

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводяться науковцями ННЦ "Інститут біології" 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 та студентів.

Подано експериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украина, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии" в области физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные биохимических и биофизических основ регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of Biology" 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 РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф. Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д. Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); І. Г. Емельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р біол. наук, проф.; В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології" ☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 09.04.15 (протокол № 9)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". 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
Журнал входить до наукометричних баз / Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,23), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.); E-Library.ru

ЗМІСТ

Мусієнко М., Остапченко Л., Таран Н., Бацманова Л., Стороженко В. Київський державний університет – Київський державний університет імені Т.Г. Шевченка: становлення і розвиток біологічної освіти і науки (1933–1945)	5
Сторожук О., Руденко О., Білюк А., Гарманчук Л.В. Гамма-глутамінотранспептидазна активність в трансформованих клітинах за впливу на рецептор епідермального фактора росту	14
Карпюк Т., Безусько Л., Безусько А. Палеохорологія <i>SELAGINELLA SELAGINOIDES</i> (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK та <i>DIPHASIASTRUM ALPINUM</i> (L.) HOLUB на рівнинній Україні в пізньому дріасі	16
Гладун Д., Чорненька Н., Ракша Н., Остапчук С. Отримання фракції трипсиноподібних ферментів з антарктичних морських організмів	19
Ковтун-Водяницька С., Вергун О. Антиоксидантні властивості надземної частини інтродуцентів роду (<i>SCHRAD. EX BENTH.</i>) <i>SPACH</i>	22
Малина А., Корнелюк О. Взаємодія протипухлинного цитокіна ЕМАР II з гідроксипропіл-В-циклодекстрином	25
Бурлова-Васильєва М., Вовк Т., Кравченко Н., Савчук О., Мельник В. Критерії ендогенної інтоксикації за умов атеротромботичного ішемічного інсульту та кардіоемболічного ішемічного інсульту	29
Цимбал Д., Мінченко Д., Кривдюк І., Мінченко О. Експресія генів <i>ATF3</i> , <i>FOXF1</i> та <i>CENPU</i> у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 за умов дефіциту глутаміну і глюкози	32
Ніколаєнко Т., Петрук Н., Шелест Д., Гарманчук Л. Вплив VEGF, EGF та їх антагоністів на проліферативну активність і споживання глюкози ендотеліальними клітинами	36
Одукалець І., Мусієнко М., Ольхович О. Дослідження причин всихання <i>Pinus sylvestris</i> L. в штучних соснових насадженнях НПП "Подільські Товтри"	38
Чован О., Серебряков В., Давиденко І. Розселення лебедя-шипуна (<i>CYGNUS OLOR</i> GMELIN, 1789) у південній частині лівобережного лісостепу України	43
Шупова Т. Адаптація птахів ряду голубоподібних (<i>COLUMBIFORMES</i>) до трансформації середовища існування	46
Яковлєв Є., Харченко В. Методи вивчення ентомопатогенних нематод	51
Шекк П. Характеристика стану іхтіофауни і перспективи рибогосподарського використання Тілігульського лиману	54
Харченко О. Вміст трипсиноподібних ферментів і молекул середньої маси плазми крові як потенційні маркери хронічної алкогольної інтоксикації	61
Богдановська Н., Голубенко А. Розвиток оксидативного стресу в умовах фізичних навантажень високої інтенсивності	64
Горпинченко М., Атраментова Л. Популяційно-генетичні характеристики населення України, отримані з використанням прізвищ	68
Драницина А., Дворченко К., Моргаєнко О., Остапченко Л. Експресія гена <i>Tlr2</i> в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії шлунка та при введенні мультипробіотика Симбітер	72
Храновська Н., Скачкова О., Горбач О., Потебня Г., Сидор Р. Фенотипові та функціональні властивості генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами <i>B. subtilis B-7025</i>	76
Штапенко О., Мадіч А. Вітрифікація ембріонів мишей на стадії пронуклеусів при використанні різних кріопротекторів та їх здатність до подальшого розвитку на культурі клітин яйцепроводів до бластоцисти	79
Шаяхметова Г. Порушення антенального та постнатального розвитку нащадків щурів-самців лінії Вістар, тривало споживаного алкоголю	82

СОДЕРЖАНИЕ

Мусяненко Н., Остапченко Л., Таран Н., Бацманова Л., Стороженко В. Киевский государственный университет – Киевский государственный университет имени Т.Г. Шевченко: становление и развитие биологического образования и науки (1933–1945)	5
Сторожук О., Руденко О., Билюк А., Гарманчук Л. Гамма-глутаминтранспептидазная активность в трансформированных клетках при воздействии на рецептор эпидермального фактора роста	14
Карпюк Т., Безусько Л., Безусько А. Палеохорология <i>SELAGINELLA SELAGINOIDES</i> (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK и <i>DIPHASIASTRUM ALPINUM</i> (L.) HOLUB на равнинной Украине в позднем дриасе	16
Гладун Д., Чорненька Н., Ракша Н., Остапчук С. Получение фракции трипсиноподобных ферментов из антарктических морских организмов	19
Ковтун-Водяницкая С., Вергун Е. Антиоксидантные свойства надземной части интродуцентов рода <i>ISODON</i> (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH.....	22
Малина А., Корнелюк А. Взаимодействие противоопухолевого цитокина ЕМАР II с кардиоксипропил-β-циклодекстрином	25
Бурлова-Васильева М., Вовк Т., Кравченко Н., Савчук А., Мельник В. Критерии эндогенной интоксикации при атеротромботическом ишемическом инсульте и кардиоэмболическом ишемическом инсульте.....	29
Цимбал Д., Минченко Д., Кривдюк И., Минченко А. Экспрессия генов <i>ATF3</i> , <i>FOXF1</i> и <i>CENPU</i> в клетках глиомы линии U87 с угнетенной функцией сигнального фермента ERN1 при дефиците глутамин и глюкозы	32
Николаенко Т., Петрук Н., Шелест Д., Гарманчук Л. Влияние VEGF, EGF и их антагонистов на пролиферативную активность и потребление глюкозы эндотелиальными клетками	36
Одукалец И., Мусяненко Н., Ольхович О. Исследование причин усыхания <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L. в искусственных сосновых насаждениях НПП "ПОДОЛЬСКИЕ ТОВТРИ"	38
Чован А., Серебряков В., Давиденко И. Расселение лебедя-шипуна (<i>CYGNUS OLOR</i> GMELIN, 1789) в южной части левобережной лесостепи Украины	43
Шупова Т. Адаптация птиц отряда голубеобразных (columbiformes) к трансформации среды обитания	46
Яковлев Е., Харченко В. Методы изучения энтомопатогенных нематод.....	51
Шекк П. Характеристика состояния ихтиофауны и перспективы рыбохозяйственного использования Тилигульского лимана	54
Харченко О. Содержание трипсиноподобных ферментов и молекул средней массы плазмы крови как потенциальные маркеры хронической алкогольной интоксикации	61
Богдановская Н., Голубенко А. Развитие оксидативного стресса в условиях физических нагрузок высокой интенсивности	64
Горпинченко М., Атраментова Л. Популяционно-генетические характеристики населения Украины, полученные с использованием фамилий	68
Драницина А., Дворченко Е., Моргаенко А., Остапченко Л. Экспрессия гена <i>Tlr2</i> в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки крыс при длительной желудочной гипохлоргидрии и при введении мультипробиотика Симбитер	72
Храновская Н., Скачкова О., Свергун Н., Горбач О., Потебня Г., Сидор Р. Фенотипические и функциональные свойства генерируемых дендритных клеток человека после обработки цитотоксическими лектинами <i>B. subtilis</i> B-7025.....	76
Штапенко О., Мадич А. Витрификация эмбрионов мышей на стадии пронуклеусов при использовании различных криопротекторов и их способность к дальнейшего развития на культуре клеток яйцепроводов к бластоцисты	79
Шаяхметова А. Нарушение антенатального и постнатального развития потомства крыс-самцов линии Вистар, длительно потреблявших алкоголь	82

CONTENTS

Musienko M., Ostapchenko L., Taran N., Batsmanova L., Storozhenko V. From Kiev state university to Taras Shevchenko state university of Kiev – the formation and development of biological education and science (1933–1945)	5
Storozhuk O., Rudenko O., Bilyuk A., Garmanchuk L. Gamma-glutamyltranspeptidase activity in transformed cells effected on epidermal growth factor receptor	14
Karpiuk T., Bezusko L., Bezusko A. Paleoecological studies of <i>SELAGINELLA SELAGINOIDES</i> (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK and <i>DIPHASIASTRUM ALPINUM</i> (L.) HOLUB in the younger dryans within plain part of Ukraine	16
Gladun D., Chornenko N., Raksha N., Ostapchuk S. Derivation of trypsin-like enzymes from Antarctic marine organisms	19
Kovtun-Vodyanitska S., Vergun O. The antioxidant properties of the above-ground parts introduct of the genus <i>ISODON</i> (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH	22
Malya A., Kornelyuk O. Interaction of antitumor cytokine EMAR II with hydroxypropyl- β -cyclodextrin	25
Burlova-Vasylieva M., Vovk T., Kravchenko N., Savchuk O., Melnyk V. Criteria of endogenous intoxication in patients with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke	29
Tsymbal D., Minchenko D., Kryvdiuk I., Minchenko O. Expression of <i>ATF3</i> , <i>FOXF1</i> and <i>CENPU</i> genes in U87 glioma cells with suppressed function of ERN1 signaling enzyme upon glutamine and glucose deprivation	32
Nikolaenko T., Petruk N., Shelest D., Garmanchuk L. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells	36
Odukalets I., Musyenko N., Olkhovich A. Research the causes of <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L. shrinking in artificial pine plantings of the NNP "PODILSKI TOVTRY"	38
Chovan O., Serebryakov V., Davydenko I. Settling mute swan (<i>CYGNUS OLOR</i> GMELIN, 1789) in south part of the left-bank forest-steppe zone of Ukraine	43
Shupova T. Adaptation of the birds the order (<i>COLUMBI FORMES</i>) to the transformation of habitat	46
Yakovlev Ye., Kharchenko V. Standard methods for entomopathogenic nematodes research	51
Shekk P. Status and prospects ichthyofauna use of fishery Tiligul estuary	54
Kharchenko O. Content of blood plasma trypsin-like enzymes and molecules of average mass as potential markers of the chronic alcoholic intoxication	61
Bogdanovskaya N., Golubenko A. Development oxidative stress in terms physical activity peak intensity	64
Gorpyuchenko M., Atramentova L. Population genetic characteristics of the population of Ukraine obtained with the use of surnames	68
Dranitsina A., Dvorchshenko K., Morgaienko O., Ostapchenko L. Expression of <i>Tlr2</i> gene in rat duodenal upon long-term gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic Symbiter	72
Khranovska N., Skachkova O., Svergun N., Gorbach O., Potebnya G., Sydor R. The phenotypic and functional properties of the generated human dendritic cells after treatment with cytotoxic lectins <i>B. subtilis</i> B-7025	76
Shtapenko O., Madich A. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos using different cryoprotectants and their subsequent development in vitro with or without oviduct epithelial cells to the blastocyst stage	79
Shayakhmetova G. Disorders of antenatal and postnatal development in long-term alcohol exposed male wistar rats' offspring	82

УДК 94(477)(03)+(092)

М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., акад. НААН України,
Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф.,
Н. Таран, д-р біол. наук, проф., Л. Бацманова, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.,
В. Стороженко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

КИЇВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ – КИЇВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ Т.Г.ШЕВЧЕНКА: СТАНОВЛЕННЯ І РОЗВИТОК БІОЛОГІЧНОЇ ОСВІТИ І НАУКИ (1933–1945)

Наведено історичний нарис розвитку біологічної освіти і науки у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка за період з 1933 до 1945 року.

Ключові слова: біологічна наука, освіта, історія.

Багатобарвне і змістовне минуле та сучасне нашої Alma mater – Київського національного університету імені Тараса Шевченка. За 180 років існування кращі його вихованці зробили безцінний внесок у справу розвитку не лише вітчизняної, а й світової науки та культури. Університет пишається тим, що в ньому здобули освіту представники біологічної науки В.А. Бец (1834–1894), О.М. Бах (1857–1946), Д.К.Заболотний (1866–1929), О.В.Топачевський (1897–1975), І.І.Шмальгаузен (1884–1963), М.Г. Холодний (1882–1953), Д.К.Зеров (1895–1971), Ф.Г.Добжанський (1900–1975) та багато інших вчених, які вписали золоті сторінки в його історію і є гордістю української науки.

У попередній статті [1] нами здійснено аналіз становлення і розвитку біологічної науки за перші 100 років існування нашої Alma mater. Як відомо, весна 1920 р. була останньою в історії університету Святого Володимира. Більшовики ліквідували всі університети на теренах України. За розпорядженням Наркомосвіти УРСР № 38 від 23 липня 1920р. на базі університету, ліквідованого цим же розпорядженням, було створено Вищий інститут народної освіти ім. Драгоманова (ВІНО), який з 1926 р. також називався Київський інститут народної освіти (КІНО). В ньому функціонував шкільний факультет, що мав відділ природничих наук з підвідділом органічної природи та циклами: ботанічним, зоологічним та антропологічним [2].

У радянський час після ліквідації Київського університету до складу створеного натомість Київського інституту народної освіти ввійшли і кафедри біологічного профілю. Незважаючи на майже п'ятнадцятирічні "КІНО-поневіряння", всі вони вижили і дочекалися часів, коли 1933 р. радянська влада змушена була відновити Київський університет.

Слід нагадати, що в поліпшенні якості роботи вищої школи в тодішній УРСР вагомю стала Постанова ЦВК СРСР від 19 вересня 1932 р. та РНК СРСР від 11 жовтня 1932 р. "Про учбові програми і режим у вищій школі і технікумах". Для її виконання було розпочато роботу щодо підвищення рівня теоретичної і практичної фахової підготовки випускників вузів. Та найважливішим був той факт, що Постанова передбачала відтворення університетів в Україні.

Згідно з даною Постановою колегія Наркомосвіти УРСР ухвалила з вересня 1933 року відкрити в Києві на базі Інституту професійної освіти та Фізико-хіміко-

математичного інституту Київський державний університет в складі 6 факультетів, серед яких був і біологічний (природничий). У складі відновленого Університету був Ботанічний сад і Зоомузей, які посіли почесне місце серед підрозділів новоутвореного біологічного факультету, деканами якого в різні роки довоєнного періоду працювали Г.І.Шпет, В.В.Фінн, В.І.Соколовський, а з 1944 року О.В.Топачевський [3].

Живучи в постійних злиднях, переслідуваний та репресований за абсурдними звинуваченнями, професорсько-викладацький склад Університету зумів за короткий час відновити університетську освіту. У 1934 р. Київський державний університет відзначив свій 100-річний ювілей. На той момент було відновлено його структуру, розпочато активну наукову та педагогічну діяльність. У 1935 р. університет започаткував серійне видання Наукових записок із природничих та гуманітарних наук, зокрема біологічних. З відкриттям університету відбувається структурна реорганізація існуючих кафедр біологічного профілю. Так, кафедра морфології і систематики була розділена на кафедру морфології і систематики квіткових рослин (В.В.Фінн) та кафедру систематики і морфології спорових рослин (Д.К.Зеров), які згодом мали назву кафедри вищих рослин і нижчих рослин відповідно (рис.1) [4]. З цих пір і до 1985 року, коли знову відбулося їх об'єднання, вивчення та викладання ботаніки вищих і нижчих рослин проводилось на різних кафедрах. На кафедрі морфології і систематики квіткових рослин різні курси викладали професори В.І. Соколовський, І.С. Симоненко, В.П. Шидловський, Л.Д. Зафійовська. Саме завідувач цієї кафедри В.В.Фінн у 1935 р. був призначений деканом біологічного факультету.

Кафедра мала найтісніші наукові зв'язки з ботанічним садом, який знову був переданий університету (його очолив відомий дендролог М.В.Дубовик) і став виробничою базою біологічного факультету. Зважаючи на величезний внесок академіка О.В. Фоміна в розвиток ботанічної науки та збереження і поповнення рослинних фондів, Ботанічному саду в 1935 р. було присвоєно ім'я цього визначного вченого. Слід зауважити, що саме О.В. Фомін (рис. 1) був засновником журналу "Вісник Київського ботанічного саду". Зусиллями кількох поколінь ботаніків в ньому зібрана унікальна колекція рослин різного географічного походження, яка тепер налічує понад 8000 видів, різновидностей, форм та сортів, у тому числі близько 4000 тропічних і субтропічних рослин.



Рис. 1. Видатні ботаніки Київського університету (1933–1945)

Д.К.Зеров – відомий систематик спорових рослин, флорист, болотознавець, палеоботанік очолював кафедру нижчих рослин впродовж 1933-1957рр. (рис. 1) [5]. Як фітоценолог, флорогенетик, бріолог, він також вивчав флору різних регіонів України, займався проблемами походження рослинного світу, зокрема питаннями філогенії нижчих рослин. Значний вклад Д.К. Зерова у вивчення флори сфагнових і печіночних мохів. Він вивчав ареали, екологію, мінливість їх видів, також розробив стратиграфію і класифікацію боліт. Він також вперше запропонував схему поділу голоцену на ранній, середній і пізній, а також дав характеристику клімату і рослинності кожного з цих періодів [6]. Як завідувач кафедри він зумів зібрати ціле сузір'я видатних вчених. З її роботою тісно пов'язані імена таких яскравих і добре відомих своїми науковими працями особистостей, як: О.В.Топачевський – видатний альголог (рис. 1); А. М. Окснер – ліхенолог зі світовим визнанням; С.Ф. Морочковський – видатний міколог та фітопатолог; член-кореспондент АН УРСР В.П.Муравйов – фітопатолог. Мікологи кафедри зробили вагомий внесок у вивчення збудників та засобів боротьби з хворобами цукрових буряків. Якраз С.Ф.Морочковський з 1938 року очолював наукові дослідження мікофлори України [7].

На основі унікальних дореволюційних колекцій ботанічного кабінету університету в 1934 р. було відкрито ботанічний музей. Ініціатором відновлення і відкриття музею на факультеті був академік Д.К.Зеров, який і керував ним до 1954 р. В музеї було розгорнуто експозицію, яка виконувала функцію ілюстрованого доповнення до лекційних курсів з еволюції, систематики, екології рослин, фітогеографії. Основний фонд складається з гербаріїв: систематичного (38600 гербарних аркушів – налічує 3065 видів, 1170 родів і 148 родин за системою Енглера), флористичних областей та демонстраційного, а також 2000 натурних експонатів вищих і нижчих рослин, препаратів, інструментарію, тощо. Наявні матеріали використано в експозиції за розділами: еволюція та система рослинного світу, рослинність окремих ботаніко-географічних зон, досягнення сучасної селекційної науки, історія ботаніки в Київському університеті, охорона природи. З метою покращання експозиції музею здійснювалися наукові експедиції по Україні, на Кавказ, Алтай, у Середню Азію, Прибалтику. На жаль, в 1971 р. музей став підрозділом ботанічного саду. Унікальна експозиція Ботанічного музею демонтована, частково розподілена як навчальні колекції по кафедрах біологічного факультету та вже багато років чекає на будівництво нового окремого корпусу для музею на території Ботанічного саду університету.

Ще наприкінці 1920 р. було створено дві кафедри зоології – хребтних і безхребтних тварин, які продовжили свою роботу у відновленому університеті. Весь цей час кафедру зоології хребтних очолював видатний вчений – академік АН УРСР (1922), академік АН СРСР (1935) І.І.Шмальгаузен (1884-1963) (рис. 2). Основний напрямок його наукових досліджень – еволюційна морфологія, філогенія тварин та експериментальна зоологія. З 1936 р. завідувачем кафедри став М.М. Воскобойніков (1873-1942), який продовжив дослідження проблем морфології та порівняльної анатомії хребтних (рис. 2) [8-12].

В 1935р. Д.Є.Белінг (1882-1949) заснував кафедру гідробіології, а кафедру зоології безхребтних впродовж 1935-36 років очолював видатний ентомолог О.Г. Лебедев (1844-1936). Саме на цій кафедрі М.М. Левітт (заарештований і замордований в сталінських таборах в 1936р.) першим в Україні читав курс екології. Слід відмітити, що саме Д.Є.Белінг запровадив читання нормативних і спецкурсів українською мовою (рис. 2). З 1936 року кафедру зоології та порівняльної анатомії хребтних очолює М.М.Воскобойніков – засновник нового в зоології напрямку – функціональної морфології (рис. 2). Він викладав в університеті без перерви впродовж 40 років (1903-1942 рр.).

Кафедру зоології безхребтних з 1936 року очолює О.П.Маркевич (1905-1996) (рис. 2). У 1935 р. О.П. Маркевич на запрошення професора І. І. Шмальгаузена зайняв посаду керівника Секції морфології безхребтних тварин, що була створена в Інституті зоології та біології ВУАН. У цьому ж році О.П. Маркевич був запрошений в Київський державний університет імені Т. Г. Шевченка, а з серпня 1936 р. почав завідувати кафедрою зоології безхребтних [13]. Так розпочалася плідна діяльність О.П. Маркевича в Інституті зоології АН УРСР і в Київському державному університеті одночасно. В 1935 р. за його ініціативою створена секція паразитології, яка в 1937 р. разом з секцією морфології безхребтних тварин Інституту зоології АН УРСР увійшла до складу новоствореного відділу паразитології, який очолює О.П.Маркевич. Професором О.П. Маркевичем і його учнями та послідовниками детально вивчена фауна паразитів риб Української РСР, розроблені заходи щодо боротьби з хворобами риб. Багато уваги О.П. Маркевич і його учні приділили дослідженню систематики, морфології і екології паразитів риб, їх поширенню, залежності від умов зовнішнього середовища і фізіологічного стану їх хазяїв. Більшість описаних видів паразитів виявилися новими для науки, а деякі були відмічені вперше як для України, так і всього Радянського Союзу.



Рис. 2. Видатні зоологи Київського університету (1933–1945)

З початком війни в 1941 р. вчений разом з інститутом був евакуйований до Уфи, де працював на Башкирській науково-дослідній ветеринарній станції.

У 1944 р. співробітники Академії наук повертаються до Києва. Все подальше життя і діяльність Олександра Прокоповича були пов'язані з Інститутом зоології та Київським університетом ім. Тараса Шевченка. Багато років він читав курс загальної біології, паразитології, філогенії тварин, порівняльної анатомії безхребетних тощо [14].

Кафедра фізіології рослин та мікробіології, яка існувала в КІНО, після відновлення університету була розділена на кафедру фізіології рослин та кафедру мікробіології. Відновлення університету М.Г.Холодний розглядав як початок нового етапу в історії розвитку славетного вузу, якому в цілому ним було віддано 35 найкращих років власного життя (рис. 3) [15].

М.Г.Холодний став завідувати новоствореною кафедрою мікробіології, в якій було широко розгорнуто вивчення ґрунтової мікрофлори. Нею він керував до початку Великої вітчизняної війни. В мікробіологічній лабораторії Київського університету М.Г.Холодний розпочав серію досліджень з метою вивчення значення в природі летких органічних речовин атмосфери. Це був зовсім новий напрямок його наукових інтересів. Він не залишав його до останніх днів свого життя. В останні роки перед Великою Вітчизняною війною багато уваги М.Г.Холодний приділяє мікробіологічним дослідженням в прекрасно обладнаній ним мікробіологічній лабораторії університету та Інституті мікробіології АН УРСР, зокрема щодо особливостей повітряного (поглинання із атмосферного повітря органічних та неорганічних сполук) живлення мікроорганізмів. Він розробив нові методи дослідження мікроорганізмів, вивчав питання походження життя на Землі. Серед учнів М.Г.Холодного слід відзначити В.С.Рождественського, М.В.Стадніченка, Б.Й. Казана, які досліджували різні проблеми промислової мікробіології: ослизнення хліба, епіфітну мікрофлору зерна, ацетоно-бутилове бродиння. В.С. Рождественський був автором "Атласу бактерій", виданого у 1940 році.

В галузі фізіології рослин ці роки були присвячені підведенню підсумків роботи М.Г.Холодного по фіто-

рмонології. Завідувач кафедри мікробіології академік М.Г.Холодний останній рік війни провів у Сочі, тут зустрів день Перемоги, а 10 червня 1945 року виїхав до Москви на сесію АН СРСР і звідти до Києва.

Він побачив зруйнований Київ, спалений пограбований університет, зруйновані власні лабораторні приміщення, вияснив, що роки війни знищили майже все те, на що було витрачено кращі роки творчого життя в рідному університеті. Розпочинати все з початку, вести роботу в непристосованих приміщеннях, без допомоги загиблого свого вірного друга і помічника В.С. Рождественського вже не було сил. З боєм у серці М.Г.Холодний відмовляється від завідування кафедрою мікробіології та викладацької роботи в університеті, з яким його пов'язувало понад 40 років життя спочатку як студента, а потім викладача, професора, завідувача кафедрою. Попереду були і нові творчі успіхи, або як він згадує *"три мирні роки післявоєнного життя", і "нелегкі роки випробувань моральної стійкості, сили духу, впевненості в своїх наукових переконаннях"* [16].

Кафедру фізіології та анатомії рослин у відновленому університеті очолив професор О.М. Льовшин (1875–1946). Під його керівництвом в цей період продовжувались ще розпочаті М.Г.Холодним фізіолого-анатомічні дослідження рослин у зв'язку з їх екологічними особливостями (М.Н.Мойсєєва, Н.І.Вакуленко та інші). Ще в 1935 р. О.М.Льовшин розробив нову гіпотезу фотосинтезу щодо ролі води, вуглекислого газу та мінеральних речовин ґрунту в синтезі фотоасимілятів. М.Н. Мойсєєвою було вперше встановлено відповідність закону Заленського для хвойних рослин та висвітлено фітогормональну роль зелених пластид стебла трав'янистих рослин. Н.І.Вакуленко було розроблено низку методів польових фізіологічних досліджень щодо визначення ефірних олій, концентрації клітинного соку у рослин, водозатримуючої здатності листків в зв'язку з їх анатомічною будовою. Подальший розвиток фізіології рослин, перерваний війною, було відновлено лише в 1944 році, коли кафедру очолив професор Д.П.Проценко (рис. 3) [17].



Рис. 3. Видатні фітофізіологи Київського університету (1933–1945)

В період реформування вищої освіти в УРСР кафедра фізіології людини, очолювана В.В. Радзимовською, функціонувала у ВІНО на факультеті профосвіти. З 1933 року кафедру очолив А.І.Ємченко (1893-1964), який з 1921 року працював на різних посадах на цій кафедрі (рис. 4) [18]. Оскільки стара фізіологічна лабораторія університету на чолі з академіком В.Ю.Чаговцем в ході його реорганізації перейшла до медінституту, А.І.Ємченко довелося створювати нову фізіологічну лабораторію з нуля. Також ним було підготовлено і видано українською мовою тритомний посібник "Лабораторна фізіологічна хімія". За цю працю та експериментальні дослідження йому було присвоєно вчене звання професора (1934). На той час вчені кафедри вели дослідження за такими основними напрямками: фізіологія серцевого м'яза, дослідження його фізико-хімічних властивостей; фізіологія слинних залоз і травної системи

взагалі. В 1940 році А.І.Ємченко захистив докторську дисертацію на тему "Діяльність слинних залоз". Після відновлення університету він очолював кафедру наступні 30 років. В передвоєнний час на кафедру прийшли майбутні корифеї в галузі фізіології людини П.Г.Богач та П.Д.Харченко. В 1939 році на кафедрі розпочав роботу на посаді лаборанта П.Г.Богач, який за дорученням професора А.І.Ємченка досліджував хімічні складові слини при рефлексорному слиновиділенні. П.Д. Харченка після закінчення Київського університету 1936 р. було рекомендовано для навчання в аспірантурі. Він продовжив дослідження А.І.Ємченка про зміни діяльності серця під впливом різних іонів, характеру їхнього впливу на ритм та амплітуду скорочень шлуночків і передсердь, детально проаналізував явище контрактури серця. Та через війну свою кандидатську дисертацію "Вплив електrolітів на серце" він захистив уже в 1947 р. [19].



В.В. Радзимовська
(1886–1953)



А.І. Ємченко
(1893–1964)



П.Д. Харченко
(1910–1973)



П.Г. Богач
(1918–1981)

Рис. 4. Видатні фізіологи Київського університету (1933–1945)

Вже на початок 30-х років все більшого значення серед біологічних наук набувала біохімія, тому постало питання про підготовку кваліфікованих кадрів за даним фахом в Київському університеті на новоствореній кафедрі біохімії.

Кафедра біохімії біологічного факультету була заснована в 1934 році Президентом Академії Наук України академіком Олександром Володимировичем Палладіним (1885-1972), вченим зі світовим ім'ям, видатним біохіміком і організатором науки на Україні, директором Інституту біохімії АН УРСР, О. В. Палладін – засновник ряду актуальних наукових напрямків, що стали основою сучасної біохімії і молекулярної біології, теоретичної і практичної медицини. Серед них біохімія нервової діяльності (нейрохімія), м'язової діяльності, харчування, зокрема біохімія вітамінів, гіпо- та авітамінозних станів, порівняльна та еволюційна біохімія (рис. 5). Ці напрямки, що склали базис функціональної біохімії, упродовж десятиріч успішно розроблялися і розробляються учнями та послідовниками О. В. Палладіна в Україні і в інших державах. Не дивлячись на надмірну завантаженість в Академії наук, він багато сил віддавав створен-

ню матеріальної бази, організації навчальної та наукової роботи на новоствореній кафедрі. О.В.Палладін не лише очолив кафедру, а й особисто читав нормативний курс з біохімії та спецкурс з біохімії м'язів.

Ще у 1924 р. було видано перший в СРСР "Підручник фізіологічної хімії" О. В. Палладіна, що протягом 30 років був єдиним і який витримав 25 видань дев'ятьма мовами. Під його керівництвом на кафедрі розгортаються дослідження з біохімії головного мозку, обміну речовин в м'язах, вітамінів. Для викладання різного профілю найновітніших на той час спецкурсів О.В. Палладін запросив висококваліфікованих фахівців, які були запрошені викладачами для роботи на кафедрі на посадах професорів та доцентів – Б.І.Гольдштейн (ферментологія) В.В.Ковальський (порівняльна біохімія), А.М.Утевський (ендокринологія), С.Є.Епельбаум (біохімія харчування), А.С.Оканенко (біохімія рослин). Саме в такому складі кафедра забезпечила перший випуск висококваліфікованих кадрів біохіміків для України (рис. 6). З 1944 року посаду професора кафедри зайняв Д.Л.Фердман (рис. 5).



О.В. Палладін
(1885-1972)



Д.Л. Фердман
(1903-1970)

Рис. 5. Фундатори вітчизняної біохімії у Київському університеті

На жаль, успішна робота кафедри також була перервана війною, однак з 1944 року педагогічна і наукова робота кафедри була відновлена тимчасово в при-

міщенні Інституту біохімії АН УРСР, звідки була переведена до червоного корпусу університету лише в 1951 році [20].



Рис. 6. Перший випуск біохіміків біологічного факультету (1933–1938)

На біологічному факультеті за активної участі професора О.А.Івакіна (1893-1942) з 1934 року кафедру гістології університету Св.Володимира було відновлено як кафедру анатомії, гістології й ембріології. Професор О.І.Івакін підготував низку підручників, зокрема перший підручник анатомії людини з елементами гістології й ембріології українською мовою. Професор О. А. Івакін був її завідувачем з 1934 до 1941 року (рис. 7). Його наукова діяльність проходила в світлі ідей О.М. Северцова та І.І.Шмальгаузен і була присвячена питанням експериментальної морфології, анатомії, гістології та транспла-

нтації. Педагогічна робота О.А. Івакіна відзначалася змістовними лекціями високого наукового рівня, насиченими новим фактичним матеріалом. Він підготував ряд підручників і посібників (Краткий курс анатомии человека, 1935; Короткий підручник анатомії людини, 1938; Курс гістології для студентів університетів, 1942), а також перший підручник з анатомії людини з елементами гістології та ембріології українською мовою. При кафедрі було створено музей для навчальних цілей, але його цінні колекції загинули під час війни.



Рис 7. Професор О.А.Івакін

Як відомо [1], вивчення основ генетики почалось у Київському університеті святого Володимира в 1911 р., коли професор С. Ю. Кушакевич започаткував на кафедрі зоології курс "Учение о наследственности". Після смерті Кушакевича в 1920 р. дослідження явищ спадковості продовжив І.І.Шмальгаузен. Вже в 1921 р. у ВІНО

І.І. Шмальгаузен організовує кафедру механіки розвитку, дарвінізму й генетики на якій вчення про спадковість було нормативним предметом. Він запрошує академіка Агола І.Й. для читання спецкурсів з генетики. Професорами й доцентами кафедри були І.І. Клодницький, П.О. Ситько, Б.І. Балінський, П.А. Храновський [21].

Після обрання І.І.Шмальгаузен академіком АН СРСР в 1935 р. керована ним кафедра була розділена на дві – механіки розвитку (завідувач – доцент Б.І. Балинський) і дарвінізму та генетики (завідувач – академік І. Й. Агол). Між іншим, доц. Б.І.Балинський залишився в окупованому Києві, згодом емігрував до США і працював у Колумбійському університеті. Академік

І.Й.Агол в 1937 був безневинно заарештований, розстріляний та реабілітований лише в 1957 р. [22]. Після арешту І.Й.Агола (рис. 8) в 1937 р. місце завідувача кафедри залишилось вакантним. На цю посаду було рекомендовано доцента С.М. Гершензона, представника московської школи генетиків, учня М.К. Кольцова і С.С. Четверикова.



І.Й. Агол
(1891-1938)



С.М. Гершензон
(1906-1998)

Рис. 8. Видатні генетики Київського університету

Він керував кафедрою протягом 1937–1941 та 1944–1948 рр. Наукова робота на кафедрі велась у тісній співпраці з відділом генетики Інституту зоології АН УРСР. Під його керівництвом і проводились дослідження з радіаційної генетики, генетики популяцій, мікроеволюційних процесів. Вивчалась дія природного добору в природних умовах на мутантні форми різних видів дрозофіли. Праці з питань визначення ролі мутантів в еволюційному процесі були одними з перших у світовій літературі. Вже в 1936 р. (у віці 30 років!) С.М. Гершензон підготував докторську дисертацію з цитогенетичного аналізу гетерохроматинових ділянок у дрозофіли. Дані цієї роботи, частково опубліковані спільно з Дж. Меллером у "Доповідах Національної Академії наук США", і нині цитуються як новаторські у всіх оглядах на цю тему. Проте дисертація С.М. Гершензона, успішно захищена в 1936 р. на засіданні вченої ради під головуванням М. І. Вавилова, застрягла у ВАКу СРСР через пряме втручання Т.Д. Лисенка і не була затверджена. Дисертацію, забраковану ВАК, С.М. Гершензон надрукував у 1939 р. в Києві українською мовою у вигляді монографії. На жаль, негативне ставлення і різка критика генетики з боку Т.Д.Лисенка справили величезний вплив на подальший розвиток цієї науки в нашій країні [23].

Підготовка кадрів – почесна державна справа. Та цим далеко не вичерпувався зміст завдань, що стояли перед факультетом, який мав широку лабораторну базу і був важливим науково-дослідним центром [24]. З перших років на біологічному факультеті також активувалася науково-дослідна робота. Поліпшилась матеріальна база, розширився під керівництвом проф. В.А. Артоболевського (рис. 9) зоомузей, широко розгорнула роботу біостанція в Каневі. Адже, відповідно до Постанови РНК УРСР від 29 червня 1939 року існуючий Середньодніпровський заповідник було передано університету і він став науково-експериментальною та учбовою базою під назвою "Канівський Біогеографічний заповідник". Його завідувачим став старший викладач кафедри зоології безхребетних О.П. Кришталь (рис. 9), який і раніше досліджував там фауну луків долини Дніпра. З 1936 року розпочав свою наукову діяльність на цих теренах і майбутній відомий зоолог О.Б. Кістяківський. Подальший розвиток цієї науково-дослідної бази біологічного факультету тісно пов'язаний з їх іменами. На успішне проведення наукових досліджень співробітниками факультету позитивно впливали міцні творчі зв'язки з вченими Академії наук та іншими університетами.



В.М. Артоболевський
(1874 – 1952)



О.П. Кришталь
(1908-1985)

Рис. 9. Відомі вчені, які сторили наукову експериментальну та навчальну базу в Канівському заповіднику

Важливі народногосподарські проблеми розробляв створений у 1936 році Науково-дослідний інститут біології (директор проф. В.В.Фінн). Вчені цього інституту мали міцні творчі зв'язки з науковими установами Москви, Ленінграду, Тбілісі, Томська, Криму тощо. За час

свого існування (1936–1941) його співробітниками, головним чином з біологічного факультету було видано кілька наукових збірників з результатами роботи в різних галузях біології. Вчені факультету успішно працювали над вивченням питань філогенії та індивідуальних

особливостей розвитку організмів, біохімії, а також теоретичних і практичних завдань в народному господарстві країни. Важливою віхою в справі болотознавства стала докторська дисертація Д.К.Зерова "Болота УРСР. Рослинність і стратиграфія" (1938). В 1939 р. вийшла в світ його монографія "Визначник печіночних мохів України". За успішну роботу в галузі флори нижчих рослин, філогенії рослинного світу в 1939 р. його обирають член-кореспондентом АН УРСР. Водночас було обрано членом-кореспондентом АН УРСР за заслуги в галузі дослідження флори вищих рослин Є.І.Бордзилевського, який майже 30 років проводив їх в університеті. У 1937 р. А.М.Окснер видає книгу "Определитель лишайников УССР", яка не втратила своєї актуальності і дотепер. Успішно розвиваються нові напрямки в галузі зоології (І.І.Шмальгаузен), паразитології (О.П. Маркевич), іхтіології (М.М.Воскобойников, К.Л.Татарко), дарвінізму і генетики (С.М.Гершензон). На кафедрі біохімії успішно розвиваються дослідження з біохімії головного мозку, обміну речовин в м'язах, вітамінів (О.В.Палладін). Біологи університету спрямовують всі зусилля на розв'язання найважливіших фундаментальних і прикладних проблем біології.

Удосконаленню атестації наукових кадрів сприяло введення в 1937 році нового порядку присудження вчених ступенів і звань (кандидати, доктори наук, асистент, доцент, професор). В ці роки одними з перших успішно захистили дисертації викладачі та науковці біологічного факультету С.Я.Мінінберг, П.А.Храновський, О.П. Маркевич, О.В.Топачевський та інші.

Та перші кроки відновленого факультету супроводжувалися і багатьма труднощами. Насамперед слід зазначити, що навчальна та науково-дослідна робота проходила в цей період у страшній атмосфері доносів та арештів, що організували і здійснювали органи НКВС. Від початку 30-х років сотні викладачів і студентів університету були репресовані. Серед репресованих викладачів, як уже відзначалось, були і вчені факультету. Негативно впливали на навчальний процес надмірна кількість різних зборів, засідань, нестача аудиторій, гуртожитків, проблеми з набором студентів.

Біологічний факультет мав ще й опікуватися справами створеного радгоспу університету, в якому було 40 га ріллі, три пари коней, реманент тощо, який мав забезпечити продуктами роботу ідальні, яку очолював студент мехмату О.Давидов. До того ж весною 1933 р. спалахнула пожежа у фасадному корпусі, що завдала вагомих збитків Університету. Однак попри всі негаразди, ідеологічні обмеження та репресії, напередодні Другої світової війни Київський університет був серед провідних вищих навчальних закладів СРСР і посідав третє місце серед радянських університетів. У ньому навчалося 4 тисячі студентів, на 52 кафедрах працювало понад 300 професорів, доцентів, викладачів, з яких – 8 академіків і 6 член-кореспондентів Академії наук України, 24 доктори, 65 кандидатів наук. Через аспірантуру університет готував молодих спеціалістів вищої кваліфікації із 43 спеціальностей.

Поступове вдосконалення навчально-наукової роботи зумовило значне поліпшення якості підготовки кваліфікованих спеціалістів. У березні 1939 р., на честь 125-річчя з дня народження Тараса Шевченка Президія Верховної Ради СРСР за клопотанням всього колективу вузу присвоїла його ім'я Київського державного універ-

ситету. Як уже відмічалось у цьому ж році університетові було передано Канівський Біогеографічний заповідник, що став науково-експериментальною та навчальною базою для природничих факультетів, насамперед біологічного. Значного розширення і розвитку набув зоомузей університету під керівництвом професора В.М.Артоболевського. Все це дало можливість університету в 1940 р. підготувати 457 фахівців, в тому числі 106 біологів. За університетським Статутом 1939 року на факультеті функціонували такі кафедри: морфології і систематики квіткових рослин; нижчих рослин; зоології хребетних; зоології безхребетних; біохімії; фізіології тварин; анатомії і фізіології рослин; анатомії і гістології; мікробіології; дарвінізму і генетики. Підрозділи і кабінети: Науково-дослідний інститут біології, 13 лабораторій, 8 кабінетів (зокрема біологічної літератури), музеї і гербарії, біологічна станція в Каневі.

