин *Tillandsioideae* і *Bromelioideae*. У межах сулькатного палінотипу, ряд авторів виділяють 6 підтипів, а в межах порового типу підтипів не виділяли [7, 11].

Актуальним є більш детальне вивчення паліноморфологічних даних, для подальшого порівняння їх з результатами молекулярно-філогенетичних досліджень.

Матеріали і методи. Зразки пилку були відібрані в тропічній оранжереї однодольних рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В.Фоміна ННЦ "Інститут біології". Досліджено морфологію пилкових зерен 10 видів з 4 родів підродини *Bromelioideae* світової флори. Для вивчення під світловим мікроскопом (СМ, Carl Zeiss) готували гліцерин-желатинові препарати з використанням рідини Келберла [2]. Вимірювали 20 пилкових зерен кожного зразка при збільшенні $\times 1000$. Для дослідження пилку під сканувальним електронним мікроскопом (СЕМ, JSM-35C) матеріал фіксували на латунних столиках у 96%-му етанолі та напилковали сумішшю золота і платини. При опису пилкових зерен ми використовували термінологію П. І. Токарева [3] і Купріянової та Альошиної [1].

Результати та обговорення

Рід *Billbergia*

B. brasiliensis L.B.Smith (рис. 1, 1; рис. 2, 1,2)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні, дистально-однорозні, еліпсоїдальні за формою, в обрисі з полюса округлі, з екватора – плоско-випуклі. Полярна вісь – 77,1 – 88,6 мкм, екваторіальний діаметр – 36,4 – 41,6 мкм. Борозни довгі (62,6 – 65,3 мкм), з чіткими краями, звужені до загострених кінців. Екзина 1,9 – 2,7 мкм

завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, біля борозни на полюсах гладенька.

СЕМ. Скульптура різносітчаста. Комірки сітки від дрібних до великих, різної форми: округлі, видовжені, округлокутасті; стінки тонкі. Сітка рівномірно виражена по всій поверхні, дещо згладжена на полюсах. Борозни мембрани теж сітчасті.

B. rosea Hortus ex Beer (рис. 1, 6, 7; рис. 2, 4, 5)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні дистально одноборозні, еліпсоїдальні за формою, в обрисі з полюса округлі, з екватора – еліптичні. Полярна вісь 55,7 – 61,4 мкм, екваторіальний діаметр – 34,1 – 36,6 мкм. Борозни довгі (42,1 – 49,9 мкм), з чіткими краями, не звужені до чітких кінців, борозна мембрана дрібносітчаста. Екзина 2,1 – 3,1 мкм завтовшки. Скульптура чітка, дрібносітчаста.

СЕМ. Скульптура від ямчастої до дрібносітчастої. Комірки сітки та перфорації невеликі переважно округлої форми. Сітка та перфорації рівномірно виражені по всій поверхні. Борозни мембрани від ямчастих до дрібносітчастих.

B. pyramidalis var. *concolor* L.B.Smith (рис. 1, 2, 3; рис. 2, 3)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні дистально одноборозні, еліпсоїдальні за формою, в обрисі з полюса округлі, з екватора – плоско-випуклі. Полярна вісь – 54,6 – 60,5 мкм, екваторіальний діаметр – 33,1 – 35,2 мкм. Борозни довгі (48,3 – 52,4 мкм довжиною), з чіткими краями, розширеними кінцями. Екзина 1,7 – 2,4 мкм завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, на апокольпіумі – менше виражена.

СЕМ. Скульптура різносітчаста. Комірки сітки великі і середні, різної форми: округлі, видовжені, округлокутасті; стінки тонкі. Сітка рівномірно виражена по всій поверхні, дещо згладжена на полюсах. Борозни мембрани сітчасті.

B. chlorosticta Saunders (рис. 1, 4, 5; рис. 2, 6, 7)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні дистально одноборозні, еліпсоїдальні за формою, в обрисі з полюса округлі, з екватора – еліптичні. Полярна вісь – 55,7 – 66,1 мкм, екваторіальний діаметр – 32,1 – 37,3 мкм. Борозни довгі (42,9 – 48,6 мкм), з чіткими краями та розширеними кінцями. Екзина 1,7 – 2,7 мкм завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, на апокольпіумі – менше виражена.

СЕМ. Скульптура різносітчаста. Комірки сітки середнього і малого розміру, різної форми: округлі, видов-

жені, округлокутасті; стінки тонкі. Сітка рівномірно виражена по всій поверхні, на полюсах і біля борозен комірки меншого розміру. Борозни мембрани сітчасті.

Рід *Aechmea*

Ae. bracteata (Swartz) Grisebach (рис. 1, 13; рис. 2, 10, 11)

СМ. Пилкові зерна радіально-симетричні чотирипорові (рідше п'ятипорові), сфероїдальні за формою, в обрисі з полюса та екватора – округлі. Діаметр пилкових зерен 49,6 – 52,7 мкм. Пори глобальні, округлі, з чіткими краями, діаметром 10,5 – 15,1 мкм. Екзина 1,6 – 2,8 мкм завтовшки. Скульптура чітка, дрібноямчаста, однорідна по всій поверхні.

СЕМ. Скульптура зморшувата, зморшувато-ямчаста. Стінки нечітко виражені, дещо згладжені. Скульптура поверхні пор подібна до такої мезопоріумів.

Ae. miniata (Beer) Hort. ex Baker (рис. 1, 14, 15; рис. 2, 12, 13, 14)

СМ. Пилкові зерна радіально-симетричні чотирипорові (рідше п'ятипорові), видовжено-сфероїдальної форми, в обрисі з полюса округлокутасті, з екватора – округлі. Полярна вісь 41,0 – 43,1 мкм, екваторіальний діаметр 34,4 – 37,8 мкм. Пори глобальні округлі, чіткі, діаметром 8,3 – 11,7 мкм. Екзина 1,2 – 1,9 мкм завтовшки, спостерігається потовщення екзини біля країв пор до 2,9 мкм. Скульптура чітка, ямчаста, однорідна по всій поверхні.

СЕМ. Скульптура дрібноямчаста, рівномірно виражена по всій поверхні. Перфорації невеликі, чіткі. Скульптура поверхні пор зморшувато-ямчаста.

Ae. calyculata Baker (рис. 1, 10; рис. 2, 8, 9)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні дистально двопорові, продовгувато-сфероїдальної або еліпсоїдальної форми, в обрисі з полюса округлі, з екватора – еліптичні, з потовщеннями на кінцях. Полярна вісь 43,4 – 49,8 мкм, екваторіальний діаметр 29,2 – 33,5 мкм. Пори округлі, чіткі, діаметром 9,6 – 15,3 мкм. Екзина 1,5 – 1,7 мкм завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, однорідна по всій поверхні. Комірки різної форми, кутасті, округлокутасті, стінки тонкі.

СЕМ. Скульптура різносітчаста. Комірки великі і дрібні, зменшуються в напрямку до пор; різної форми: округлі, округлокутасті. Сітка рівномірно виражені по поверхні. Скульптура порових мембран зморшувата або дрібносітчаста.

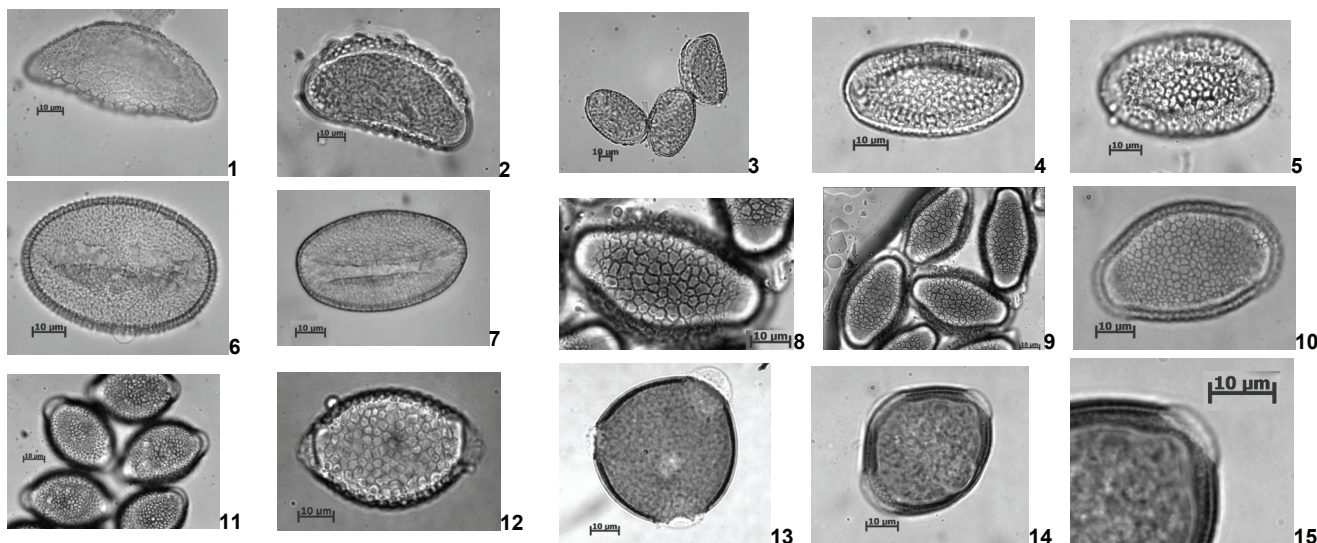


Рис.1. Пилкові зерна представників підродини Bromelioideae (СМ):