Та всі сподівання, плани, перспективи розвитку біологічного факультету було зруйновано 22 червня 1941 р. – розпочалася Велика Вітчизняна війна. Окупація фашистськими військами України загальмувала життя Київського університету. Багато викладачів і студентів факультету влилися добровольцями в ряди Червоної армії і зі зброєю в руках захищали рідну землю (П.Г.Богач, І.П.Білокінь, О.Б.Кістяковський, П.А. Храновський та інші). Чимало пішло у підпілля, до партизанських загонів (П.Д.Харченко). На жаль, вже у вересні 1941 р. загинув директор Ботанічного саду ім.О.В. Фомина М.В.Дубовик, а пізніше і ботаніки І.С.Симоненко та В.П.Шидловський, мікробіологи В.С.Рождественський, М.В.Стадніченко, Б.Й.Коган та інші.

З початком війни більшість студентів і викладачів було евакуйовано на схід, спочатку до Харкова, а потім до Кзил-орди, де було сформовано спільно з Харківським Об'єднаний Український державний університет. До того ж ботанічні кафедри евакуюють до Кзил-Орди, тоді як викладачі, водночас, і співробітники Інституту ботаніки АН УРСР Д.К.Зеров, О.В.Топачевський, А.М.Окснер були евакуйовані до Уфи. Інститут зоології разом з Інститутами гідробіології та мікробіології, в яких водночас також працювали деякі викладачі факультету було включено до об'єднаного Інституту біології та евакуйовано до м.Уфа. Життя вчених в евакуації було нелегким, у жалких побутових умовах люди хворіли, однак наукова діяльність продовжувалась. Передусім розробляли теми оборонного характеру. За однією з таких тем, у групі разом з майбутнім академіком О.П. Маркевичем, працював і С.М. Гершензон. В Інституті біології налагодили роботу вченої ради із захисту дисертацій, де у 1942 р. захистив вдруге докторську дисертацію С.М. Гершензон.

Кафедру ботаніки ОУДУ очолює харківський проф. М.В.Клоков. В ОУДУ з біологічного факультету працюють лише ботанік проф.О.І.Соколовський та зоолог проф.М.М.Воскобойников. Водночас в Києві продовжувала діяти та частина університету, яка з різних причин не евакуювалася.Продовжував роботу і ботанічний сад на чолі з директором В.В.Фінном, неймовірними зусиллями якого спільно з Л.Д.Зафійовською були збережені найцінніші його колекції. Між іншим, після визволення Києва В.В.Фінну саме за це було заборонено працювати в університеті і він був змушений переїхати до Житомира, де він до 1952 р. очолював кафедру ботаніки с-г інституту, тоді як Л.Д.Зафійовська емігрувала за кордон.



Рис. 10. Київський університет в часи гітлерівської окупації (1941–1943)

Під час окупації було здійснено спроби налагодити роботу, так званого націоналсоціалістичного університету, втім, невдовзі гітлерівці закрили університет, багатьох викладачів репресували, а студентів забрали на примусові роботи до Німеччини. Під час боїв за Київ у жовтні-листопаді 1943 року університет зазнав непоправних руйнувань і втрат.

Було значно пошкоджено головний навчальний корпус, розграбовано бібліотеку, музейні колекції, лабораторії (рис. 10). Вартість втраченого лише лабораторного обладнання сягнула величезної суми – 50 млн. карбованців. Величезних збитків зазнала і навчально-наукова база біологічного факультету, зокрема, зоомузей, який не був евакуйований і колекції якого в 1941 році налічували близько 2 млн одиниць, ботанічний сад та Канівський біо-географічний заповідник.

Завдяки працівникам музею Л.А.Шелюжко, К.Л. Шишкіну, С.М.Образцову, Н.С.Павлицькій та іншим музей продовжував функціонувати під час окупації, проте більша частина колекцій була знищена пожежою під час визволення Києва в листопаді 1943 року. Загинули і колекції зоотомічного кабінету, який вже ніколи не був відновлений. На щастя, збереглася знаменита колекція метеликів Палеарктики яку єдину загарбники вивезли, як трофей на Захід. Після війни з Східної Пруссії, вона була вивезена до Москви і тільки завдяки наполегливим зусиллям В.В.Совинського та М.А.Воїнственського, колекцію було повернено до музею. Під керівництвом його директора – професора В.М.Артоболевського поступово відбувалось повоєнне відновлення зоомузею.

Завдяки самовідданій праці незмінного директора ботанічного саду професора В.В.Фінна, співробітників Н.І.Вакулєнка, П.С.Коляди, Ю.М.Рубаховського, В.О. Тарарова, Л.М.Сергієнка, С.Я.Терещенка, К.С.Гаражєєвої та багатьох небайдужих киян під час окупації вдалося зберегти його унікальні колекції. Вже в 1944 році Постановою РНК УРСР від 12 травня було поновлено роботу Ботанічного саду ім.О.В.Фоміна під керівництвом вже нового директора – професора Д.П.Проценка.

Майже повністю були знищені лабораторії, музей, житлові та господарські приміщення ще однієї навчально-наукової бази факультету – Канівського заповідника,

на території якого фашисти будували лінію оборони вздовж берегів Дніпра.

За часів окупації 1941-1943 рр. землі заповідника входили до Канівського лісництва і багато лісу було вирубане. Та вже 12 травня 1944 року Постановою № 461 РНК УРСР було відновлено роботу заповідника з довоєнною територією 1260 га. Влітку 1944 року було поновлено навчальну практику студентів-біологів. Живучи в землянках, навчаючись, вони водночас відбудовували заповідник, роботою якого з 1945 року знову керував директор О.П.Кришталь.

Одразу ж після визволення Києва розпочалося відродження університету. Студенти та викладачі власними силами відбудовували гуманітарний та хімічний корпуси і вже 15 січня 1944 р. відновилися заняття на старших курсах, а з 1 лютого – і на першому. У першому післявоєнному році університет налічував 13 факультетів, серед них і біологічний (на той час біолого-грунтознавчий).

Поновили свою роботу і кафедри біологічного факультету довоєнного періоду. З відновленням роботи університету в січні 1944 р. знову відбулась реорганізація ботанічних кафедр біологічно, унаслідок якої створені кафедра систематики вищих рослин (М.Г.Попов), морфології та анатомії рослин (А.С.Лазаренко), систематики нижчих рослин (Д.К.Зеров) та мікології і фітопатології (С.Ф.Морочковський). На кафедрі вищих рослин у цей період відомими персоналіями та науковцями стали: Михайло Григорович Попов, флорист, професор і завідувач кафедрою з 1941 по 1944 рр.; Петро Федорович Оксіюк та Яків Самойлович Моділевський – відомі цитоембріологи; Олексій Лаврентійович Липа – визнаний фахівець у галузі дендрофлори та озеленення. На жаль, кафедра морфології та анатомії рослин проіснувала лише рік. З призначенням А.С.Лазаренка на посаду завідувача кафедри систематики нижчих рослин Львівського університету, кафедру розформовують.

Курс морфології рослин передають кафедрі систематики вищих рослин, тоді як анатомію рослин передають кафедрі фізіології та біохімії рослин. В 1945 р. до Львова відкомандировують також М.Г.Попова і кафедру впродовж наступних двох років очолював учень О.В.Фоміна проф. П.Ф.Оксіюк – відомий фахівець у галузі флористики та систематики рослин. Відбулися та-

кож зміни і серед складу завідувачів деяких кафедр. Так, кафедру зоології хребетних очолював академік АН УРСР Д.К.Третяков (1878-1950), мікробіології – член-кореспондент АН УРСР Л.Й.Рубенчик (1896-1988), фізіології рослин – професор Д.П.Проценко (1899-1980), анатомії, гістології та ембріології – професор Б.Г.Новиков (1909-1986) (рис. 11). Слід відмітити, що в 1944 р. вперше в університеті професором В.М. Артоблевським була створена кафедра екології й зоогеографії, яка проіснувала до 1951 р. і поклала початок розвитку екології в Україні. Крім того, було відкрито но-

вий науковий підрозділ згідно Постанови РНК Укрїни № 867 від 15 червня 1945 року "Про відновлення роботи науково-дослідного інституту біології при Київському державному університеті і перейменування його в науково-дослідний інститут фізіології тварин". Директором інституту було призначено доцента С.Д.Шестакова, а наукове керівництво забезпечували професор А.І. Ємченко та член-кореспондент АН УРСР Д.С.Воронцов. З такою структурою та професорським складом розпочався новий етап в розвитку біологічної освіти та науки в Київському державному університеті ім.Т.Г.Шевченка.

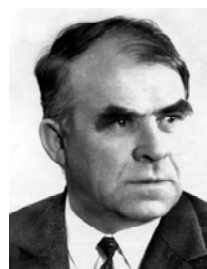


Рис. 11. Завідувачі кафедри мікробіології (Л.Й. Рубенчик) і анатомії, гістології та ембріології (Б.Г. Новиков)

Список використаних джерел

1. Мусієнко М. Університет Святого Володимира – Київський державний університет: генезис біологічної науки (1834–1933) / М. Мусієнко, Л. Остапченко, Н. Таран, Л. Бацманова, В. Стороженко // Вісн. КНУ. Біологія. – 2014. – Т. 1, № 66. – С. 5–14.
2. Киевский университет : документы и материалы. 1834–1984 / [сост. В. А. Замлинский ; ред. кол. : М. У. Белый, Л. В. Губерский, И. И. Ляшко и др.]. – Киев, 1984. – 191 с.
3. Історія Київського університету. – К. : Вид-во КДУ, 1959. – С. 617.
4. Нариси історії біологічного факультету. – К. : Фітосоціоцентр 2004. – 276 с.
5. Білокінь І. П. Академік Дмитро Костянтинович Зеров (до 60-річчя з дня народження) / І. П. Білокінь // Наук. зап. Київ. ун-ту. Труды біол. ф-ту. – 1956. – Т. 15, вип. 11. – С. 163–168.
6. Белоконов И. П. Основные вехи жизни и деятельности Д.К. Зерова / И. П. Белоконов // Флора. Систематика и филогения растений. – Киев : Наук. думка, 1975. – С. 7–23.
7. Гамалія В. М. Розвиток мікології та фітопатології в Київському університеті у другій половині XIX ст. / В. М. Гамалія // Вісник НТУ "ХПІ". – 2013. – № 10 (984). – С. 13–21.
8. Мазурмович Б. М. Вклад учених Київського університету у розвиток зоології у XIX і на початку XX ст. / Б. М. Мазурмович // Труды біолого-грунтознавчого ф-ту КДУ ім. Т. Г. Шевченка. – 1954. – № 11. – С. 24–43.
9. Шмальгаузен И. И. Пути и закономерности эволюционного процесса / И. И. Шмальгаузен. – М. ; Л. : Из-во АН СССР, 1939. – 232 с.
10. Мазурмович Б. М. Невтомні шукачі / Б. М. Мазурмович // Невтомні шукачі. – К., 1975. – С. 65–71.
11. Шмальгаузен Иван Иванович / Т. П. Бабий, Л. Л. Коханова, Г. Г. Костюк [и др.] // Биологи : биогр. справ. – Киев : Наук. думка, 1984. – С. 709–710.
12. Дзеверін І. Іван Іванович Шмальгаузен (до 120-річчя від дня народж.) / І. Дзеверін // Хімія. Біологія. – 2004. – № 22. – С. 3–11.
13. Мазурмович Б. Н. Розвиток зоології на Україні / Б. Н. Мазурмович. – К., 1972. – 230 с.
14. Шаповал А. Особові фонди зоологів у Інституті архівознавства НБУВ: нові надходження та їх інформаційний потенціал / А. Шаповал // Наук. пр. нац. б-ки України ім. В. І. Вернадського. – 2014. – Вип. 40. – С. 45–87.
15. Мусієнко М. М. Золоті імена України, народжені університетом імені Святого Володимира: Микола Григорович Холодний / М. М. Мусієнко // Укр. ботан. журн. – 2003. – 60, № 3. – С. 326–347.

16. Нагороджені Україною : меморіал. альм. : у 2 т. – К. : ЄВРОІМІДЖ, 2002. – Т. 2. – С. 66–67; 210–211.
17. Д. П. Проценко – відомий вчений і педагог (до 100-річчя від дня народження) // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1999. – Т. 31, № 4. – С. 313–316.
18. 170 років кафедрі фізіології людини і тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології : VI Міжн. наук. конф. 9–12 жовт. 2012 р. : тези доп. – К., 2012. – С. 7–32.
19. До 120-річчя від дня народження Андрія Івановича Ємченка, члена-кореспондента АН України, завідувача кафедри фізіології людини і тварин Київського університету імені Тараса Шевченка // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології : VII Міжн. наук. конф., присвяченої 180-річчю Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка та 120-річчю від дня народження А. І. Ємченка : тези доп. – К. : Логос. – 2014. – С. 1–9.
20. Александр Владимирович Палладин: Воспоминания современников / сост. Р. В. Чаговец, Я. В. Белик, Н. М. Полякова ; под ред. Я. В. Белика НАН Украины ; Ин-т биохимии им. А. В. Палладина. – К. : Наук. думка. – 1995. – 171 с.
21. Дзеверін І. І. До 125-річчя від дня народження І. І. Шмальгаузен. Шлях до синтезу: дарвінізм, генетика і еволюційна концепція І. І. Шмальгаузен / І. І. Дзеверін // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів – 2009. – Т. 7, № 2 – С. 305–321.
22. Агол Ізраїль Йосипович // Енциклопедія сучасної України. – К., 2001. – Т. 1. – С. 151.
23. Мусієнко М. М. Минуле і сучасне біологічної науки Київського національного університету імені Тараса Шевченка (1834–2014) / М. М. Мусієнко, Л. М. Бацманова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / НАН України. Ін-т молекулярної біології і генетики України. – К., 2014. – Т. 14. – С. 22–26.
24. Київський університет за п'ятдесят років Радянської влади. – К., 1967. – С. 191.
25. Маркевич О. П. Наука і наукові працівники в КДУ за 112 років його існування (1834–1946) / О. П. Маркевич // Наук. зап. КДУ ім. Т. Г. Шевченка, 1946. – Т. 5, вип. 1. – С. 21.
26. Нариси історії Київського національного університету імені Тараса Шевченка / В. В. Різун, М. С. Тимошик, А. Є. Конверський [та ін.] – К. : НВЦ "Наша наука і культура", 2004. – 440 с.

Надійшла до редколегії 24.03.15

Н. Мусієнко, акад. НААН України, д-р биол. наук, проф., Л. Остапченко, д-р биол. наук, проф., Н. Таран, д-р биол. наук, проф., Л. Бацманова, канд. биол. наук, ст. научн. сотр., В. Стороженко, канд. биол. наук, научн. сотр. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

КИЕВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ – КИЕВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Т.Г. ШЕВЧЕНКО: СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ (1933–1945)

Приведен исторический очерк развития биологического образования и науки в Киевском национальном университете имени Тараса Шевченко за период с 1933–1945 год.

Ключевые слова: биологическая наука, образование, история.

M. Musienko, Dr. of Sci., Prof., Academician of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, L. Ostapchenko, Dr. of Sci., Prof., N. Taran, Dr. of Sci., Prof., L. Batsmanova, PhD, Senior Research Scientist, V. Storozhenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FROM KYIV STATE UNIVERSITY TO TARAS SHEVCHENKO STATE UNIVERSITY OF KYIV – THE FORMATION AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL EDUCATION AND SCIENCE (1933–1945)

The historical overview of the development of biological education and science at the Kiev National Taras Shevchenko University for the period 1933–1945 years was given.

Key words: biological science, education, history.

УДК 577.112:616.128

О. Сторожук, студ., О. Руденко, студ., А. Білюк, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ГАММА-ГЛУТАМІНТРАНСПЕПТИДАЗНА АКТИВНІСТЬ В ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИНАХ ЗА ВПЛИВУ НА РЕЦЕПТОР ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ

Досліджено гамма-глутамінтранспептидазну активність (ГГТ активність) клітин ліній HeLa (рак шийки матки людини) та HerG2 (гепатокарцинома людини) за умов впливу на рецептор епідермального фактора росту мітогеном (EGF) та моноклональними антитілами до цього рецептора – герцептином. Фоновий рівень ГГТ активності в клітинах ліній HerG2 перевищував майже в 10 разів ($p < 0,01$) порівняно з таким для клітин HeLa і становив $1,95 \pm 0,2$ нкат/мл. За впливу EGF та герцептину у клітинах HeLa достовірної різниці не виявлено, тоді як EGF в клітинах гепатокарциноми підсилював ГГТ активність на 20%, а герцептин, навпаки, пригнічував в 2 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Виявлена різниця ГГТ активності у клітинних лініях HerG2 та HeLa свідчить про селективну експресію даного ферменту в HerG2 клітинах та може використовуватись як маркер малігнізації трансформованих клітин гепатоцелярного походження.

Ключові слова: гамма-глутамінтранспептидаза, герцептин, EGF.

Вступ. Численними дослідженнями показано, що зміна активності гамма-глутамінтранспептидази (ГГТ) пов'язана з ризиком розвитку захворювань серцево-судинної системи, є індикатором захворювань гепатобіліарної системи, маркером алкогольної інтоксикації та оксидативного стресу, проте її зв'язок з онкологічними захворюваннями залишається майже недослідженою областю [1]. Деякі експериментальні моделі пояснюють можливість ГГТ модулювати важливі редокс-чутливі функції, такі як антиоксидантний/антиоксидантний захист та клітинний проліферативний/апоптичний баланс, і його роль в пухлинній прогресії, інвазії і лікарській резистентності [2]. Крім того, перспективними виступають дослідження ролі ГГТ в якості біомаркера за впливу певних канцерогенних ксенобіотиків, у тому числі стійких органічних забруднювачів [3].

Відомо, що ГГТ є мембранозв'язаним ферментом, який залучений у метаболізм глутатіону і традиційно розглядається як ланка системи захисту від окисного стресу. З іншого боку, нещодавно підтверджено, що окисно-відновні процеси, що впливають з ГГТ-опосередкованого метаболізму позаклітинного глутатіону можуть бути залучені в модулювання важливих функціональних аспектів пухлинних клітин [2, 4], а також доведена можливість використання ГГТ пухлиною в якості засобу для локальної активації протиракових ліків [5]. Проте, розподіл і концентрація ГГТ в різних типах пухлин різняться, ще не знайдено кореляційних зв'язків між експресією ГГТ і стандартною клініко-патологічною картиною. Неопластичні перетворення в печінці призводять до підвищеної експресії ГГТ [6], однак механізми, що лежать в основі цього явища нині ще не повністю вивчені. Згідно отриманих даних в даному процесі беруть участь AP-1-подібний транскрипційний фактор шляхом активації позаклітинної ERK і p38 мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK) [7], та активні форми кисню, які залучені в процес канцерогенезу та здатні впливати на експресію деяких генів, в тому числі ГГТ [8].

ГГТ експресується в багатьох типах клітин, проте активність даного ферменту різна в залежності від локалізації. Так, підвищена активність ГГТ характерна для тканин печінки, мозку, нирок та при злоякісних новоутворен-

нях [9], в тому числі в пухлинах з підвищеною експресією рецептора епідермального фактора росту (EGF), оскільки EGF виступає одним з основних індукторів клітинної проліферації, міграції та формування метастазів.

Мета дослідження полягала у порівнянні гамма-глутамінтранспептидазної активності в клітинах ліній HeLa та HerG2, визначенні кореляційних зв'язків між активністю даного фермента та впливом специфічних модифікаторів рецептору епідермального фактора росту – мітогену EGF та герцептину (гуманізованих моноклональних антитіл до рецептору).

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження ГГТ активності було використано лінії пухлинних клітин – HeLa (аденокарцинома шийки матки людини) та HerG2 (гепатокарцинома людини). Клітини вирощували до повного моношару в культуральному середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ-глутаміну (Sigma, США) за стандартних умов культивування (5% CO₂, 100% вологості, 37°C) в чашках Петрі або 6-ти лункових планшетах. Клітини розсіювали в концентрації 2×10^5 кл/мл, після досягнення моношару додавали герцептин та EGF як описано [10] та інкубували 72 години. Після закінчення терміну інкубації клітини разом із середовищем інкубації відбирали, переосаджували центрифугуванням, визначали концентрацію живих клітин та співвідношення живих і мертвих після зафарбовування останніх трипановим синім. В середовищі інкубації визначали рівень ГГТ активності, для чого використовували тест-набір для оцінки загальної активності гамма-глутамінтранспептидази (Філісід-діагностика, Україна). Принцип методу полягає в тому, що під дією ГГТ глутаміновий залишок з у-L-(+)-глутамін п-4-нітроаніліда переходить на дипептидний акцептор гліцилгліцин. При цьому вивільнюється хромоген п-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину вимірювали після зупинки ферментативної реакції оцтовою кислотою при довжині хвилі 405 нм за допомогою мультилункового спектрофотометра (BioTek). Для визначення абсолютних показників ГГТ активності проводили порівняння одержаних показників як в розрахунку на 1 мкл культурального середовища, так і на кількість

клітин. Представлені показники в нанокаталах/мл та на 1×10^4 живих клітин

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel 2010. Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували t-критерій Стюдента, достовірність значень приймалася при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Першим етапом нашого дослідження, було порівняння двох ліній куль-

тивованих клітин HepG2 та HeLa за гамма-глутамінтранспептидазною активністю. Виявлено, що пухлинні клітини гепатоцелюлярної аденокарциноми HepG2 проявили майже 10-ти кратне переважання даного показника в порівнянні з клітинами HeLa (рис.1). Згідно одержаних результатів було показано, що рівень активності ферменту ГГТ у пухлинних клітинах HepG2 становив $1,95 \pm 0,1$ нкат/мл, тоді як аналогічний показник в клітинах лінії HeLa становив $0,34 \pm 0,07$ нкат/мл.

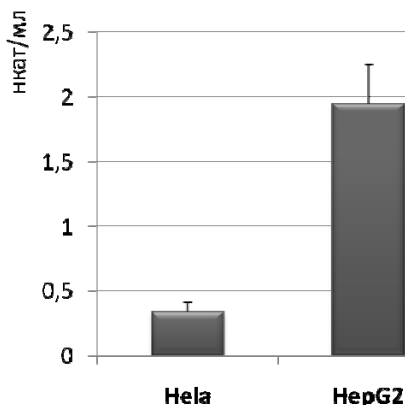


Рис.1. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в середовищі інкубації клітин (нкат/мл/10000 кл)

Отримані результати щодо гамма-глутамінтранспептидазної активності вказують на те, що даний фермент виявляє більшу специфічність до клітин гепатоцелюлярної аденокарциноми, оскільки саме гепатоцити є основним місцем синтезу одних біологічно активних речовин, катаболізму інших та бар'єром на шляху токсинів. Ці процеси протікають за участі глутатіону, а отже й неможливі без ГГТ, тому саме цей фермент може використовуватись як маркер при визначенні дисфункцій печінки, а зміна його активності слугує для оцінки ступеня ураження та деструктивних змін в печінці. Клітини HeLa мають епітеліальне походження, тому й проявили значно меншу ГГТ активність.

Відомо, що EGF є сильним мітогеном, прискорює процеси клітинного поділу, сприяє міграції та в деяких

випадках клітинній трансформації. Багато типів пухлин характеризуються підвищеними рівнями експресії EGF, тому нами був обраний саме цей мітоген в якості досліджуваного агента. При додаванні до клітин модифікаторів рецептора епідермального фактора росту було виявлено, що реакція клітин HeLa майже не підвищувалась за дії EGF та не пригнічувалась під впливом герцептину (рис 2А). В той же час ГГТ активність у клітинній лінії HepG2 при додаванні до культури клітин EGF збільшилась на 20 % відносно контролю ($p < 0,05$), а при додаванні герцептину зменшилась на 51 % відносно контролю ($p < 0,05$) (рис.2Б).

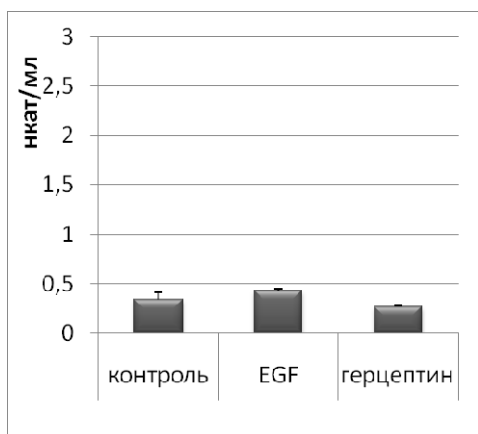


Рис.2А. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в клітинній лінії HeLa за дії герцептину та EGF

Відсутність відмінностей в ГГТ активності клітин HeLa за дії досліджуваних модифікаторів EGF-рецептора може бути пов'язана не лише з тим, що немає певної різниці, а й з чутливістю методу за яким визначали ГГТ-активність. Щодо клітин гепатоцелюлярного походження, то результати підтверджують дані про стимулюючу дію EGF на клітини, тому можна розглядати пря-

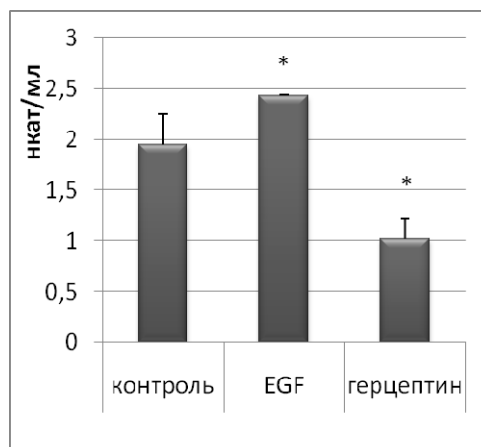


Рис.2Б. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в клітинній лінії HepG2 за дії герцептину та EGF

мі кореляційні зв'язки між підвищенням проліферативної активності, синтетичними процесами в клітині та активністю ГГТ. Зменшення активності даного ферменту під впливом герцептину в 2 рази можна пояснити тим, що відбувається перехрещення сигнальних шляхів, опосередкованих впливом на рецептор епідермального фактора росту та їх гальмування.

Висновки. Отримані експериментальні дані виявляють різницю ГГТ активності у клітинних лініях HepG2 та HeLa, що свідчить про селективну експресію даного ферменту в цих клітинах та може використовуватись як маркер малігнізації трансформованих клітин гепатоцелюлярного походження. Зміну ферментативної активності ГГТ в клітинах HepG2 – збільшення за впливу EGF та зниження за впливу герцептину можна використовувати як додаткову характеристику метаболізму трансформованих гепатоцитів при дослідженні різних сполук.

Список використаних джерел

1. Strasak A. M. Association of gamma-glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study / A. M. Strasak, K. Rapp, L. J. Brant [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – P. 3970–3977.
2. Pompella A. Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance / Pompella A., Corti A., Paolicchi A. [et al.] // *Current Opinion Pharmacology*. – 2007. – Vol. 7. – P. 360–366.
3. Lee D. H. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and g-glutamyltransferase: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002 / Lee D.H., Jacobs D.R. // *Clinical Chemistry*. – 2006. – Vol. 52. – P. 1825–1827.

4. Paolicchi A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism / Paolicchi A., Dominici S., Pieri L. et al // *Biochemical Pharmacology*. – 2002. – Vol. 64. – P. 1027–1035.
5. Dilda P. J. Metabolism of the tumor angiogenesis inhibitor 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsinous acid / P. J. Dilda, E. E. Ramsey, A. Corti et al // *Journal Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 238. – P. 35428–35434.
6. Roomi M. W. Preneoplastic liver cell foci expansion induced by thioacetamide toxicity in drug-primed mice / M. W. Roomi, K. Gaal, Q. X. Yuan et al // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2006. – Vol. 81. – P. 8–14.
7. Zhang H. 4-Hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyltranspeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling / H. Zhang, H. Liu, K. E. Iles et al // *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 34. – P. 174–181.
8. Pandur S. Gamma-glutamyltransferase is up-regulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells / S. Pandur, S. Pankiv, M. Johannessen et al // *Free Radical Research*. – 2007. – Vol. 41. – P. 1376–1384.
9. Corti A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting / A. Corti, M. Franzini, A. Paolicchi, A. Pompella. // *Anticancer Research*. – 2010. – Vol. 30. – P. 1169–1182.
10. Nikulina V. V. A combined effect of herceptin and theralok with EGF on MCF-7 breast cancer cells / V. V. Nikulina, L. V. Garmanchuk, L. I. Ostapchenko et al // 13th International conference St. Gallen "Primary therapy of early breast cancer". 13–16 march 2013. – Switzerland, 2013.

Надійшла до редколегії 24.03.15

О. Сторожук, студ., О. Руденко, студ., А. Билук, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

ГАММА-ГЛУТАМИНТРАНСПЕПТИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Исследована гамма-глутаминтранспептидазная активность (ГГТ активность) клеток линии HeLa (рак шейки матки человека) и HepG2 (гепатокарцинома человека) в условиях воздействия на рецептор эпидермального фактора роста митогеном (EGF) и моноклональные антитела к этому рецептору – герцептином. Фоновый уровень ГГТ активности в клетках линии HepG2 преобладал почти в 10 раз ($p < 0,01$) по сравнению с таковым для клеток HeLa и составлял $1,95 \pm 0,2$ нкат / мл. По воздействию EGF и Герцептина в клетках HeLa достоверной разницы не обнаружено, тогда как EGF в клетках гепатокарциномы усиливал ГГТ активность на 20%, а герцептин, наоборот подавлял в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Выведена разница ГГТ активности в клеточных линиях HepG2 и HeLa свидетельствует о селективной экспрессии данного фермента в HepG2 клетках и может использоваться как маркер малигнизации трансформированных клеток гепатоцеллюлярного происхождения.

Ключевые слова: гамма-глутаминтранспептидаза, герцептин, EGF.

O. Storozhuk, stud., O. Rudenko, stud., A. Bilyuk., PhD stud, L. Garmanchuk, Dr. of Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

GAMMA-GLUTAMINTRANSPETIDASIC ACTIVITY IN TRANSFORMED CELLS EFFECTED ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

Researched gamma-glutamintranspeptidasic activity (GGT activity) of HeLa cell line (human cervical cancer) and Hep G2 (human hepatocarcinomas) the influence on epidermal grow factor by mitogen and monoclonal antibodies to this receptor – herceptin. Background levels of GGT activity in Hep G2 cells lines prevailed almost 10 times ($p < 0,01$) comparing with HeLa cells and was $1,95 \pm 0,2$ nkat/ml. Was discovered that influence of EGF and herceptin on HeLa cells doesn't cause significant differences, while EGF that effected hepatocarcinoma cells increase GGT activity on 20%. Herceptin, conversely inhibit twice ($p < 0,05$) comparing with controls. The observed difference GGT activity in cell lines HeLa and Hep G2 shows the selective expression of this enzyme in Hep G2 cells and can be used as a marker of malignancy transformed cells of hepatocellular origin.

Key words: gamma-glutamintranspeptidase, herceptin, EGF.

УДК 561.381/382: 551.793.9:551.4.032 (477)

Т. Карпюк, асп., Л. Безусько, канд. біол. наук
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ,
А. Безусько, канд. біол. наук
Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ

ПАЛЕОХОРОЛОГІЯ *SELAGINELLA SELAGINOIDES* (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK TA *DIPHASIASTRUM ALPINUM* (L.) HOLUB НА РІВНИННІЙ УКРАЇНІ В ПІЗНЬОМУ ДРІАСІ

Наводяться дані про наявність в спорово-пилкових спектрах відкладів пізнього дріаса рівнинної частині України спор *Selaginella selaginoides* і *Diphasiastrum alpinum*. Ці два види вищих спорових рослин представлені в третьому виданні Червоної книги України (2009) і в даний час беруть участь у формуванні рослинності високогір'я Українських Карпат. Встановлено, що в пізньому дріасі (стадіальне похолодання останнього кліматичного ритму пізньольодовиков'я) *Selaginella selaginoides* і *Diphasiastrum alpinum* входили до складу перигляціальних урешовань лісової, лісостепової та степової зон України. Отримані палеопалінологічні матеріали дозволили зробити висновок про те, що *Selaginella selaginoides* була поширена, як на правобережній, так і на лівобережній частинах цих зон. Поширення *Diphasiastrum alpinum* було обмежено правобережною частиною лісової та степової зон України. Розроблені перші карти-схеми розповсюдження *Selaginella selaginoides* і *Diphasiastrum alpinum* на території рівнинної України в пізньому дріасі.

Ключові слова: палеопалінологія, палеохорологія, *Diphasiastrum alpinum*, *Selaginella selaginoides*, пізній дріас, Україна.

Вступ. Реконструкція поширення в просторі та часі видів, представлених в "Червоній книзі України" [27], є одним з актуальних аспектів сучасних палеохорологічних досліджень [9; 10; 19; 20]. Перспективними модель-

ними таксонами є представники вищих спорових рослин [11]. Серед них цікавими об'єктами для вивчення є ті, що сьогодні поширені тільки у високогірній флорі Карпат, а протягом кватеру брали участь у формуван-

ні рослинних угруповань на території рівнинної України. До таких видів відносяться *Diphasiastrum alpinum* (L.) Holub та *Selaginella selaginoides* (L.) P. Beauv. ex Mart. et Schrank. Зелениця альпійська (*Diphasiastrum alpinum* (L.) Holub (= *Diphasium alpinum* (L.) Rothm., *Lycopodium alpinum* L.)) трапляється на високогірних луках, серед скель, кам'яних розсипищ, до висоти 2000 м н. р. м. (хребти Боржава, Свидовець, Чорногора, Мармароські Альпи, Чивчини), має рідкісний природоохоронний статус та диз'юнктивний ареал [27]. Плаунок плауноподібний (*Selaginella selaginoides* (L.) P. Beauv. ex Mart. et Schrank (= *Lycopodium selaginoides* L., *Selaginella spinulosa* A. Braun)) бере участь у формуванні рослинних угруповань альпійського та субальпійського поясів Карпат, трапляється у вологих та переважно затінених місцях на скелях, у криволіссях гірської сосни (хребти Чорногора, Свидовець, Гор'гани, Мармароські Альпи), має вразливий природоохоронний статус та диз'юнктивний ареал. *Selaginella selaginoides* відноситься до арктоальпійських видів і ймовірно є гляціальним плейстоценовим реліктом [27]. На важливу роль у формуванні рослинного покриву України в квартирі саме гляціальних реліктів вказувала О.Т. Артюшенко [3]. Стадіальне похолодання в пізньому дріасі (останній кліматичний ритм пізньольодовиків'я) сприяло поширенню у складі перигляціальних угруповань мікротермних видів. В цей час також відбувалось проникнення представників гірської флори на рівнинні території [8]. Перигляціальний тип рослинності, який був широко поширений в пізньольодовиків'я (і не має аналогів в сучасній рослинності України), під впливом поліпшення кліматичних умов міжльодовикового рангу починає швидко розпадатись і зникає вже на початку голоцену.

Мета статті – узагальнити відомості про наявність в палінофлорах відкладів пізнього дріасу рівнинної частини України *Diphasiastrum alpinum* і *Selaginella selaginoides* та провести для цих видів, представлених в "Червоній книзі України" [27], палеохорологічні дослідження.

Матеріал і методи. Основний метод – спорово-пилковий аналіз. Матеріал – палінологічні характеристики відкладів пізньольодовиків'я розрізів лісової, лісостепової та степової зон України як отримані нами [4; 5; 6; 7; 8], так і іншими дослідниками [1; 2; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 21; 22; 23, 24; 26; 29; 30; 32]. Первинний матеріал для палеохорологічних досліджень формувався в

два етапи. На першому з них були відібрані спорово-пилкові характеристики відкладів DR–3. На другому етапі опрацьовувались тільки ті спорово-пилкові спектри, які містили викопні спори *Selaginella selaginoides* та *Diphasiastrum alpinum*.

Ідентифікація викопних спор *Diphasiastrum alpinum* та *Selaginella selaginoides* проводилась за допомогою як визначників [12; 28], так і спеціальних паліноморфологічних розробок [25], які використовуються в практиці спорово-пилкового аналізу.

Палеохорологічні дослідження проведені з використанням програми DIVA–GIS [34].

Латинські назви рослин наведені за списком судинних рослин України [31].

Результати та їх обговорення Результати аналізу спорово-пилкових спектрів відкладів пізньольодовиків'я рівнинної частини України свідчать про наявність спор *Diphasiastrum alpinum* та *Selaginella selaginoides* у складі викопних паліофлор. Встановлено, що переважно ці види траплялись у складі перигляціальних рослинних угруповань.

Як наголошувалось вище, при опрацюванні палеопалінологічних матеріалів для цілей палеохорології основну увагу було зосереджено на узагальненні відомостей про наявність у споровій складовій паліофлор DR–3 спор *Diphasiastrum alpinum* та *Selaginella selaginoides*. Ми цілеспрямовано проаналізували палінологічні характеристики відкладів DR–3 в розрізах лісової – Дорошив, Іква–І, Кукаринське, Озерне–3, Романьково, Вільне [4; 5; 6; 7; 16; 18], лісостепової – Клопотівське, Чугмак, Оржиця [4; 8] та степової – Білолісся-острів [26] зон України. Встановлено, що в незначній кількості *Selaginella selaginoides* входить до складу паліофлор пізнього дріасу правобережжя (Дорошив, Іква–І) та лівобережжя (Романьково, Кукаринське, Вільне) лісової та правобережжя (Клопотівське) і лівобережжя (Чугмак, Оржиця) лісостепової зон України. Порівняно з *Selaginella selaginoides*, спори *Diphasiastrum alpinum* набагато рідше трапляються в спорово-пилкових спектрах відкладів пізнього дріасу. На даний час вони відмічені у спорових складових паліофлор правобережних частин лісової (Дорошив, Іква–І) та степової (Білолісся-острів) зон.

Отримані нами результати узагальнені в таблиці.

Таблиця 1. Наявність спор *Selaginella selaginoides* та *Diphasiastrum alpinum* у складі спорово-пилкових спектрів відкладів пізнього дріасу рівнинної частини України

Таксон	Лп	Лл	Лсп	Лсл	Сп	Сл
<i>Selaginella selaginoides</i> (L.) C. Mart.	XXX	XXXX	XXX	XXX	-	-
<i>Diphasiastrum alpinum</i> (L.) Holub	XXX	-	-	-	XXX	-

Примітки: Лп – лісова зона (правобережжя); Лл – лісова зона (лівобережжя); Лсп – лісостепова зона (правобережжя); Лсл – лісостепова зона (лівобережжя); Сп – степова зона (правобережжя); Сл – степова зона (лівобережжя)

Узагальнені палеопалінологічні дані є вихідним фактичним матеріалом для розробки перших карт поширення *Diphasiastrum alpinum* та *Selaginella selaginoides* в пізньому дріасі на території рівнинної України. Результати палеохорологічних досліджень представлені на карті-схемі (рисунок).

На території України *Diphasiastrum alpinum* та *Selaginella selaginoides* сьогодні трапляються тільки у складі високогірної флори Карпат. Відмічені ці два види вищих спорових рослин також у сучасних флорах

Польщі, Словачки та Румунії [33]. В цьому контексті можна припустити, що знахідки викопних спор *Diphasiastrum alpinum* в спорово-пилкових спектрах відкладів пізнього дріасу розрізу Білолісся-острів пов'язані з існуванням в пізньому дріасі на території південної частини Одеської області локального рефугіуму цього виду. Цілком імовірно також, що міграція *Diphasiastrum alpinum* в пізньому плейстоцені на рівнинні території півдня степової зони України відбувалась при зниженні гірських поясів Румунських Карпат.



Рис. Карта-схема поширення *Diphasiastrum alpinum* та *Selaginella selaginoides* на території рівнинної України в пізньому дріасі

Пояснення: 1 – Дорошів, 2 – Іква-І, 3 – Кукаринське, 4 – Романьково, 5 – Вільне, 6 – Клопотівське, 7 – Чугмак, 8 – Оржиця, 9 – Білолісся-острів

Висновки.

1. Узагальнені результати палінологічних досліджень відкладів пізнього дріасу рівнинної частини України свідчать про участь спор *Selaginella selaginoides* та *Diphasiastrum alpinum* у формуванні викопних спорово-пилкових спектрів.

2. На прикладі цих двох видів вищих спорових рослин, представлених в "Червоній книзі України" (2009) та поширених в сучасній флорі високогірних поясів Українських Карпат, проведені перші палеохорологічні дослідження для пізнього дріасу лісової, лісостепової та степової зон.

3. Встановлено, що *Selaginella selaginoides* траплялась у складі перигляціальних рослинних угруповань як на правобережжі, так і на лівобережжі. Поширення *Diphasiastrum alpinum* в пізньому дріасу обмежувалось тільки правобережною частиною лісової та степової зон.

Список використаних джерел

1. Артюшенко А. Т. Растительность Лесостепи и Степи Украины в четвертичном периоде (по данным спорово-пыльцевого анализа). / А.Т. Артюшенко – Киев : Наук. думка, 1970. – 176 с.
2. История растительности западных областей Украины в четвертичном периоде / за ред. А. Т. Артюшенко ; сост. А. Т. Артюшенко, Р. Я. Арап, Л. Г. Безусько. – Киев : Наук. думка, 1982. – 136 с.
3. Артюшенко А. Т. Морфология пыльцы реликтовых, эндемичных и редких видов флоры Украины / А. Т. Артюшенко, Л. С. Романова. – Киев : Наук. думка, 1984. – 48 с.
4. Безусько Л. Г. Рослинний покрив та клімат України в пізньольодовиків'ї / Л. Г. Безусько // Укр. ботан. журн. – 1999. – Т. 53, № 5. – С. 449–454.
5. Безусько Л. Г. Палінологічні дослідження відкладів аллереду-голоцену лісостепової зони України: паліоестратиграфічні та палеоботанічні аспекти / Л. Г. Безусько // 36. наук. пр. / Інституту геологічних наук НАН України. – К., 2013. – Т. 6, вип. 1. – С. 216–222.
6. Безусько Л. Г. Рослинний покрив лісової зони України в пізньому дріасі / Л. Г. Безусько, А. Г. Безусько // Наук. зап. НаУКМА. Біологія та екологія. – 2002. – Т. 20. – С. 3–8.
7. Безусько Л. Г. Характеристики відкладів пізньольодовиків'я та голоцену розрізу Романьково (Сумська область, Україна) / Л. Г. Безусько, А. Г. Безусько // Палеонтологічні дослідження в Україні: історія,

сучасний стан та перспективи / НАН України. Інститут геологічних наук. – К., 2007. – С. 399–405

8. Безусько Л. Г. Закономірності та тенденції розвитку рослинного покриву України у пізньому плейстоцені та голоцені / Л. Г. Безусько, С. Л. Мосякін, А. Г. Безусько. – К. : Альтерпрес., 2011. – 450 с.

9. Палеохорологічні дослідження рідкісних та реликтових видів рослин в Україні: сучасний стан та перспективи / Л. Г. Безусько, Т. С. Карпюк, С. Л. Мосякін, А. Г. Безусько // Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження глобал. стратегії збереж. рослин. Мат-ли II Між нар. наук. конф., м. Умань 9–12 жовт. 2012 р. – К., 2012. – С. 61–62.

10. Безусько Л. Г. Палінофлора Палінофлора відкладів аллереду та пізнього дріасу лівобережжя лісостепової зони України / Л. Г. Безусько, Т. С. Карпюк, С. Л. Мосякін [та ін.] // Наук. зап. НаУКМА. Біологія та екологія. – 2012. – Т. 132. – С. 9–14.

11. Безусько Л. Г. Палеохорологія деяких рідкісних видів вищих спорових рослин на території Слов'янсько-Овруцького краю в XIII ст. н. е. / Л. Г. Безусько, Т. С. Карпюк, С. Л. Мосякін [та ін.] // Укр. ботан. журн. – 2013. – Т. 70, № 6. – С. 762–768.

12. Споры папоротникообразных и пыльца голосеменных и однодольных растений флоры европейской части СССР / сост. А. Е. Бобров, Л. А. Куприянова, М. В. Литвинцева, В. Ф. Тарасевич ; за ред. А. Е. Боброва. – Л. : Наука, 1983. – 208 с.

13. Болиховская Н. С. Эволюция лессово-почвенной формации Северной Евразии. / Н. С. Болиховская. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 270 с.

14. Величко А. А. Геохронология палеолита Восточно-Европейской равнины / А. А. Величко, Ю. Н. Грибченко, Е. И. Куренкова [и др.] // Ландшафтно-климатические изменения, животный мир и человек в позднем плейстоцене и голоцене. – М., 1999. – С. 19–50

15. Герасименко Н. П. Природная среда обитания человека на юго-востоке Украины в позднеледниковье и голоцене (по материалам палеогеографического изучения археологических памятников) / Н. П. Герасименко // Археологический альманах. – 1997. – № 6. – С. 3–64.

16. Еловичева Я. К. Опорные разрезы плейстоцена Украины и их корреляция с территорией Беларуси / Я. К. Еловичева / ИГН НАН Украины. – Минск, 2003. – 109 с.

17. Еловичева Я. К. Особенности гляциальной и перигляциальной растительности плейстоцена Украины и Беларуси / Я. К. Еловичева // Glacjal i periglacial Wschodniego Podkarpacia. – Monografia naukowa, XVII ukraińsko-polskie seminarium. Sambor, 15–18 września 2011. – Lwów, 2011. – S. 207–217.

18. Калинович Н. О. Зміни лісів північно-західного Передкарпаття в голоцені / Н. О. Калинович // Наук. пр. Лісівничої академії наук України. – Л., 2002. – Вип. 1. – С. 62–66.

19. Карпюк Т. С. Палеохорологічні дослідження видів на прикладі *Scheuchzeria palustris* L. / Т. С. Карпюк // Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин : матеріали міжнар. наук. конф., м. Львів, 4–7 черв. 2014 : тези доп. – Л., 2014 а. – С. 115 – 116.

20. Поширення *Linnaea borealis* L. на території України від пізнього плейстоцену до сучасності // Актуальні проблеми ботаніки та екології: матер. міжнар. конф. молод. вчених. Умань, 9–12 верес. 2014. – Умань, 2014. 6. – С. 56–57.

21. Комар М. Нові дані про фауну та флору пізньопалеолітичної стоянки Бужанка 2 (Середнє Понесення) / М. Комар, Д. Ступак. // Палеонтологічний збірник. – 2011. – № 43. – С. 97–106.

22. Пашкевич Г. А. Палинологическое исследование разреза стоянки Кормань IV / Г. А. Пашкевич // Многослойная палеолитическая стоянка Кормань IV. – М.: Наука, 1977. – С. 105–111.

23. Пашкевич Г. А. Динамика растительного покрова Северо-Западного Причерноморья в голоцене, его изменения под влиянием человека / Г. А. Пашкевич // Антропогенные факторы в истории развития современных экосистем. – М.: Наука, 1981. – С. 74–86.

24. Пашкевич Г. А. Палинологическая характеристика отложений многослойной стоянки Молодова–V. / Г. А. Пашкевич // Многослойная палеолитическая стоянка Молодова–V. Люди каменного века и окружающая среда. – М.: Наука, 1987. – С. 141–151.

25. Сладков А. Н. Определение видов *Lycopodium* L. и *Selaginella* Spring по спорам и микроспорам / А. Н. Сладков // Тр. Ин-та географии АН СССР – 1951. – Вып. 50 – С. 167–199

26. Стратиграфия финального плейстоцена и палеолита долины Днестра (верхи разреза Роксоланы и Буджака) / А. Чепалыга, Н. Герасименко, М. Гладырская [и др.] // Лесовий покрив Північного Причорно-

мор'я // 36. наук. пр. до XVIII українсько-польського семінару. Роксолани, 8–13 верес. 2013 р. – Люблин, 2013. – С. 210–220.

27. Червона книга України. Рослинний світ / за заг. ред. Я. П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.

28. Erdtman G. An introduction to pollen analysis. / G. Erdtman. – Waltham, Mass., USA, 1943. – 239 p.

29. Korniets N. Dobranichivka site. / N. Korniets, M. Komar // The Ukraine Quaternary Explored: the Middle and Upper Pleistocene of the Middle Dnieper Area and its importance for East-West European correlation. – Excursion guide. – Kyiv: IVFQR, 2001 – P. 20–22.

30. Korniets N. Mezhychich site / N. Korniets, A. Velichko, Ju. Gribchenko [et al.] // The Ukraine Quaternary Explored: the Middle and Upper Pleistocene of the Middle Dnieper Area and its importance for East-West European correlation. – Excursion guide. – Kyiv: IVFQR, 2001. – P. 42–48.

31. Mosyakin S. L. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. / S. L. Mosyakin, M. M. Fedoronchuk. – Kiev, 1999. – xxiv + 345 p.

32. Pashkevich G. A. Pollen data of upper Paleolithic site Dobranichivka / G. A. Pashkevich // The Ukraine Quaternary Explored: The Middle and Upper Pleistocene of the Middle Dnieper Area and its importance for the East-West – European correlation. – Kyiv: IUFQR, 2001. – P. 70.

33. Tassenkevich L. Flora of the Carpathians. Checklist of the native vascular plant species. / L. Tassenkevich. – L'viv: State Museum of Natural History of NAS of Ukraine, 1998. – 623 p.

34. DIVA-GIS: <http://www.diva-gis.org>

Надійшла до редколегії 16.03.15

Т. Карпюк, асп., Л. Безусько, канд. биол. наук.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина,

А. Безусько, канд. биол. наук

Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина

ПАЛЕОХОРОЛОГИЯ *SELAGINELLA SELAGINOIDES* (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK И *DIPHASIASTRUM ALPINUM* (L.) HOLUB НА РАВНИННОЙ УКРАИНЕ В ПОЗДНЕМ ДРИАСЕ

Приводятся данные о наличии в спорово-пыльцевых спектрах отложений позднего дриаса равнинной части Украины спор *Selaginella selaginoides* и *Diphasiastrum alpinum*. В настоящее время эти два вида высших споровых растений представлены в третьем издании Красной книги Украины (2009) и участвуют в формировании растительности высокогорий Украинских Карпат. Установлено, что в позднем дриасе (стадиальное похолодание последнее климатического ритма позднеледникового) *Selaginella selaginoides* и *Diphasiastrum alpinum* входили в состав перигляциальных сообществ лесной и лесостепной зон Украины. Полученные палеопалинологические материалы позволили сделать вывод о том, что *Selaginella selaginoides* была распространена как на правобережной, так и левобережной частях этих зон. Распространение *Diphasiastrum alpinum* было ограничено правобережной частью лесной и лесостепной зон Украины. Разработаны первые карты-схемы распространения *Selaginella selaginoides* и *Diphasiastrum alpinum* на территории равнинной Украины в позднем дриасе.

Ключевые слова: палеопалинология, палеохорология, *Diphasiastrum alpinum*, *Selaginella selaginoides*, поздний дриас, Украина.

T. Karpiuk, PhD stud., L. Bezusko, PhD.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,

A. Bezusko, PhD.

National University Kiyv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

PALEOCHOROLOGICAL STUDIES OF *SELAGINELLA SELAGINOIDES* (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK AND *DIPHASIASTRUM ALPINUM* (L.) HOLUB IN THE YOUNGER DRYAS WITHIN PLAIN PART OF UKRAINE.

The data on the presence of spores of *Selaginella selaginoides* and *Diphasiastrum alpinum* in the spore-pollen spectra of Younger Dryas sediment within plains part of Ukraine are presented. Currently, these two species are listed in the third edition of the Red Data Book of Ukraine (2009) and are involved in the formation of highlands vegetation of the Ukrainian Carpathians. We found that *Selaginella selaginoides* and *Diphasiastrum alpinum* were part of the periglacial community of the forest, forest-steppe and steppe zones during the Younger Dryas in Ukraine. Paleopalynological materials are shown that *Selaginella selaginoides* was distributed both on the right bank and left-bank parts of these zones. The occurrence of *Diphasiastrum alpinum* was limited to the right-bank part of the forest and steppe zones of Ukraine. As a result of our investigation, the sketch maps of distribution of *Selaginella selaginoides* and *Diphasiastrum alpinum* within the plain part of Ukraine were developed.

Key words: paleopalynology, paleochorology, *Diphasiastrum alpinum*, *Selaginella selaginoides*, Late Dryas, Ukraine.

UDC 577.151.644

D. Gladun, PhD stud., N. Chornenka, stud., S. Ostapchuk, stud., N. Raksha, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

DERIVATION OF TRYPSIN-LIKE ENZYMES FROM ANTARCTIC MARINE ORGANISMS

Modern biotechnology provides continuous search for alternative sources of raw materials. The aim of this work was to isolate and characterize trypsin-like enzymes from tissues of Antarctic marine aquatic organisms (krill, starfish, nemertines). Trypsin fraction was obtained by column chromatography on benzamidino-Sepharose. Proteolytic activity in the resulting fraction was revealed. Analysis of protein fractions was performed by disc-electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel. The presence of active hydrolases with different molecular weights in the tissues of aquatic organisms was demonstrated. Protein bands with molecular weights below 10-14 kDa may be trypsin-like enzyme fragments that were subjected to autolysis process.

Keywords: marine organisms, trypsin-like enzymes.

Introduction. Most modern biotechnology developments are focused on finding a variety of alternative sources of raw materials for the production of biologically active molecules with directed action, including marine and aquatic organisms [1]. The development of

methods for the preparation of biologically active substances in order to use them to create original effective pharmacological agents with the most promising and important properties for academic research is the main problem of biotechnology. Decisive factor that motivates

the need to find the target molecules of marine aquatic metabolites is the constantly rising price of new pharmacological agents [2], which are based on highly valuable biologically active substances of plant and animal origin. Scarcity and cost of marine aquatic organisms, making cost-effective production of marine biological resources, especially non-traditional, receiving pharmacological substances and creation of original effective biotechnological products. Great interest for pharmaceutical industry is active substances from metabolites of marine organisms – a group of cephalosporin antibiotics, nucleosides nereiztoksin, eledoizin, glycosides, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and many other substances with a different spectrum of pharmacological action. Development of optimal methodological approaches for obtaining and testing proteins of Antarctic organisms for further implementation of these proteins in practical biotechnology is the main interest of this study.

Object and research methods. Antarctic marine aquatic – krill (*Euphasia Superba*), starfish (*Odontaster validus*) and nemertine (*Parborlasia corrugata*) were used as an test objects. Animal tissues were homogenized in

liquid nitrogen, followed by addition of the extraction buffer – 0,1 M Na-phosphate buffer containing 0.15 M NaCl and 0,15 mM (ethylenediaminetetraacetic acid) (EDTA), pH 7.4.) and were separated by centrifugation at 10,000 g at 4° C for 20 min. Supernatant was decanted and lyophilized for storage optimization. Lyophilized samples were dissolved in distilled water and precipitation of the proteins was performed using trichloroacetic acid (25%). Identification of potential trypsin-like protein fraction was performed by disc-electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate [3]. Trypsin fraction was obtained by column chromatography on benzamidine-Sephadex [4]. In order to separate solutions of proteins from non-protein fraction gel filtration chromatography using a Sephadex G-25 was performed [5]. Identification of trypsin-like protein fractions after chromatographic separation was performed by disc-electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Proteolytic activity of the studied fractions were determined using as substrate 4% solution of casein in 0.05 M phosphate buferi, pH 7.4.

Results and discussion. Analysis of total protein composition of organisms was performed by disc-electrophoresis polyacrylamide gel.



Fig.1 Results of electrophoretic separation of samples of hydrobionts
1,2 – nemertines; 3,4 – krill; 5,6 – starfish; 7 – molecular weight markers

Electrophoretic analysis revealed the presence of proteins with a molecular weight from 3 to 126 kDa in tissues of marine animal. These results may indicate the presence of variety of enzymes, including trypsin-like enzymes in animal tissues. In order to analyze the amount of trypsin-like enzymes in the samples, we performed chromatographic separation by chromatography on benzamidine-Sephadex. The lyophilized material was dissolved in 2 ml of distilled water and transferred into a 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4 using Sephadex G 25. Fraction was applied to 2 ml Sephadex G 25 equilibrated with 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4 at 10 ml/min. Protein fractions separation and change of conductivity was monitored using an UV and conductivity sensors. Column with benzamidine-Sephadex was equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Protein fraction was applied on the column in a volume of 5 ml with an application rate of 0.5 ml/min. Non-specifically bound proteins were washed out with a standard buffer and trypsin-like enzymes were eluted with 50 mM glycine-HCl buffer, pH 3.0. The speed of all stages of the chromatographic separation was 0.5 ml/min. Changes in absorbance were fixed using a UV sensor at a wavelength of 280 nm.

Figure 2 shows the chromatogram of isolation of trypsin-like enzymes. The fraction of non-specifically bound

proteins (3) and trypsin enzyme fraction (2) were collected, protein concentration was measured using the Bradford method [6]. The test fractions were transferred to 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 using Sephadex G-25, immediately before the measurement of activity.

Measurement of protein content in fraction 2 gave the following result: *Euphausia superba* – $2,9 \pm 0,3$ mg/g sample, *Parborlasia corrugatus* – $1,7 \pm 0,1$ mg/g sample, *Odontaster validus* – $0,8 \pm 0,3$ mg/g. sample. Analysis showed the presence of trypsin-like activity in the fraction №2 and the complete absence of this activity in fractions №1 and №3. Measurement of trypsin-like activity showed results: krill – $4,1 \pm 0,4$ c.u./ g sample, nemertines – $2,8 \pm 0,3$ c.u/g sample, starfish $1,8 \pm 0,3$ c.u/g sample.

Serine proteases are enzymes that cleave peptide bonds in proteins, in which serine serves as the nucleophilic amino acid at the active site. Trypsin-like serine proteases cleave peptide bonds following a positively charged amino acid (lysine or arginine) [7].

For more information about qualitative composition of trypsin-like enzyme fractions in the test samples, electrophoretic separation of the fraction №2 was performed using disc-electrophoresis in polyacrylamide gel with the addition of sodium dodecyl sulfate.

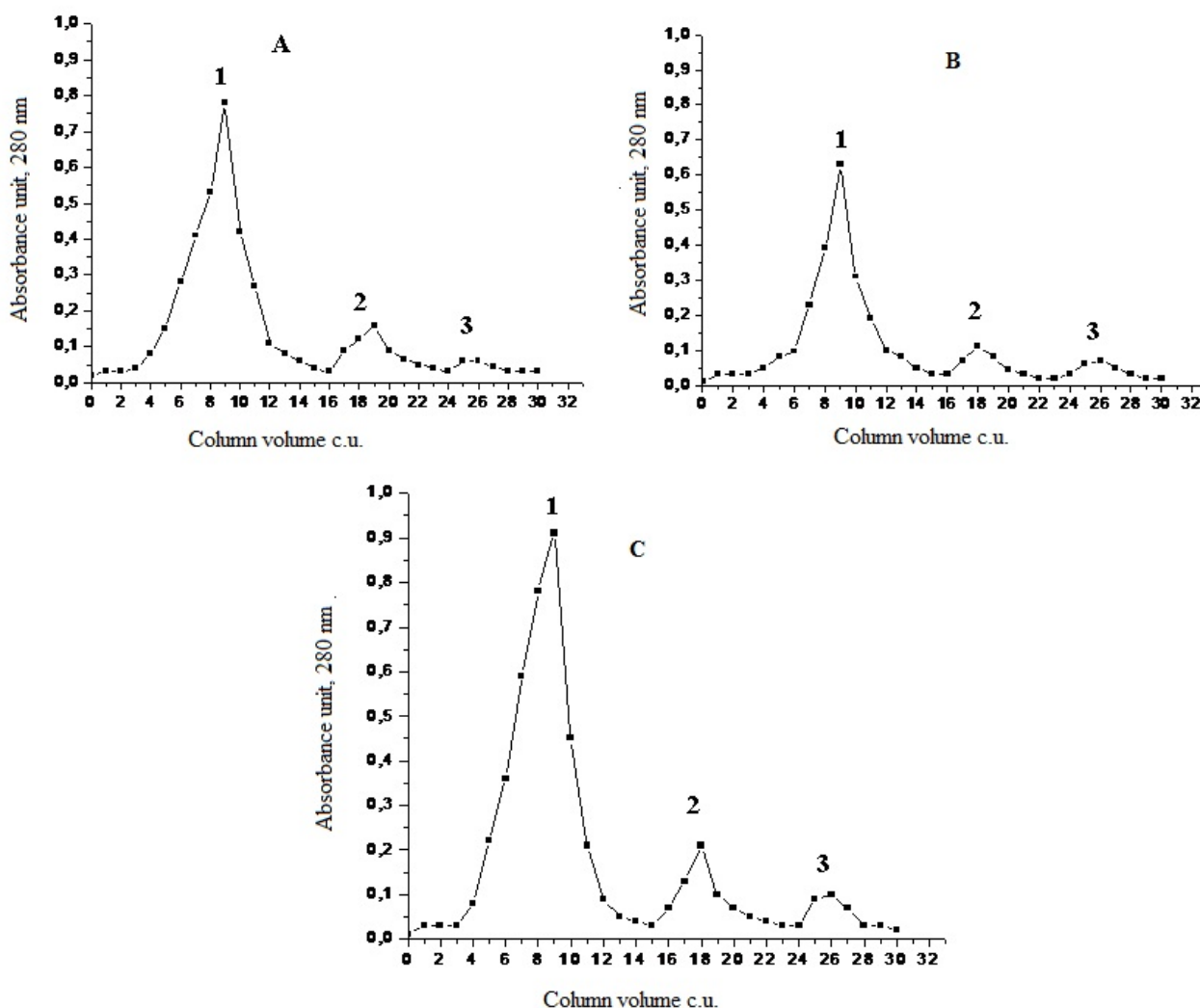


Fig.2 – Chromatogram of separation of samples protein fractions on a column of benzamidine-Sepharose (A – nemertines – *Parborlasia corrugatus*; B – starfish – *Odontaster validus*; V – krill – *Euphausia superba*): 1 – not related stuff; 2 fraction of trypsin-like enzymes; 3 – fraction which was eluted with 1M NaCl

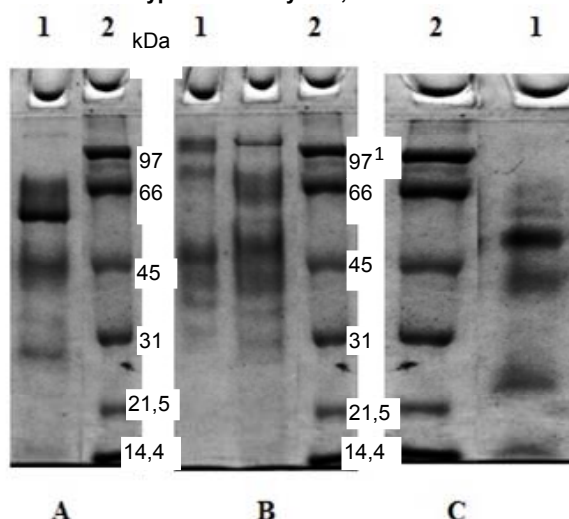


Fig.3. Electrophoregram of separation of trypsin-like fraction obtained from nemertines (A), krill (B) starfish (C) after chromatography on benzamidine-Sepharose: 1 – molecular weight markers (96, 67, 43, 30, 20, 14 kDa) 2 – fraction of trypsin enzymes

As it's indicated in Figure 3, nine bands with different molecular weight were present in trypsin-like enzyme fraction. Protein bands with molecular weight below 10-14 kDa fragments may be trypsin-like enzymes that were subjected to autolysis.

Conclusions. These findings suggest that development of optimal methodological approaches for obtaining and testing trypsin-like enzymes of Antarctic organisms might be used for the creation of potential biotechnological substances which can be used in modern

medical industry in order to create a new generation of pharmacological agents.

References

1. Buchholz F. Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, and Antarctic krill, *Euphausia superba* / F. Buchholz, S. Reinhard // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2000. – Vol. 57. – P. 115–129.
2. Campell D. Debridging ability of a novel multi-enzyme preparation isolated from Antarctic krill (*Euphausia superba*) / D. Campell, L. Hellgren, B. Karlstam // Experientia. – 1987. – Vol. 43. – P. 578–579.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

4. Affinity Chromatography. Principles and Methods. – Sweden: Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001. – P. 89–96.
5. Kimoto K. Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba* / K. Kimoto, S. Kusama, K. Murakami // Agricultural and biological chemistry Journal. – 1983. – Vol. 47. – P. 529–534.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 86. – P. 193–200.
7. Luke B. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection / B. Luke, J. R. Vásquez, C. S. Craik // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Vol. 87 (17). – P. 63.

Надійшла до редколегії 24.03.15

Д. Гладун, асп., Н. Чорненька, студ., С. Остапчук, студ., Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОТРИМАННЯ ФРАКЦІЙ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ З АНТАРКТИЧНИХ МОРСЬКИХ ОРГАНІЗМІВ

Сучасна біотехнологія потребує постійного пошуку альтернативних джерел сировини. Мета проведеної роботи – виділити та охарактеризувати трипсиноподібні ферменти морських антарктичних гідробіонтів (криль, морська зірка, немертина). Ідентифікацію трипсиноподібних ферментів проводили методом диск-електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі. Фракцію трипсиноподібних ферментів отримували шляхом афінної хроматографії на колонці з бензамідин-сефарозою. Показано присутність у тканинах досліджуваних гідробіонтів активних гідролаз з різними молекулярними масами. Білкові смуги з молекулярною масою нижче 10-14 кДа можуть бути фрагментами трипсиноподібних ферментів, які зазнали процесу автолізу.

Ключові слова: морські організми, трипсиноподібні ферменти.

Д. Гладун, асп., Н. Чорненька, студ., С. Остапчук, студ., Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАКЦИИ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ АНТАРКТИЧЕСКИХ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Современная биотехнология требует постоянного поиска альтернативных источников сырья. Цель проведенной работы – выделить и охарактеризовать трипсиноподобные ферменты морских антарктических гидробионтов (криль, морская звезда, немертина). Идентификацию трипсиноподобных ферментов проводили методом диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Фракцию трипсиноподобных ферментов получали путем аффинной хроматографии на колонке с бензамидин-сефарозой. Показано присутствие в тканях исследуемых гидробионтов активных гидролаз с различными молекулярными массами. Белковые полосы с молекулярной массой ниже 10-14 кДа могут быть фрагментами трипсиноподобных ферментов, которые подверглись процессу автолиза.

Ключевые слова: морские организмы, трипсиноподобные ферменты.

УДК 581.135.51

С. Ковтун-Водяницька, канд. біол. наук, О. Вергун, канд. біол. наук
Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України, Київ

АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ НАДЗЕМНОЇ ЧАСТИНИ ІНТРОДУЦЕНТІВ РОДУ *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

Визначено сумарну антиоксидантну активність надземної частини рослин *Isodon japonicus* (Burman) H. Nara та *I. japonicus* (N. Z. Burm) Nara var. *glauco-salux* (Maxim.) H. W. Li, інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп). Використано спектрофотометричний метод зі спиртовим розчином радикалу DPPH. Досліджено зразки сировини інтродуцентів, екстраговані водою, метанолом, етанолом. Найвищу антиоксидантну активність рослин отримано в метанолі 82-83%. Відмічено, що фаза розвитку рослин не мала кардинального впливу на отриманий результат. Встановлено високу загальну антиоксидантну активність представників роду *Isodon*, інтродукованих в Україні. Отримані результати дозволяють розглядати їх як потенційне джерело сировини для створення продукції зі спрямованою антиоксидантною дією.

Ключові слова: інтродуценти, *Isodon*, антиоксидантна активність, DPPH-метод.

Вступ. Збереження рослинного біорізноманіття (видового, генетичного, екологічного) та його раціональне використання і надалі не втрачає своєї актуальності, а навпаки, постає на часі гостріше. Суттєво зменшити навантаження на природні популяції рослин, які експлуатуються людиною, дозволяє інтродукційна робота. В останні 10-15 років відмічається тенденція пошуку та використання рослин, які вирізняються поліфункціональними властивостями. Це спонукає в інтродукційних дослідженнях до одночасного багатовекторного вивчення окремо взятого виду рослин, до виявлення та оцінки сукупних господарсько-цінних ознак. Сьогодні одним із трендових напрямків у дослідженні корисних властивостей рослин є встановлення їх позитивної дії на організм людини, зокрема антиоксидантної активності. Адже згідно останніх даних ВОЗ близько 80% населення планети, як і раніше, спирається на використання

лікарських засобів рослинного походження [1]. Іншим, не менш важливим аспектом у дослідженнях є те, що на думку вчених активність антиоксидантної системи рослин може використовуватися для оцінки ступеню їх стресу і адаптації до несприятливих умов зростання [2].

Цікавим об'єктом в цьому розрізі постає рід *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини *Lamiaceae* Lindley. На сьогодні в межах роду *Isodon* нараховують 117 видів і внутрішньовидових таксонів, які поширені переважно в тропічній і субтропічній Азії з центром різноманіття в південно-західному Китаї та 2 види – в тропічній Африці. Види даного роду достатньо рідко представлені в ботанічних колекціях Європи, практично невідомі в Україні. Однак вони мають тривалу історію використання в країнах Азії, насамперед в якості рослин-цілительів: сировина окремих видів активно використовується в народній ме-

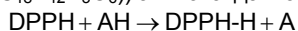
дицині як антибактеріальний, протипухлинний, проти-алергійний, протизапальний і глистогінний засіб.

Найбільш активно наукове вивчення видів роду *Isodon* розгорнуто протягом останніх 30-ти років. Це переважно біохімічні і мікробіологічні дослідження, зосереджені на даний час в Кореї, Китаї, Японії та США. Серед біохімічних сполук найбільше зацікавлення дослідників викликають дитерпеноїди, в тому числі, з антиканцерогенними властивостями [3-7]. На основі сировини *Isodon* та її похідних здійснюється розробка нових лікарських препаратів, БАДів, косметологічних засобів, препаратів для харчової промисловості, тощо. З початку XXI століття зарубіжними вченими виявлено нові властивості видів роду *Isodon* в біохімічному плані і палітра їх позитивної дії у боротьбі з різними захворюваннями значно розширилася. На сьогодні це рослини номер один у дослідженнях з подолання ракових захворювань, із здатністю виявляти протимутаційну і імунотимулюючу дію [8-10].

Проте, більшість публікацій, які висвітлюють результати досліджень зарубіжних вчених, стосується рослин *Isodon* із природних місцезростань. Інформація стосовно дослідження сировини інтродукованих рослин носить вкрай фрагментарний характер. В межах України оприлюднених результатів із такого плану досліджень видів роду *Isodon* на сьогодні нами не виявлено. Це спонукало нас провести біохімічні дослідження надземної частини інтродукованих видів *Isodon*, зокрема результати з визначення сумарної антиоксидантної активності сировини викладено нижче.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження слугувала повітряно-суха сировина багаторічників *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara та *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України. Зразки сировини, використані в дослідженнях, заготовляли у фазу вегетативного росту (липень) та цвітіння (вересень) рослин. Аналізували надземну облістлену частину рослин, зрізану на висоті 20-25 см відносно поверхні ґрунту.

Із чималої кількості методів з визначення антиоксидантної активності (AA), які об'єднані в кілька груп (хемілюмінесцентні, флуориметричні, тощо), застосовано непрямий фотометричний DPPH метод, що відрізняється високою чутливістю до антирадикалів [11]. Даний метод ґрунтується на відновленні радикалу DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)) антиоксидантом за схемою:



В результаті реакції інтенсивність пурпурово-синього забарвлення DPPH, розчиненого в метанолі, знижується [12, 13].

Визначення загальної антиоксидантної активності даних рослин здійснювали згідно модифікованої методики [14]. Подрібнену рослинну сировину (три проби масою по 1 г) екстрагували в 25 мл кожного із розчинників (дистильованої води, метанолу, етанолу) протягом 12 годин при постійному перемішуванні (8000 об./год на шейкері LT 2, Czechoslovakia). З отриманих екстрактів відбирали 0,1 мл розчину і додавали до 3,9 мл метанольного розчину DPPH. Оптичну густину всіх розчинів визначали на спектрофотометрі GENESYS 20 (Termo Electron, Germany) за довжини хвилі 515 нм. Обраховано % інгібування радикалів DPPH різними розчинами вихідного антиоксиданту. Антиоксидантну активність (AA) обраховували за формулою:

$$AA = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \times 100,$$

A_0 – оптична щільність розчину радикалу; A_{10} – оптична щільність розчину радикалу із зразком.

Повторність дослідів трикратна. Обробку експериментальних даних проводили параметричним методом прикладної математичної статистики з розрахунком середнього значення (M), похибки середнього значення (m_m) та коефіцієнту варіації (V) за допомогою програми Office Excel 2003.

Результати та їх обговорення. На сьогодні відомо понад 3000 антиоксидантів рослинного походження. Антиоксиданти (АО) – речовини, які інгібують перекисне окислення ліпідів, стабілізують структуру і функції мембран клітин та створюють оптимальні умови для підтримки гомеостазу клітин і тканин під час різноманітних впливів патогенних факторів на живий організм. Головною мішенню АО є вільні радикали (ВР) – продукти неповного відновлення кисню, яким властива надзвичайно висока реакційна здатність, завдяки чому вони виявляють виражену пошкоджувальну дію на клітинні макромолекули. Найбільш слабким місцем для атаки ВР є клітинна мембрана, зокрема мембранні ліпіди, а також ДНК.

ВР виникають в організмі людини шляхом утворення із нейтрального кисню під дією ультрафіолетового чи іонізуючого опромінення або ж шляхом аутоокислення. Здорова клітина здатна відбити до 10 тисяч атак ВР завдяки роботі ферментів, а також дії вітамінів, мікроелементів, зокрема Mg, K, Zn, Se. Механізм дії АО полягає у перериванні реакційних ланцюжків між ВР і структурами клітини: молекули АО взаємодіють із активними радикалами, утворюючи малоактивні радикали. АО є ендегенні, тобто ті, що наявні в організмі, та екзогенні – надходять ззовні. Екзогенні АО можуть бути різного походження – природні (вітаміни, поліненасичені жирні кислоти, тощо) і синтетичні (ефіри галлової кислоти, органічні сполуки сірки і т.п.) [15-17].

На сьогодні види роду *Isodon* розглядаються як потенційне джерело природних АО. Серед низки видів відмічена висока антиоксидантна дія, яку виявляють насамперед фенольні сполуки рослин [18, 19]. До речі, вважається, що вміст речовин, які взаємодіють з DPPH радикалом, корелює з вмістом фенольних сполук. Це може вказувати на домінуючу роль останніх в сумарній активності рослинних екстрактів відносно цього радикалу [20]. В науковій літературі є відомості, що саме етанольний екстракт *I. japonicus* індукує значне підвищення активності клітин-вбивць (natural-killer cells) проти пухлинних клітин, а також інгібує ріст клітин лейкемії людини (K562) на 74%. Дослідження зарубіжних вчених показують, що ефект протипухлинної дії *I. japonicus* може бути пов'язаний із його здатністю стимулювати клітини-вбивці, тобто виступати в ролі неспецифічного імунотимулятора зазначених клітин. Експериментально встановлено, що для етанольних екстрактів рослин *Isodon* властива висока AA: зразки сировини, зібрані і проаналізовані в Китаї методом DPPH, мають 93,72% AA [21]. На сьогодні є чимало оприлюднених результатів із біологічної активності *Isodon*, зокрема *I. japonicus*, проте механізм дії з наукової точки зору ще не доведено [22, 23].

Наразі види роду *Isodon*, а саме *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucoalyx* є новими маловідомими рослинами на території України. В результаті біохімічних досліджень виявлено, що сировина інтродукованих в умовах Правобережного Лісостепу рослин має якісні характеристики антиоксидантної активності. Із трьох видів екстрактів, використаних в експерименті, показники сумарної AA сировини *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucoalyx* були вищими у метанольних екстрактах, порівняно із іншими розчинниками, і найнижчими – у водних (табл.).

Таблиця. Сумарна антиоксидантна активність інтродуцентів роду *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach в різних екстрактивних речовинах

Назва рослини	Фаза розвитку рослини	DPPH					
		CH ₃ OH		C ₂ H ₅ OH		H ₂ O	
		M±m _M , %	V, %	M±m _M , %	V, %	M±m _M , %	V, %
<i>Isodon japonicus</i>	вегетативний ріст	82,25±1,88	1,88	79,44±0,78	1,69	55,85±3,8	11,78
<i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	вегетативний ріст	82,55±1,27	2,67	63,57±0,67	1,82	57,18±0,65	1,98
<i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	цвітіння	82,74±0,56	1,18	48,23±1,66	5,96	40,89±2,0	8,45

Зауважимо, що для аналізу *I. japonicus* var. *glaucocalyx* використана сировина двох строків заготівлі: літнього і осіннього. Влітку у рослин триває фаза вегетативного росту і спостерігається інтенсивний розвиток бічних пагонів, при цьому облиственість є максимальною. На початку осені рослини переходять до генеративної фази розвитку. В цей період починається стрімкий розвиток суцвіть, однак в результаті зміни теплового режиму листки нижнього ярусу всихають і таким чином суттєво зменшується загальна облиственість рослин. Порівнявши результати аналізу, вочевидь, що сировина *I. japonicus* var. *glaucocalyx* в осінній період виявляє меншу АА (на 15-16%), судячи із водних та етанольних екстрактів, хоча в метанолі лишається стабільно високою. Враховуючи ці особливості ритму сезонного розвитку рослин кращим періодом для заготівлі сировини є літній.

Висновки. В результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що в умовах Правобережного Лісостепу України інтродуценти роду *Isodon*: *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* продукують сировину з високою АА. Це дає підстави розглядати їх як сировинне джерело при створенні продукції зі спрямованою антиоксидантною дією. Також, враховуючи їх маловідомий статус в Україні, в подальшому інтродукційна робота має бути зосереджена на вивченні біологічних особливостей та продуктивного потенціалу видів роду *Isodon*.

Подяка. Автори висловлюють глибоку подяку Яну Бріндзі, професору, директору Інституту охорони біорізноманіття та біологічної безпеки Словачького аграрного університету (м. Нітра, Словаччина) за сприяння у виконанні вищеписаних досліджень.

Список використаних джерел

1. Tuhinandri S. Medicinal plants Human Health and Biodiversity: A Broad Review / S. Tuhinandri, K. S. Samir // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2015. – Vol. 147. – P. 59–110. Available from: www.link.springer.com
2. Вагабова Ф. А. Изучение суммарного содержания флавоноидов и антиоксидантной активности надземной части *Satureja subdentata* Boiss., произрастающей в условиях Дагестана / Ф. А. Вагабова, А. М. Мусаев, А. Н. Алибегова [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 4(1). – С. 103–107.
3. Chen S. N. Diterpenoids from *Isodon eriocalyx* / S. N. Chen, J. M. Yue, S. Y. Chen, Z. W. Lin, G. W. Qin, H. D. Sun [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 1999. – Vol. 62 (5). – P. 782–784.
4. Selection for high oridonin yield in the Chinese medicinal plant *Isodon* (Lamiaceae) using a combined phylogenetics and population genetics approach / E.-S. J. Harris, S. Cao, S. D. Schoville [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7(11). – P. 1–12.

5. Ent-Kaurane diterpenoids from *Isodon japonicus* / S. S. Hong, S. A. Lee, X. H. Han [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2008. – Vol. 71 (6). – P. 1055–1058.
6. Diterpenoids from *Isodon adenantha* / B. Jiang, H. Yang, M. L. Li [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2002. – Vol. 65 (8). – P. 1111–1116.
7. Ren K. Studies on oridonin solid lipid nanoparticles: preparation and pharmacodynamics / K. Ren, D. Chen, R. Zhang, L. Xie, H. Wang // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. Vol. 3(2). – P. 88–93.
8. Feng W.S. Progress in studies of chemical compositions from *Isodon rubescens* / W. S. Feng, H. Lii, X. Zheng, Y. Wang // *Chinese Journal of New Drugs*, 2008. Available from: www.cnki.cn
9. Hong S.S. A new furofuran lignan from *Isodon japonicus* / S.S. Hong, C. Lee, C.H. Lee, M. Park, M.S. Lee, J.T. Hong [et al.] // *Archives of Pharmacological Research*. – 2009. – Vol. 32(4). – P. 501–504.
10. Huang H. Phenolic Compounds of *Isodon oresbii* / H. Huang, H.D. Sun, M.S. Wang, S.X. Zhao // *Journal of Natural Products*. – 1996. – Vol. 59 (11). – P. 1079–1080.
11. Хасанов В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // *Химия растительного сырья*, 2004. – №3. – С. 63–75.
12. Бидарова Ф.Н. Экспресс-методы оценки антиокислительной антирадикальной активности органических субстратов / Ф.Н. Бидарова, Т.О. Хубаева, М.Т. Кисиева [и др.] : матер. VI междунар. студ. эл. науч. конф. "Студенческий научный форум", 15-февраля-31 марта 2014 г. – <http://www.scienceforum.ru/>
13. Lim J. H. Method for quantitatively analysing antioxidant using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) / J. H. Lim, J. B. Kim, D. H. Kim, Y. S. Hwang // *Korea Patent KR 1019970014958*. -1999 Sept 02. Available from: www.patent.ipexl.com/KR/
14. Brand-Williams W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity / W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset // *Lebensmittel Wissenschaften und Technologie*. – 1995. – Vol. 28. – P. 25–30.
15. Смирнов Л. Антиоксиданты в медицине: новые возможности / Л. Смирнов // *Наука и жизнь*. – 2002. – № 12. – www.nkj.ru
16. Антиоксиданты в медицине и косметологии. – Available from: www.medobzor.net
17. Науменко Т. С. Антиоксиданты, их роль в биологии и медицине / Т. С. Науменко. – Волгоград, 2014. – www.bibliofond.ru
18. Masuoka N. Antioxidants from *Rabdosia japonica* / N. Masuoka, T. Isobe, I. Kubo // *Phytotherapy research*. – 2006. – Vol. 20(3). – P. 206–213.
19. Zhou W. Phenolic constituents from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their antioxidant and antibacterial activities / W. Zhou, H. Xie, X. Xu // *Journal of Functional Foods*. – 2014. – Vol. 6. – P. 492–498.
20. Волков В.А. Физико-химические закономерности взаимодействия 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с антиоксидантами растительного происхождения : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 / Волков Владимир Анатольевич. – Тверь, 2010. – 137 с.
21. Of 22 Labiatae Antioxidant Activity of Plants. *Clinical Medicine Papers*. 2011;11. Available from: www.anpaper.com
22. Hwang Y. J. Study on the Immunomodulation Effect of *Isodon japonicus* and NK Anti-Tumor Activity / Y. J. Hwang, J. Kim, D.S. Park, K.A. Hwang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13(4). – P. 4880–4888.
23. An B. J. Antioxidant and Antibacterial Effects of Korean *Isodon japonicus* H. / B.J. An, J.M. Park, H.J. Bae [et al.] // *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 49(2). – P. 129–134.