1 – *Billbergia brasiliensis*; 2, 3 – *B. pyramidalis* var. *concolor*; 4, 5 – *B. chlorosticta*; 6, 7 – *B. rosea*; 8, 9 – *Nidularium sheremetievii*; 10 – *Aechmea calyculata*; 11 – *Neoregelia carolinae*; 12 – *N. shultesiana*; 13 – *Aechmea bracteata*; 14, 15 – *Ae. miniata*

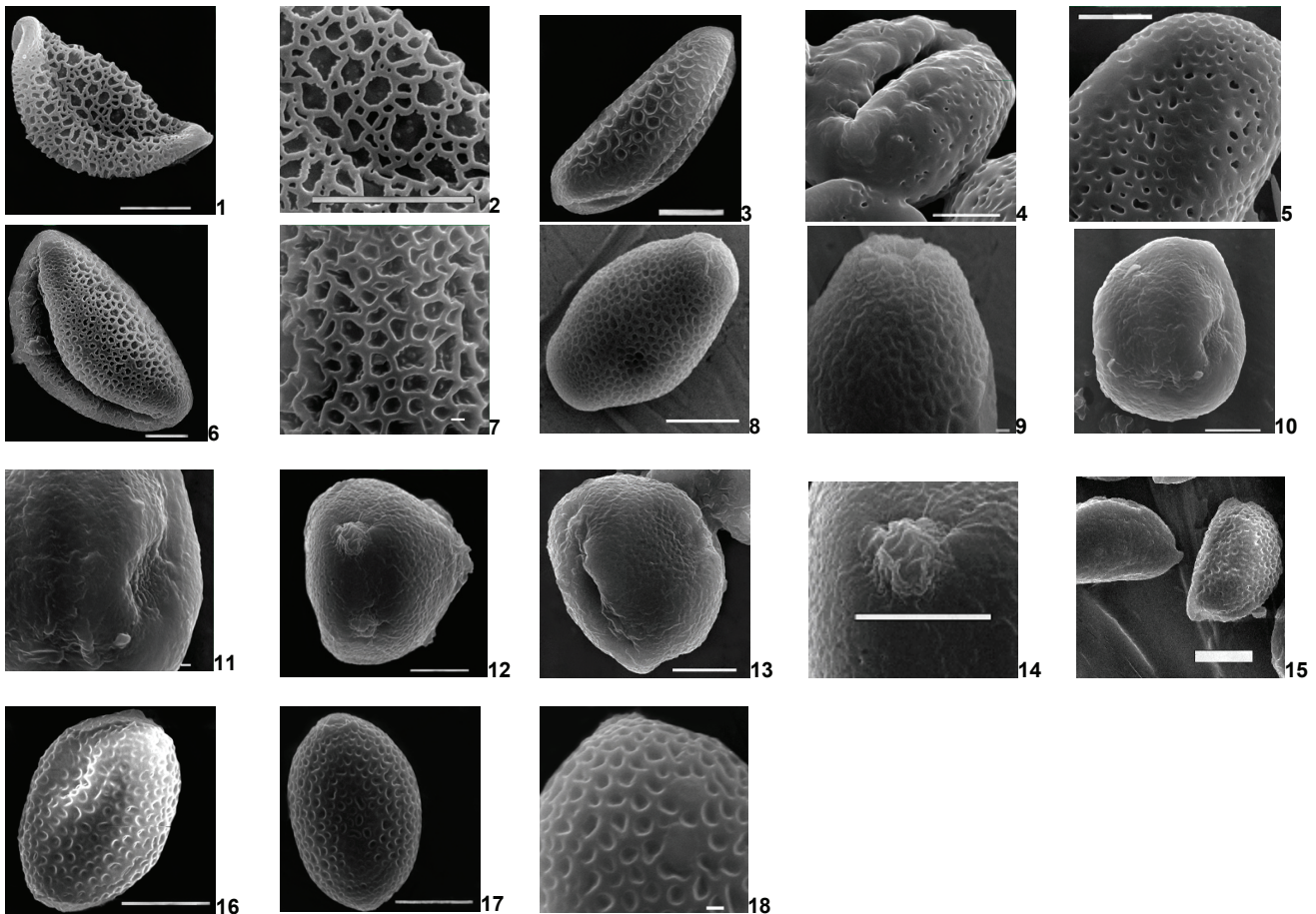


Рис.2. Пилкові зерна представників підродини Bromelioideae (СЕМ):
 1, 2 – *Billbergia brasiliensis* (x3000, x2000); 3 – *B. pyramidalis* var. *concolor* (x2400);
 4, 5 – *B. rosea* (x2400, x1800);
 6, 7 – *B. chlorosticta* (x1800, x5400); 8, 9 – *Aechmea calyculata* (x2600, x4800);
 10, 11 – *Ae. bracteata* (x2400, x4400);
 12, 13, 14 – *Ae. miniata* (x2600); 15, 16 – *Neoregelia carolinae* (x600, x3000);
 17, 18 – *N. shultesiana* (x3000, x6600)

Рід *Nidularium*

N. sheremetievii L.B.Smith (рис. 1, 8, 9)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні, дистально двопорові; еліпсоїдальної форми, в обрисі з полюса округлі, з екватора – еліптичні. Полярна вісь 41,9 – 49,1 мкм, екваторіальний діаметр 23,6 – 25,3 мкм. Пори чіткі, округлі, діаметром 9,2 – 12,3 мкм. Екзина 1,4 – 2,2 мкм завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, однорідна по всій поверхні. Комірки великі, кутасті. Біля пор скульптура гладенька.

СЕМ. Скульптура рівносітчаста, однорідна по всій поверхні, дещо згладжена біля пор. Комірки округлокутасті, майже однакового розміру. Краї пор чіткі, рівні, скульптура порових мембран гладенька або зморшувата.

Рід *Neoregelia*

N. carolinae (Beer) L.B.Smith (рис. 1, 11; рис. 2, 15, 16)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні, двопорові, еліпсоїдальної форми, в обрисі з полюса округлі, з екватора – еліптичні. Полярна вісь 30,9 – 34,5 мкм, екваторіальний діаметр 19,2 – 21,3 мкм. Пори округлі, чіткі, діаметром 7,9 – 9,9 мкм. Екзина 1,9 – 2,4 мкм завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, однорідна по всій поверхні. Комірки великі, округлі.