Надійшла до редколегії 16.03.15

С. Ковтун-Водяницкая, канд. биол. наук., Е. Вергун, канд. биол. наук
Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ИНТРОДУЦЕНТОВ РОДА *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

Определено суммарную антиоксидантную активность надземной части растений *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara и *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) H. W. Li, интродуцированных в Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины (Правобережная Лесостепь). Использован спектрофотометрический метод со спиртовым раствором радикала DPPH. Исследованы образцы сырья интродуцентов, экстрагированные водой, метанолом и этанолом. Наиболее высокая антиоксидантная активность получена в метаноле 82-83%. Фаза развития растений не оказывала кардинального влияния на высокий результат. Установлена высокая антиоксидантная активность представителей рода *Isodon*, интродуцированных в Украину. Полученные результаты позволяют рассматривать их как потенциальный источник сырья для создания продукции с нацеленным антиоксидантным действием.

Ключевые слова: интродуценты, *Isodon*, антиоксидантная активность, DPPH-метод.

S. Kovtun-Vodyanitska, PhD, O. Vergun, PhD

M.M. Gryshko National Botanical Garden National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE ABOVE-GROUND PARTS INTRODUCTANTS OF THE GENUS *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

It was determined the total antioxidant activity above-ground parts of plants *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara and *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, introduced in M.M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine (Right-bank Forest-steppe). Used spectrophotometric method with an alcoholic solution of the radical DPPH. Samples of raw plant extracted with water, methanol and ethanol. The high antioxidant activity was obtained in methanol 82-83%. Phase development of plant did not has a cardinal effect on higher result. Installed the high antioxidant activity the species of genus *Isodon*, introduced in Ukraine. The obtained results allow us to consider them as a potential source of raw materials to creating products with the targeted antioxidant effect.

Key words: *introducents, Isodon, antioxidant activities, DPPH*.

УДК 577.217.5

А. Малина, асп.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ,

О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВЗАЄМОДІЯ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II З ГІДРОКСИПРОПІЛ-В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Проведено дослідження зі взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл-β-циклодекстрином методами оптичної спектроскопії. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок триптофану Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поряд з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Ключові слова: флуоресценція, гідроксипропіл-β-циклодекстрин, рекомбінантний цитокін ЕМАР II.

Вступ. Неправильний фолдінг і агрегація білків супроводжуються утворенням нерозчинних внутрішньоклітинних структур, що призводять до пошкодження і загибелі клітин. Дослідження механізму агрегації білків і механізмів, які запобігають їх агрегації, поряд з фундаментальним значенням має істотну практичну цінність для терапії так званих конформаційних (дегенеративних і нейродегенеративних) хвороб, зумовлених агрегацією білків. Індукувати агрегацію білків в клітинах можуть різні процеси. Перш за все це тепловий та окиснювальний стреси. *In vitro* нативні білки можуть бути розгорнуті в результаті теплової денатурації, а також під дією денатуруючих агентів, таких як гуанідінгідрохлорид або сечовина [3; 6]. Розгорнуті білки можуть взаємодіяти між собою, в основному за участю контактів гідрофобних поверхонь, з утворенням амілоїдних або аморфних агрегатів [3; 6; 15]. У зв'язку з цим дослідження механізму агрегації білків і механізмів пригнічення їхньої агрегації агентами природного і штучного походження є одним із актуальних напрямів сучасної біології.

Дослідження кінетики теплової агрегації різних білків в широкому діапазоні температур і концентрацій з використанням методу динамічного світлорозсіювання показало, що початковою стадією процесу агрегації білків є стадія утворення стартових агрегатів [8; 10; 11]. Стартовий агрегат включає сотні молекул денатурованого білка. Подальша агрегація білка обумовлена злипанням стартових агрегатів і агрегатів більш високого порядку. Стадія зростання білкових агрегатів протікає в кінетичному режимі, при якому кожне зіткнення призводить до злипання білкових агрегатів (так званий режим diffusion-limited cluster-cluster aggregation, DLCA) [10; 11].

Для зниження агрегації білків використовують низькомолекулярні сполуки, такі як циклодекстрини (ЦД) та їхні похідні [2; 10; 13-15]. Здатність ЦД пригнічувати агрегацію білків пояснюється їх властивістю зв'язуватися з залишками ароматичних амінокислот в ненативних (частково розгорнутих) формах білків.

Дослідження впливу ЦД на теплову інактивацію, денатурацію і агрегацію білків має важливе значення для біотехнології (підвищення виходу розчинної форми нативного рекомбінантного білка з солюбілізованих тілець

включення) і медицини (збільшення терміну зберігання білків, які мають терапевтичне значення, таких як гормон росту та інсулін; створення систем цілеспрямованої доставки ліків).

Відомо, що АРСазі можуть приймати участь в регуляторних процесах в клітинах. Клонування і секвенування гена тирозил-тРНК синтетази ссавців виявило високу гомологію амінокислотної послідовності С-кінцевого некаталітичного модуля цього ферменту до цитокіну ЕМАР II (endothelial monocyte activating polypeptide II), яка складає більше 80% (52% ідентичності) [5; 16]. Цитокін ЕМАР II було відкрито при дослідженні факторів, які забезпечують підвищену чутливість мікроциркуляторного русла деяких пухлин до фактору некрозу пухлин (TNF). Подальші дослідження ЕМАР II показали, що він має протипухлинну і протизапальну активність, бере участь в ангіогенезі, ембріогенезі та деяких патологічних процесах, індукує апоптоз клітин ендотелію. Пізніше було встановлено, що білком-попередником цього цитокіну є AIMP1/p43 – один з білків мультиферментного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз вищих евкаріотів. Загальновідомо, що злоякісні пухлини займають друге місце серед причин смерті в економічно розвинутих країнах та третє – в країнах, що розвиваються. Дослідження процесів, які лежать в основі взаємодії злоякісних новоутворень з організмом-хазяїном, мають теоретичні підстави для розробки нових протипухлинних препаратів і підходів до лікування онкологічних захворювань.

Метою роботи було дослідження взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл-β-циклодекстрином.

Матеріали і методи. Експресія, виділення і очистка рекомбінантного білка ЕМАР II з клітин *Escherichia coli*. Для експресії білка ЕМАР II було використано штам-продуцент, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Штам клітин трансформовано плазмідним вектором pET-30a-ЕМАР II, у якого під контролем промотора фага T7 міститься ген, який кодує синтез цільового білка ЕМАР II. Генетичним маркером плазміди pET-30a є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину.

Експресію рекомбінантного білка ЕМАР II проводили на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Індукцію експресії рекомбінантного білка ЕМАР II з промотора lacUV5 здійснювали шляхом додавання до культурального середовища ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1,25 мМ [1]. Очистку цільового рекомбінантного білка ЕМАР II проводили методом металхелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою (Qiagen, USA).

Концентрацію очищеного білка визначали на спектрофотометрі BioMate-5 з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції на довжині хвилі 280 нм, який складав $8730 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Коефіцієнт молярної екстинкції визначали за даними амінокислотного складу з використанням програми ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Аналіз отриманого препарату проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за Лемлі в денатуруючих умовах, використовуючи 15% розділюючий поліакриламідний гель із 0,1% додецилсульфату натрію.

Розчин трипептиду гліцин-триптофан-гліцин (Serva) готували у буфері 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5. Концентрацію цього трипептиду визначали на спектрофотометрі BioMate-5 з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції на довжині хвилі 280 нм, що складав $5690 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Методика флуоресцентних вимірювань. Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка ЕМАР II і гідроксипропіл- β -циклодекстрину проводили титрування у буфері, який містив 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH 7,5. Гідроксипропіл- β -циклодекстрин (ГПЦД) (Ashar) розчиняли у аліквоті білка (в тому ж буфері) та протягом 2 год інтенсивно перемішували при кімнатній температурі. Для дослідження взаємодії трипептиду та ГПЦД вико-

ристовували аналогічні умови, розчиняючи ГПЦД у розчині трипептиду. Це дозволяє уникнути впливу розведення білка і трипептиду на показники флуоресценції. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварcovій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілин для монохроматора збуджувачого світла та реєструючої системи становила 5–10 нм. Довжина хвилі збудження дорівнювала 280 нм, інтервал довжини хвиль для спектрів флуоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджувачого світла при $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Молекулярний докінг проводили за допомогою онлайн сервісу HexServer (<http://hexserver.loria.fr/>). Координатний файл цитокіну ЕМАР II – 1E7Z.pdb, кореляційний тип – форма, розрахунковий прилад – GPU. Результати візуалізували за допомогою програми PyMol. Аналіз експонованості амінокислотних залишків проводили за допомогою онлайн сервісу GetArea (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>) з радіусом 0,14 нм.

Результати та їх обговорення. З літературних джерел відомо, що всі циклодекстрини в першу чергу зв'язуються з ароматичними амінокислотними залишками, тому було проведено модельне дослідження взаємодії трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з гідроксипропіл- β -циклодекстрином. Як видно з рис. 1 під час титрування трипептиду розчином ГПЦД спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції трипептиду, що може свідчити про міцне зв'язування ліганду з гліцин-триптофан-гліцином. Про це також свідчить константа зв'язування, яка дорівнювала $9,84 \pm 0,80 \text{ mM}$. Стехіометрія зв'язування ліганду 1:1.

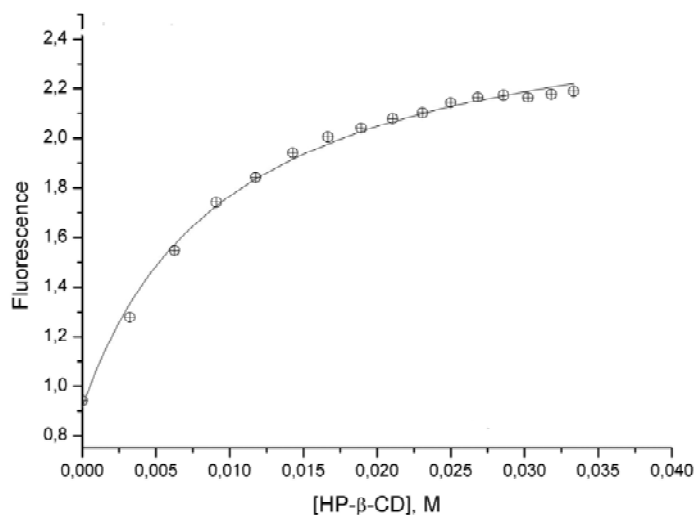


Рис. 1. Залежність інтенсивності флуоресценції трипептиду гліцин-триптофан-гліцин від концентрації гідроксипропіл- β -циклодекстрину в розчині. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5, температура 25°C ; λ_{EX} 280 нм, λ_{EM} 355 нм

При дослідженні взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл- β -циклодекстрином інтенсивність флуоресценції ЕМАР II зростає у 2,1 рази (рис. 2),

що свідчить про міцне зв'язування, а константа зв'язування ліганду з ЕМАР II дорівнювала $5,12 \pm 0,74 \text{ mM}$.

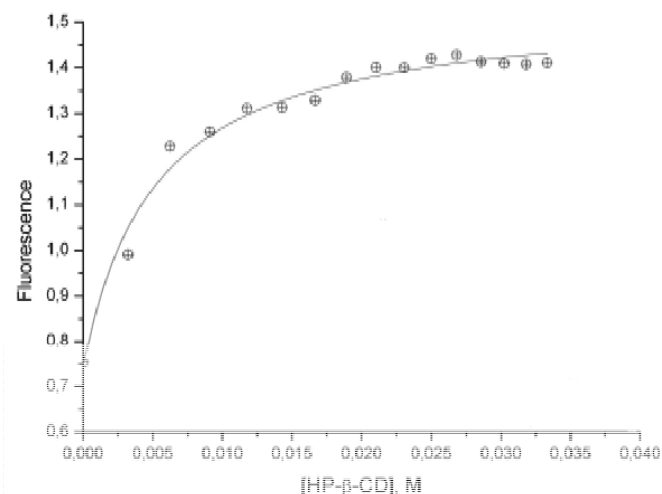


Рис. 2. Залежність інтенсивності флуоресценції протипухлинного цитокіну ЕМАР II від концентрації гідроксипропіл- β -циклодекстрину в розчині. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5, температура 25°C; λ_{EX} 280 нм, λ_{EM} 334 нм

Проведено аналіз експонованості ароматичних амінокислотних залишків в структурі рекомбінантного цитокіну ЕМАР II. Відомо, що ЕМАР II має у своєму складі шість ароматичних амінокислот: Tyr32, Phe110, Tyr145, Phe113, Phe150 і Trp126. Найбільш експонованим є залишок Trp126 (18,6%), який знаходиться біля функціонального центру протеїну (рис. 3). Як було згадано вище, циклодекстрини в першу чергу зв'язуються з ароматичними амінокислотами, тому, найбільш вигідним місцем зв'язування ГПЦД з протипу-

хлинним цитокіном ЕМАР II буде саме цей триптофановий залишок (Trp126).

Для кращого розуміння взаємодії ГПЦД з ароматичними амінокислотами, було проведено молекулярний докінг трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з гідроксипропіл- β -циклодекстрином за допомогою онлайн сервісу HexServer. З рис.4 видно, що взаємодія трипептиду з гідроксипропіл- β -циклодекстрином відбувається шляхом утворення зв'язку між триптофановим залишком та внутрішньою гідрофобною порожниною ліганду.

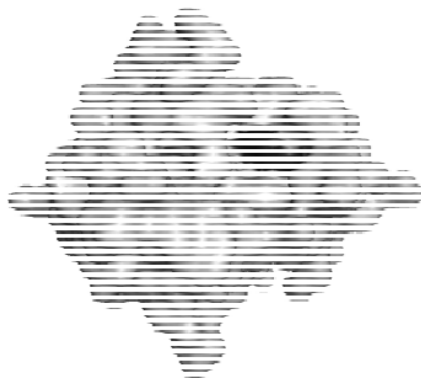


Рис. 3. Експонованість ароматичного залишку триптофану Trp126 на молекулярній поверхні рекомбінантного цитокіну ЕМАР II. Чорним кольором позначено Trp126 (координатний файл 1E7Z.pdb). Структуру візуалізовано за допомогою програми PyMol

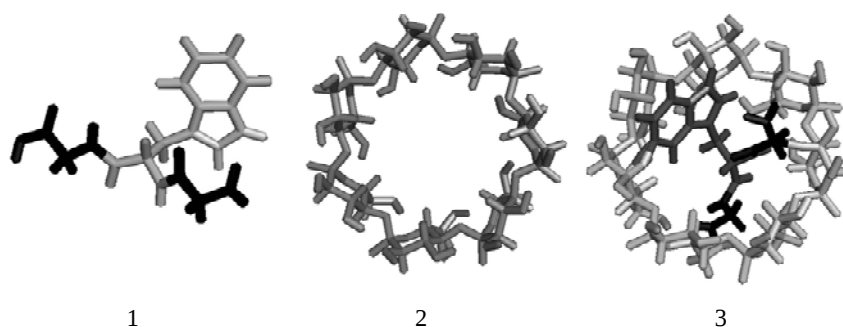


Рис. 4. Взаємодія трипептиду гліцин-триптофан-гліцин з гідроксипропіл- β циклодекстрином. Тривимірні структури: 1 – трипептид гліцин-триптофан-гліцин; 2 – ГПЦД; 3 – можлива модель утворення комплексу трипептиду з ГПЦД

Проведений молекулярний докінг дозволяє зробити висновки про те, як саме відбувається взаємодія ароматичного амінокислотного залишку в складі трипептиду з ГПЦД.

Висновки. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поруч з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Подяки. Висловлюємо подяку Драгану Анатолію Івановичу за допомогу в обговоренні результатів.

Робота виконана в рамках наукового проекту "Фундаментальні основи технології отримання нового протипухлинного цитокіна ЕМАР II та його мутантних форм з підвищеною антиангіогенною дією" цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України

Список використаних джерел

1. Бабенко Л. А. Оптимізація бактеріальної експресії проти пухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *Escherichia Coli* BL21(DE3)pLysE / Л. А. Бабенко, О. Ю. Скоробогатов, О. Л. Дубровський, О. І. Корнелюк // Мікробіологія і біотехнологія – № 3. – 2010. – С. 21-31.
2. Курганов Б. И. Кинетика агрегации белков. Количественная оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении агрегации белков / Б. И. Курганов // Биохимия. – 2002. – № 67. С. 492–507.
3. Маркосян К. А. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агресом / К. А. Маркосян, Б. И. Курганов // Биохимия. – 2004. – № 69. – С. 1196–1212.
4. Панасенко О. О. Структура и свойства малых белков теплового шока / О. О. Панасенко, О. В. Ким, Н. Б. Гусев // Успехи биол. химии. – 2003. – № 43. – С. 59–98.
5. Резников А. Г. Аминоацил-tРНК-синтазы: новая перспектива иммуномодуляции, регенерации и противоопухолевой терапии. / А. Г. Резников, А. И. Корнелюк // Вісн. фармакології та фармації. – 2008. – №9. – С. 2–9.

А. Малина, асп.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,

А. Корнелюк, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА ЕМАР II С ГИДРОКСИПРОПИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Проведенно дослідження взаємодії протипухлинного цитокіна ЕМАР II з гідроксипропіл-β-циклодекстрином методами оптичної спектроскопії. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок триптофана Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поруч з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Ключевые слова: флуоресценция, гидроксипропил-бета-циклодекстрин, рекомбинантный цитокина ЕМАР II.

A. Malyna, PhD stud.

Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine,

O. Kornelyuk, professor, Dr. Sci., Corresponding Member of NASU

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INTERACTION OF ANTITUMOR CYTOKINE EMAP II WITH HYDROXYPROPYL-β-CYCLODEXTRIN

The interaction of the antitumor cytokine EMAP II with hydroxypropyl-β-cyclodextrin was investigated by methods of optical spectroscopy. Established that HP-β-CD binds specifically to EMAP II. The most likely binding site is partially exposed residue Trp126, localized in depressions on the surface of EMAP II along with functionally important lysine-rich cluster.

Keywords: fluorescence, hydroxypropyl-β-cyclodextrin, recombinant cytokine EMAP II.

6. Fink A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid / A. L. Fink // *Folding Dis.* – 1998. – № 3. – P. R9 – R23.

7. Giese K. C. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro / K. C. Giese, E. Vierling // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277. – P. 46310–46318.

8. Golub N. Evidence of the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation / N. Golub, A. Meremyanin, K. Markossian, T. Eronina [et al.] // *FEBS Lett.* – 2007. – № 581. – P. 4223–4227.

9. Hamada F. effect of dansyl-modified β-cyclodextrin on the chaperone activity of heat shock proteins / F. Hamada, M. Narita, A. Makabe, H. Itoh // *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* – 2001. – № 40. – P. 83–88.

10. Khanova H. A., Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of betaL-crystallin by alpha-crystallin / H. A. Khanova, K. A. Markossian, B. I. Kurganov, A. M. Samoilov [et al.] // *Biochemistry.* – 2005. – № 44. – P. 15480–15487.

11. Markossian K. A. Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / K. A. Markossian, H. A. Khanova, S. Y. Kleimenov, D. I. Levitsky [et al.] // *Biochemistry.* – 2006. – № 45. – P. 13375–13384.

12. Murphy R. M., Kendrick B.S. Protein Misfolding and Aggregation / R. M. Murphy, B. S. Kendrick // *Biotechnol. Prog.* – 2007. – № 23. – P. 548–52.

13. Nomura Y. Thermoresponsive controlled association of protein with a dynamic nanogel of hydrophobized polysaccharide and cyclodextrin: heat shock protein-like activity of artificial molecular chaperon / Y. Nomura, Y. Sasaki, M. Takagi, T. Narita [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2005. – № 6. – P. 447–452.

14. Otzen D. E. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation / D. E. Otzen, B. R. Knudsen, F. Aachmann, K. L. Larsen [et al.] // *Protein Sci.* – 2002. – № 11. – P. 1779–1787.

15. Panyukov Y. The study of amorphous aggregation of tobacco mosaic virus coat protein by dynamic light scattering / Y. Panyukov, I. Yudin, V. Drachev [et al.] // *Biophys. Chem.* – 2007. – № 127. – P. 9–18.

16. Schwarz M. A. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. A novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells / M. A. Schwarz, J. Kandel, J. Brett [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1999. – № 190. – P. 341–354.

Надійшла до редколегії 16.03.15

УДК: 616-092.4

М. Бурлова-Васильєва, асп., Т. Вовк, канд. біол. наук,
Н. Кравченко, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
В. Мельник, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

КРИТЕРІЇ ЕНДОГЕННІ ІНТОКСИКАЦІЇ ЗА УМОВ АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА КАРДІОЕМБОЛІЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Визначалися концентрація IgG, рівень олігопептидів та молекул середньої маси у плазмі крові хворих на атеротромботичний та кардіоемболічний інсульт. У дослідженні взяли участь 122 пацієнти з діагнозом атеротромботичний та кардіоемболічний ішемічний інсульт та 40 відносно здорових донорів. Концентрацію IgG визначали методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі. Рівень олігопептидів та молекул середньої маси визначали згідно методики, описаної Ніколайчук В.В. та співавторами. Концентрація IgG зростає з розвитком кардіоемболічного ішемічного інсульту, досягаючи $10,7 \pm 0,97$ мг/мл на 14 добу, в той час як при надходженні до стаціонару показник становив $5,0 \pm 0,35$ мг/мл. За атеротромботичного ішемічного інсульту рівень молекул середньої маси у плазмі крові зростає в 3,35 рази, в той час як рівень олігопептидів зростає в 3,6 разів відносно показників донорів. Кардіоемболічний ішемічний інсульт супроводжувався зростанням рівня молекул середньої маси у 2,6 разів, олігопептидів у 2,5 рази відносно показників донорів. Кардіоемболічний ішемічний інсульт супроводжувався зростанням концентрації IgG у плазмі крові у 2 рази на 14-у добу розвитку хвороби відносно рівня, встановленого при надходженні до стаціонару. За обох підтипів ішемічного інсульту спостерігалось зростання рівня молекул середньої маси та олігопептидів, що вказує на активацію протеолітичних процесів у організмі.

Ключові слова: атеротромботичний ішемічний інсульт, кардіоемболічний ішемічний інсульт, IgG, молекули середньої маси.

Вступ. Патологічна активація захисних реакцій організму має місце за багатьох хвороб [1]. Так, активація імунної системи та продукція аутоантитіл виявлені у хворих з такими захворюваннями як системний склероз, ревматоїдний артрит, діабет, системний червоний вовчак, тиреоїдит та ін. [2, 3]. За деяких з патологічних станів аутоантитіла можуть виступати як предиктором самої хвороби, так і швидкості її прогресування. За ограноспецифічних аутоімунних захворювань таких як діабет 1 типу та тиреоїдит, аутоантитіла можуть бути виявлені у периферичній крові за роки до пошкодження гормон-секретуючих клітин [4-5]. Незважаючи на важливу діагностичну та прогностичну цінність аутоантитіл, їх роль в патогенезі аутоімунних розладів до цих пір залишається дискусійним питанням. Також не відомо, чому конкретні аутоантитіла переважно утворюються за певних захворювань [6].

До активних компонентів, які утворюються в організмі за патологічних умов, в тому числі за рахунок активації протеолітичної системи організму, належать так звані молекули середньої маси. Дана фракція включає в себе молекули з послідовністю від 2 до 20 амінокислот, серед яких відомі біологічно активні сполуки. Відомо, що продукти розпаду білків діють як вторинні ендотоксини, викликаючи розлад різних фізіологічних процесів. Відзначається, що ендотоксемія різного генезу супроводжується збільшенням концентрації молекул середньої маси, при цьому їх рівень корелює з тяжкістю стану хворих і може використовуватися як показник ступеня токсикозу. Рівень молекул середньої маси підвищується за широкого спектру патологічних станів, таких як цукровий діабет обох типів, опіки, гострий панкреатит [7-9].

Серед олігопептидів є сполуки здатні інгібувати тирозинкіназу активність та впливати на протікання запальних процесів [10-12]. Молекули середньої маси впливають на життєдіяльність усіх систем та органів, оскільки за своєю будовою близькі до регуляторних пептидів. Показано, що молекули середньої маси накопичуються у плазмі крові хворих на хронічну ниркову недостатність та проявляють антикоагулянтний ефект, знижують функціональні властивості тромбоцитів та підвищують проникність судин [13]. Окремі фракції молекул середньої маси здатні інгібувати гліколіз, гліюконеогенез, пентозний цикл, синтез гемоглобіна та нуклеїнових кислот, порушувати мембранний транспорт, еритропоез, фагоцитоз, мікро-

циркуляцію та лімфодинаміку, мають імунодепресивну, цитотоксичну, нейро-та психотропну дію [14].

Ряд авторів вважають молекули середньої маси універсальним біохімічним маркером, який відображає рівень патологічного білкового метаболізму та корелює з основними клінічними та лабораторними прогностичними критеріями метаболічних порушень. Підвищення рівня молекул середньої маси в плазмі крові обумовлено порушенням їх елімінації з організму, посиленням утворення в тканинах, або поєднанням обох механізмів. Було показано, що у складі даного класу пептидів містяться речовини з вираженою анти- та прокоагулянтною активністю. Зміна вмісту даних речовин в ході розвитку патологічного процесу або в результаті лікувальних процедур може значно змінювати гемостатичний потенціал крові [13, 15].

Матеріали і методи. Для проведення дослідження було виконано клініко-лабораторне обстеження 122 хворих з гострим ішемічним інсультом. В залежності від підтипу інсульту пацієнти були відкритим методом рандомізовані на дві групи: 1 група – пацієнти з атеротромботичним ішемічним інсультом (n=66) та 2 група – пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом (n=56). Вік хворих на момент огляду варіював від 43 до 91 років, складаючи в середньому $73,62 \pm 8,9$ років. Діагноз ішемічного інсульту був підтверджений нейровізуалізаційно (КТ- або МРТ-головного мозку). Всі хворі або їх родичі були попереджені про проведення клінічного дослідження та давали письмову згоду на участь у ньому.

В дослідженні також взяли участь відносно здорові донори (n=40) без тромбоемболічних захворювань в анамнезі, які за статтю та віком відповідали обом групам хворих осіб.

Кардіоемболічний підтип ішемічного інсульту був діагностований за наявністю у хворого миготливої аритмії: постійної, пароксизмальної форми або перенесеного гострого інфаркту міокарда в анамнезі та їх поєднання. Діагноз миготлива аритмія вважали достовірним, якщо даний стан був підтверджений на електрокардіограмі або за наявності пароксизмальної форми миготливої аритмії, що було зафіксовано у амбулаторній карті та пароксизмом миготливої аритмії перед розвитком ішемічного інсульту. Перенесений інфаркт міокарда теж був підтверджений на електрокардіограмі у вигляді постінфарктного кардіосклерозу та задокументований у амбулаторній картці. В дослідження не включали хво-

рих у стані коми, хворих з вираженою дихальною недостатністю або з підозрою на онкологічне захворювання.

При надходженні до стаціонару усі хворі на першу добу отримували аспірин 325 мг внутрішньо. Забір венозної крові проводили пункцією ліктьової вени з 8 до 9 години ранку натщесерце, в пробірку з розчином лимоннокислого натрію (38 г/л) в кінцевому співвідношенні 9:1.

Кров відбирали пункцією ліктьової вени з 8 до 9 годин ранку натщесерце у пластикову пробірку з лимоннокислим натрієм (38 г/л) у кінцевому співвідношенні 9:1, обережно перемішували (не струшуючи). Суміш центрифугували 20 хв. з прискоренням 1200-1400g. Супернатант перенесли лабораторним дозатором у пластикову пробірку.

Сироватку крові ссавців отримували з цільної крові. Кров відбирали у скляну пробірку та залишали при 37° С на 4 години для вилучення фібриногену і супутніх білків. Утворений згусток видаляли скляною паличкою, після чого кров центрифугували при 2000 g протягом 40 хв. [16]. Сироватку крові перенесли лабораторним дозатором у поліетиленову пробірку.

Фракцію, яка містила IgG виділяли з сироватки крові хворих та донорів методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі [17].

На колонку з носієм наносили сироватку крові, враховуючи загальний об'єм колонки. Неспецифічно зв'язані білки відмивали 0,05 М трис-HCl буфером, pH 7,4. Елюцію проводили 100 мМ гліцин-HCl, pH 2,2. Фракції збирали по 1 мл та вимірювали оптичну густину за 280 нм. Проби, які містили білок, об'єднували та висолювали розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 50 % і залишали на ніч за температури 4°С. Висол центрифугували за 400 об./хв, 30 хв. та розчиняли осад в 1 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, pH 7,4.

Для видалення залишків сульфату амонію використовували хроматографію, яка поділяє за розмірами. Отриману на протеїн-А сефарозі фракцію наносили на колонку G 25, врівноважену 0,05 М Na-фосфатним буфером, pH 7,4. Елюат збирали по 1 мл та вимірювали оптичну густину за 280 нм. Проби, які містили білок, об'єднували, концентрували, вимірювали оптичну густину та вираховували концентрацію отриманих антитіл. Фракцію додатково доочищували для видалення окремих важких та легких ланцюгів імуноглобулінів на Sephadex G75. Хроматографічне розділення проводили у 50 мМ Na-фосфатному буфері pH 7,4 зі швидкістю 1 мл/хв.

Чистоту препарату антитіл контролювали методом диск-електрофорезу за Лемлі [18]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5% β-меркаптоетанол. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти.

Рівень молекул середньої маси визначали згідно методу Ніколайчик В.В. та співавторів [19]. Плазму крові, стабілізовану цитратом натрію, осаджували 1,2 М HClO₄ у співвідношенні 1:1 та центрифугували 20 хв. за 5000 g.

Надосадову рідину відбирали, нейтралізували 2М K₂CO₃ з розрахунку 0.2 мл на 1 мл супернатанту та залишали на льоду на 20 хв. Суміш центрифугували 20 хв. за 2500 g та відкидали осад. Супернатант розділяли на 2 частини. У першій визначали фракцію олігопептидів. Для цього супернатант розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:10 та спектрофотометрували за довжини хвилі 210 нм. Другу частину доосаджували етанолом до кінцевої концентрації 80% протягом 10 хв. та центрифугували протягом 15 хв за 2500 g. У надосадовій рідині визначали молекули середньої маси. Для цього супернатант розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:10 та спектрофотометрували за довжини хвилі 210 нм.

Кількість білка визначали за методом Бредфорд [20], що базується на здатності білків зв'язуватися з кумасі діамантовим синім G-250.

Результати та їх обговорення. Роль антитіл як фактора ризику судинних уражень є предметом інтенсивних досліджень [21]. Раніше було встановлено зв'язок між наявністю у периферичній крові антифосфоліпідних антитіл та розвитком патологій серцево-судинної системи. Високі рівні антифосфоліпідних антитіл, особливо антитіл класу IgG, пов'язані з високим ризиком розвитку тромбозу [22]. Вважається, що первинною мішенню для антифосфоліпідних антитіл є саме фосфоліпідзв'язувальні білки, а не окремі молекули фосфоліпідів. У хворих із позитивними рівнями антитіл до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 частіше діагностували інсульти, інфаркти, артеріальні тромбози судин нижніх кінцівок, судинний головний біль та ураження клапанного апарату серця. Відомо, що взаємодія антитіл із бета-2-глікопротеїном-1 проходить на мембранах ендотеліоцитів та викликає ураження ендотелію, що спричиняє ендотеліальну дисфункцію та серцево-судинні ускладнення [23]. Також показано, що дана група антитіл може взаємодіяти з протромбіном. Антитіла до протромбіну, зокрема, можуть впливати на результати хронометричних тестів in vitro, виступаючи компонентом системи патологічних інгібіторів зсідання. Ряд дослідників розглядають антифосфоліпідні антитіла як незалежний фактор ризику серцево-судинних захворювань [24-26].

Накопичення антитіл до власних антигенів може провокувати порушення у системі гемостазу в напрямку посиленого тромбоутворення. У зв'язку з цим нами було досліджено концентрацію IgG у сироватці крові за розвитку різних підтипів ішемічного інсульту. Відбір зразків крові хворих здійснювали при надходженні до стаціонару, через 7 та 14 днів перебування у лікарні на стаціонарному лікуванні.

Було показано, що у пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом при надходженні до стаціонару та на 7-у добу перебування на лікуванні концентрація IgG знаходиться у межах норми. На 14-у добу розвитку хвороби відмічалось падіння рівня IgG у межах даної групи хворих відносно донорів (Табл. 1.).

Таблиця 1. Концентрація IgG у плазмі крові хворих з різними підтипами ішемічного інсульту

Групи	IgG, мг/мл
Донори	7,58 ± 0,02
AI при надходженні до стаціонару	7,0 ± 0,5
AI на 7-а доба перебування у стаціонарі	7,66 ± 0,71
AI на 14-а доба перебування у стаціонарі	5,96 ± 0,73*
KI при надходженні до стаціонару	5,0 ± 0,35*
KI на 7-а доба перебування у стаціонарі	9,25 ± 0,34*
KI на 14-а доба перебування у стаціонарі	10,7 ± 0,97*

* – достовірні зміни відносно донорів, p ≤ 0,05

При надходженні до стаціонару у хворих з кардіоміо-емболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії відзначалося значне зниження концентрації IgG до 5,0±0,35 мг/мл відносно донорів. На 7-у та 14-у добу

розвитку хвороби у пацієнтів спостерігалось значне зростання концентрації IgG відносно рівня, встановлено при надходженні до стаціонару.

Встановлене зростання рівня IgG за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії, на нашу думку, не може бути наслідком введення хворим низькомолекулярних гепаринів, оскільки подібний ефект не був характерним для пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом, які отримували лікування за аналогічною схемою.

Подальше дослідження якісного складу фракцій та ефектів, які вони викликають дозволять встановити специфічні антитіла, які впливають на функціонування системи гемостазу та можуть бути мішенями білкової терапії.

Нами було виявлено значне зростання рівня молекул середньої маси за розвитку атеротромботичного ішемічного інсульту протягом усього часу дослідження (табл. 2). На 7-у добу перебування у стаціонарі було зафіксовано максимальний рівень молекул середньої маси, що перевищував показник донорів у 3,3 рази.

Також було встановлено зростання рівня oligopeptидів у плазмі крові, який досягав 0,43±0,25 мг/мл на 7-у добу перебування у стаціонарі та перевищував показник донорів у 3,6 рази.

Таблиця 2. Динаміка показників ендотоксемії за атеротромботичного ішемічного інсульту

Показник	Донори	При надходженні до стаціонару	На 7-у добу перебування у стаціонарі
Загальний білок, мг/мл	2,23±0,14	2,30±0,36	2,38±0,49
Молекули середньої маси, у.о.	0,31±0,15	0,97±0,41*	1,04±0,46*
Фракція oligopeptидів, мг/мл	0,12±0,09	0,37±0,33*	0,43±0,25*

* – достовірні зміни відносно донорів, $p \leq 0,05$

Загальний білок за даного патологічного стану залишався у межах норми протягом усього часу дослідження.

За кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії також спостерігалось зростання рівня маркерів ендогенної інтоксикації (табл. 3.). На 7-у добу перебування у стаціонарі рівень молекул середньої маси перевищував показник донорів у 2,6 рази. Концентрація

oligopeptидів у зразках плазми крові хворих також значно перевищувала нормальний показник – у 2,2 рази. При цьому спостерігалась тенденція до зниження концентрації загального білка плазми крові від 2,23±0,14 мг/мл (показник донорів) до 1,63±0,17 мг/мл у хворих на 7-у добу перебування у стаціонарі.

Таблиця 3. Динаміка показників ендотоксемії за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії

Показник	Донори	При надходженні до стаціонару	На 7-у добу перебування у стаціонарі
Загальний білок мг/мл	2,23±0,14	1,68±0,30	1,63±0,17
Молекули середньої маси, у.о.	0,31±0,15	0,79±0,28*	0,82±0,33*
Фракція oligopeptидів, мг/мл	0,12±0,09	0,30±0,13*	0,27±0,16*

* – достовірні зміни відносно донорів, $p \leq 0,05$

Необхідно відмітити, що розвиток атеротромботичного ішемічного інсульту супроводжувався вищою ендогенною інтоксикацією організму хворих у порівнянні з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії. Про це свідчить накопичення значної кількості молекул середньої маси, а також помітно вищий рівень oligonucleotидів у плазмі крові пацієнтів.

Висновки. Кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії супроводжувався зростанням концентрації IgG у плазмі крові у 2 рази на 14-у добу розвитку хвороби відносно рівня, встановленого при надходженні до стаціонару. Розвиток атеротромботичного ішемічного інсульту супроводжувався незначним падінням концентрації IgG на 14-у добу перебування у лікарні. За обох підтипів ішемічного інсульту спостерігалось зростання рівня молекул середньої маси та oligopeptидів, що вказує на активацію протеолітичних процесів у організмі. Причому, за атеротромботичного ішемічного інсульту рівень даних маркерів ендогенної інтоксикації перевищував показники, характерні для хворих з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії.

Список використаних джерел

- Leslie D. Autoantibodies as predictors of disease / D. Leslie, P. Lipsky, A. L. Notkins // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – 108(10). – P. 1417–1422.
- Sharma S. Identification of Autoantibodies against Transthyretin for the Screening and Diagnosis of Rheumatoid Arthritis / S. Sharma, S. Ghosh, L. K. Singh [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – 9(4). – P. 939-05.
- Cozzani E. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects / E. Cozzani, M. Drosera, G. Gasparini, A. Parodi // *Autoimmune disease*. – 2014. – P. 321–359.
- Wenzlau J. M. Novel Diabetes Autoantibodies and Prediction of Type 1 Diabetes / J. M. Wenzlau, J. C. Hutton // *Current Diabetes Reports*. – 2013. – 13 (5). – P. 608-615.
- Wang Y. P. Hemoglobin, iron, and vitamin B12 deficiencies and high blood homocysteine levels in patients with anti-thyroid autoantibodies

/ Y. P. Wang, H. P. Lin, H. M. Chen [et al.] // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2014. – 113(3). – P. 155-60.

6. Racanelli V. V. Autoantibodies to intracellular antigens: Generation and pathogenetic role / V. V. Racanelli, M. Prete, G. Musaraj [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2011. – 10 (8). – P. 503–8.

7. Alabovskii V. V. Medium molecular size peptides of blood plasma in diabetes mellitus / V. V. Alabovskii, D. V. Vasilenko, A. I. Maslov [et al.] // *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika*. – 2005. – 4. – P. 15-8.

8. Levin G. Y. Egorihina Aggregation of erythrocytes in burn disease / G. Y. Levin, N. Marpha // *International Journal of Burns and Trauma*. – 2011. – 1(1). – P. 34-41

9. Matveyev S. B. The comparative characteristic of coefficients of endogenic intoxication under severe acute pancreatitis / S. B. Matveyev, Y. V. Klytchnikova, A. V. Grishin [et al.] // *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika*. – 2013. – 5. – P. 5-7.

10. Reddy B. Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I / B. Reddy, T. Jow, B. M. Hantash // *Experimental Dermatology*. – 2012. – 21(8). – P. 563-8.

11. Short-Sequence Oligopeptides with Inhibitory Activity against Mushroom and Human Tyrosinase / A. A. Ubeid, L. Zhao, Y. Wang, B. M. Hantash. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2009. – 129. – P. 2242–49.

12. van den Berg H. R. Synthetic oligopeptides related to the [beta]-subunit of human chorionic gonadotropin attenuate inflammation and liver damage after (trauma) hemorrhagic shock and resuscitation / H. R. van den Berg, N. A. Khan, M. van der Zee [et al.] // *Shock*. – 2009. – 31(3). – P. 285–291.