СЕМ. Скульптура ямчаста, перфорації округлі, майже однакового розміру, рівномірно розташовані по всій поверхні. Пори містяться на полюсах, мембрани пор

мають ямчасту та зморшувато-ямчасту скульптуру. На поверхні пилкового зерна помітні заглиблення.

N. shultesiana L.B.Smith (рис. 1, 12; рис. 2, 17, 18)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні двопорові, пори знаходяться на полюсах, еліпсоїдальної форми, в обрисі з полюса округлі, з екватора – еліптичні. Полярна вісь 42,1 – 50,6 мкм, екваторіальний діаметр 28,2 – 36,2 мкм. Пори округлі, чіткі, діаметром 9,6 – 11,2 мкм. Екзина 1,4 – 1,8 мкм завтовшки. Скульптура чітка, сітчаста, однорідна по всій поверхні. Комірки великі, округлі або округло-кутасті.

СЕМ. Скульптура ямчаста, перфорації чіткі, округлі, зменшуються в напрямку до пор. Пори не великі, опуклі. Скульптура мембрани пор зморшувата та зморшувато-ямчаста.

Базуючись на отриманих даних складено загальну паліноморфологічну характеристику досліджених видів. Пилкові зерна вивчених видів еліпсоїдальної або сфероїдальної форми; у полярному положенні еліптичні, округлі або округло-кутасті; в екваторіальному – еліптичні, округлі, зрідка плоско-випуклі. Для пилкових зерен представників родів *Billbergia*, *Nidularium* і *Neoregelia* характерна еліпсоїдальна форма, натомість представників роду *Aechmea* трапляються, як еліпсоїдальні так і сфероїдальної форми пилкові зерна.

У досліджених видів родів *Aechmea*, *Neoregelia*, *Nidularium* пилкові зерна переважно середнього розміру (30,9 – 52,7 мкм), у видів роду *Billbergia* – великі (54,6 – 88,6 мкм). Найбільші розміри серед досліджених видів характерні для пилкових зерен *B. brasiliensis*: полярна вісь становить 77,1 – 88,6 мкм, екваторіальний діаметр 36,4 – 41,6 мкм.

У дослідженій групі відзначена висока різноманітність апертур (борозен і пор): їх кількість, розміри і форма. Для видів роду *Billbergia* характерні довгі дистальні борозни з чіткими краями, вони розширюються (*B. rosea*, рис. 1, 7) або звужуються до загострених кінців (*B. brasiliensis*).

Переважаючими апертурами у досліджених видів є пори. Пори варіюють за кількістю і розташуванням. У п.з. видів роду *Neoregelia* та видів *Aechmea calyculata* і *Nidularium sheremetievii* виявлено дві дистальні пори, діаметром 7,9 – 15,3 мкм. При дослідженні під СМ порові мембрани гладенькі, під СЕМ встановлено, що вони можуть бути гладенькими, зморшкуватими або ямчастими. У решти видів роду *Aechmea* п.з. багатопорові. Пори рівномірно розташовані по всій поверхні пилкових зерен, їх кількість варіює в межах 4-5 (*Ae. bracteata*, *Ae. miniata*). Діаметр пор 8,3 – 15,1 мкм. Порові мембрани під СМ гладенькі (рис. 1, 15), при дослідженні під СЕМ – зморшкуваті та ямчасті у *Ae. bracteata* (рис. 2, 11) і зморшкувато-ямчасті у *Ae. miniata* (рис. 2, 14).

Екзина 1,2 – 3,1 мкм завтовшки. Найтовща екзина спостерігається у пилкових зерен представників роду *Billbergia* 1,7 – 3,1 мкм, для п.з. видів роду *Aechmea* екзина становить 1,2 – 2,8 мкм, для п.з. представників роду *Neoregelia* – 1,4 – 2,4 мкм і для п.з. роду *Nidularium* товщина екзини становить 1,4 – 2,2 мкм.

Встановлено, що діагностичними ознаками для п.з. роду *Billbergia* є еліпсоїдальна форма п.з. та дистальна борозна. В межах роду п.з. досліджених видів відрізняються елементами скульптури, зокрема, для видів *B. brasiliensis*, *B. chlorosticta*, *B. pyramidalis* var. *concolor* характерна різносітчаста скульптура п.з., комірки сітки дрібні та великі у *B. brasiliensis*, середні та великі у *B. pyramidalis* var. *concolor*, дрібні та середні у *B. chlorosticta*. У п.з. виду *B. rosea* скульптура варіює від ямчастої до дрібносітчастої. Борозни мембрани у видів *B. brasiliensis*, *B. chlorosticta*, *B. pyramidalis* var. *concolor* під СМ – гладенькі, з тязами екзини, під СЕМ – сітчасті, у виду *B. rosea* скульптура мембрани борозни під СМ – дрібносітчаста, під СЕМ – від ямчастої до дрібносітчастої.

Рід *Aechmea* виявився гетероморфним за типом апертур і скульптурою поверхні п.з. Два види – *Ae. bracteata* та *Ae. miniata* мають сфероїдальні пилкові зерна з чотирма, рідше п'ятьма порами. Для *Ae. miniata* характерні п.з. з дрібноямчастою скульптурою поверхні, а для *Ae. bracteata* – від зморшкуватої до зморшкувато-ямчастої. Для виду *Ae. calyculata* характерні еліпсоїдальні п.з. з дистальними порами і сітчастою скульптурою.

Для видів роду *Neoregelia* характерні еліпсоїдальні п.з. з дистальними порами. Скульптура п.з. ямчаста, перфорації чіткі, округлі, скульптура мембран пор – зморшкувато-ямчаста та ямчаста у *N. carolinae* та змо-

ршкувата і зморшкувато-ямчаста у *N. shultesiana*. У п.з. *N. carolinae* на поверхні помітні заглиблення.

Для представника роду *Nidularium* – *N. sheremetievii* характерні еліпсоїдальні п.з. з двома порами на полюсах і сітчастою скульптурою.

Нами виявлено, що деякі ознаки пилкових зерен можуть використовуватись як додаткові діагностичні ознаки для розмежування родів. Встановлено, що діагностичними ознаками родового і видового рівня є форма п.з., тип апертур та характер скульптури поверхні пилкових зерен. Дистально-одноборозні еліпсоїдальні пилкові зерна характерні для видів роду *Billbergia*, ці ознаки можна використовувати, як додаткові при визначенні роду.