13. Карякина Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2004. – № 3. – P. 3–8.

14. Ковалевский А. Н. Замечания по скрининговому методу определения молекул средней массы / А. Н. Ковалевский, О. Е. Нифантьев // *Лабораторное дело*. – 1989. – № 10. – С. 35–39.

15. Влияние молекул средней массы на механизмы гемостаза / В. А. Сятковский, В. А. Змачинский, Л. П. Василенко, О. И. Ким // *Гематологии и трансфузиологии*. – 1989. – № 6. – С. 45–48.

16. Токар А. В. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікророзриву крові (методичні рекомендації) / А. В. Токар, Е. М. Макогоненко, Т. М. Платонова. – К., 1994. – С. 23

17. Huse K. Purification of antibodies by affinity chromatography / K. Huse, H. J. Böhm, G. H. Scholz // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 2002. – 51(3). – P. 217–231.

18. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber, M. Osborn // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – 244 (16). – P. 4406–4412.

19. Николайчик В. В. Способ определения средних молекул / В. В. Николайчик, В. М. Моин, В. В. Кирковский // *Лабораторное дело*. – 1991. – № 10. – С. 13–18.

20. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – 72 (1–2). – 248–254.

21. Cieślak P. Vasculopathy and vasculitis in systemic lupus erythematosus / P. Cieślak, A. Hrycek, P. Kluciński // *Polish Archives of Internal Medicine*. – 2008. – 118(1–2). – P. 57–63.

22. da Silva F.F. Cardiovascular Risk Factors in the Antiphospholipid Syndrome / F. F. da Silva, R. A. Levy, J. F. de Carvalho // *Journal of Immunology Research*. – 2014. – P. 621–270.

23. Blum A. The antiphospholipid syndrome and endothelial function / A. Blum, C. Simsolo // *Israel Medical Association Journal*. – 2004. – 6(9). – P. 556–558.

24. Koniari I. Antiphospholipid syndrome; its implication in cardiovascular diseases: a review / I. Koniari, S. N. Siminelakis, N. G. Baikoussis // *Cardiothorac Surg*. – 2010. – 5. – P. 101.

25. Ruiz-Irastorza G. Stroke and antiphospholipid syndrome: the treatment debate / G. Ruiz-Irastorza, M. A. Khamashta // *Rheumatology (Oxford)*. – 2005. – 44(8). – P. 971–4.

26. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review / D. Garcia, E. A. Akl, R. Carr, C. Kearon // *Blood*. – 2013. – 122(5). – P. 817–824.

Надійшла до редколегії 30.10.14

М. Бурлова-Васильєва, асп., Т. Вовк, канд. биол. наук,
Н. Кравченко, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
В. Мельник, канд. мед. наук.
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

КРИТЕРИИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ И КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Определялась концентрация IgG, уровень олигопептидов и молекул средней массы в плазме крови больных атеротромботическим и кардиоэмболическим ишемическим инсультами. В исследовании приняли участие 122 пациента с диагнозом атеротромботический и кардиоэмболический ишемический инсульты и 40 относительно здоровых доноров. Концентрацию IgG определяли методом аффинной хроматографии на протеин А сепарозе. Уровень олигопептидов и молекул средней массы определяли по методике, описанной Николайчук В.В. и соавторами. Концентрация IgG увеличивалась с развитием кардиоэмболического ишемического инсульта, достигая $10,7 \pm 0,97$ мг/мл на 14 сутки, в то время как при поступлении на стационар показатель составлял $5,0 \pm 0,35$ мг/мл. При атеротромботическом ишемическом инсульте уровень молекул средней массы в плазме крови увеличивался в 3,35 раза, в то время как уровень олигопептидов увеличивался в 3,6 раза относительно показателей доноров. Кардиоэмболический ишемический инсульт сопровождался ростом уровня молекул средней массы в 2,6 раза, олигопептидов – в 2,5 раза относительно показателей доноров. Кардиоэмболический ишемический инсульт сопровождался увеличением концентрации IgG в плазме крови в 2 раза на 14-е сутки развития болезни относительно уровня, установленного при поступлении на стационар. При патологических состояниях наблюдался рост уровня молекул средней массы и олигопептидов, что указывает на активацию протеолитических процессов в организме.

Ключевые слова: атеротромботический ишемический инсульт, кардиоэмболический ишемический инсульт, IgG, молекулы средней массы.

M. Burlova-Vasylijeva, PhD stud., T. Vovk, PhD., N. Kravchenko, PhD., Savchuk O. DsC
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
V. Melnyk, PhD.
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

CRITERIA OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN PATIENTS WITH ATHEROTHROMBOTIC ISCHEMIC STROKE AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE

To determine the concentration of IgG, the level of middle mass molecules and oligopeptides in blood plasma of patients with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. The study involved 122 patients diagnosed with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke and 40 relatively healthy donors. The concentration of IgG was determined by affinity chromatography on protein A sepharose. The level of oligopeptides and middle mass molecules were determined by methods described by Nikolaichuk V. and co-authors. IgG concentration increased with the development of cardioembolic ischemic stroke, reaching $10,7 \pm 0,97$ mg/ml on the 14th day, while on admission to hospital was $5,0 \pm 0,35$ mg/ml. For atherothrombotic ischemic stroke the level of middle mass molecules in the plasma was 3.35 times higher, while the level of oligopeptides was 3.6 times higher relative to donors. Cardioembolic ischemic stroke was accompanied by 2.6 times higher level of middle mass molecules and by 2.5 times higher level of oligopeptides relative to donors. Cardioembolic ischemic stroke was accompanied by 2 times higher concentration of IgG in plasma on the 14th day of disease relative to the rate specified on admission to hospital. For both subtypes of ischemic stroke an increase in middle mass molecules and oligopeptides was observed, indicating the activation of proteolytic processes in the organism.

Keywords: atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke, IgG, middle mass molecules.

УДК 577.112.7

Д. Цимбал, пров. інж., Д. Мінченко, канд. мед. наук,
І. Кривдюк, асп., О. Мінченко, проф.
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *ATF3*, *FOXF1* ТА *CENPU* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛУТАМІНУ І ГЛЮКОЗИ

Встановлено, що рівень експресії генів транскрипційних факторів *ATF3* та *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну у середовищі збільшувався у клітинах гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ферментом ERN1, а рівень експресії гена *CENPU* за цих умов різко знижувався. В той же час, у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1 рівень експресії гена *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну істотно не змінювався, гена *ATF3* збільшувався, а гена *CENPU* зменшувався, причому пригнічення ERN1 значно посилювало ефект дефіциту глутаміну на експресію гена *ATF3*, але при цьому не змінювало чутливості гена *CENPU* до дефіциту цієї амінокислоти. Експресія гена *FOXF1* за умов дефіциту глюкози пригнічувалася, але лише у клітинах з функціонально активним ERN1. Пригнічення ERN1 зменшувало рівень експресії генів *ATF3* і *FOXF1* та посилювало експресію гена *CENPU* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування. Таким чином, гени *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* задіяні у регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми і є чутливими до умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції ензиму ERN1.

Ключові слова: експресія генів, *ATF3*, *FOXF1*, *CENPU*, клітини гліоми, дефіцит глюкози і глутаміну, ERN1.

Вступ. Відомо, що ріст злоякісних пухлин, в тому числі гліом, асоціюється з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин, а також стресом ендоплазматичного ретикулу, що обумовлений накопиченням у ньому не зго-

рнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [1 – 4]. Внутрішньоклітинною структурою, що надзвичайно чутлива до змін гомеостазу, є ендоплазматичний ретикулум, в якому проходить пост-трансляційна модифікація проте-

їнів, процес їх згортання, дозрівання перед переходом до апарату Гольджі, а також точний контроль їх структури. При порушенні гомеостазу чи дії різноманітних чинників спостерігається порушення процесів пост-трансляційної модифікації протеїнів та їх згортання, в результаті чого всі не згорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються і обов'язково знищуються. А тому реакція клітин на не згорнуті в ендоплазматичному ретикулумі протеїни є необхідною для збереження його функціональної цілісності і називається стресом ендоплазматичного ретикулуму, який опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ньому: ERN1/IRE1 (Endoplasmic Reticulum to Nuclei Signaling 1/Inositol Requiring Enzyme-1), PERK (PRK-like Endoplasmic Reticulum Kinase) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6), але саме ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1) є основною і найбільш консервативною сенсорно-сигнальною системою цього стресу [5 – 8]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулуму не лише пригнічується синтез протеїнів на рибосомах, а і припиняється вхід до ендоплазматичного ретикулуму нових протеїнів, що синтезуються, а це сприяє як фолдингу протеїнів, які уже є в ньому, так і їх деградації не згорнутих протеїнів [9 – 12].

Відомо, що сенсорно-сигнальний ензим ERN1 має два різних каталітичних домени (один для серин/треонінової кінази, а другий для ендорибонуклеази), які опосередковують залежне від ERN1 сигналювання, причому асоційована з ERN1 кіназна активність є відповідальною за аутофосфорилування цього ензиму і це фосфорилування є необхідним моментом для димеризації ERN1 та активації його ендорибонуклеази. Виявлено, що ендорибонуклеаза ERN1 є відповідальною не лише за ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 (X-box binding protein 1) мРНК, а і за деградацію певних мРНК, контролюючи таким чином рівень їх експресії [10, 11]. Сплайс-варіант мРНК XBP1 кодує синтез транскрипційного фактора, що є більшим за розміром від основного варіанту і контролює експресію сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулуму [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13].

Сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулуму, що опосередкований ERN1, є тісно пов'язаним з процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, оскільки виключення функції ERN1 призводить до пригнічення росту пухлин із клітин гліоми з повною блокадою функції цього сигнального шляху [9, 13, 14]. Добре відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженням ангіогенезом і посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку і що чинники, які імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліобластом і підвищують виживання пухлинних клітин, а також суттєво посилюють їх агресивність [9]. Детальне вивчення механізмів залежності трансформованих клітин від дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну, є необхідною умовою для розробки нових терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення росту пухлин шляхом блокади механізмів їх проліферації та виживання.

Транскрипційний фактор ATF3 (Activating Transcription Factor 3) є залежним від циклічного аденозинмонофосфату і задіяний у регуляції клітинного циклу, апоптозу та проліферації пухлинних клітин, причому рівень його експресії позитивно корелює з посиленням ростом злоякісних пухлин [15]. Крім того, ATF3 приймає участь у адаптації клітин до зовнішніх та внутрішньоклітинних змін шляхом трансдукції сигналів з різних реце-

пторів, що може виражатися як в активації, так і в репресії експресії генів [15]. Відомо, що транскрипційний фактор FOXF1 (Forkhead box F1 transcription factor) відіграє важливу роль в регуляції процесів проліферації, міграції та виживання клітин, причому транскрипція гена *FOXF1* контролюється пухлинним супресором TP53 [16, 17]. Протеїн CENPU (centromere protein U), відомий ще як MLF1IP (myeloid leukemia factor-1 interacting protein) є транскрипційним репресором, що взаємодіє з Polo-Box і відіграє важливу роль в контролі "правильної" локалізації протеїнкінази PLK1 в мітотичних кінетофорах, причому його рівень є зниженим у пухлинах мозку, що вказує на можливу його участь у патогенезі гліом та можливо і інших злоякісних пухлинах [18]. Разом з тим, залежність експресії генів *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* у клітинах гліоми від дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну, у середовищі і роль опосередкованого ERN1 сигналювання стресу ендоплазматичного ретикулуму при цьому вивчені ще недостатньо, що вимагає подальшого вивчення ролі цих генів у контролі процесів проліферації у цих клітинах.

Метою даної роботи було оцінити експресію генів, що кодують транскрипційні фактори *ATF3* і *FOXF1*, а також пухлинний супресор *CENPU*, які залучені до регуляції процесів проліферації клітин, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим сигнальним ензимом ERN1 за умов дефіциту глюкози та глутаміну для визначення ролі сигнального ензиму ERN1 у механізмах регуляції експресії цих генів та їх можливу причетність до регуляції процесів проліферації у клітинах без функції ERN1.

Матеріали та методи. Робота проведена з використанням клітин гліоми лінії U87, отриманих із компанії "ATCC" (США). Клітини росли в середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; "Gibco", "Invitrogen", США) з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 ммоль/л глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят ("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco") та стрептоміцин (0,1 мг/мл; "Gibco") при температурі 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані дві сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини (вектор), що були стабільно трансфіковані вектором pCDNA3.1 та 2) клітини (dnERN1) з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінант-негативною конструкцією dnERN1, що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1. Пригнічення функції ензиму ERN1 було раніше оцінено по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулуму [19]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози та глутаміну клітини спочатку промивали від середовища вирощування, а потім додавали середовище DMEM ("Gibco") без глюкози або без глутаміну і витримували протягом 16 годин в інкубаторі.

РНК із клітин гліоми виділяли як було описано раніше [19, 20]. Осади РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом для додаткового очищення від можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ("QIAGEN", Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії генів *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі, використовуючи „Mx 3000P QPCR” ("Stratagene", La Jolla, CA, США) та "SYBRGreen Mix" ("AB gene", "Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Ампліфікацію проводили протягом 40 цик-

лів для всіх досліджених генів за таких температурних умов циклу: 95°C – 30 сек., 55°C – 30 сек. та 72°C – 30 сек. Для ампліфікації кДНК ATF3 (activating transcription factor 3), відомого також як cyclic AMP-dependent transcription factor, були використані такі праймери: прямий (5'– CAAGTGCATCTTTGCCTCAA –3' та зворотний (5'– CCACCCGAGGTACAGACACT –3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1024 – 1043 та 1190 – 1171 кДНК ATF3 людини (GenBank номер NM_001674). Розмір ампліфікованого фрагмента 167 п.н.з. Ампліфікацію кДНК FOXF1 (forkhead F1) проводили за допомогою прямого (5'– AAGCCGCGCCTATTCTTACAT –3') та зворотного (5'– TGATGAAGCACTCGTTGAGC –3') праймерів, які відповідають послідовності 185 – 204 та 365 – 346 кДНК FOXF1 людини (GenBank номер NM_001451). Розмір ампліфікованого фрагмента 181 п.н.з. Для ампліфікації кДНК CENPU (centromere protein U), відомого також як MLF1P (myeloid leukemia factor-1 (MLF1) interacting protein) та Polo-Box-Interacting Protein 1, були використані такі праймери: прямий – 5'– GGCTGGGTGAAAATGAGAAA –3' та зворотний – 5'– CGCTGTGTTTGAATAACCT –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 240 – 259 та 577 – 558 кДНК CENPU людини (GenBank номер NM_024629). Розмір ампліфікованого фрагмента 338 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (ACTB) проводили за допомогою прямого – 5'– GGACTTCGAGCAAGAGATGG –3' та зворотного – 5'– AGCACTGTGTTGGCGTACAG –3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. Селекцію праймерів проводили у програмі "Primer3web", version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). По рівню експресії мРНК гена бета-актину оцінювали

рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів ATF3, FOXF1 and CENPU виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз з використанням *t*-тесту однієї проби (one sample *t* test). Значення експресії генів ATF3, FOXF1 and CENPU нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %), але ефект дефіциту глюкози та глутаміну у клітинах (dnERN1) порівнювали з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози та глутаміну. Представлені середні значення $\pm m$ чотирьох експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених у табл. 1, рівень експресії гена ATF3 за умов дефіциту глутаміну у середовищі посилюється у контрольних клітинах гліоми (вектор), що мають функціонально активний сенсорно-сигнальний ензим ERN1, (+59 %; $p < 0,05$) у порівнянні з цими ж клітинами гліоми, що росли у середовищі з глутаміном. Разом з тим, у клітинах з пригніченою активністю кінази та ендорібонуклеази ERN1 (dnERN1) рівень експресії гена ATF3 також посилюється за умов дефіциту глутаміну, але значно більшою мірою (+543 %; $p < 0,05$) при порівнянні з відповідним контролем, клітинами (dnERN1), які росли за присутності глутаміну (табл. 2). Це свідчить про значно більшу чутливість експресії гена ATF3 до дефіциту глутаміну за умов пригнічення ензиматичної активності сигнального ензиму ERN1. Крім того, було показано, що пригнічення ензиму ERN1 призводить до різкого зниження рівня експресії гена цього транскрипційного фактора у клітинах гліоми лінії U87 (-86 %; $p < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами (вектор) за нормальних умов інкубації (табл. 1).

Таблиця 1. Рівень експресії генів ATF3, FOXF1 та CENPU у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pCDNA3.1 (Вектор) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну та глюкози. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину) і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з вектором), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Контроль (вектор)	Дефіцит глутаміну	Контроль (вектор)	Дефіцит глюкози	Контроль (вектор)	Пригнічення ERN1 (dnERN1)
1	ATF3	100	159 $\pm$ 7,8 *	100	150 $\pm$ 7,4 *	100	14 $\pm$ 1,3 *
2	FOXF1	100	223 $\pm$ 9,8 *	100	84 $\pm$ 4,2 *	100	47 $\pm$ 4,06 *
3	CENPU	100	42 $\pm$ 3,42 *	100	46 $\pm$ 2,56 *	100	274 $\pm$ 9,6 *

Встановлено також, що експресія гена ATF3 є чутливою до дефіциту глюкози, причому в обох типах клітин гліоми. Так, за умов дефіциту глюкози виявлено підвищення рівня експресії гена ATF3 на 50 % ($p < 0,05$)

у контрольних клітинах гліоми (табл. 1), а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 експресія цього транскрипційного фактора посилювалася на 1807 % ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 2. Рівень експресії генів ATF3, FOXF1 та CENPU у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну та глюкози. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину) і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з dnERN1), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Контроль (dnERN1)	Дефіцит глутаміну	Контроль (dnERN1)	Дефіцит глюкози
1	ATF3	100	643 $\pm$ 41,4 *	100	1907 $\pm$ 136 *
2	FOXF1	100	113 $\pm$ 9,36	100	92 $\pm$ 7,66
3	CENPU	100	45 $\pm$ 2,08 *	100	49 $\pm$ 2,12 *

Таким чином, пригнічення функції ERN1 значно посилює чутливість експресії гена ATF3 як до дефіциту глутаміну, так і глюкози.

Із даних, приведених у табл. 1 та 2 видно, що рівень експресії гена FOXF1 за умов дефіциту глутаміну у середовищі збільшується у контрольних клітинах гліоми (вектор) на 123 % ($p < 0,05$) при порівнянні з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози, але у клі-

тинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорібонуклеази ERN1 за цих умов істотного зниження рівня експресії гена FOXF1 не виявляється при порівнянні з клітинами (dnERN1). У той же час, рівень експресії гена цього транскрипційного фактора за умов дефіциту глюкози зменшується у контрольних клітинах гліоми (вектор) (-16 %; $p < 0,05$) у порівнянні з цими ж клітинами (вектор), що росли з глюкозою, а пригнічення

ERN1 повністю елімінує ефект дефіциту глюкози на експресію цього гена при порівнянні з відповідним контролем (табл. 1 і 2). Для гена *FOXF1* також виявлено зниження рівня його експресії (-53% ; $p < 0,05$) у клітинах гліоми з пригніченою активністю сенсорно-сигнального ензиму ERN1 за нормальних умов інкубації у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (вектор) (табл. 1). Таким чином, пригнічення функції ERN1 знімає чутливість експресії гена *FOXF1* як до дефіциту глутаміну, так і глюкози.

Дослідження експресії гена *CENPU* показало, що рівень його експресії різко зменшується (-58% ; $p < 0,05$) за умов дефіциту глутаміну як у контрольних клітинах гліоми (вектор), так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) (-55% ; $p < 0,05$) (табл. 1 і 2). Більше того, за умов дефіциту глюкози рівень експресії гена *CENPU* також зменшується як у контрольних клітинах (вектор) (-54% , $p < 0,05$), так і у клітинах (dnERN1) (-51% , $p < 0,05$). Більше того, пригнічення функції ERN1 змінює рівень експресії гена *CENPU* у клітинах гліоми і за стандартних умов їх вирощування. Як видно із даних, представлених у табл. 1, рівень експресії цього гена підвищується у клітинах без функціонально активного ERN1 на 174% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами (вектор).

Таким чином, зниження рівня експресії гена *ATF3* у клітинах гліоми з пригніченим ERN1-опосередкованим сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулу та підвищення його експресії за умов дефіциту глюкози і глутаміну, виявлене нами у клітинах гліоми, узгоджується з даними літератури [15, 16] про здатність транскрипційного фактора *ATF3* посилювати проліферацію та інвазію пухлинних клітин, зокрема через активацію експресії гена цикліну D1 та пригнічення *TP53*. Більше того, отримані нами результати про значне зниження рівня експресії гена *ATF3* узгоджується з даними літератури про зменшення інтенсивності проліферації клітин гліоми з пригніченою активністю ERN1 та росту пухлин з цих клітин [14, 20].

Транскрипційний фактор *FOXF1* також відіграє важливу роль у регуляції процесів проліферації, міграції та виживання клітин, причому транскрипція гена *FOXF1* контролюється пухлинним супресором *TP53* [17]. Як про-проліферативний фактор, він є необхідним для регуляції експресії генів, задіяних в ангиогенезі і сигналюванні VEGF, а тому отримані нами результати про зниження експресії гена *FOXF1* за умов пригнічення ERN1 та активації експресії за умов дефіциту глутаміну повністю узгоджуються з даними літератури [17]. Протеїн *CENPU* є транскрипційним репресором, його рівень є зниженим у пухлинах мозку [18], а тому посилення його експресії у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1, а також за умов дефіциту глутаміну і глюкози, узгоджуються з його функцією як транскрипційного репресора.

Отримані нами результати розкривають деякі сторони молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми та росту гліом за умов інгібування сигнального ензиму ERN1 шляхом змін в експресії генів транскрипційних факторів *ATF3* та *FOXF1*, а також транскрипційного репресора *CENPU*, важливих для регуляції процесів проліферації і апоптозу, та механізмів регуляції їх експресії за дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну в залежності від стресу ендоплазматичного ретикулу, опосередкованого сигнальним шляхом ERN1.

Таким чином, результати цієї роботи вказують на те, що експресія генів *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* у клітинах гліоми лінії U87 контролюється опосередкованою ERN1 сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулу і може бути причетною до регуляції процесів проліферації у цих клітинах, оскільки білкові продукти

цих генів є ключовими у регуляції процесів проліферації, клітинного циклу та апоптозу. За умов дефіциту глюкози та глутаміну рівень експресії гена *ATF3* у клітинах гліоми збільшується, а гена *CENPU* знижується в залежності від функції сигнального ензиму ERN1.

Висновки.

1. Встановлено, що рівень експресії генів *ATF3* та *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну у середовищі збільшувався у клітинах гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ензимом ERN1, а рівень експресії гена *CENPU* за цих умов різко знижувався.

2. Показано, що у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 рівень експресії генів *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну істотно не змінювався, *ATF3* збільшувався, а *CENPU* зменшувався, причому пригнічення ERN1 значно посилювало ефект дефіциту глутаміну на експресію гена *ATF3*, але не змінювало чутливості гена *CENPU* до дефіциту цієї амінокислоти у порівнянні з контрольними клітинами (вектор).

3. Встановлено, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *ATF3* та *CENPU* також змінювався, причому ці зміни були аналогічними до тих, що спостерігалися за умов дефіциту глутаміну в обох типах клітин гліоми, а гена *FOXF1* за цих умов пригнічувалася лише у контрольних клітинах (вектор).

4. Пригнічення функції ERN1 зменшувало рівень експресії генів *ATF3* і *FOXF1* та посилювало експресію гена *CENPU* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування.

5. Результати цієї роботи вказують на можливу причетність генів транскрипційних факторів *ATF3* і *FOXF1* та транскрипційного репресора *CENPU* до регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми лінії U87 та на чутливість експресії цих генів до умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції сигнального ензиму ERN1.

Список використаних джерел

1. Johnson A. B. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. / A. B. Johnson, N. Denko, M. C. Barton // *Mutation Research*. – 2008. – Vol. 640, N 1–2. – P. 174–179.
2. Clarke H. J. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. / H. J. Clarke, J. E. Chambers, E. Liniker, S. J. Marciniak // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 563–573.
3. Lee J. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. / J. Lee, U. Ozcan // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N 3. – P. 1203–1211.
4. Sakaki K. Interaction between quality control systems for ER protein folding and RNA biogenesis. / K. Sakaki, R. J. Kaufman // *Worm Journal*. – 2013. – Vol. 2, N 2. – P. 230.
5. Ferris S. P. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. / S. P. Ferris, V. K. Kodali, R. J. Kaufman // *Disease Models & Mechanisms*. – 2014. – Vol. 7, N 3. – P. 331–341.
6. Hetz C. Targeting the unfolded protein response in disease. / C. Hetz, E. Chevet, H. P. Harding // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2013. – Vol. 12, N 9. – P. 703–719.
7. Aragón T. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. / T. Aragón, E. van Anken, D. Pincus [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 736–740.
8. Taouji S. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling. / S. Taouji, S. Wolf, E. Chevet // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2013. – Vol. 117. – P. 465–484.
9. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. / M. Moenner, O. Pluquet, M. Bouchecareilh, E. Chevet // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 22. – P. 10631–10634.
10. Manié S. N. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. / S. N. Manié, J. Lebeau, E. Chevet // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2014. – Vol. 307, N 10. – P. C901–C907.
11. Pluquet O. Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α . / O. Pluquet, N. Dejeans, M. Bouchecareilh [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, N 15. – P. 4732–4743.
12. Lee J. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. / J. Lee, C. Sun, Y. Zhou [et al.] // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, N 10. – P. 1251–1260.
13. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. / B. Drogat, P. Auguste, D. T. Nguyen [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 14. – P. 6700–6707.

14. Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. / G. Auf, A. Jabouille, S. Guérin [et al.] // Proceeding National Academy of Sciences U.S.A. – 2010. – Vol. 107, N 35. – P. 1555–1558.

15. Cao H. Expression and clinical significance of activating transcription factor 3 in human breast cancer. / H. Cao, Z. X. Yang // Iran. Journal of Basic Medicine Science. – 2013. – Vol. 16, N 11. – P. 1151–1154.

16. Upregulation of ATF-3 is correlated with prognosis and proliferation of laryngeal cancer by regulating Cyclin D1 expression / J. Feng, Q. Sun, T. Wu [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2013. – Vol. 6, N 10. – P. 2064–2070.

17. Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target gene of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness

/ M. Tamura, Y. Sasaki, R. Koyama [et al.] // Oncogene. – 2014. – Vol. 33, N 40. – P. 4837–4846.

18. Regulation of myeloid leukemia factor-1 interacting protein (MLF1IP) expression in glioblastoma. / S. H. Hanissian, B. Teng, U. Akbar [et al.] // Brain Research. – 2005. – Vol. 1047, N 1. – P. 56–64.

19. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown. / D. O. Minchenko, K. I. Kubajchuk, O. V. Hubenia [et al.] // Advances in Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 2, N 2. – P. 198–206.

20. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. / Auf G., Jabouille A., Delugin M. [et al.] // BMC Cancer, 2013, Vol. 13(1). – P. 597.

Надійшла до редколегії 26.01.15

Д. Цимбал, вед. инж., Д. Минченко, канд. мед. наук., И. Кривдюк, асп., А. Минченко, проф.
Институт биохимии имени А.В. Палладина, Киев, Украина

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНОВ *ATF3*, *FOXF1* І *CENPU* В КЛЕТКАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87

С УГНЕТЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМА ERN1 ПРИ ДЕФИЦИТІ ГЛЮТАМІНА І ГЛЮКОЗИ

Установлено, що рівень експресії генів транскрипційних факторів *ATF3* і *FOXF1* при дефіциті глютаміна в середі збільшувався в клітках гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ферментом ERN1, а ген супресор пухликового росту *CENPU* при цих умовах знижувався. В той же час, в клітках гліоми з угнетеною активністю ERN1 рівень експресії гену *FOXF1* при дефіциті глютаміна суттєво не змінювався, ген *ATF3* збільшувався, а ген *CENPU* знижувався. Угнетення ERN1 значительно посилювало ефект дефіциту глютаміна на експресію гену *ATF3*, але при цьому не змінювало чутливості гену *CENPU* до дефіциту цієї амінокислоти. Експресія гену *FOXF1* при дефіциті глюкози знижувалася, але тільки в клітках з функціонально активним ERN1. Угнетення ERN1 зменшувало рівень експресії генів *ATF3* і *FOXF1* і посилювало експресію гену *CENPU* в клітках гліоми при стандартних умовах їх вирощування. Таким чином, гени *ATF3*, *FOXF1* і *CENPU* задіяні в регуляції процесів проліферації в клітках гліоми і є чутливими до дефіциту глюкози і глютаміна в залежності від функції ферменту ERN1.

Ключові слова: експресія генів, протеїнкінази, клітки гліоми, дефіцит глюкози і глютаміна, ERN1.

D. Tsymbal, leading engin., D. Minchenko, PhD., I. Kryvdiuk, PhD stud., O. Minchenko, prof.
Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF *ATF3*, *FOXF1* AND *CENPU* GENES IN U87 GLIOMA CELLS WITH SUPPRESSED FUNCTION OF ERN1 SIGNALING ENZYME UPON GLUTAMINE AND GLUCOSE DEPRIVATION

It was shown that the expression level of transcription factors *ATF3* and *FOXF1* genes is increased, but tumor suppressor gene *CENPU* is strongly decreased in U87 glioma cell with functionally active the sensor and signaling enzyme ERN1 upon glutamine deprivation condition. At the same time, in glioma cells with suppressed activity of ERN1 the expression level of *FOXF1* gene does not change significantly upon glutamine deprivation, but *ATF3* gene is increased and *CENPU* is decreased; however, the inhibition of ERN1 significantly enhances the sensitivity of *CENPU* gene to glutamine deprivation. The expression of *FOXF1* gene is decreased upon glucose deprivation condition only in cells with functionally active ERN1. Inhibition of ERN1 down-regulates the expression levels of *ATF3* and *FOXF1* genes as well as up-regulates *CENPU* gene expression in glioma cells upon standard growing condition. Thus, the *ATF3*, *FOXF1* and *CENPU* genes are related to the regulation of cell proliferation in glioma cells and are sensitive to glutamine and glucose deprivation in dependence of ERN1 enzyme function.

Key words: gene expressions, *ATF3*, *FOXF1*, *CENPU*, glioma cells, glucose and glutamine deprivations, ERN1.

UDC 616-006

T. Nikolaenko, PhD stud., N. Petruk, stud., D. Shelest, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INFLUENCE OF VEGF, EGF AND THEIR ANTAGONISTS ON PROLIFERATIVE ACTIVITY AND GLUCOSE CONSUMPTION BY ENDOTHELIAL CELLS

In the article the proliferative activity of endothelial cells and endothelial cells of glucose consumption in terms of their previous incubation with EGF, VEGF and their antagonists.

Key words: VEGF, EGF, teralok, herceptin, anti-VEGF.

Introduction. Vascular endothelial cells cover the entire inner surface of blood vessels in the body. They play an important role in tissue homeostasis, fibrinolysis and coagulation, blood-tissue exchange, vasotonus regulation, the vascularization of normal and neoplastic tissues, and blood cell activation and migration during physiological and pathological processes [1].

Angiogenesis is a complex multistage process, the final stage of which is the formation of vascular network from endothelial cells. Proliferation and differentiation of them is regulated by a number of biologically active molecules and primarily depends on the presence of nutrient substrates and growth factors in microenvironment [2]. Angiogenesis is subject to a complex control system with proangiogenic and antiangiogenic factors. In adults, angiogenesis is tightly controlled by this "angiogenic balance", i.e., a physiological balance between the stimulatory and inhibitory signals for blood vessel growth. One of the most important proangiogenic factors is vascular endothelial growth factor (VEGF) [3].

One of the promising directions of chemotherapy in the last decades is the inhibition of tumor angiogenesis, the advantages of which are low cytotoxicity against normal

tissues and the absence of drug resistance, since the main target of angiogenesis are the endothelial cells [4]. In previous studies we have shown a stimulating effect of pro-angiogenic cytokines VEGF and EGF on proliferation of endothelial cells of MAEC line [5], but influence of these growth factors on the consumption of trophic substrates by cells from microenvironment was not examined. Glucose is an essential metabolic substrate of all mammalian cells for energy demand. It is taken up into cells by energy-independent transportation down its concentration gradient, which is mediated by glucose transporter proteins [6]. Transport of glucose across the plasma membrane of mammalian cells is the first rate-limiting step for glucose metabolism and is mediated by facilitative glucose transporter (GLUT) proteins. The main glucose transporter isoforms in the endothelial cells is GLUT1 [7].

Therefore the aim of this study was to investigate proliferative activity of endotheliocytes and glucose consumption by MAEC under the conditions of its preincubation with aforementioned pro-angiogenic cytokines and their antagonists.

Materials and methods.

2.1 Cell line

Mouse aortic cell line (MAEC) isolated from mouse aorta and spontaneously immortalized in culture were used [5]. MAEC preserve the main biological properties of normal endotheliocytes, including the ability to differentiation and formation of procapillary structures *in vitro*. MAEC were incubated in DMEM medium (Sigma, USA) supplemented with 10% FBS (Sigma, USA), 2mM L-glutamine and 40 mg/ml gentamicin. Cell lines were cultured at the standard conditions at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂. After adaptation of cells to culture medium test-agents were added: VEGF (vascular endothelial growth factor), antiVEGF (antibody specific for VEGF), EGF (epidermal growth factor), herceptin and teralok (antagonists of EGF). Incubation of cells with agents continued 48 hours after the period of cell adaptation in normal conditions for 4 hr.

2.2 Proliferative assay.

The number of living cells was determined in wells using MTT-colormetric test [8] and cell counts were performed using a tripan blue dye after 48 hours incubation with VEGF, antiVEGF, EGF, herceptin and teralok. Mitogenic effect was evaluated as percent increase cell number relative to control. Initial cell concentration was about 1×10^5 cells/ml in the sample volume of 200 μ l.

2.3 Determination of glucose by glucose-oxidase method.

Determining the level of glucose in the incubation medium of endothelial cells was performed using a standard set based on glucose-oxidase reaction which we modified for culture medium of cells. Initial cell concentration was about 1×10^5 cells/ml in the sample volume of 200 μ l. Determination was performed according to the protocol of the manufacturer "Felicet-Diagnostics" (Ukraine), for this to 20 ml of the medium was added 1 ml bireagent and after 20 minutes spectrophotometrically measured absorbance of the solution at a wavelength of 500 nm. Calculation of the glucose concentration was performed using the formula:

$$C = 10.0 \cdot E_{\text{ex.}} / E_{\text{cal.}}, \text{ where}$$

C – concentration of glucose in the expirement sample, mM/ l; 10.0 – the concentration of glucose in the calibration solution, mM / l; $E_{\text{ex.}}$ – absorbing of the test sample; $E_{\text{cal.}}$ – absorbing calibration samples.

2.4 Statistical analysis.

Experimental data were analysed using descriptive methods, by Student's t-criterion and by the method of nonlinear regression.

Results and discussion. The study of proliferative activity of endotheliocytes and glucose consumption by MAEC under the conditions of their pre-incubation with pro-angiogenic cytokines and their antagonists hasdemonstrated that they have quite different effects on these two parameters.

It is shown that VEGF and EGF cause cell proliferation to the same extent, which is $30 \pm 1.5\%$ ($p < 0.05$) more compared to controls (Fig. 1). Because these two factors are the main factors that initiate and stimulate proliferation of endotheliocytes. In addition VEGF affects on the basic functional characteristics endothelial cells, such as adhesion, migration, intracellular mitogenic signal transmission, intercellular contacts, vascularization and neovascularization.

AntiVEGF specific antibodies, respectively caused decrease of cells proliferation by $55 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$) vs. control. Herceptin and teralok as antagonists of EGF, also caused the decrease in proliferative activity of endotheliocytes 20 ± 1.1 and $30 \pm 2.3\%$ ($p < 0.05$) vs. control respectively. In addition, antiVEGF inhibits the proliferative activity of cells significantly more pronounced for herceptin and teralok.

All the processes that take place in the body need of energy, so the next step of our study was to determine the level absorption of glucose by cells.

It is shown that the level of glucose consumption by cells increased by $40 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$) under the influence of VEGF, whereas antiVEGF caused its decrease by $50 \pm 3.1\%$ ($p < 0.05$). However, decrease in glucose consumption by cells at $58 \pm 3.4\%$ ($p < 0.05$) under conditions of endotheliocytes pre-incubation with EGF was demonstrated. Antagonists of EGF, herceptin and teralok also caused the decreasing of this parameter, though less pronounced – $40 \pm 2.9\%$ ($p < 0.05$) (Fig. 2). The amount of glucose that has been absorbed by cells under the influence of EGF, herceptin and teralok is almost the same, but the number of cells varied considerably. Interestingly, EGF has stimulated cell proliferation at the level of VEGF, but EGF has stimulated absorption of glucose least of all.

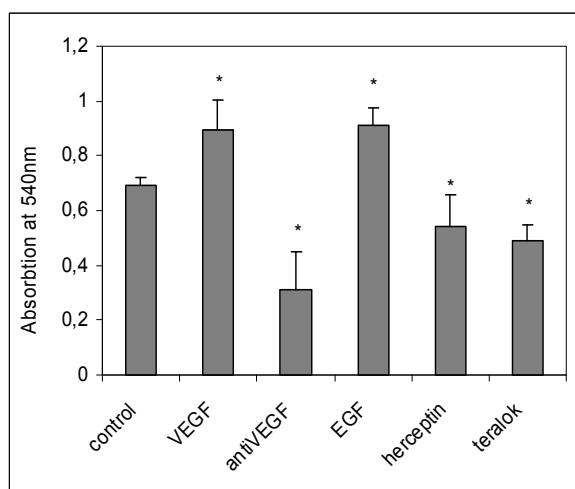


Fig. 1. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity of endothelial cells
* – $p < 0.05$ relative to control

EGF activation causes formation of various Erb family members homodimers and heterodimers on tumor cells, that leads to activation of cancer cells proliferation and changes in electrokinetic potential [9]. Possible EGF shows

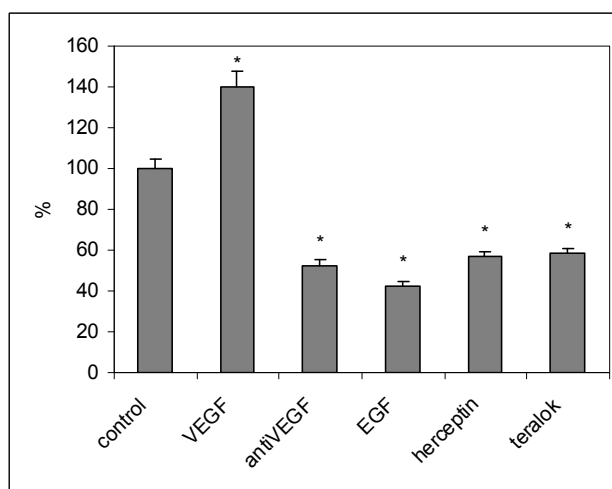


Fig. 2. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on endothelial glucose consumption in terms of number of cells in % compared with control
* – $p < 0.05$ relative to control

same effect on endothelial cells. So change the electrokinetic potential is associated with the electrophoretic mobility of cells. Influence of EGF on cells mobility is related with their mitogenic activity and

stimulation of proliferation. Strongly metastatic phenotype is associated with the expression of voltage-gated Na⁺ channels (VGSCs) and inhibition of these channels strongly inhibits lateral motility cells. Electric-field-enhanced directional migration correlates well with the expression level of EGF receptor (EGFR/ErbB1). These results suggest that electric signals might play a role in metastasis of breast cancers by enhancing cell migration through the ErbB-signalling pathway [10].

It has been shown [11] that the stimulation of endothelial cells with electric field leads to elevated secretion of VEGF and reorientation of endothelium. Activation of VGSC that similarly to stimulation with weak electric field, may have result in reorganization of endothelium [12] elevation of VEGF secretion, change in cell orientation (perpendicularly to the direction of electric field) and migration – a key event in angiogenesis [13].

Transport of amino acids (including L-glutamine) is Na⁺-dependent process. MAEC were incubated in medium which contains glutamine. Activation of L-glutamine transport via the Na⁺-dependent system was dependent on de novo protein and RNA synthesis, and as L-glutamine supplementation protected endothelial cells from H₂O₂ injury [14]. Possibly EGF stimulates the transport of glutamine and its involvement in metabolic pathways of cells.

While VEGF enhances microvascular permeability, transport of glucose and modulates Ca²⁺ signaling in endothelial cells [15]. In addition VEGF has a pronounced effect on the functional state of endothelial cells compared to EGF.

Conclusion. For all studied agents, except for EGF, the same direction effects on proliferative activity and glucose consumption of endothelial cells were found. Reducing consumption of glucose under the influence of EGF attached to its expressed mitogenic action is of interest for further research.