Для частини представників роду *Aechmea*, а саме для видів *Ae. bracteata* та *Ae. miniata*, діагностичними є 4-5-порові сфероїдальні пилкові зерна зі зморшкувато-ямчастою та ямчастою скульптурою.

Пилкові зерна іншого представників роду *Aechmea* – *Ae. calyculata*, а також виду *Nidularium sheremetievii* та видів роду *Neoregelia* еліпсоїдальні і мають дистальні пори. Для п.з. видів *N. shultesiana* та *N. carolinae* діагностичною ознакою є ямчаста екзина. В той же час для видів *Aechmea calyculata* характерні п.з. з різносітчастою скульптурою, а для представника роду *Nidularium* (*N. sheremetievii*) – рівносітчаста, що разом з еліпсоїдальною формою і дистальними порами є діагностичними ознаками видового рівня. Подібність пилкових зерен родів *Aechmea*, *Neoregelia* і *Nidularium* можливо пояснюється спільним походженням родів і схожими умовами існування.

Висловлюємо подяку к.б.н. Цимбалюк З.М. та к.б.н. Коломієць Т.В. за надану допомогу при підготовці матеріалів для статті.

1. Куприянова Л.А., Алешина Л.А. Пыльца и споры растений флоры СССР: в 3 т. – Л.: 1972. – Т. 1. 2. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: 1988. 3. Токарев П. И. Морфология и ультраструктура пыльцевых зерен. – М.: 2002. 4. Эрдтман Г. Морфология пыльцы и систематика растений. – М.: 1956. 5. Baensch U. Blühende Bromelien – Nassau (Bahamas): 1994. 6. Benzing D. H. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. – Cambridge: 2000. 7. Halbritter H. Morphologie und systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae // Grana. – 1992 – Vol. 31, №3. – P. 197 – 212. 8. Halbritter H., Hesse M. Sulcus morphology in some monocot families // Grana. – Vol. 32, №2. – P. 87 – 99. 9. Horres R., Schulte K. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies // Aliso – 2007. – № 23. – P. 27 – 43. 10. Mez C. Bromeliaceae. – Leipzig: 1935. 11. Milocani E., Papini A., Brighigna L. Ultrastructural studies on bicellular pollen grains of *Tillandsia seleriana* Mez (Bromeliaceae), a neotropical epiphyte. // Caryologia. – 2006. – Vol. 59, №1. – P. 88 – 97. 12. Sass Ch., Specht Ch. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae) // Molecular phylogenetics and evolution. – 2010. – Vol. 55, №2. – P. 559 – 571. 13. Schulte K., Barfuss M., Zizka G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily // Molecular phylogenetics and evolution. – 2009. – Vol. 51, №2. – P. 327 – 329. 14. Smith L., Till W. Bromeliaceae. The families and genera of vascular plants. // Springer. – 1998 – vol. 4, P. 74–99. 15. www.paldata.org

Надійшла до редколегії 21.12.10

УДК 615.45:615.033

Є. Торгалло, канд. біол. наук,
Л. Остапченко, д-р біол. наук., проф.

ВПЛИВ РІЗНИХ ФОРМ КВЕРЦЕТИНУ НА ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНІЙ ПАТОЛОГІЇ (ГЕМОРАГІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ)

Серцево-судинні захворювання серед, яких значне місце посідають інсульти є одними з найнебезпечніших та найпоширеніших захворювань населення. Сьогодні відомо, що цереброваскулярні захворювання складають від 30% до 50% хвороб серцево-судинної системи. На кожні 100 млн. жителів припадає біля 500 тис. інсультів і церебральних судинних кризів. Тому питання профілактики та лікування судинних захворювань нервової системи мають не тільки медичне, а велике соціальне значення.

Cardiovascular diseases among which a significant element of strokes are among the most dangerous and most common diseases of the population. Today it is known that cerebrovascular disease is between 30% and 50% of diseases of the cardiovascular system. For every 100 million people accounts for about 500 thousand strokes and cerebral vascular crisis in the year. Therefore the prophylaxis and treatment of vascular diseases of the nervous system have not only medical but also of great social value.

Вступ. Інсульт – це гостре порушення кровообігу в мозку (крововилив). Найчастіше він проявляється при симптоматичній артеріальній гіпертензії, яка зумовлена атеросклерозом судин мозку, патологією нирок, захворюванням ендокринних органів, крові, при інтоксикації, васкулітах та ревматизмі. Інсульт – одне з найпоширеніших захворювань у людей середнього, а також похилого віку. Рівень смертності в економічно розвинених державах від порушень мозкового кровообігу стоїть на 3 місці, поступаючись лише онкологічним та та серцево-судинним захворюванням.