References

1. W. Risau. Differentiation of endothelium / W. Risau // The Journal of Federation of the American Societies for Experimental Biology. – 1995. – Vol. 9. – P. 926-933.
2. Dai J. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification / J. Dai, A. B. Rabie // Journal of Dental Research. – 2007. – Vol. 10. – P. 937-950.
3. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoebe, B. Landuyt, M. S. Highley et al // Pharmacological Reviews. – 2004. – Vol. 56. – P. 49-580.
4. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors / T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, K. Alitalo // Cancer Research. – 2000. – Vol. 60. – P. 203-212.
5. Garmanchuk L. V. Influence of pro-angiogenic cytokines on proliferation and survival of endothelial cell / L. V. Garmanchuk, O. N. Pyaskovskaya, G. I. Solyanik // Biopolymers and cell. – 2010. – Vol. 3. – P. 87-193.
6. Gould G. W. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression / G. W. Gould, G. D. Holman // Biochemical Journal. – 1993. – Vol. 295. – P. 329-341.
7. Yeh W. L. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia / W. L. Yeh, C. J. Lin, W. M. Fu // Molecular Pharmacology. – 2008. – Vol. 73. – P. 170-177.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays / T. Mosmann // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 55-63.
9. Riese D. J. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network / D. J. Riese, D. F. Stern // Bioessays. – 1998. – Vol. 20. – P. 41-48.
10. EGF receptor signalling is essential for electric-field directed migration of breast cancer cells / J. Pu, C. D. McCaig, L. Cao et al // Journal of Cell Science. – 2007. – Vol. 120. – P. 3395-3403.
11. Zhao M. Electrical stimulation directly induced pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors / M. Zhao, H. Bai, E. Wang et al // Journal of Cell Science. – 2003. – Vol. 117. – P. 397-405.
12. He P. Measurement of membrane potential of endothelial cells in single perfused microvessels / P. He, F. E. Curry // Microvascular Research. – 1995. – Vol. 50. – P. 183-98.
13. McCaig C. D. Physiological electric fields modify cell behavior / C. D. McCaig, M. Zhao // Bioassays. – 1997. – Vol. 19. – P. 819-826.
14. Hinshaw D. B. Protective effect of glutamine on endothelial cell ATP in oxidant injury / D. B. Hinshaw, J. M. Burger // Journal of Surgical Research. – 1990. – Vol. 49. – P. 222-227.
15. Michel C. C. Microvascular permeability / C. C. Michel, F. E. Curry // Physiological Reviews. – 1999. – Vol. 79. – P. 703-761.

Надійшла до редколегії 02.04.15

Т. Ніколаєнко, асп., Н. Петрук, студ., Д. Шелест, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ VEGF, EGF ТА ЇХ АНТАГОНІСТІВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ І СПОЖИВАННЯ ГЛЮКОЗИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ

В статті розглянуто проліферативну активність ендотеліальних клітин і споживання глюкози ендотеліальними клітинами в умовах їх попередньої інкубації з EGF, VEGF та їх антагоністами.

Ключові слова: VEGF, EGF, тералок, герцептин, анти-VEGF.

Т. Николаенко, асп., Н. Петрук, студ., Д. Шелест, асп., Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ VEGF, EGF И ИХ АНТАГОНИСТОВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПОТРЕБЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

В статье показано изучении пролиферативной активности эндотелиальных клеток и потребления глюкозы эндотелиальными клетками в условиях их предварительной инкубации с EGF, VEGF и их антагонистами.

Ключевые слова: VEGF, EG, тералок, герцептин, анти-VEGF.

УДК 582.475:632.938:631.48(477.43)

І. Одукалець, асп., М. Мусієнко, д-р біол. наук, О. Ольхович, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИЧИН ВСИХАННЯ *PINUS SYLVESTRIS* L. В ШТУЧНИХ СОСНОВИХ НАСАДЖЕННЯХ НПП "ПОДІЛЬСЬКІ ТОВТРИ"

Доказано, що на всихання *Pinus sylvestris* на території НПП "Подільські Товтри" впливають особливості ландшафту, будова та хімічний склад ґрунту. Досліджувані ґрунти достатньо забезпечені гумусом (2,05-3,63 %), але мають низький вміст фосфору та надлишковий вміст кальцію і магнію. На пригнічений стан соснових насаджень впливають листяні породи, які за підвищених температур відрізняються інтенсивним розвитком вегетативних органів та створюють природну конкуренцію видам сосни у фітоценозі. Ущільнений ґрунт перешкоджає нормальному росту сосни. В ущільнених ґрунтах життєві процеси проходять повільніше, затримується ріст коренів, погіршується по-стачання до них води і повітря, що може спричинювати всихання сосни.

Ключові слова: Національний природний парк "Подільські Товтри", річка Дністер, *Pinus*, щільність ґрунту, склад ґрунту, штучні насадження.

Вступ. Національний природний парк "Подільські Товтри", який займає 261316 га, розміщений на території Хмельницької області. За геоботанічним районуван-

ням одна частина парку належить до Покутсько-Медоборського округу букових, грабово-дубових та дубових лісів, справжніх лук та лучних степів Південно-

© Одукалець І., Мусієнко М., Ольхович О., 2015

пільської Західноподільської підпровінції, широколистяних лісів, луків, лучних степів та евтрофних боліт Центральноєвропейської провінції широколистяних лісів Європейської широколистянолісової області, а інша – до Центральноподільського округу грабово-дубових та дубових лісів і суходольних лук Української лісостепової підпровінції Східноєвропейської лісостепової провінції дубових лісів, остепнених лук та лучних степів Лісостепової підобласті Євразійської степової області [9]. Для даної території характерні широколистяні ліси, штучні насадження хвойних культур, а також степова, лучна, кальцепетрофітна, чагарникова, болотяна, прибережно-водна та водна рослинності. Значну площу займають насадження хвойних, які представлені видами *Pinus*.

Соснові ліси на цій території були поширені здавна. Впродовж століть під впливом природних і антропогенних факторів відбулася сукцесія, завдяки чому природні лісові фітоценози (мішані та хвойні ліси) цього регіону змінилися на дубові, дубово-грабові та букові ліси. У 1969 році Харківською експедицією Всесоюзного державного проектно-пошукового інституту "СОЮЗГППРОЛІСГОСП" було розроблено і впроваджено штучне заліснення неугідь на берегах Дністра в Панівецькому лісвництві Кам'янець-Подільського лісового господарства. У листопаді 1970 року міністерством лісового господарства УРСР була прийнята широкомасштабна програма заліснення схилів річки Дністер і її приток, завдяки якій на території Новоушицького і Кам'янець-Подільського адміністративних районів було створено Новоушицьку лісомеліоративну станцію [2]. Для заліснення схилів було обрано 10 типів лісових культур, домінуючими з яких були види роду *Pinus* (*P. sylvestris*, *P. pallasiana* та *P. nigra*).

Таким чином, види роду *Pinus* на досліджуваних територіях є не корінними породами, а інтродуцентами, які штучно насадженні з метою зупинення ерозійних процесів вапнякових відкладень, кам'янистих степів та біорекультивації вапнякових відвалів, що утворилися після промислових розробок надр. Вивчення особливостей сформованих штучних фітоценозів за домінування *Pinus* є актуальним для подальшого прогнозування можливості їхнього існування та перспективи розширення насаджень на досліджуваних територіях, а саме схилах річки Дністер та її приток.

Оцінка нових територій для штучного насадження видів роду *Pinus* і забезпечення їхнього оптимального росту і розвитку передбачає дослідження ґрунту, оскільки саме від будови ґрунту залежить водний режим, газообмін між ґрунтом і атмосферою та інтенсивність протікання біологічних процесів всередині ґрунту. Відомо, що кожний тип ґрунту має власний характерний профіль, вивчивши який можна визначити специфіку ґрунту та доречність його використання під ті, чи інші культури. Будова ґрунту залежить від механічного складу та розташування ґрунтових грудок і частинок, структури, часу і способів обробки, а також від потужності розвитку кореневих систем рослин і діяльності ґрунтової мікрофлори [6]. На території НПП "Подільські Товтри" подібні дослідження не проводились, тому нашим завданням було провести оцінку придатності ґрунтів для створення нових штучних лісових насаджень за участі видів роду *Pinus*.

Матеріали та методи досліджень.

Досліджувані постійні пробні площі (ППП) закладені у 2010 році за загальноприйнятими в лісвництві методиками [1], з урахуванням вимог вивчення лісових культур [7].

Обрані для дослідження ППП розміщені поблизу таких населених пунктів: ППП №2 с. Гораївка, ППП №6 с. Баговиця, ППП №7 с. Бабшин та характеризуються наступними таксаційними показниками.

Насадження на ППП №2 розміщені в південно-східній експозиції схилу 20°, площа представлена змішаним насадженням, до складу якого входять сосна кримська, сосна звичайна та акація біла. Вік даних насаджень складає 25 років, середня висота – 10 м, середній діаметр стовбура – 29 см. Нами виявлено, що на даній ППП серед досліджуваних 100 дерев пошкоджених було 62, що свідчить про ослаблений стан деревостану.

На ППП №6 представлені насадження чистого типу за участі сосни звичайної. Ділянка розміщена на схилі південно-західної експозиції з нахилом 20°. За рекреаційною характеристикою це напіввідкриті простори з рівномірним розміщенням дерев, 3 клас естетичної оцінки, 3 клас пішохідної доступності, рекреаційна оцінка середня, 4 клас стійкості, 1 стадія дигресії. Вік сосни 30 років, середня висота 10 м, діаметр 21 см. Бонітет 4 класу.

На досліджуваній ППП №7 є насадження з переважанням сосни звичайної віком 23 років, середнім діаметром стовбура – 19 см, висотою – 7 м. Закриті простори-деревостани горизонтальної зімкнутості характеризуються 4-тим класом естетичної оцінки. Дану ділянку можна віднести до 3-го класу пішохідної доступності та низької рекреаційної оцінки. Стан насаджень – пошкоджений. Серед досліджуваних 100 дерев – 18-ть сухих та 34 посихлих в нижній частині стовбура.

За матеріалами лісовпорядкування і обліку лісового фонду [16] визначено розміщення чистих та змішаних штучних насаджень та проведено опис лісотаксаційних особливостей сосни: вік, висоту, середній діаметр стовбура, експозицію, групу віку, клас бонітету, тип лісу та повноту насаджень.

Життєвий стан сосни оцінено візуально за 5-ти бальною шкалою: 1-без ознак пошкодження, 2-ослаблені, 3-сильноослаблені, 4-засихаючі, 5-сухостій [17].

З кожної ППП у 2010 та 2013 роках конвертним способом відібрано зразки ґрунту для проведення агрохімічного аналізу [8]. Хімічний аналіз проводили в лабораторії Хмельницького обласного центру родючості ґрунтів за основними агрохімічними показниками. У зразках ґрунту визначали гумус та азот за методом Тюріна за ГОСТ-27753.1, за ГОСТ-27753.7 [14], фосфор та калій за модифікованим методом Чірікова ДСТУ-4115 [5], pH – за ГОСТ-26484-85, суму основ Са+Mg – за методом Каппена за ГОСТ-27821-88.

Зразки для визначення щільності та вологості ґрунту відбирали за допомогою спеціальних кілець. У них визначали щільність ґрунту методом ріжучого кільця. Маса та внутрішній об'єм кільця були відомі, відбирали зразок ґрунту кільцем (без порушення структури), надлишки ґрунту обережно зрізували. Після визначення маси кільця з ґрунтом із цієї величини вираховували масу кільця, а отриманий результат ділили на внутрішній об'єм кільця [3].

Вміст вологи в ґрунті визначали ваговим методом. Бюкси з ґрунтом зважували на вагах, а потім витримували в термостаті при температурі 105°C до постійної маси. Вологість, виражену у відсотках від абсолютно сухого ґрунту, визначали за формулою:

$$W = \frac{b}{p} \cdot 100\% [3].$$

Для опрацювання отриманих експериментальних даних використовували аналітичні методи та методи математичної статистики "Microsoft Excel 2007".

Результати та їх обговорення. Таким чином, в результаті наших досліджень було відмічено, що на усіх досліджуваних ділянках сосна, орієнтовно у віці 20-30 років, починає всихати, здебільшого на 12-16 см у діаметрі. Причини цього не з'ясовані, тому потребують

ретельного дослідження усіх складових, які можуть спричинювати це явище.

Нами було з'ясовано, що вид *Pinus sylvestris* зростає на чорноземах та карбонатних ґрунтах. За хімічним

аналізом гумусового горизонту ґрунтів експериментальних ППП нами було виявлено певні відмінності в основних досліджуваних показниках (рис. 1, 2).

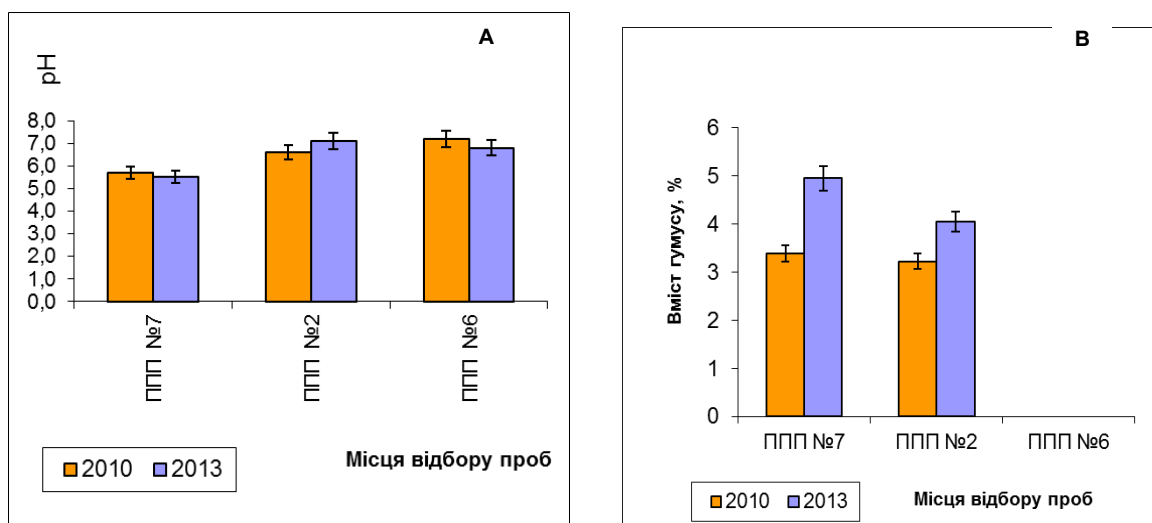


Рис.1. pH (А) та вміст гумусу (В) в досліджуваних ґрунтах НПП "Подільські Товтри" в 2010 та 2013 роках

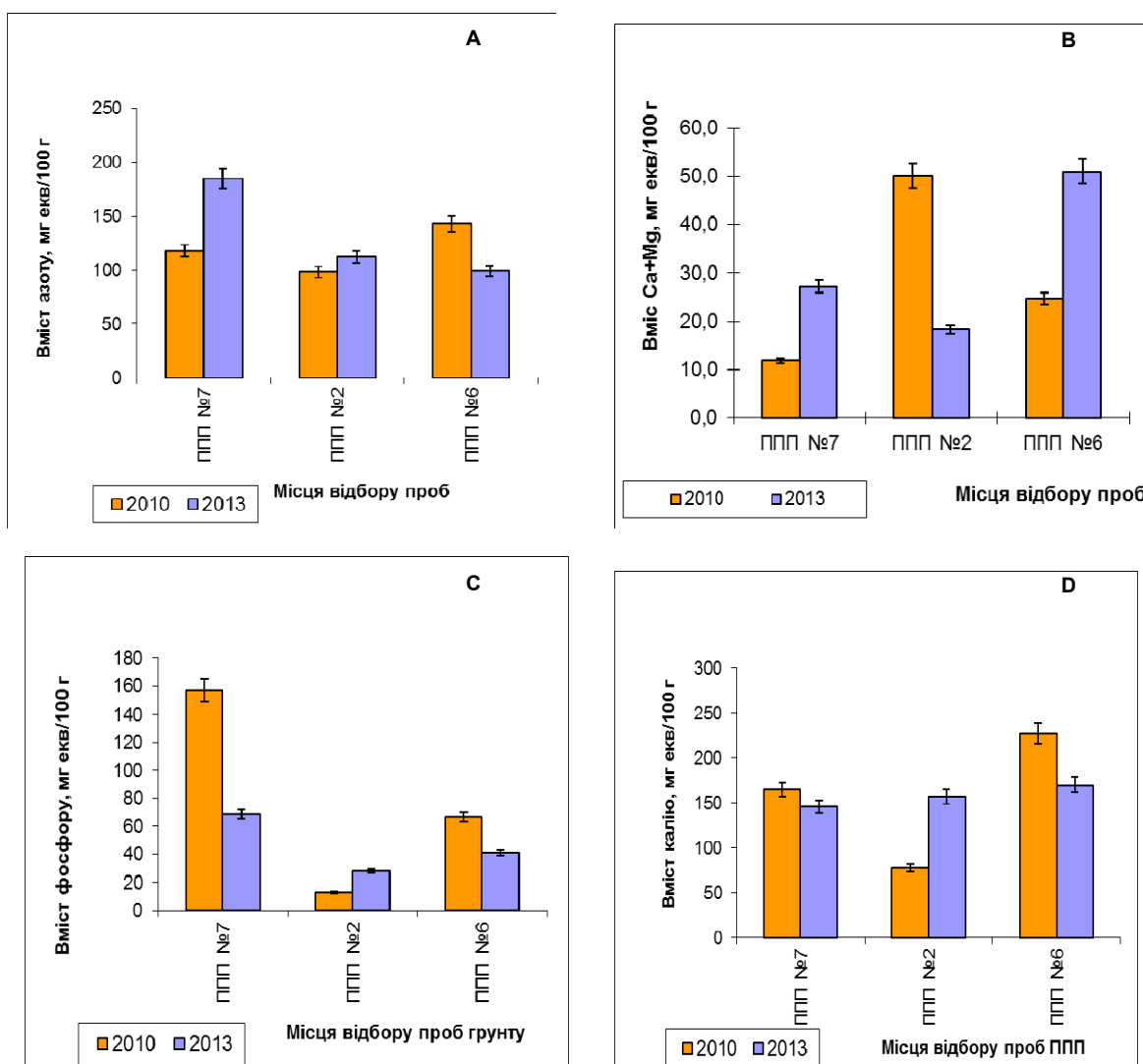


Рис. 2. Вміст азоту (А), Са+Мг (В), фосфору (С) та калію (D) в досліджуваних ґрунтах НПП "Подільські Товтри" в 2010 та 2013 роках

Отже, ППП № 2 представлена карбонатними ґрунтами та нейтральним рН. Кількісні показники гумусу, азоту, фосфору та калію підвищились, а вміст кальцію мав тенденцію до зменшення. Стан деревостану був сильно пошкодженим, адже зі 100 обстежених дерев 69 виявились сухими. Незважаючи на велику кількість у ґрунті поживних речовин, на даній ППП №2 сосна інтенсивно всихає.

На ППП №6 ґрунт дерново-карбонатний, рН дорівнює нейтральному. За роки досліджень кількість азоту, фосфору та калію зменшилась, а рівень суми поглинутих основ (Ca+Mg) підвищився. У зв'язку з тим, що у ґрунті даної пробної площі високий вміст кальцію, нам не вдалося визначити вміст гумусу. Загальний стан дерев пригнічений, у нижній частині стовбура дерева вже починають всихати.

ППП №7, що розміщена поблизу с. Бабшин представлена слабко лужними ґрунтами, в досліджені роки рН коливався в межах 5,5-5,7. Стосовно вмісту суми поглинутих основ (Ca+Mg), то з 2010 по 2013 рр. відмічено підвищення з 11,8 до 27,2 мг екв/100 г. Гумусу у 2010 році виявлено 3,39%, а в 2013 – 4,95%. Кількість азоту у ґрунті збільшилася, а фосфору та калію, навпаки, зменшилася. Сосна на даній ділянці починає всихати, зі 100-та обстежених дерев 18-ть вже всохли. Стан насадження можна віднести до пригніченого.

Визначивши хімічний склад ґрунту на досліджуваних ділянках штучних насаджень сосни, ми з'ясували, що *Pinus sylvestris* зростає на ґрунтах з відносно високим вмістом гумусу (2,05-3,63 %), що свідчить про забезпечення рослин мінеральними поживними речовинами. Оптимальний вміст гумусу у суглинистих ґрунтах складає 2,5 – 3,0 %. Те саме можна сказати і про вміст кальцію та магнію, який є надто високим. Так, при нормі 9,1 – 12 мг/екв /100г на ППП №2 в 2010 році було аж 50 мг/екв /100г, хоча в 2013 році його виявили вдвічі менше (25,7 мг/екв /100г), але все одно його було значно більше за норму.

Відомо [15], що у 14-річному віці сосна звичайна щорічно поглинає коренями і повертає в ґрунт з опадом

відповідно: азоту – 36,7 і 18; кальцію – 22,3 і 15; калію – 17,3 і 5; фосфору – 4,2 і 1,5; магнію – 4,7 і 3; в 30-річному віці: азоту – 47 і 21; кальцію – 43,9 і 23; калію – 19,4 і 6; фосфору – 5,9 і 1,5; магнію – 8,3 і 4; у 95- річному віці: азоту – 13 і 11, кальцію – 13,5 і 12; калію – 4,6 і 3; фосфору – 1,4 і 1; магнію – 2,5 і 1 кг на 1 га. Крім того, показано, що у сосняків у стадії змикання, порівняно з сосняками у стадії до змикання і зріджування, мінімальні вміст азоту, фосфору, калію, кальцію, магнію, а також загальна сума поглинутих основ. Це можна пояснити тим, що сосна звичайна у віці приблизно 30 років максимально вилучає мінеральні елементи з ґрунту і мінімально повертає їх з опадом в ґрунт. Тобто 30-річні сосни на досліджуваних ППП більше поглинають і менше виділяють у ґрунт іонів кальцію, азоту, калію та фосфору. Таке пояснення, можливо, і дозволяє припускати, що сосна як кальцефоб, поглинаючи значну кількість кальцію в процесі свого росту, починає всихати.

Відомо, що будова ґрунту визначає умови життя рослин. Вона формує середовище, в якому зосереджені вода, повітря, рослинні рештки, мікроорганізми і корені рослин. Показник щільності ґрунтів, або об'ємну масу, широко використовують у землеробстві, під час оцінювання якості ґрунту. Рослини сосни однаково погано реагують, як на надмірне розпушення, так і на ущільнення ґрунту. У дуже ущільненому ґрунті утруднюється ріст коренів, погіршується постачання до них води і повітря, а у надмірно розпушеному ґрунті збільшується випаровування ґрунтової вологи, підсилюється розкладання органічних залишків і вимивання утворених при цьому рухливих поживних речовин в глибокі шари. Саме тому, для з'ясування умов росту насаджень сосни на території НПП "Подільські Товтри", нами було проведено визначення вологості та щільності ґрунту (рис.3).

ґрунт вважають пухким, якщо щільність гумусового горизонту дорівнює 0,90 – 0,96 г/см³, нормальним, якщо щільність дорівнює 0,96 – 1,15; ущільненим – за 1,15 – 1,25; сильно ущільненим і таким, що вимагає розпушування – більше 1, 25.

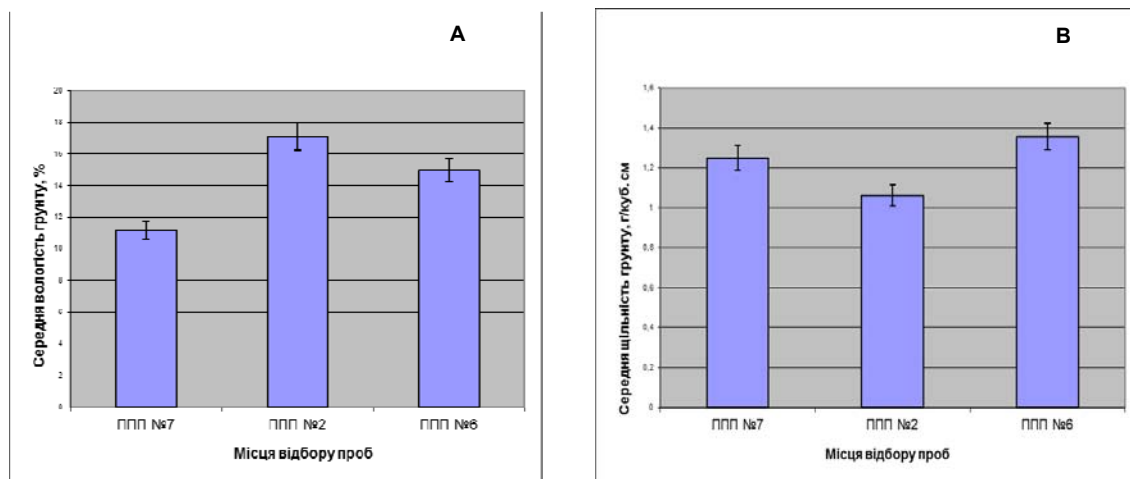


Рис. 3. Показники вологості (А) та щільності ґрунту (В) досліджуваних ділянок НПП "Подільські Товтри"

Так, за нашими дослідженнями ґрунт на ППП №2, № 6, № 7 був ущільненим. В ущільнених ґрунтах життєві процеси проходять повільніше, затримується ріст коренів, погіршується постачання до них води і повітря, що може спричинювати всихання сосни.

В ґрунтах лісів, які не використовувалися в сільсько-господарському виробництві, відсутній основний фак-

тор, що впливає на щільність – механічний обробіток. Цикл перетворення елементів у цих умовах не супроводжується їх вилученням, як це відбувається при обробітку польових культур. У природних умовах ґрунт є замкненою термодинамічною врівноваженою системою. На щільність ґрунту впливають такі фактори, як волога, діяльність тварин, температура та атмосферний тиск.

Такі явища, як замерзання і розмерзання води, нагрівання та охолодження, ріст коренів – створюють значний тиск, здатний викликати деформації структури ґрунту.

Досить детально щільність ґрунтів була описана академіком УААН В.В. Медведєвим в 2004 році. У даній роботі, з використанням великої кількості експериментального матеріалу, переконливо показано вплив будови ґрунту на процеси, що протікають в ньому, особливо на ріст і розвиток коренів дерев [13].

Якщо проаналізувати лісотаксаційні характеристики насаджень, то ми побачимо, що насадження ППП №2 є змішаними та створеними за участі листяних порід, а листяні породи дерев є середньо-вимогливими до високих температур, реагують на підвищення температури інтенсивним ростом та розвитком вегетативних органів. Можливо, пригнічення сосни спостерігається тому, що відбувається боротьба за виживання та конкуренція з іншими культурами фітоценозу.

Висновки.

1. Умови Національного природного парку "Подільські Товтри" є несприятливими для росту *Pinus sylvestris*. На життєздатність *P. sylvestris* вздовж схилів Дністра впливають різні фактори, такі як особливості ландшафту, будова та склад ґрунту, насамперед хімічний. Досліджувані ґрунти достатньо забезпечені гумусом (2,05-3,63 %), але мають низький вміст фосфору та надлишковий вміст кальцію і магнію.

2. На пригнічений стан соснових насаджень за присутності інших видів на території НПП "Подільські Товтри" впливає їхній видовий склад, насамперед листяні породи, які за підвищених температур характеризуються інтенсивним розвитком вегетативних органів та створюють природну конкуренцію видам сосни у фітоценозі.

3. Ущільнений ґрунт на ППП №2, ППП №6 та ППП №7 перешкоджає нормальному росту сосни. В ущільнених ґрунтах життєві процеси проходять повільніше, затримується ріст коренів, погіршується постачання до них води і повітря, що може спричинювати всихання сосни.

Список використаних джерел

1. Ануцин Н.П. Лесная таксация. – М. 1982, Лесная промышленность. – 547 с.
2. Вакулюк П.Г. Нариси з історії лісів України. – Фасті., 2000, Поліфаст, 2000. – 96 с.
3. Вахняк В.С., Гаврилюк В.Б. Загальне ґрунтознавство. Лабораторний практикум. 2007. – С 36-37.
4. Визначення щільності твердої фази пікнометричним методом. ДСТУ 4745:2007. Київ Держстандарт України 2008. – С 3-5.
5. Визначення рухомих сполук Р і К за модифікованим методом Чірікова. ДСТУ 4115. Київ., Державний комітет України з питань технічного регулювання та споживчої політики. 2002. – С. 3-5.
6. Гордієнко В.П., Геркіял О.М., Опришко В.П. Землеробство. – К. 1991, Вища школа. – 264 с.
7. Гордієнко М.И. Методические указания по изучению и исследованию лесных культур. – К., 1979 УСХА. – 89 с.
8. Глазовская М. А. Геохимия природных и техногенных ландшафтов СССР. – М. 1988, Высш. шк. – 328 с.
9. Дідух Я.П., Шеляг-Сосонко Ю.Р. Геоботаничне районування України та суміжних територій/ Дідух Я.П., Шеляг-Сосонко Ю.Р. // Укр. Ботан. Журн. – 2003. – 60, №1. – С. 6-17.
10. Кобранов Н.П. Обследование и исследование лесных культур. – К., 1973, РИОЛТА, 77 с.
11. Структура культурценозів роду *Pinus* L. в умовах НПП "Подільські Товтри" (Хмельницька область). // Праці Всеукраїнської науково-практичної конференції "Екологічні проблеми співіснування: людина-рослина", Дніпропетровськ, 2009. – С. 74-76.
12. Матвеев Н.М., Козлов Н.В. До питання про вплив екобіоморфного складу рослинного покриву на фізико-хімічні властивості ґрунту. /Матвеев Н.М., Козлов Н.В. // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: Вид. ЗНУ. – 2008. – вип. 13. – №1. – С.151-160.
13. Медведєв В.В. Плотность сложения почв. – Харьков, 2004, Таймс, 243 с.
14. Методические указания по определению щелочно-гидролитного азота в почве по методу Корнфилда. – Москва 1985. – С. 4-7.
15. Ремезов Н.П. Роль биологического круговорота элементов в почвообразовании под пологом леса. / Ремезов Н.П. // Почвоведение. – 1956. – № 7 – С. 68-79.
16. Тимофеев А.В. Влияние засух на рост сосны обыкновенной в различных сосняках Жигулевского заповедника Самарская Лука. /Тимофеев А.В.// Проблемы региональной и глобальной экологии. – 2007. – Т.16. – №22. – С. 810.
17. Шелуха В.П. Изменение сосновых биогеоценозов зоны широколиственных лесов при хроническом воздействии веществ щелочного типа: дис. доктора сел.-хоз. наук.: 03.00.16. – Брянск, 2003.

Надійшла до редколегії 10.12.14

И. Одукалец, асп, Н. Мусиенко, д-р биол. наук, О. Ольхович, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЧИН УСЫХАНИЯ PINUS SYLVESTRIS L. В ИСКУССТВЕННЫХ СОСНОВЫХ НАСАЖДЕНИЯХ НПП "ПОДОЛЬСКИЕ ТОЛТРЫ"

Доказано, что на усыхание *Pinus sylvestris* на территории НПП "Подольские Толтры" влияют особенности ландшафта, строение и химический состав почвы. Исследуемые почвы достаточно обеспечены гумусом (2,05-3,63%), но имеют низкое содержание фосфора и избыточное содержание кальция и магния. На подавленное состояние сосновых насаждений влияют листовые породы, которые при повышенных температурах отличаются интенсивным развитием вегетативных органов и создают естественную конкуренцию видам сосны в фитоценозе. Уплотненный ґрунт препятствует нормальному росту сосны. В уплотненных почвах жизненные процессы проходят медленнее, задерживается рост корней, ухудшается снабжение в них воды, воздуха и может вызвать усыхание сосны.

Ключевые слова: Национальный природный парк "Подольские Товтры", река Днестр, *Pinus* L., плотность почвы, состав почвы, искусственные насаждения.

I. Odukalets, PhD stud., N. Musyenko, DSc., A. Olkhovich, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

RESEARCH THE CAUSES OF PINUS SYLVESTRIS L. SHRINKING IN ARTIFICIAL PINE PLANTINGS OF THE NNP "PODILSKI TOVTRY"

It was proved that the features of landscape, structure and chemical composition of soil influence on shrinking of *Pinus sylvestris* at the territory of NNP "Podilski Tovtry". The researched soils enough provide by humus (2.05-3.63%), but have low content of phosphorus and excess of calcium and magnesium content. On depressed state pine plantations influence leaved species, which for higher temperatures differ by intensive development of vegetative organs and create the natural compete to species of pine in phytocenosis. The compacted soil prevents the normal growth of pine. At the compacted soils life processes are slower, is delayed root growth, worsening the supply them by water and air, which can cause shrinking of pine.

Keywords: National Park "Podilsky Tovtry" Dniester River, *Pinus* L., soil density, soil composition, artificial plantations.

УДК 598.252

О. Чован, асп., В. Серебряков, д-р біол. наук, І. Давиденко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

РОЗСЕЛЕННЯ ЛЕБЕДЯ-ШИПУНА (*CYGNUS OLOR* GMELIN, 1789) У ПІВДЕННІЙ ЧАСТИНІ ЛІВОБЕРЕЖНОГО ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

Досліджено шляхи розселення лебедя-шипун на півдні Лівобережного Лісостепу України, виявлено причини, які призвели до різкого збільшення чисельності та розселення виду та встановлення сучасного статусу виду на досліджуваній території.

Ключові слова: лебідь-шипун, Лівобережний Лісостеп України, популяція, розселення.

Вступ. Лебідь-шипун (*Cygnus olor* Gmelin, 1879) – представник ряду Гусеподібні (Anseriformes) який зустрічається на всій території України, крім гірських районів [18]. Птах віддає перевагу різним за розміром водоймам слабо-проточного та стоячого типу з густою прибережною та водною рослинністю. В останні десятиріччя чисельність цього швидко зростає по всій території України, зокрема відбувається розселення птахів у північно-східному напрямку. Лебідь-шипун – агресивний птах, у період розмноження він витісняє інших водоплавних птахів зі своєї гніздової території [24; 26]. У той же час з середини 30-х років XX ст. він не є мисливським птахом в Україні і знаходиться під охороною Бернської та Боннської конвенцій, а у деяких регіонах (Полтавська, Сумська, Харківська області) занесений до регіональних червоних списків [17]. Значні скупчення лебедів порушують стабільність водно-болотних екосистем. Лебеді харчуються переважно водною рослинністю, і часто знищують її набагато більше, ніж споживають. Це може призвести до зникнення певних видів такої рослинності з водойм, яка у свою чергу забезпечує живлення і притулок для багатьох видів риб та інших тварин. Дослідження, проведені у США (штат Мічиган) доводять, що лебеді-шипун опосередковано можуть впливати на розміри водних тварин. Наприклад, в озерах, які населяють лебеді, один вид риб – сонячний окунь синьозябровий (*Lepomis macrochirus*) має меншу довжину тіла, ніж особини цього ж виду в озерах, де мало чи зовсім немає лебедів [25]. В Україні таких досліджень не проводилося, проте не виключено, що з ростом чисельності лебедя-шипун в подальшому буде помічено певні негативні впливи на природні екосистеми. На сучасному етапі дослідження шляхів розселення лебедя-шипун на території України актуальним є вивчення його статусу у регіонах протягом останніх десятиків років та встановлення сучасного стану популяції цього виду.

Метою роботи було дослідження шляхів розселення лебедя-шипун на півдні Лівобережного Лісостепу України, виявлення причин, які призвели до різкого збільшення чисельності та розселення виду та встановлення сучасного статусу виду на досліджуваній території.

Матеріал та методи. Матеріал для написання статті було зібрано на основі власних спостережень під час експедицій у вказаному регіоні, а також опрацьованих літературних джерел по даному виду за останні 150 років, які стосуються досліджуваної території, анкетних даних, зібраних кафедрою зоології Київського національного університету імені Тараса Шевченка та усних повідомлень про зустрічі лебедів від мисливців, юннатів і екологів. Польові дослідження проводилися переважно у 2013-2014 рр. з викорис-

танням загальноприйнятих методик обліку водоплавних птахів [11]. За літературними джерелами та анкетними даними визначалися початкові етапи розселення виду в регіоні, експедиційні виїзди надали матеріал по сучасному поширенню лебедя-шипун на півдні Лівобережного Лісостепу України.

Результати та обговорення. Перші документальні дані про лебедів на території південної частини Лівобережного Лісостепу України можна знайти у відомості 1782-го р., на яку посилається, але не називає М.М. Сомов [15]. Згідно з даними автора, там зазначається, що лебеді-шипун "водилися" в околицях м. Чугуїв (сучасна територія Харківської області). В історичній довідці кінця 18 століття збереглося пояснення походження назви міста Лебедина (сучасна територія Сумської області) – "тут є озеро, на якому раніше було багато лебедів" [12]. За літературними даними, протягом XIII – XX ст. в Україні відбулася зміна чисельності цього виду і скорочення гніздового ареалу [22; 10]. Ще на початку XIX ст. у деяких районах досліджуваної території лебідь-шипун був звичайним видом, а вже з середини цього ж століття його чисельність тут почала різко падати. К.Ф.Кесслер [6], О.В.Чернай [19], М.М.Сомов [15] та М.І.Гавриленко [3] наводять цього птаха у фауністичних списках Лівобережного Лісостепу України у період середини XIX ст. – початку XX ст. як рідкісний пролітний чи навіть залітний вид. До середини XX ст. статус цього птаха в регіоні залишався без особливих змін. Однак у другій половині XX ст. відбулися досить значні зміни в орнітофауні Середнього Придніпров'я, що пов'язано зі спорудженням каскаду середньодніпровських водосховищ, два з яких (Кременчуцьке та Дніпродзержинське) прилягають до південно-західної частини Полтавської області (південно-західна територія Лівобережного Лісостепу України). Перші гніздові знахідки цього виду у досліджуваному регіоні датуються 1980-1983 рр. на вказаних водосховищах та у прилеглих районах після зарегулювання Середнього Дніпра (Рис. 1) [10; 14]. Проте, у літній період зустрічі лебедя-шипун реєстрували у Глобинському районі Полтавської області навіть дещо раніше, – у 1970-1971 рр. у долині лівобережної притоки Дніпра р. Кагамлик [14]. Проте, як зазначає автор, ці птахи до гніздування не приступали. На нашу думку, одним із початкових каталізаторів швидкого зростання чисельності й інтенсивного розселення лебедя-шипун у центральній частині Лівобережного Лісостепу поряд зі зниженням фактору турбування, збільшенням евтрофікації водойм [10], та у зв'язку із глобальними змінами клімату [23] було ще й створення водосховищ [20].

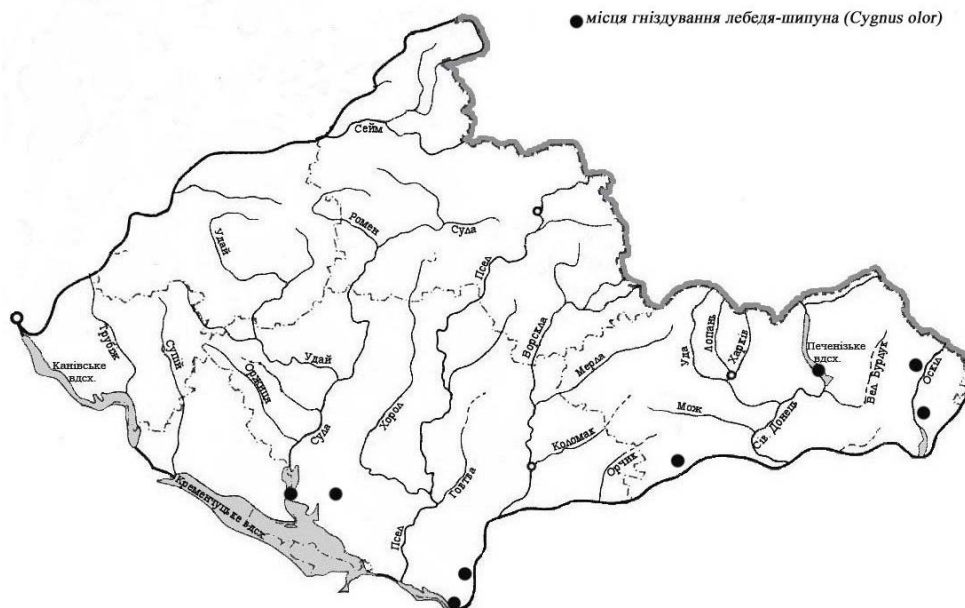


Рис. 1. Перші реєстрації лебедя-шипуна (*Cyanus olor*) на півдні Лівобережного Лісостепу України в 1980-1990 рр.