Факторами ризику розвитку цього захворювання є: порушення жирового обміну; ожиріння; гіпертонічна хвороба; куріння; брак фізичної активності; тривале нервово-психічне перенапруження; вік хворого; генетична схильність. Якщо поєднуються три і більше несприятливих чинника, схильність до даного захворювання підвищується.

Інсulti в залежності від характеру змін у головному мозку поділяють на 2 групи: ішемічні та геморагічні. Геморагічний – це крововилив в речовину мозку або ж під його оболонки. Найчастіше крововиливи починаються у зв'язку з розривом мозкової посудини, що обумовлено підвищенням артеріальним тиском. Ішемічний інсульт виникає в іншому випадку – у зв'язку з недостатнім приливом крові до різних ділянок головного мозку. Результатом являє звуження або ж повна закупорка судин. Часом ці два види інсультів з'являються в сукупності [1]

У профілактиці та лікуванні в після інсультному періоді використовують фармакологічні препарати, спрямовані на метаболічний захист мозку. Але більшість препаратів не досягають потрібної терапевтичної концентрації в зоні інсульту через погане проникнення активної субстанції в структури мозку [2]. Тому, поряд з традиційними засобами лікування (пірацетам, актовегін, солкосерил, церебролізін) останнім часом все більше уваги приділяється біофлавоноїдам, зокрема найбільш перспективним з них – кверцетину та ліпофлавонолу.

Однак біодоступність кверцетину до клітин мозку ускладнена у зв'язку з його нерозчинністю у водному середовищі, що виключає введення і спрямований

швидкий транспорт у зону ураження. Одним з перспективних напрямків усунення цих недоліків є створення спеціальних ліпосомальних лікарських систем, які за своїми біохімічними властивостями виявилися значно краще, ніж звичайні антиоксиданти [3]. У механізмі позитивної дії ліпосомального кверцетину відіграє значну роль сам фосфатидилхолін, який використовується в якості основи для формування ліпосом.

Метою даної роботи було вивчення процесів пероксидного окиснення ліпідів в умовах експериментального геморагічного інсульту, а також застосування різних лікарських форм кверцетину.

Методи і матеріали. У досліді використовували білих щурів-самців масою 180 ± 10 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію. Тварини були розділені на 4 групи. Перша група (30 щурів) – контроль, склали тварини, які містилися на стандартних умовах виварію. Друга група (30 щурів) – твариною відтворили геморагічний інсульт за модифікованим методом [8]. Третя група (30 щурів) – твариною відтворили геморагічний інсульт та вводили в дозі 10 мг / кг протягом 7-ми днів ліпосомальної форми кверцетину під робочою назвою "Ліпофлавоно", виробництва ЗАТ "Біолік" (Харків). Четверта група (30 щурів) – твариною відтворили геморагічний інсульт та вводили перорально в дозі 10 мг / кг протягом 7-ми днів субстанцію кверцетину, виробництва Борщагівського хіміко-фармацевтичного заводу (Київ). Тварин декапітованих на 7-му добу. Активність СОД визначали використовуючи метод [6]. Активність каталази в тканинах щурів визначали, як показано в роботі [5]. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики [7].

Результати та їх обговорення. Однією з ланок антиоксидантної системи є ферменти антиоксидантного захисту, зокрема, СОД і каталаза, які задіяні у знешкодженні таких активних форм кисню, як супероксид-аніон і перекис водню, відповідно. Як показники, що характеризують стан антиоксидантного захисту нами були обрані супероксиддисмутаза і каталаза (табл).

Активність антиоксидантних ферментів у різних органах при експериментальній моделі геморагічного інсульту в умовах введення різних форм кверцетину ($M \pm m$, $n=5$ на серію досліджень)

Активність супероксиддисмутази ум.од./ (мг білку * мин.)				
органи	контроль	інсульт		
		без введення препарату	Введення кверцетину	введення ліпофлавонолу
мозок	0,64±0,08	0,42±0,01*	0,68±0,05	0,81±0,06*
селезінка	0,39±0,06	0,30±0,05	0,51±0,01*	0,57±0,03*
нирки	0,15±0,02	0,10±0,01*	0,25±0,01*	0,28±0,03*
Активність каталази мкмоль пероксиду водню / (мг білку* мин)				
мозок	3,67±0,44	2,22±0,17*	4,72±0,21*	5,68±0,72*
селезінка	6,25±0,75	5,37±0,86	4,87±0,63*	5,99±0,31
нирки	3,83±0,56	2,85±0,58	3,92±0,47	3,34±0,51

* – $p \leq 0,05$ по відношенню до контролю

Аналіз експериментальних даних вказує на те, що у всіх досліджуваних органах при експериментальному геморагічному інсульті активність СОД і каталази в порівнянні з контрольними значеннями достовірно знижується. Отримані результати можуть свідчити про різке гальмування роботи антиоксидантного захисту при інсульті, що може бути наслідком безпосередньої інактивації антиоксидантних ферментів продуктами перекисного окиснення.

При використанні досліджуваних препаратів активність СОД змінюється. Так, при експериментальному інсульті на фоні введення препарату кверцетину активність ферменту підвищувалася в нирках майже в 2 рази і в селезінці – в 1,5 рази, відповідно. Активність каталази при введенні кверцетину підвищувалася в мозку, в селезінці активність знижувалася, а в нирках достовірно не відрізнялася від контрольних значень. При дослідженні дії ліпофлавонолу встановлено, що в порівнянні з контролем активність СОД зростала в мозку, нирках і селезінці. Активність каталази при введенні ліпофлавонолу істотно зростала в головному мозку, в нирках – знижувалася, а в селезінці не відрізнялася від контрольних значень.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що геморагічний інсульт супроводжується зниженням в досліджуваних органах щурів, особливо в тканинах головного мозку, активацією таких антиоксидантних ферментів, як СОД і каталаза. Введення препаратів з антиоксидантами властивостями (зокрема, кверцетину та ліпофлавонолу) призводить до нормалізації процесів ліпопероксидації та функціонування антиоксидантної системи, що підтверджується підвищенням активності СОД і каталази.

Висновки. Таким чином, в умовах геморагічного інсульту відбувається інтенсифікація процесів ПОЛ, про що свідчить встановлене нами підвищення вмісту продуктів ПОЛ і зниження активності ферментів.

Введення кверцетину та ліпофлавонолу приводить до нормалізації стану системи ПОЛ, а саме до зниження вмісту продуктів ПОЛ і активації антиоксидантного захисту.

1. Возіанов О.Ф. Смертність населення України: головні причини, шляхи подолання негативних тенденцій // Журнал Академії наук України. – 1996. № 2. – С. 191-198.
2. Жулев Н.М., Пустозеров В.Г., Жулев С.Н. Цереброваскулярные заболевания. Профилактика и лечение инсультов. СПб.: "Невский диалект", 2002. – 384 с.
3. Могурова Т.В., Лазарева Д.Н. Влияние лекарственных средств на свободно-радикальное окисление // Эксперим. и клин. фармакология. – 2000, – т.63, №1, – С.71-75.
4. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Пероксидное окисление и радиация. – К.: Наук. думка, 1991. – 256 с.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.И. Метод определения активности каталазы // Лаб. Дело. – 1988. – № 1. – С. 16-17.
6. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. // Вопросы мед. химии. – 1999. – № 3. – С. 1-2.
7. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений. – М.: Мир, 1975. – 312 с.
8. Ярош О.К., Кириченко С.В., Данилов М.М. Метод відтворення інтрацеребральної геморагії у білих щурів. // Журн. Кровообіг та гомеостаз. 2005. №1. С.77-81.
9. Li J.X., Xue B., Chai Q., Liu Z.X., Zhao A.P., Chen L.B. Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of Astragalus complanatus in hypertensive rats // Chin. J Physiol. – 2005. – Vol. 30, № 48. – P. 101-6.
10. Rajendran M., Manisankar P., Gandhidasan R., Murugesan R. Free radicals scavenging efficiency of few naturally occurring flavonoids: a comparative study // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 24. – P. 7389-94.

Надійшла до редколегії 20.01.11

Наукове видання



ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
БІОЛОГІЯ

Випуск 57

Друкується за авторською редакцією

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та дискети не повертаються.



Підписано до друку 18.11.06. Формат 60x84^{1/8}. Вид. № 165. Гарнітура Arial. Папір офсетний.
Друк офсетний. Наклад 300. Ум. друк. арк. 7,6. Обл.-вид. арк. 9,63. Зам. № 23-1397.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43,
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; (38044) 239 31 58; факс (38044) 239 31 28
E-mail: vydav_polygraph@univ.kiev.ua
WWW: <http://vpc.univ.kiev.ua>