Спочатку лебідь-шипун заселив Кременчуцьке водосховище, що пов'язано з більш раннім його заповненням порівняно з Дніпродзержинським [13; 7], на якому даний вид загніздився дещо пізніше на відрізку с. Світлогірськ – с. Бородаївка (Полтавська область), а на початкових етапах формування та у перші роки після зарегулювання він тут не був виявлений [2; 8]. У подальші роки шипуни розселялися у північному та північно-східному напрямку по лівобережним притокам Дніпра – Сулі, Пслу та Ворсклі [4]. За даними В.М. Грищенка зі співавторами [5] у 1996 р. на р. Удай лебідь-шипун уже був звичайним видом. У той же час, починаючи з 1981-1984 рр. лебідь-шипун з'явився на гніздуванні у Харківській області у Куп'янському, Чугуєвському та Дворічанському районах [10]. У подальшому його регулярно реєстрували на гніздуванні у вищезазначених та прилеглих районах [21; 9; 16]. За літературними даними на р. Сухий Кагамлик у 1996 р. на 10 кілометрів русла річки гніздилися 3 пари лебедів, тобто 0,3 пари на 1 км русла ріки [14]. За нашими даними (усне повідомлення С. Безноса), на тій же ділянці р. Сухий Кагамлик (Глобинський район Полтавської області) у 2013 р. на 6 км русла гніздилися 4-5 пар птахів, що становить 0,6-0,8 пар на 1 кілометр русла. Також, у 2013 р. в пониззі р. Ворскла (Кобеляцький р-н, Полтавської області) на 6 км русла нами було обліковано 4 пари лебедя-шипуну – 0,6 пар на 1 кілометр річки. На стоячих водоймах, таких як ставки, озера, рибгоспи, водосховища кількість гніздових птахів залежить від розмірів водойм. На невеликих за площею озерах та ставках відмічалася лише одна пара. На великих водоймах, або на декількох водоймах, що розташовані поряд, можна спостерігати декілька пар гніздючих лебедів. Зокрема, на початку 1990-х на ставках Печенізького рибного господарства гніздилися 3-4 пари представників даного виду [9]. У 1994-96 рр. на Лиманських озерах (Зміївський р-н Харківської області) гніздилися 3-5 пар [1]. Ми реєстрували гніздування 4 пар лебедя-шипуну на озерах в долині р. Ворскла в околицях с. Зінці та с. Безручки Полтавського р-ну.

Висновки. На основі вищевикладеного можна припустити, що розселення лебедя-шипуну на півдні Лівобережного Лісостепу України відбувалося не з однієї

локальної популяції, а декількома шляхами (Рис. 1). Перший проходив по лівобережним притокам Дніпра від каскаду водосховищ у північному та північно-східному напрямках на західі досліджуваної території, інший – у північному напрямку по долинах р. Сіверський Донець та його приток на сході регіону. Доказом цього також слугують дані літературних джерел [1; 9; 21], дані обробки анкетних матеріалів та власні спостереження (зустрічі дорослих птахів у гніздовий період, знахідки гнізд та виводків), де найчисельніші гніздові поселення лебедя-шипуну визначені у західних придніпровських районах Полтавської області та у північно-східних районах Харківської області, згідно яких ми виділяємо Середньодніпровську (каскад дніпровських водосховищ) та Східну (долина р. Сіверський Донець, Печенізьке та Червонооскільське водосховища, долина р. Оскіл) локальні популяції (Рис. 2).

У центральних районах Лівобережного Лісостепу України відмічені лише поодинокі випадки гніздування лебедя-шипуну. На нашу думку, нерівномірність розселення досліджуваного виду по даній території пояснюється відповідним розташуванням водойм у регіоні. Основна роль у цьому належить басейнам лівобережних приток Дніпра – Орелі, Ворсклі, Пслу та Сулі, долини яких перетинають майже всю Полтавську область. У зв'язку зі створенням каскаду дніпровських водосховищ у XX ст., в їх гирлах утворилася величезна кількість озер, заток, плавнів і різноманітних стариць, що створило сприятливі умови для гніздування лебедя-шипуну. З просуванням вгору за течією, площі придатних для гніздування акваторій зменшуються. У Харківській області на річках Сіверський Донець та його притоці Оскіл також було створено водосховища (Печенізьке та Червонооскільське), де розвинулися великі площі прибережної рослинності та які теж підходять для гніздування лебедів. За відсутності великих придатних для гніздування водойм лебеді обирають різні за розміром штучні водойми біля населених пунктів.

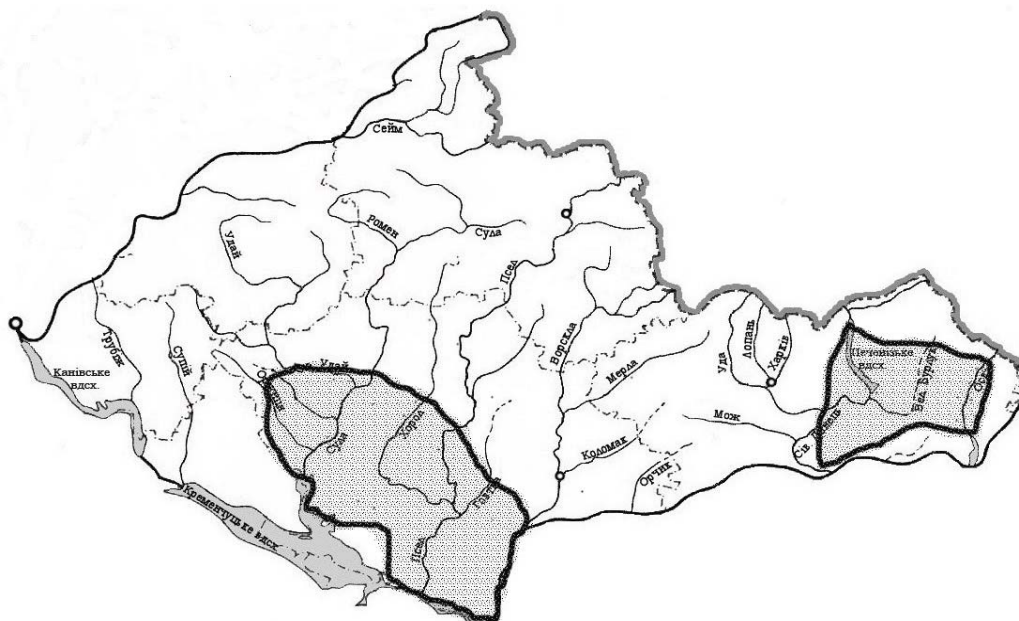


Рис. 2. Осередки розселення лебедя-шипуну на території південної частини Лівобережного Лісостепу України

Таким чином, лебідь-шипун на півдні Лівобережного Лісостепу України є досить звичайним гніздовим видом.

Список використаних джерел

1. Баник М. В. Динамика сообществ гнездящихся птиц Лиманской озерной системы и урочища "Горелая долина" / М. В. Баник, Ю. И. Вергелес // Птицы бассейна Северского Донца : матер. 7–10 совещ. "Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца". – Х., 2003. – Вып. 8. – С. 3–16.
2. Булахов В. Л. Формирование орнитофауны Днепродзержинского водохранилища / В. Л. Булахов // Орнитология. – 1968. – Вып. 9. – С. 78–187.
3. Гавриленко Н. И. Птицы Полтавщины / Н. И. Гавриленко. – Полтава, 1929. – 133 с.
4. Фауна хребетных тварин національного природного парку "Деснянсько-Старогутський" / Г. Г. Гаврис, Ю. В. Кузьменко, А. В. Мішта, І. М. Коцержинська. – Суми : БАТ "Сумська обласна друкарня", 2007. – 120 с.
5. Матеріали по орнитофауне долини р. Удай / В. Н. Грищенко, Е. Д. Яблонівська-Грищенко, Д. П. Гуляєв // Авіфауна України. Додаток до журналу "Беркут". – 2002. – Вып. 2. – С. 45–48.
6. Кесслер К. Ф. Животные губернии Киевского учебного округа / К. Ф. Кесслер. – Киев, 1850. – 101 с.
7. Клестов Н. Л. Орнитофауна Среднего Днепра и её изменения под влиянием гидростроительства / Н. Л. Клестов : автореф. ... канд. биол. наук. – К., 1983. – 26 с.
8. Клестов Н. Л. Особенности формирования и современное состояние населения птиц Днепродзержинского водохранилища / Н. Л. Клестов, А. В. Лепешков // Орнитология. – 1985. – Вып. 20. – С. 113–119.
9. Кривицкий И. А. Птицы прудов Печенежского рыбхоза / И. А. Кривицкий, Ю. А. Кальченко, А. Ю. Кальченко // Птицы бассейна Северского Донца : матер. 3-й конф. "Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца" (13–15 сент. 1995 г.) – Харьков, 1996. – Вып. 3. – С. 16–21.
10. Лысенко В. И. Гусеобразные. Фауна Украины. В 40 т. Т. 5. Птицы / В. И. Лысенко. – К. : Наук. думка, 1991. – Вып. 3. – С. 72–81.
11. Новикова Л. М. Методическое руководство по сбору полевых данных, их вводу в базы данных, предварительной камеральной обработке и выводу материалов для отчетов и Летописи природы / Л. М. Новикова, И. В. Карякин. – Н. Новгород, 2008. – 116 с.
12. Панченко В. О. Птицы в геральдики міст України / В. О. Панченко // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 1996. – Т. 5, вип. 1. – С. 88–90.
13. Рева П. П. Гнездование водоплавающих птиц на Кременчугском водохранилище / П. П. Рева, С. Л. Самарский // Ресурсы водоплавающей дичи в СССР, их воспроизводство и использование. – М. : МГУ, 1972. – Вып. 1. – С. 72–74.
14. Роговий Ю. Ф. Гніздування лебедя-шипуну на р. Кагамлик у Полтавській області / Ю. Ф. Роговий // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 1996. – Т. 5, вип. 2. – С. 203–204.
15. Сомов Н. Н. Орнитологическая фауна Харьковской губернии / Н. Н. Сомов. – Харьков : Тип. Адольфа Дарре, 1897. – 680 с.
16. Токарский В. А. Интересные находки / В. А. Токарский // Птицы бассейна Северского Донца : матер. 7–10 совещ. "Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца". – Х., 2003. – Вып. 8. – С. 122.
17. Фауна України: охоронні категорії : довід. / О. Годлевська, І. Парнікоза, В. Різун [та ін.] ; за ред. О. Годлевська, Г. Фесенко. – К., 2010. – 80 с.
18. Фесенко Г. В. Птицы фауны Украины: полевой визначник / Г. В. Фесенко, А. А. Бокотей. – К. : Укр. т-во охорони птахів, 2002. – 416 с.
19. Чернай А. В. Фауна Харьковской губернии и прилежащих к ней мест / А. В. Чернай. – Харьков, 1853. – Вып. 2. – 51 с.
20. Чован О. О. Зміна чисельності лебедя-шипуну (*Cygnus olor*) в Полтавській області / О. О. Чован // Пирятинські екологічні читання : матеріали Всеукр. екол.-практ. конф. 11 трав. 2012 р. м. Пирятин. – Полтава : СПДФО Гаража М. Ф., 2012. – С. 86–89.
21. Шапаренко С. А. К вопросу об изучении орнитофауны Карсноо-скольского водохранилища с целью ее охраны / С. А. Шапаренко // Птицы бассейна Северского Донца : матер. 2-й конф. "Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца" (4–6 мая 1994 г.). – Харьков, 1994. – Вып. 2. – С. 17–18.
22. Шарлемань М. В. Птицы УРСР. (Матеріали до фауни) / М. В. Шарлемань. – К., 1938. – 265 с.
23. Щёголев И. В. Лебедь-шипун *Cygnus olor* в северном Причерноморье / И. В. Щёголев, С. И. Щёголев // Русский орнитологический журнал. – 2011. – Т. 20, экспресс-вып. 623. – С. 35–43.
24. Reese J. G. Productivity and management of feral Mute Swans in Chesapeake Bay / J. G. Reese // J. Wildl. Manag. – 1975. – 39. – P. 280–286. Available from: www.longpointwaterfowl.org/research
25. Status and ecology of Mute Swans in New York state / B. L. Swift, K. J. Clarke, R. A. Holevinski, E. M. Cooper. – New York, 2013. – 37 p. Available from: www.dec.ny.gov
26. Williams W. Dark side of a classic beauty / W. Williams // National Wildlife Federation. – 1989. – 27(2). – P. 42–49. Available from: <http://www.nwf.org>

Надійшла до редколегії 02.04.15

А. Чован, асп., В. Серебряков, д-р биол. наук, І. Давиденко, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

РАССЕЛЕНИЕ ЛЕБЕДЯ-ШИПУНА (*CYGNUS OLOR* GMELIN, 1789) В ЮЖНОЙ ЧАСТИ ЛЕВОБЕРЕЖНОЙ ЛЕСОСТЕПИ УКРАИНЫ

В статье исследованы пути расселения лебедя-шипуну на юге Левобережной Лесостепи Украины, также были выявлены причины, которые привели к резкому увеличению численности и расселения вида, а также определен современный статус вида на исследуемой территории.

Ключевые слова: лебедь-шипун, Левобережная Лесостепь Украины, популяция, расселение.

O. Chovan, PhD stud, V. Serebryakov, DSc., I. Davydenko, PhD.
Taras Shevchenko National University in Kyiv, Kyiv, Ukraine

SETTLING MUTE SWAN (CYGNUS OLOR GMELIN, 1789) IN SOUTH PART OF THE LEFT-BANK FOREST-STEPPE ZONE OF UKRAINE

In the article the ways of settlement Mute Swan in southern left-bank forest-steppe of Ukraine, also identify the causes that led to a sharp increase in the number and type of settlement and the establishment of the modern status of species in the study area.

Keywords: mute swan, Left Bank Forest Steppe Ukraine, population, settlement.

УДК 591.526. 598.265.1

Т. Шупова, канд. біол. наук
Інститут еволюційної екології НАН України, Київ

АДАПТАЦІЯ ПТАХІВ РЯДУ ГОЛУБОПОДІБНИХ (COLUMBIFORMES) ДО ТРАНСФОРМАЦІЇ СЕРЕДОВИЩА ІСНУВАННЯ

Розглянуто шляхи адаптації голубоподібних птахів до антропогенних трансформацій середовища існування сучасного рівня та можливостей синантропізації видів ряду. Проведено порівняння синантропізації різних видів, та групи у цілому, залежно від трансформації модельної території. Індекс синантропізації ряду за Jedryczkowski тим нижче, чим нижче трансформація модельних територій.

Ключові слова: припутень (*Columba palumbus* L.), голуб синяк (*Columba oenas* L.), голуб сизий (*Columba livia* Gmelin), горлиця звичайна (*Streptopelia turtur* L.), горлиця кільчаста (*Streptopelia decaocto* Frivaldszky), трансформація середовища існування.

Вступ. Для ХХІ сторіччя характерне підсилення урбанізації середовища, пов'язане з ростом населених пунктів, об'єднанням їх в міські агломерації з мільйонним населенням. Результатом сучасної урбанізації є не тільки зміни природних біотопів, а і створення нових технолітоморфних форм рельєфу земної поверхні [1]. При цьому в урбанізованому ландшафті відбуваються закономірні історичні зміни стосовно типу забудови, старіння житлових кварталів, структури і віку зелених насаджень, що призводять, відповідно, до змін складу і структур орнітофауни населених пунктів, екології і поведінки птахів. Урбанізація напряму впливає на птахів через зміни природних біотопів у селітебні та індустриальні, а також, і опосередковано через зміни кормової бази, хижаків, конкуренції, хвороб. Пристосування тварин до існування у високо урбанізованих ландшафтах не обмежується лабільними компенсаційними реакціями на рівні окремих організмів. Стійке впровадження тварин в антропогенні екосистеми

– синантропізація видів – за масштабами відповідає еволюційним процесам [2].

Усі види європейських голубів проникли на гніздування у міста [3]. Випадки гніздування у містах Європи голуба синяка (*Columba oenas* L.) та звичайної горлиці (*Streptopelia turtur* L.), поодинокі. Голуб сизий та кільчаста горлиця є повними синурбаністами, припутень в деяких регіонах початковий, а в деяких розвинений синурбаніст.

Метою роботи є з'ясування шляхів адаптації голубоподібних птахів до антропогенних трансформацій середовища існування сучасного рівня та можливостей синантропізації видів ряду.

Матеріали і методи. Дослідження голубоподібних (Columbiformes) у природних та трансформованих ландшафтах дає можливість з'ясувати механізми адаптації близьких за біологією та походженням видів птахів до змін середовища існування. Для виконання цього завдання нами обрано 6 модельних територій (Рис. 1).



Рис. 1. Модельні території: 1 – Київська, 2 – Криворізька, 3 – Гуровська, 4 – Лучківська, 5 – Гайдарівська, 6 – Святогорська

1 – Київська. Включає м. Київ та його околиці. Територія сильно трансформована та густо населена. Села щільно оточують Київ, а ландшафти, біля міського агломерату являють собою мозаїчно розсередоточені лісові масиви, луки, дачні ділянки і села, поля. Райони багатоповерхової забудови охоплюють перетворюються у гігантський масив, який включає в себе парки, підприємства, будівельні майданчики. В останнє десятиріччя у центральній частині Києва розбудовуються висотні житлові споруди, що збільшує ярусність старих кварталів міста. Райони індивідуальної забудови розташовані фрагментарно і займають незначну частку міста. В них наявна тенденція будівництва великих 2-3-х будинків, які створюють схожість біотопу з районами багатоповерхової забудови. Збільшення тери-

торії Києва призвело до того, що лісові урочища, які раніше належали до зеленої зони міста, опинились в оточенні житлових кварталів та перетворились на лісопарки. **Додатково обстежене Боярське лісництво.** Загальна площа ділянок близько 70 км².

2 – Криворізька також охоплює велике місто: Кривий Ріг (населення 700 тис. чоловік), та його околиці. У зв'язку зі здобиччю руди Криворізького залізничного басейну, територія сильно трансформована на величезній площі. У процесі розвитку міста, воно поступово включало в себе велику кількість рудничних поселень. В результаті був створений єдиний урбано-техногенний агломерат, ландшафт якого різноманітний і фрагментований. Житлові райони різного типу забудови межують з однієї сторони з промисловими гігантами, оточеними буферною зоною, а з іншої, зі слабо трансформованими біотопами, які використовуються місцевими жителями в якості зони відпочинку. Слабо трансформовані ділянки – невеличкі степові балки, зарослі чагарнику, круті береги річок. В минулому вся селітебна зона складалась з районів індивідуальної забудови. Нині ці райони розташовані фрагментарно, але великими масивами і охоплюють суттєву площу. У 50–80-ті роки ХХ сторіччя вздовж центральних вулиць збудували

5–9-типоверхові будівлі житлового та службового призначення. У 80–90-ті роки ХХ сторіччя на околиці Кривого Рогу замість сільськогосподарських полів, які оточували місто, були створені спальні масиви 9–16-типоверхових будинків. На сьогодні житлове будівництво у Кривому Розі ведеться слабо: окремі елітні будинки вбудовуються на придатні ділянки у старих районах міста. До модельної території входить ділянка, берегу річки Інгулець біля селища Лозуватка Криворізького району, представлена типовим для регіону комплексом степового різнотрав'я з виходами гранітних скель на поверхню ґрунту та пологих балок, порослих деревною рослинністю. Її територія не придатна для господарської діяльності, тому біотоп зберіг свій природний облік і використовується лише в якості рекреаційної зони. Загальна площа обстежених ділянок близько 20 км².

3 – Гуровська. Включає Гуровське лісництво, село Кірово, юнацький табір розташовані на межі з лісом. Гуровський ліс (S = 6,52 км²) є ділянкою мішаних дубових насаджень. Від корінного лісового масиву місцями збереглися поодинокі дерева 250-річного віку. Загальна площа території близько 10 км².

4 – Лучківська. Включає заказник загальнодержавного значення "Лучківський". Площа заказника 16,2 км² охоплює річкову долину Ворскли та її тераси. Безпосередньо до заказника прилягають урбанізовані біотопи села Лучки, бази відпочинку та управління заказника. Показник залісненості нижньої течії Ворскли близько 30%. Степові біотопи фрагментарно збереглися на крутих корінних схилах правого берегу в яружно-балочних системах в комплексі з байрачними лісами. Частка сільськогосподарських угідь у регіоні до 38% [4].

5 – Гайдарівська. Включає ділянку зони постійної рекреації національного природного парку "Гомольшанські ліси", представлену річкою Сіверський Донець з розташованими на її берегах байрачним лісом, сухим степовим та заплавним луками, табори проведення польової практики Харківського Національного педагогічного університету та Харківського національного університету, село Гайдари. Площа модельної території 9 км².

6 – Святогорська. До модельної території входить ділянка нагорного та заплавної лісів на берегах Сіверського Донця, що є зоною постійної рекреації національного природного парку "Святі гори", трансформовані біотопи управління парком та прилеглих до парку баз відпочинку, і мікрорайонів міста Святогорська. Площа обстеженої ділянки 6 км².

Щільність гніздування і біотопічний розподіл птахів ми визначали методом обліку птахів на маршрутах, за Г.А. Новіковим [5]. **Сумарна площа обстеженої території становить близько 150 км².** При виборі маршрутів ми орієнтувались на загальноприйнятій класифікації біотопів, розроблені попередніми дослідниками [6;7]. При закладанні маршрутів ми вважали за потрібне охопити ландшафтну структуру території за наявності необхідних птахам екологічних ніш.

Градiєнт антропогенної трансформації знижується в ряду модельних територій: Київська (1) → Криворізька (2) → Святогорська (6) → Гуровська (3) → Гайдарівська (5) → Лучківська (4).

Результати та обговорення. Пристосування різних представників ряду голубоподібних птахів до сучасних умов трансформованого середовища існування ілюструє диференціацію близьких за походженням, біологією та екологічними особливостями видів. Першочерговим при цьому є обирання птахами гніздових біотопів. Навіть в межах кожного з родів (*Columba* або *Streptopelia*) реакція різних видів до змін середовища та антропогенного тиску відрізняється.

Голуб сизий (*Columba livia* Gmelin), який у природних популяціях є склерофільним птахом, на території майже всієї України типовий синантроп, що гніздиться у спорудах селітебних та техногенних біотопів. Природні популяції голуба сизого в Україні існують лише на південному березі Криму [8]. В орнітокомплексах багатоповерхової забудови селітебних зон регіону цей птах є одним з домінуючих за чисельністю. У сильно змінених регіонах, птахи гніздяться і в слабо трансформованих біотопах, але чисельність їх тут у 10–20 разів нижча, ніж у селітебних зонах. В парках, насичених будівлями він звичайний фоновий вид [9]. У слабо трансформованих біотопах, де є кам'яні споруди голуб також селиться. При відсутності гніздових стацій, прилітає на годівлю. У регіонах, де слабо трансформовані ділянки значних розмірів, сизий голуб відсутній в списку фауни. Даний факт нами було виявлено в заказнику "Лучківський" Полтавської області, Гуровському лісництві Кіровоград-

ської області [10], та у НПП "Гомольшанські ліси". Щільність гніздування виду в Києві та його околицях складає 11,6, у Кривому Розі – 6,8, у Святогорську – 1,5 пар/км².

Припутень (*Columba palumbus* L.) і голуб-синяк (*Columba oenas* L.) до кінця минулого сторіччя були урбофобами [6]. Припутень завжди гніздився в лісах по всій території України, а безлісі степові райони відвідував тільки під час перельотів [11]. На сьогодні він заселив майже всю степову зону України окрім приморських районів, а в Одеській області на узбережжі Чорного моря зимує [8]. За екологією гніздування цей корінний лісовий птах успішно адаптується до урбанізованого середовища існування. В якості синантропного виду припутень заселив Західну Європу вже в минулому столітті [3; 12–14]. В Україні припутень пристосувався до антропогенно трансформованого середовища значно пізніше [7; 15; 16]. В Центральній Україні гніздування припутень у біотопах міської забудови почало розповсюджуватись лише у ХХІ столітті. Ми виявили стійку синантропну популяцію виду у Києві [17]. Стадія синантропії, її за Tomialojc [14], відповідає першій фазі: початковій синантропії – гніздування поодиноких пар на урбанізованих територіях. Синантропізація київської популяції йде прогресивно, але, наступної стадії – гніздування у міських парках з більшою щільністю, ніж це спостерігається у лісах, вона не досягла. Поодинокі пари синантропного типу гніздяться в інших населених пунктах центрального та східного регіонів, але розселення птахів у інші біотопи міста не відбувається [18]. У природних біотопах припутень гніздиться по всій дослідженій нами території Центральної та північної частини Східної України зі щільністю 0,3–0,6 пар/км².

Голуб-синяк лісовий птах, який все ще уникає територій зі значним антропогенним тиском. У минулому сторіччі найбільш південними пунктами його гніздування були Чорний ліс (Кіровоградська область), Володимирське лісництво (Миколаївська область), Самарський ліс (Дніпропетровська область), деякі ліси Донбасу, ліси гірського Криму [19]. На сьогодні в лісах степової зони птахи більше не гніздяться [8]. Але у ХХІ столітті вони

з'явилися на гніздуванні в степовій та лісостеповій зонах України в агроландшафті, опановуючи нову гніздову нішу: полі бетонні опори ліній електропостачання [20; 21]. Зимують птахи в Криму і в Південній Європі [22]. Внаслідок зменшення площ старих лісів, омолодження деревостанів, отруєння хімікатами, збільшення тиску фактору занепокоєння та полювання на птахів чисельність голуба-синяка зазнала катастрофічного зниження, і вид був занесений до Червоної книги України. Нині в Україні гніздування птахів фрагментарне. У більшості районів Полісся і Криму голуби не чисельні, у Лісостепу – рідкісні. Загальна чисельність птахів в Україні не більше 8–12 тисяч, при чисельності в Європі 520–730 тисяч пар [23].

У Києві в старих лісопаркових масивах голуб-синяк припинив гніздитися з 70-х років XX століття, внаслідок підвищення рекреаційного навантаження [24]. На обстеженій території голуб-синяк був відмічений нами на гніздуванні лише у заказнику загальнодержавного значення "Лучківський". Поселення його невеличкі, але тримаються агреговано. З пари голубів зареєстровано у байрачному лісі на правому березі Ворскли, ще 5 пар

птахів оселилось на ділянці вологого луку в заплаві Ворскли у залізобетонних стовпах ліній електропостачання. Два гнізда знаходились на сусідніх стовпах на відстані 20 м один від одного. Ці пари встановили межу гніздових ділянок посередині дротів. На даному етапі встановлення гніздових ділянок, боїв, характерних для голубоподібних птахів, не спостерігалось.

Щільність гніздування голуба-синяка на території заказника у цілому склала 0,7 пар/км². Враховуючи, що поселення голуба-синяка в стовпах ліній електропостачання відмічені як нами, так і нашими колегами [20; 21], були груповими, можна прогнозувати, що опанування даного типу гніздової стації цими птахами буде досить швидким і в разі відсутності знищення птахів людьми, вид зможе відновити свою чисельність.

В угрупованні птахів Лучківського заказника та прилеглого до нього ділянок, відносна частка голуба-синяка достатня для того, щоб віднести його до категорії фонових видів. В той же час, хоча припущень розповсюдження більш широко, частка його популяцій в угрупованнях гніздових птахів кожного з регіонів значно менша (табл. 1).

Таблиця 1. Відносна частка голубоподібних в угрупованнях птахів модельних територій

Вид	Модельна територія					
	Лучківська	Гайдарівська	Гуровська	Святогорська	Криворізька	Київська
<i>Columba palumbus</i>	0	0,003	0,003	0	0,001	0,002
<i>Columba oenas</i>	0,009	0	0	0	0	0
<i>Columba livia</i>	0	0	0	0,012	0,028	0,096
<i>Streptopelia decaocto</i>	0	0,001	0,019	0,001	0,012	0,001
<i>Streptopelia turtur</i>	0,14	0,003	0,01	0,001	0,001	0

У роді горлиць (*Streptopelia*) також спостерігається наявність синантропа – горлиці кільчастої (*Streptopelia decaocto* Frivaldszky) і виду який в Україні заселяє лише природні та слабо трансформовані біотопи – горлиці звичайної (*Streptopelia turtur* L.). До урбофоба горлицю звичайну віднести не можна, бо птахи деяких популяцій гніздяться і в трансформованих біотопах і навіть в місцях постійної присутності людини. Але в умовах центральної та східної України горлиця звичайна надає перевагу слабо трансформованим ландшафтам. Поодинокі гнізда птахів описані в міських парках Східної Польщі [14].

Горлиця звичайна розповсюджена на дослідженій території фрагментарно. Найбільшою щільністю – 1,3 пар/км² птахи гніздяться у об'єктах природоохоронного значення, віддалених від великих населених пунктів: заказнику загальнодержавного значення "Лучківський" та національному природному парку "Гомольшанські ліси". Птахи селяться у байрачному лісі та на деревах в лучних біотопах. У Гуровському лісі птахи гніздяться в затишних місцях, віддалених від трансформованих ділянок та ділянок з високим рекреаційним навантаженням. Чисельність птахів у Гуровському лісі на сьогодні складає 0,5 пар/км². В Київській, Дніпропетровській та Донецькій областях горлиця звичайна є мало-чисельним видом, що оселяється подалі від населених пунктів і чисельність її знижується. Птахи вже не гніздяться не тільки у великих містах, але і зонах їх рекреації, де спостерігались нами ще в середині 90-х років.

На сильно трансформованих модельних територіях, де гніздяться обидва види горлиць (Криворізькій та Гуровській), щільність гніздування і відносна частка в угрупованні гніздових птахів, популяцій горлиці кільчастої вище, ніж звичайної. У регіоні сильно трансформованому на значній площі (Київській модельній території) горлиця звичайна на гніздуванні нами не знайдена, а на найменш трансформованій ділянці – в заказнику загальнодержавного значення "Лучківський" навпаки, не гніздиться горлиця кільчаста, навіть на території управління.

Горлиця кільчаста (горлиця садова) є чужорідним видом фауни України. Експансія птахів з території Малої Азії у Європу масово почалася у 1920–1930 роки і відбувалась з величезною швидкістю. Європейський ареал виду кожного року збільшувався на 110 тисяч км², і виріс до 6,5 млн. км² у 1980х роках. На сьогодні швидкість розселення горлиці знизилась, але говорити про його припинення не варто, оскільки в 90ті роки до ареалу горлиці кільчастої увійшло і північне узбережжя Африки [25]. Нині птахи з невеликою швидкістю розселяються в Азії на північний схід [26]. В Україні горлиця кільчаста вперше з'явилась в 1944 р., в Ужгороді, в 1949 у Львові, а в 1955 в Києві. В 60-х рр. XX сторіччя вона вже була осілим птахом західних областей України на схід до Києва [27]. Наприкінці 60-х років птахи з'являються у Харкові [28]. На сьогодні горлиця кільчаста є осілим птахом всій території України який веде синантропний спосіб існування. Поза населеними пунктами вона гніздиться не часто.

Чисельність горлиці кільчастої у різних регіонах України відрізняється суттєво. У Києві вона гніздиться поодинокими парами на околицях міста. На гніздуванні птахи оселяються в парках і в районах промислової забудови, але в останні роки ніколи не спостерігались в житлових масивах центру міста. Нами відмічені, випадки, коли самець, який прилетів на гніздову ділянку, після декількох днів токування, вимушений був залишати потенційне місце гніздування, оскільки не знайшов собі пару. Не відмічений вид на гніздуванні у заказнику "Лучківський", хоча в Полтаві горлиця кільчаста є звичайним птахом. На півдні Центральної України горлиця кільчаста розповсюджена більш широко ніж на півночі. У Дніпропетровській області вона гніздиться навіть у слабо трансформованих біотопах. Щільність гніздування її на Криворізькій модельній ділянці коливається від 0,2 до 3,0 пар/км² і складає в середньому 2,0 пар/км². У Кіровоградській області горлиця кільчаста населяє не лише селітебні зони. Щільність гніздування птахів у цілому тут складає 0,3 пар/км². У Гуровському лісі

вона 0,2, а на території селищ та таборів відпочинку – 2,0 пар/км². На північному сході країни щільність горлиці кільчастої у селітебних зонах складає 0,1 пар/км², а у природних біотопах птахи відсутні.

У цілому у дослідженому регіоні природні біотопи населяють усі види голубоподібних птахів фауни України, а трансформовані – лише 3 види. Щільність їх гніздування та відносна частка в угрупованнях птахів суттєво коливається в усіх типах біотопів (Табл. 2).

Таблиця 2. Щільність гніздування та відносна частка голубоподібних в угрупованнях птахів

Вид	Щільність гніздування (пар/км ²)		Відносна частка	
	природні біотопи	трансформовані біотопи	природні біотопи	трансформовані біотопи
<i>Columba palumbus</i>	0,1–0,6	0,1–0,5	0,001–0,010	0,001–0,003
<i>Columba oenas</i>	0,9	–	0,009	–
<i>Columba livia</i>	0,8–5,2	0,4–47,0	0,010–0,055	0,004–0,384
<i>Streptopelia decaocto</i>	0,2	0,1–2,3	0,002	0,001–0,015
<i>Streptopelia turtur</i>	0,1–1,7	–	0,001–0,014	–

Голубоподібні птахи, в межах кожного з родів, відрізняються за статусом перебування на території України. Синантропні види: сизий голуб і горлиця кільчаста – осілі птахи, а природні: припутень, голуб-синяк і горлиця звичайна – перелітні.

У процесі антропогенних трансформацій регіону змінюється співвідношення кількості голубів та горлиць в орнітокомплексах. Раніше горлиць скрізь було

значно більше ніж голубів [11]. На сьогодні, співвідношення частки голубів та горлиць змінилось. В угрупованнях птахів, що гніздяться, на сильно трансформованих територіях, відносна частка голубів значно вище ніж горлиць. Відносна частка горлиць в угрупованнях птахів, у цілому зменшується за градієнтом збільшення антропогенної трансформації, а частка голубів, навпаки – зростає (Рис. 2).

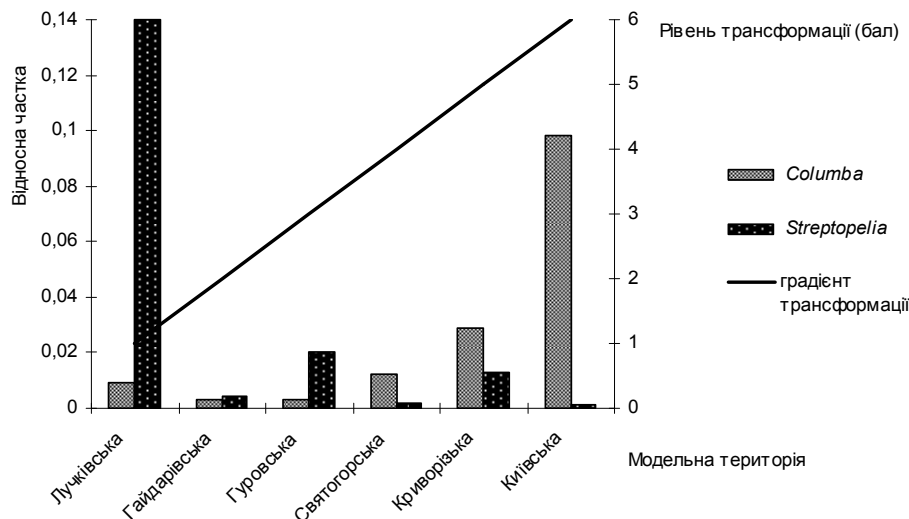


Рис. 2. Відносна частка горлиць (*Streptopelia*) та голубів (*Columba*) залежно трансформації території

Навіть на слабо трансформованих модельних територіях спостерігається значне зменшення частки горлиць у порівнянні з практично не трансформованою модельною ділянкою (Лучківською). Значне збільшення кількості голубів в орнітокомплексах сильно трансформованих територій, пов'язане з багаточисельністю в урбанізованому середовищі синантропа – сизого голуба, чисельність якого значно перевищує чисельність вилучених з цих орнітокомплексів дендрофільних видів голубів. Невеличке збільшення кількості горлиць на деяких трансформованих ділянках, відбувається за рахунок наявності синантропного виду – горлиці кільчастої, але її внесок в угруповання птахів помірно трансформованих біотопів не такий суттєвий, як сизого голуба.

Реакцію різних популяцій голубоподібних птахів на сучасний антропогенний вплив, демонструє динаміка їх чисельності. Так, після першої появи в Києві чисельність горлиці кільчастої почала швидко зростати і у 1970–1980-х рр. вона траплялась у місті повсюдно. Наприкінці минулого сторіччя горлиця кільчаста витіснила горлицю звичайну з більшості біотопів Центральної України, а потім зникла з багатьох з них [6]. Тепер чи-

сельність горлиці кільчастої в Києві впала до менш ніж 0,1 пар/км². Порівняно з нашими даними за 1991–1997 роки чисельність південних популяцій горлиці кільчастої на території степової зони – збільшується і птахи, подекуди, навіть проникають на гніздування в лісові біотопи [10]. За динамікою чисельності різні популяції горлиці звичайної також відрізняються: щільність гніздування її на Лучківській модельній території зросла майже вдвічі, на Гуровській та Криворізькій, навпаки, суттєво знизилась. З середини ХХ сторіччя зникли природні популяції сизого голуба [11], а чисельність припутня суттєво скоротилась [19]. Можливо тиск з боку мисливців сприяв тому, що припутень протягом останніх 20ти років створив декілька нових синантропних популяцій в регіоні дослідження. Але нами виявлений і факт елімінації виду з орнітокомплексу. Наприкінці 90-х років минулого сторіччя припутень гніздився у байрачних лісах заказнику "Лучківський" щільністю 0,4 пар/км². На сьогодні птахи відсутні на території заказника. Натомість голуб-синяк створює тут агреговані поселення.

Пристосованість голубоподібних до життя в урбанізованому середовищі проявляється, зокрема і в тому,

що для гніздування птахи використовують матеріали антропогенного походження. Голуби (сизий та синяк) і горлиця кільчаста гніздяться у спорудах людини. Горлиці іноді будують свої гнізда не лише з природних матеріалів, а і з дроту [22]. В синантропних популяціях збільшується толерантність птахів, до людини. У містах з підвищенням фактору турбування відмічена статистично достовірна тенденція до зменшення у птахів дистанції зльоту [29]. Так, припутні, які оселяються в парках Києва та Кривого Рогу припиняли будувати гніздо лише тоді, коли ми наближались більше ніж на 5 м. до їх гнізд. Але в населених пунктах України припутень залишається дендрофільним видом і навіть в якості присади використовує лише дерева. Поведінка голубів сизих та горлиць кільчастих, які гніздяться в населених

пунктах в значній мірі орієнтоване на підгодовування птахів людиною. Взимку це підтримує існування голубоподібних у кварталах багатоповерхової забудови.

За урахуванням частки синантропних видів в різних досліджених регіонах ми обраховували індекс синантропізації ряду голубоподібних за Jedryczkowski [30]: $W_s = L_s/L_o$, де L_s – число синантропних видів, L_o – загальне число видів ряду. Ми вираховували величину індексу синантропізації голубоподібних для кожної з модельних територій. Ряд модельних територій за зменшенням показника індексу синантропізації відповідає їх ряду за зменшенням градієнту їх антропогенної трансформації: Київська → Криворізька → Святогорська → Гурівська → Гайдарівська → Лучківська (Рис. 3).

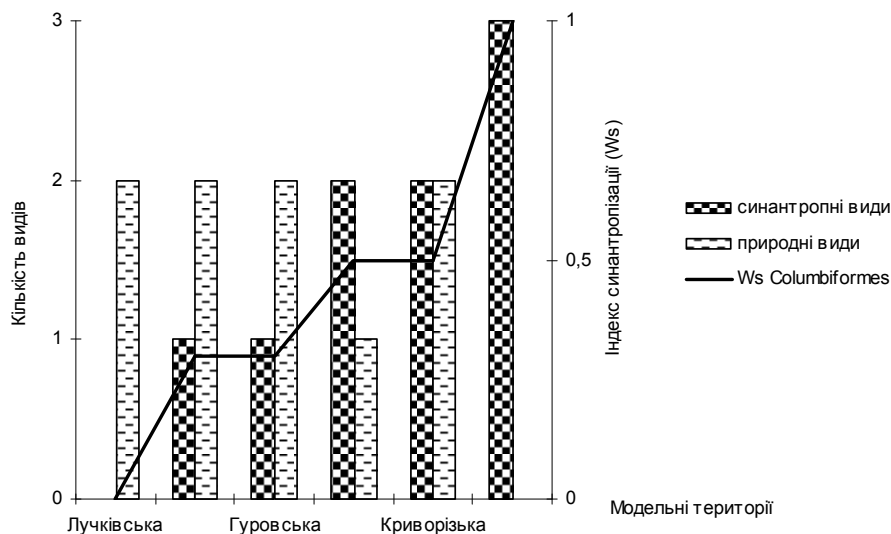


Рис. 3. Синантропізація ряду голубоподібних модельних територій

Величина цього індексу для ряду голубоподібних відрізняється і у різних природно-географічних зонах дослідженого району. Так у зв'язку з тим, що синантропні популяції припутня відмічені нами лише в південній частині Києва, яка розташована в лісостеповій природно-географічній зоні [17], та у Харківській області, показник індексу синантропізації птахів ряду голубоподібних тут сягає 0,8. У степовій зоні, де синантропами є лише голуб сизий та горлиця кільчаста, а припутень заселяє лише природні біотопи, його величина складає 0,4.

Висновки. Результатом впливу динамічного середовища існування в XXI сторіччі на голубоподібних птахів є диференціація адаптивних напрямів у різних видів та популяцій. Птахи змінюють місця гніздування, способи гніздування, заселяють нові біотопи. Голуби (*Columba*) схильні до існування поряд з людиною: синантропні популяції припутня розширюють ареал гніздування у східному напрямку, голуб-синяк пристосовується до використання гніздових стацій антропогенного походження. Горлиці (*Streptopelia*) менш лабільні, ніж голуби. Адаптації горлиці звичайної зведені до опанування нових, не характерних раніше виду біотопів. У цілому горлиці схильні залишати місця гніздування в разі занадто значного для птахів підсилення антропогенного впливу. Збільшення індексу синантропізації за Jedryczkowski для ряду голубоподібних є індикатором підвищення впливу антропогенної трансформації в регіоні.

Список використаних джерел

1. Розанов Л. Л. Технолитоморфная трансформация окружающей среды / Л. Л. Розанов. – М. : Изд-во НЦ ЭНАС, 2001. – 184 с.

2. Обухова Н. Ю. Основное направление и механизмы микроэволюционных сдвигов в синантропных комплексах птиц / Ю. Н. Обухова // Проблемы макроэволюции. – М. : Наука, 1988. С. 121–122.

3. Лыков Е. Л. Биология гнездования вяхиря в условиях города (на примере Калининграда) / Е. Л. Лыков // Беркут. – 2009. – Т. 18, вып. 1–2. – С. 54–68.

4. Стецюк Н. О. Антропогенная трансформация понижья р. Ворскла у зв'язку з побудовою Дніпродзержинського водосховища / Н. О. Стецюк, Л. Л. Кушнір, Л. М. Кушнір // Захист довкілля від техногенного впливу. – Харків ; Кременчук, 2002. – Вип. 6. – С. 114–119.

5. Новиков Г. А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных / Г. А. Новиков. – М. : Сов. наука, 1953.

6. Лопарьов С. О. Орнітофауна населених пунктів Центру України та її зміни : автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.08. Зоологія / С. О. Лопарьов. – К., 1997.

7. Скильський І. В. О формировании нового экологического типа вяхиря в Северной Буковине / И. В. Скильський, В. В. Бучко, Б. И. Годованец // Беркут. – 1997. – Т. 6, вып 1–2. – С. 49–51.

8. Серебряков В. В. Атлас птахів України (поширення та характер перебування) / В. В. Серебряков. – К. : Фітосоціоцентр, 2012. – 240 с.

9. Шупова Т. В. Орнітофауна селищної зони Києва / Т. В. Шупова // Вісн. Харк. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. – 2014. – Вип. 21 – С. 83–91.

10. Шупова Т. В. Разнообразие орнитофауны Гуровского лесничества / Т. В. Шупова, В. В. Коцюрба, С. В. Думенко // Экосистемы, их оптимизация и охрана – 2013. – Вип. 9. – С. 31–42.

11. Войцешенський М. А. Визначник птахів УРСР / М. А. Войцешенський, О. Б. Кістяківський. – К. : Рад. шк., 1962. – 371 с.

12. Астафьева Т. В. История формирования и современное состояние городской популяции вяхиря *Columba palumbus* L. Калининграде / Т. В. Астафьева, Г. В. Гришанов, Е. Л. Лыков // Вест. Балт. федер. ун-та им. И. Канта. Сер. Естественные науки. – 2011. – С. 51–58.

13. Астафьева Т. В. Вяхирь *Columba palumbus* L. в городах Калининградской области / Т. В. Астафьева, Г. В. Гришанов // Там же. – 2012. – С. 52–59.

14. Tomiatojc L. The urban population of the Woodpigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758, in Europe – its origin, increase and distribution / L. Tomiatojc // Acta Zool. – 1976. – Vol. 21(18). – P. 585–632.

15. Гулай В. І. Новий екологічний тип припутнів на Поділлі / В. І. Гулай // Матер. 1-ї конф. молодих орнітологів України. – Луцьк ; Чернівці, 1994.

16. Сеник М. А. Сучасні зміни в орнітофауні Львова / М. А. Сеник, М. М. Хорняк // Беркут. – 2003. – Т. 12, вип. 1–2. – С. 3–13.
17. Шупова Т. В. Утворення міської популяції припугня (*Columba palumbus* L.) в Києві / Т. В. Шупова // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2014. – Вип. 1 (17) – С. 36–39.
18. Шупова Т. В. Роль естественных биотопов в адаптации вяхиря (*Columba palumbus* L.) к синантропному способу гнездования / Т. В. Шупова // Матер. IV междунар. науч.-практ. конф. "Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов". – Волгоград, 2014.
19. Воинственский М. А. Птицы степной полосы Европейской части СССР. Современное состояние орнитофауны и ее происхождение / М. А. Воинственский. – К. : Из-во АН УССР, 1960. – 290 с.
20. Ветров В. В. Новые данные об особенностях гнездования клинтуха (*Columba oenas*) на востоке Украины / В. В. Ветров, Д. С. Олейник // Экология птиц: виды, сообщества, взаимосвязи : тр. науч. конф., посвящ. 150-летию со дня рождения Н. Н. Сомова (1861–1923), 1–4 дек. 2011 г., г. Харьков, Украина / [под ред. М. В. Баника и др.]. – Х. : Точка, 2011. – С. 234–235.
21. Гаврилюк М. Н. Гнездование клинтуха *Columba oenas* в бетонных столах Черкасской области / М. Н. Гаврилюк // Русский орнитологический журнал. – 2014. – Т. 23. – С. 2546–2547.
22. Фесенко Г. В. Птахи садів і парків Києва / Г. В. Фесенко. – Кривий Ріг : Мінерал, 2010. – 236 с.

23. Червона книга України. Тваринний світ / за ред. І. А. Акімова. – К. : Глобалконсалтинг, 2009. – 600 с.
24. Андрієвська О. Л. Значення національного природного парку "Голосіївський" у збереженні видового різноманіття хребетних тварин м. Києва / О. Л. Андрієвська, О. М. Цвєлих // Екол. вісн. – 2011. – С. 29–30.
25. Birds of Britain & Europe with North Africa & the Middle East / ed. H. Heinzel. – London, 1995. – 384 p.
26. Хроков В. В. Краткий справочник по птицам Казахстана / В. В. Хроков, С. Л. Скляренко. – Алматы : АСБК, 2009. – 156 с.
27. Мекленбурцев Р. Н. Отряд голуби. *Columbae* или *Columbiformes* / Р. Н. Мекленбурцев // Птицы Советского Союза / под ред. Г. П. Деметьева, Н. А. Гладкова. – М. : Сов. наука, 1954. – Т. 2. – С. 1–68.
28. Надточий А. С. К экологии кольчатой горлицы в Харькове / А. С. Надточий, С. К. Зиоменко // Экология гнездования, изменение численности под воздействием рекреации некоторых видов птиц УССР. – К. : Из-во АН УССР. – 1987. – С. 5–7.
29. Резанов А. А. Эколого-поведенческие аспекты синантропизации и урбанизации птиц : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.16. Экология / А. А. Резанов. – М., 2005.
30. Клауснитцер Б. Экология горордской фауны / Б. Клауснитцер ; пер. И. В. Орловой, И. М. Маровой. – М. : Мир, 1990. – 246 с.

Надійшла до редколегії 02.04.15

Т. Шупова, канд. биол. наук

Институт эволюционной экологии НАН Украины, Киев, Украина

АДАПТАЦИЯ ПТИЦ ОТРЯДА ГОЛУБЕОБРАЗНЫХ (COLUMBIFORMES) К ТРАНСФОРМАЦИИ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Рассмотрены пути адаптации голубеобразных птиц в антропогенных трансформаций среды обитания современного уровня и возможностей синантропизации видов ряда. Проведено сравнение синантропизации различных видов, и группы в целом, в зависимости от трансформации модельной территории. Индекс синантропизации ряда по Jedryczkowski тем ниже, чем ниже трансформация модельных территорий.

Ключевые слова: припугня (*Columba palumbus* L.), голубь синяк (*Columba oenas* L.), сизый голубь (*Columba livia* Gmelin), обыкновенная горлица (*Streptopelia turtur* L.), горлица кольчатая (*Streptopelia decaocto* Frivaldszky), трансформация среды обитания.

T. Shupova, PhD

Institute for evolutionary ecology NAS Ukraine, Kyiv, Ukraine

ADAPTATION OF THE BIRDS THE ORDER COLUMBIFORMES TO THE TRANSFORMATION OF HABITAT

The article discusses ways to adapt Columbiformes birds in anthropogenic habitat transformation and the current level of capacity synanthropization kinds of series. A comparison synanthropization various species and groups in general, according to the transformation model area. Index synanthropization number of Jedryczkowski the lower, the lower the transformation model areas.

Keywords: priputen (*Columba palumbus* L.), pigeon brui (Solumba oenas L.), the rock pigeon (*Columba livia* Gmelin), European Turtle Dove (*Streptopelia turtur* L.), ringed turtledove (*Streptopelia decaocto* Frivaldszky), transformation of the environment.

УДК 595.132:632.7

Є. Яковлєв, асп., В. Харченко, канд.біол.наук
Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України, Київ

МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ НЕМАТОД

Наведено методи роботи з ентомопатогенними нематодами в полі й лабораторії: відбір проб, виявлення у пробах та культивування.

Ключові слова: ентомопатогенні нематоди, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

Вступ. Ентомопатогенні нематоди (ЕПН) – це екологічна група паразитодів комах, що належать до роду *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae* (Nematoda: Rhabditida). На території Палеарктики зустрічається 35 видів роду *Steinernema* та 7 видів з роду *Heterorhabditis*. Вивчення ЕПН фауни України має в перспективі важливе прикладне значення. На даний момент більше 100 лабораторій світу (США, Канада, Туреччини, Нідерландів, Словаччини, Колумбії та ін.) розробляють та впроваджують у виробництво препарати проти шкідників сільськогосподарських культур на основі ЕПН.

Дослідження нематод, що паразитують у шкідливих комах, в Радянському Союзі почалися в 1950–70-х роках. О. С. Кірюяновою та Л. В. Пучковою було описано чотири види роду *Neoaplectana* Steiner, 1923, які згодом були зведені до морф *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) та *S. feltiae* Filipjev, 1934 [13]. Після цих робіт вивчення ЕПН поновилося лише 2007 року на базі Національного аграрного університету та Лабораторії нематології Інституту захисту рослин УААН, починаючи з 2009 року, – на базі Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена [21; 22].

Метод пасток Уайта, метод "живих" пасток, культивування тест-комах приведені українською мовою вперше.

Польові методи дослідження ЕПН. Методи відбору проб

Методи відбору проб для виявлення ЕПН широко представлені у [11]. До них можна віднести:

1. Безпосередній відбір ґрунту [3; 5]. Проби відбирають на елементарній ділянці випадково або систематично за маршрутом в залежності від мети дослідження з глибини 5–10 см від поверхні. Проби ґрунту можуть бути точковими та об'єднаними (коли декілька проб з різних точок відбору з однієї типової ділянки змішуються разом). Об'єм кожної проби 250–300 см³. Місце відбору проби ґрунту та координати точок відбору визначаються та фіксуються за допомогою GPS-приймача. До кожної проби ґрунту заповнюється супровідний листок, в якому фіксуються порядковий номер, дата, тип ґрунту, тип рослинності, ступінь зволоженості проби на момент відбору.

2. Метод ґрунтових пасток [1]. Для цього личинок обраного виду тест-комах вміщують у сітчасту капсулу

© Яковлєв Є., Харченко В., 2015

та закопують на глибину до 10 см у ґрунт на пробному майданчику. Капсула виготовляється з верхньої частини мікропробірки та нержавіючої металевої сітки, попередньо позбавленої технічного мастила.

3. Маршрутний ручний збір мертвих комах. Відбираються комахи з ознаками нематодного ураження. Проводиться систематично або за маршрутом відповідно до вищенаведеної методики.

Сезонність відбору проб. Ентомопатогенним нематодам властива горизонтальна, вертикальна міграції в ґрунті, що залежить від температури та вологості навколишнього середовища [2; 8; 10; 15; 16; 18; 19]. Відповідно до цього, відбір проб проводиться у період з квітня по жовтень, коли ЕПН масово представлені на глибині відбору проби.

Лабораторні методи дослідження ЕПН. Виявлення та культивування ЕПН. Виділення ентомопатогенних нематод з проб ґрунту. Метод "живих" пасток. В лабораторних умовах, з проби ґрунту видаляють каміння, торф та рештки коріння та вміщують до тари об'ємом 250 см³. До проби вміщують дві личинки тест-комах обраного виду у сітчастій капсулі. В разі необхідності, ґрунт помірно зволожується водопровідною водою з розбризкувача.

Проба ґрунту з комахами витримується 5 днів та перевіряється на предмет нематодного ураження – почервоніння тулуба, місцевого або сегментарного почорніння, знерухомлення зі збереженням відносного тургору. При негативному результаті проба експонується ще 5 днів.

Метод пасток Уайта. В разі виявлення уражених тест-комах, їх відмивають 10-15 секунд у 70% етиловому спирті та переносять на пастки Уайта – чашки Петрі з годинниковими скельцями з фільтрувальним папером, постійно змоченим 0,001% розчином формаліну у фізіологічному розчині. Пастки Уайта витримуються за кімнатної температури в темному приміщенні, або при розсіянному світлі. Контамінація грибами обов'язково усувається шляхом механічної (прибирання гіфів грибків або наростань) або хімічної обробки (змочування фунгістатиками (ністатин) або 70% етиловим спиртом фільтрувального паперу тіла комах).

Після початку міграції, нематод зливають разом з розчином у окремий посуд, де зберігають, підтримуючи постійний рівень розчину, за температури 4 °С, до пір року; у чашки Петрі доливають новий 0,001% розчин формаліну у фізіологічному розчині. Для зберігання інвазійних личинок (ІЛ) також застосовуються пористі матеріали з діаметром пор 0,5-0,7 мм, змочені стерилізованою водопровідною водою або фізіологічним розчином, в скляному посуді з отворами для аерації. Інвазійні личинки перед зберіганням омиваються 0,1% розчином натрієвої солі мертиоляту (тимеросал, ортоетилртутьсаліцилат натрію).

Культивування тест-комах. Тест-комахи – це комахи, які використовуються в якості моделей для виділення, культивування та проведення експериментальної роботи з ентомопатогенними нематодами. Тест-комахи відбираються за наступними критеріями: сприйнятливість до проникнення в організм комах ЕПН та розвитку патогенного процесу, можливість швидкої репродукції в лабораторних умовах зі зменшенням витрат на годування. В якості тест-комах використовують личинок великої воскової молі *Galleria mellonella* L., та великого мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. [4]. Велика воскова міль широко використовується в світовій практиці в якості тест-комах для вивчення ентомопатогенних грибів, вірусів, бактерій, найпростіших та нематод, проте її утримання вимагає чіткого дотримання температури, режиму годування та перешкоджання по-

трапляння до культури вищезазначених патогенів. Так, потрапляння до лабораторної культури галерії спорівиків з роду *Nosema* спричиняє її повне винищення і унеможливорює відтворення внаслідок забруднення поверхонь, контейнерів та кормів спорами. Великий мучний хрущак легкий у розведенні та утриманні, проте є менш сприйнятливим до зараження ентомопатогенними організмами, що вимагає збільшення витрат часу на виділення культур ЕПН.

Для розведення воскової молі використовуються термостати з температурою в робочій камері 38 °С, для годування личинок використовуються спеціальні суміші [11].

Культивування ентомопатогенних нематод. Зараження тест-комах здійснюють у попередньо простерилізованих чашках Петрі з сухим фільтрувальним папером, на якому розміщують їх личинок. Попередньо протягом 30 секунд комахи анестезуються ефіром. Для ураження, комах обприскують суспензією нематод з відомою кількістю личинок для досягнення концентрації 100 ІЛ/комаху. Чашки Петрі з зараженими тест-комахами витримують при 22-25 °С до евазії інвазійних личинок. Після цього проводять збір культури. Для збільшення ефективності зараження, личинок тест-комах поміщають у попередньо підготовлені мікропробірки на 2 мл (з отворами для вентиляції та згорнутим фільтрувальним папером, або простерилізованим піском), та обприскують суспензією нематод. Знерухомлені таким чином личинки комах знаходяться в постійному тісному контакті з ІЛ.

Мікроскопія. Підготовка до мікроскопії. Фіксація нематод. Для дослідження морфології та вимірювання використовують тимчасові та постійні препарати нематод.

Для виготовлення тимчасових препаратів ЕПН, живих нематод вміщують у краплю розчину Рінгера для комах (10,93 г NaCl, 1,57 г KCl, 0,83 г CaCl₂·2H₂O, 0,83 г MgCl₂·6H₂O на 1 л дистильованої води) [13] на предметному скельці, накривають покривним скельцем та вбивають витриманням препарату при 65-70 °С протягом 7-10 секунд. Виготовлений таким чином тимчасовий препарат придатний до дослідження нативного забарвлення нематод, морфологічних особливостей будови генітального апарату, первинної морфометрії.

Для виготовлення постійних препаратів, нематод фіксують у нагрітому до 65-70 °С одиному ТАФ (2 мл триетаноламіну, 7 мл 40% розчину формальдегіду на 91 мл дистильованої води) та витримують у закритому від прямих сонячних променів місці протягом доби. Після цього, нематод відмивають у дистильованій воді та вміщують у розчин Зайнхорста №1 (95% етиловий спирт, гліцерин та дистильована вода у співвідношенні 20:1:79) та витримують 12 годин, після чого переміщують до розчину Зайнхорста №2 (95% етиловий спирт та гліцерин у співвідношенні 95:5) і у чистий гліцерин [17]. Прийнятною є також спрощена схема, за якою нематод із фіксатора переносять до розчину дистильованої води, етилового спирту та гліцерину (у співвідношенні 6:3:1 (пропорційно), або 25:75:5 (у мл)) та витримують за кімнатної температури до випаровування спирту, після чого переносять до чистого гліцерину. Дана методика була модифікована автором для покращення процесу мікроскопіювання. Нематоди з фіксатора переносять до 2 мл суміші, що складається з 1 мл розчину фуксину у гліцерині 2 грами кислого фуксину на 85 мл дистильованої води та 15 мл гліцерину) та 1 мл дистильованої води, 95% етилового спирту та гліцерину (25:75:5 (у мл)), після випаровування спирту, нематод переносять до розчину гліцерину у воді у співвідношенні 1:2. Кислий фуксин добре розчиняється у спирті та фарбує цитоплазму клітин і органели з лужною реакці-

єю і не блокує нативне забарвлення кутикулярних структур, що дозволяє контрастувати деталі внутрішньої будови нематод, ядра та межі клітин.

Краплину з вміщеними до гліцерину нематодами накривають покривним скельцем та закривають лаком. Виготовлений подібним чином постійний препарат придатний до зберігання протягом 3-4 років.

Фіксовані в ТАФ нематоди не придатні для подальших молекулярно-генетичних досліджень. Плануючи такі дослідження нематод фіксують в нагрітому до 65-70 °C 70% або 96% етиловому спирті.

Дослідження морфології та морфометрії. Виготовлені нативні та постійні препарати мікроскопіюють на збільшенні 200-500×. У ентомопатогенних нематод загалом визначають наступні показники: L – довжина тіла; W – діаметр тіла; T – дистанція від анального отвору до кінця хвоста (у самців визначається як дистанція від клоаки до кінця хвоста); ES – дистанція від апікального кінця до дна стравоходу; EP – дистанція від апікального кінця до отвору екскреторної пори; NR – дистанція від апікального кінця до нервово кільця. У інвазійних личинок визначають параметр H – гіаліновий шар. У самців визначають параметри GL – довжина губернакулуму; SL – довжина спікул; CBD – діаметр тіла на рівні клоаки. У самиць визначають параметри ABD – діаметр тіла на рівні анусу; V – дистанція від апікального кінця до вульви.

На основі визначених морфометричних параметрів вираховуються наступні індекси: GL/SL , $D\% = EP/ES \cdot 100$; $E\% = EP/T \cdot 100$; $SW\% = SL/CBD$; в тому числі для ІЛ вираховують індекси Де Мана [6; 7]: $a = L/W$; $b = L/ES$; $c = L/T$.

З морфологічних особливостей, відмічають: забарвлення спікул, наявність мукрального відростка хвостового кінця у самців, наявність епіпигми вульви у самиць.

Молекулярно-генетичне дослідження ЕПН. Екстракція ДНК. Для молекулярно-генетичного аналізу використовують ІЛ або самиць ентомопатогенних нематод, суправітально, або зафіксованих у 96% етиловому спирті. В разі використання фіксатора, нематод "відмивають" від залишків етилового спирту, витримують у дистильованій воді протягом доби, оскільки останній може депресувати процес виділення ДНК.

Для виділення ДНК у кількості, достатній для проведення ампліфікації, вистачає 10-15 інвазійних личинок, або 1-2 самиць. Нематод вміщують до мікропробірки на льоду з лізуючим буфером для нематод, виготовленим за прописом [13], або до готового набору для виділення ДНК.

Підбір праймерів. ПЛР. Для визначення видової приналежності та філогенетичних зв'язків аналізується склад нуклеотидів рибосомної ДНК (рДНК) малої субодиниці рибосоми, відрізки внутрішнього транскрибованого гену VTB1 та VTB2 та гену цитохром оксидази 1 мітохондріальної ДНК (мтДНК). Розроблені для ПЛР дані ділянок праймери представлені у таблиці 1.

Таблиця 1. Праймери, розроблені для ПЛР ділянок геномної та мітохондріальної ДНК ентомопатогенних нематод

Праймери	Роди ЕПН	Джерело ДНК	Температура віджигу	Посилання
TW81 5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3'	<i>Steinernema</i> , <i>Heterorhabditis</i>	рДНК	45 °C	[9]
AB28 5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3'				
18S 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'	<i>Steinernema</i> , <i>Heterorhabditis</i>	рДНК	50 °C	[20]
28S 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'				
BIC58 5'-GATCACTTGGTTCGTAGATCG-3'	<i>Steinernema</i>	внутрішній спейсер рДНК	50 °C	[14]
BICRV 5'-GCTCAATAATGATCCTTCCGC-3'				
507 5'-AGT TCT AAT CAT AA(A/G) GAT AT(C/T) G G-3'	<i>Steinernema</i>	мтДНК	40 °C	[12]
588 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'				

Для ПЛР використовуються як спеціально розроблені суміші [13] так і готові багатокомпонентні комерційні набори (виробництва BioLine, TopBio, Qiagen).

Візуалізація. Електрофорез у гелі. Для електрорезу продуктів ПЛР, застосовують застиглий 1% (або 0,8%) розчин агарозного гелю у 10× буфері ТАЕ з попередньо виготовленими лунками для зразків ДНК. Гель поміщають у 1× розчин буферу ТАЕ у електрофоретичній ванні. Після завершення електрофорезу, гель виймають з буферного розчину та поміщають у розчин бромистого етидію (EtBr) на 10 хвилин. Після витримання у даному розчині, гель підсушують фільтрувальним папером та піддають ультрафіолетовому опроміненню середнього рівня (довжина хвилі 290 нм).

При наявності стійкої флуоресценції з відсутнім або низьким рівнем контамінації (олігонуклеотиди, або відрізки довжиною не більше 300 по), продукт ПЛР визначають як придатний до подальшого секвенування.

Висновок. Вивчення ентомопатогенних нематод є перспективним для розробки препаратів біологічного методу і їх ефективного використання для захисту агрокультур. Наведені у статті групи методів є необхідними для успішного виявлення та дослідження ЕПН обох

родин. Також, вони придатні для вивчення нематод з інших родин ряду Rhabditida.

Деякі методи (комплекс молекулярно-генетичних методик) потребують високої якості матеріалу, технічного забезпечення лабораторії та кваліфікації науковця.

Список використаних джерел

- Данилов Л. Г. Особенности экологии и распространения энтомопатогенных нематод в различных экосистемах / Л. Г. Данилов // Вест. защиты растений. – 2005. – Т. 1. – С. 18–26.
- Киринова Е. С. Новый паразит свекловичного долгоносика *Neoplectana bothynoderi* Kirjanova et Putschkova, sp. n. (Nematodes) / Е. С. Киринова, Л. В. Пучкова // Тр. зоол. ин-та АН СССР. – 1955. – Т. 18. – С. 53–62.
- Марчук І. У. Методика відбору ґрунтових зразків для агрохімічного аналізу / І. У. Марчук, А. В. Савчук. – К.: ДП "Агроцентр ЄвроХім-Україна", 2008. – 6 с.
- Стефановська Т. Р. Ефективність розмноження ентомопатогенних нематод *Steinernema carpocapsae* та *Heterorhabditis bacteriophora* на личинках *Galleria melonella* L. та *Tenebrio molitor* L. / Т. Р. Стефановська // Наукові доповіді НАУ. – 2007. – Т. 2. – Доступна за посиланням: <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2007-2/07stratm.pdf>
- Bedding R. A. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil / R. A. Bedding, J. R. Akhurst // Nematologica. – 1975. – Vol. 21, № 1. – P. 109–110.
- De Man J. G. Onderzoekingen over vrij in de aarde levende nematoden / J. G. De Man // Nederlandsch Tijdschrift voor de Dierkunde. – 1876. – H. 2. – S. 78-196.

7. De Man J. G. Die Eingheimischen, frei in der reinen erde und im süßen wasser lebends Nematoden / J. G. De Man // Nederlandsch Tijdschrift voor de Dierkunde. – 1880. – H. 5. – S. 1–104.
8. Georgis R. Vertical migration of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) in sandy loam soil / R. Georgis, G. O. Poinar // Journal of Nematology. – 1983. – Vol. 15, № 4. – P. 652–654.
9. Curran J., Driver F. Molecular taxonomy of *Heterorhabditis* / J. Curran, F. Driver – Luxembourg : European Commission Publication, 1994. – P. 41–48.
10. McGraw B. A. Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass / B. A. McGraw, A. M. Koppenhöfer // Applied soil ecology. – 2009. – Vol. 41, № 1. – P. 77–89.
11. Meyling N. V. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment / N. V. Meyling // Laboratory manual. – 2007. – January. P. 1–18.
12. Nadler S. A. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data / S. A. Nadler, E. Bolotin, S. P. Stock // Systematic Parasitology. – 2006. – Vol. 63, № 3. – P. 161–181.
13. Nguyen K. B., Hunt D. J. Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial symbionts / K. B. Nguyen, D. J. Hunt. – Leiden ; Boston : Brill, 2007. – 816 p.
14. *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia / K. B. Nguyen, M. Tesfamariam, U. Gozel, R. Gaugler, B. J. Adams // Nematology. – 2004. – Vol. 6, № 6. – P. 839–856.
15. Poinar G. O. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoaplectana carpocapsae* in the field / G. O. Poinar, Jr. A. Hom // Journal of Nematology. – 1986. – Vol. 18, № 1. – P. 34–36.
16. Schroeder W. J. Movement of the entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae in soil

- / W. J. Schroeder, J. B. Beavers // Journal of Nematology. – 1987. – Vol. 19, № 2. – P. 257–259.
17. Seinhorst J. W. On the killing, fixation and transferring to glycerin of nematodes / J. W. Seinhorst // Nematologica. – 1962. – Vol. 8. – P. 29–32.
18. Sturhan D. Seasonal occurrence, horizontal and vertical dispersal of entomopathogenic nematodes in a field / D. Sturhan // Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. – 1996. – H. 317. – S. 35–45.
19. Susurluk I. A. Seasonal and vertical distribution of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (TUR-H2) and *Steinernema feltiae* (TUR-S3) in turf and fallow areas / I. A. Susurluk // Nematology. – 2008. – Vol. 11, № 3. – P. 321–327.
20. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group / T. C. Vrain, D. A. Wakarchuk, A. C. Levesque, R. I. Hamilton // Fundamental and Applied Nematology. – 1992. – Vol. 15. – P. 563–574.
21. Yakovlev Ye. B. Findings of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) in Nature Reserves in Ukraine / Ye. B. Yakovlev, V. A. Kharchenko, Z. Mráček // Vestnik zoologii. – 2014. – Vol. 48, № 3. – P. 167–173.
22. Yakovlev Ye. B. The fauna of the Entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) of central forest-steppe of Ukraine / Ye. B. Yakovlev, V. V. Olenenko // Zoology in modern society: the All-Ukrainian scientific conference devoted to 175th anniversary of department of zoology. – Kyiv ; Kaniv. 15–18 of September, 2009 – P. 516–520 – Ukrainian: Яковлев Є. Б., Олененко В. В. Фауна ентомопатогенних нематод родин Steinernematidae та Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) Центрального лісостепу України.

Надійшла до едкології 03.04.15

Е. Яковлев, асп., В. Харченко, канд. биол. наук
Институт зоологии имени И. И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев, Украина

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД

Описаны методы для работы с энтомопатогенными нематодами в поле и в лабораторных условиях: отбор проб, выделение из проб и культивирование культур.

Ключевые слова: энтомопатогенные нематоды, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

Ye. Yakovlev, PhD stud., V. Kharchenko, PhD.
Schmalhausen Institute of Zoology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

STANDARD METHODS FOR ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES RESEARCH

This article describes field and laboratory methods for working with entomopathogenic nematodes: sampling, isolation from samples and cultivation.
Keywords: entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, *Heterorhabditis*

УДК 597.2/5(477)(035)

П. Шекк, д-р с.-х. наук
Одесский государственный экологический университет, Одесса

ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ ИХТИОФАУНЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТИЛИГУЛЬСКОГО ЛИМАНА

Установлено, что качественный состав ихтиофауны и условия формирования водных биоресурсов Тилигульского лимана зависят от гидрологического и гидрохимического режимов водоема, а также солёности его вод. В настоящее время ихтиофауна лимана представлена 37 видами рыб. Для повышения рыбопродуктивности, улучшения качественного состава и биоразнообразия ихтиофауны рекомендуется интродукция в водоём некоторых видов осетровых, лососевых, кефалевых, камбаловых, бычковых и других рыб для их акклиматизации или товарного выращивания.

Ключевые слова: ихтиофауна, гидрологический и гидрохимический режимы, рыбопродуктивность, биоразнообразие.

Введение. Марикультура – перспективная отрасль рыбного хозяйства. Базой для создания рыбных ферм и плантаций на юге Украины могут служить прибрежные солоноватоводные лиманы и лагуны. Их общая площадь в Азово-Черноморском бассейне превышает 200 тыс. га. Основная часть этих водоёмов сосредоточена в северо-западном Причерноморье. Их богатая естественная кормовая база позволяет выращивать тысячи тонн высококачественной товарной рыбы и других гидробионтов.

Для создания на базе солоноватоводных лиманов северо-западного Причерноморья высокопродуктивных, современных марихозяйств необходимо всесторонне изучить и проанализировать изменения экологического состояния водоёмов, связанные с этим нарушениями стру-

ктуры биоты, колебания её численности и биомассы, определить перспективные объекты культивирования и основные направления развития марикультуры.

Один из наиболее крупных и продуктивных водоёмов северо-западного Причерноморья – Тилигульский лиман. Топографические и гидробиологические исследования на этом водоёме были начаты еще в конце XVIII века. В последующий период проводились работы по изучению геоморфологии, гидрологии, гидрохимии водоёма, состава флоры и фауны. Наиболее интенсивно водоём изучался в XX веке. В этот период сотрудниками АЗЧерНИРО (ЮгНИРО), ОФИНБЮМ, Института Гидробиологии НАН Украины, Одесского национального университета им. И.И. Мечникова и других организаций проводились комплексные исследования, в результа-

те которых получены данные о динамике и особенностях формирования водного режима водоёма, химическом составе его вод, токсикологи, качественных и количественных характеристиках кормовой базы и ихтиофауны. Изучены продукционные возможности лимана [1;2;4;6;9;10]. Вместе с тем, при наличии значительной научной информации в настоящее время практически отсутствуют обобщающие, аналитические работы, которые позволили бы оценить влияние комплекса биотических и абиотических факторов на формирование ихтиофауны водоёма и на этой основе разработать стратегию его рыбохозяйственного использования.

Цель работы – анализ влияния экологического состояния Тилигульского лимана на условия формирования водных биоресурсов и качественный состав ихтиофауны, определение стратегии развития марикультуры в водоёме.

Материал и методика. Сбор ихтиологического материала проводился на протяжении 1980-2014 гг. в разные сезоны года на всей акватории лимана. В период промысла материал отбирали из промысловых орудий лова (сети, ставные невода, волокуши). Осенью, в период работы обловно-запускного канала, анализировали данные, характеризующий видовой состав, численность и размерно-массовые характеристики мигрирующей через канал в море рыбы. Использовали метод взятия репрезентативных средних проб [5].

В запретный период ихтиологический материал для анализа отбирали из контрольных орудий лова. Весь улов сортировали по видам. Фиксировали общую величину улова и соотношение в нем различных видов. Выборку (по 50-100 особей каждого вида) подвергали полному биологическому анализу [5]. Фиксировали соотношение отдельных видов в улове, распределение их по акватории лимана. Отбирали пробы для изучения питания рыб, определения возрастной структуры популяции. Весь полученный материал доставляли в лабораторию, где и проходила его обработка.

Видовой состав ихтиофауны определяли по определителю пресноводных и морских рыб Украины [3]. Для оценки общности качественного состава рыб лимана в разные годы рассчитывали коэффициент общности видового состава Т. Сьересена по формуле: $K_s = 2c / (a+b)$, где c – общие виды; a – множество видов в системе X ; b – множество видов в системе Y .

В работе также использованы данные ихтиологической службы Одессарыбвод, сообщения отдельных рыбаков и инспекторов службы государственной рыбоохраны о случаях вылова в акватории лимана редких видов рыб. Достоверность таких сообщений всегда тщательно проверялась.

Результаты и их обсуждение. Гидрологический и гидрохимический режим Тилигульского лимана определяется его связью с морем, объемами материкового пресноводного стока, поступлением атмосферных осадков и интенсивность испарения с поверхности. Все составляющие водного баланса водоёма изменяются по годам в широких пределах, поэтому условия существования (воспроизводства, нагула и зимовки) рыб разных экологических комплексов в водоёме нестабильны.

Формирование состава ихтиофауны и структура промысловых уловов в лимане определяются его гидрологическим и гидрохимическим режимом и, в первую очередь, солёностью. В годы опреснения, когда солёность не превышает 9-14‰, в лимане встречалось до 49 видов рыб. Осолонение водоёма сопровождается

снижением количества пресноводных и солоноватоводных видов и замене их морскими.

К морским и солоноватоводным видам рыб, которые постоянно живут и воспроизводятся в лимане, относятся бычки (от 7 до 14 видов), камбала глосса, кефаль пиленгас, колюшка (2 вида) и морские собачки. Таким образом, в осолонённой части лимана постоянно обитает от 13 до 20 видов рыб. В опреснённой части, в устье реки Тилигул и прилегающей акватории, встречается от 12 до 25 видов пресноводных рыб из семейств Карповые, Окуневые, Щучьи и др.

Большое влияние на формирование ихтиофауны водоёма оказывает его связь с морем. В отдельные годы периодически действующий канал обеспечивает водообмен лимана с морем и его зарыбление массовыми мигрирующими видами. В первую очередь, это атерина (*Atherina mochon*), кефалевые (*Mugilidae*), сельдевые (*Clupeidae*). В наиболее благоприятные годы, когда канал открывался в марте-апреле и работал до июля, в Тилигульский лиман, кроме обычных для этого водоема видов, заходили редко встречающиеся представители осетровых (*Acipenseridae*), выюновых (*Coditidae*), угревых (*Anguillidae*), а также ряд пресноводных видов, которые в многоводные годы выносились из устья Днепра и Буга в Днепро-Бугский лиман и проникали в лиман.

В годы изоляции Тилигульского лимана от моря и слабого материкового стока лиман осолонялся до 23-28‰ и выше. Ихтиофауна водоема в эти периоды была представлена 27-28 видами рыб. В годы с обильным материковым стоком, при работающем канале лиман-море, число видов, встречающихся в Тилигульском лимане, возрастало до 35-49.

В зависимости от солёности вод акватория лимана может быть условно разделена на три зоны: олигалинная зона (0,5-5‰), прилегающая к устью р. Тилигул, размещается в вершине лимана; полигалинная зона (18-28‰) занимающая центральную часть лимана; мезогалинная зона (12-18‰), находящаяся в нижней части лимана, соединенной с морем искусственным каналом.

В последние годы наблюдается общий рост солёности вод лимана на фоне уменьшения его объёма и площади. Это связано с уменьшением или практически полным отсутствием в отдельные годы пресноводного стока реки Тилигул, сокращением объёма атмосферных осадков и плохой работой канала лиман-море. В результате этого наблюдается сокращение площади олигалинной зоны более чем в два раза и соответствующее расширение полигалинной и мезогалинной зон. Причем в годы, когда канал лиман-море не работает или работает ограниченное время, граница между мезо- и полигалинной зонами практически отсутствует. Такие изменения привели к значительному сокращению числа пресноводных видов рыб (до 4), распределение которых в 2013-2014 гг. было приурочено в основном к плавневой и предустьевой зонам реки Тилигул.

Непродолжительная работа канала лиман – море привела также к обеднению лагуны морскими видами рыб. Ухудшились условия воспроизводства бычковых. Отсутствие достаточного количества нерестового субстрата привело к сокращению их численности и обеднению видового состава.

Для характеристики изменения состава ихтиофауны Тилигульского лимана за период с 1965 по 2014 гг. использованы имеющиеся в литературе данные [1; 4; 6; 8; 9], а также материалы собственных исследований за 2008-2014 гг. (табл. 1).

Таблица 1. Изменения видового состава ихтиофауны Тилигульского лимана

№ пп	Видовой состав ихтиофауны Тилигульского лимана	*Годы						*Экологическая характеристика
		1964 ¹	1970- 1990 ²	2001-2002 ³	2004 ⁴	2006 ⁵	2008-2014 ⁶	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Семейство Осетровые – Acipenseridae								
1 ¹	Белуга черноморская – <i>Huso huso</i> (Linnaeus, 1758)	–	+	–	–	–	–	3Д I лф
2 ²	Севрюга – <i>Acipenser stellatus</i> Pallas, 1771	+	–	–	–	–	–	3Д II лф
Семейство Угревые – Anguillidae								
3 ⁴	Речной угорь – <i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	+	+	3Д I+II пф
Семейство Анчоусовые – Engraulidae								
4	Анчоус европейский – <i>Engraulis encrasicolus</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	+	+	+	+	1П III пф
Семейство Сельдевые – Clupeidae								
5	Шпрот средиземноморский – <i>Sprattus phalericus</i> (Risso, 1827)	+	–	–	+	+	+	1П III пф
6 ³	Тюлька черноморско-азовская – <i>Clupeonella cultriventris</i> (Nordmann, 1840)	+	+	–	–	–	+	2П III пф
7	Пузанок азово-черноморский – <i>Alosa tanaica</i> (Grimm, 1901)	+	+	–	+	–	+	3П III пф
8 ²	Селедка черноморско-азовская проходная – <i>A. pontica</i> Eichwald, 1838	+	+	+	–	–	+	3П III пф
Семейство Карповые – Cyprinidae								
9 ³	Обыкновенный елец – <i>Leuciscus leuciscus</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	4Д II+III лф
10 ³	Обыкновенная плотва – <i>Rutilus rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)	+	+	–	+	–	+	4 Д II фф
11 ¹	Вырезуб – <i>Rutilus frisii</i> (Nordmann, 1840)	+	–	–	–	–	–	4Д II лф
12 ³	Обыкновенная краснопёрка – <i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus, 1758)	–	–	+	–	–	–	4П II+V лф
13 ³	Верховодка обыкновенная – <i>Alburnus alburnus</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	4П III фф
14 ³	Обыкновенная верховка – <i>Leucaspis delineatus</i> (Heckel, 1843)	+	–	–	–	–	–	4П III фф
15	Рыбец – <i>Vimba vimba</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	4Д II фф
16 ³	Густера – <i>Blicca bjoerkna</i> (Linnaeus, 1758)	–	+	+	–	–	+	4 4Д II+V фф
17 ⁴	Лещ – <i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	4Д II фф
18 ²	Жерех обыкновенный – <i>Aspius aspius</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	4П I лф
19	Белый толстолобик – <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Valenciennes, 1844)	–	+	–	–	–	–	4П III+V пф
20	Пестрый толстолобик – <i>Aristichthys nobilis</i> (Richardson, 1845)	–	+	–	–	–	–	4П III пф
21 ²	Чехонь – <i>Pelecus cultratus</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	+	–	–	–	4П I фф
22 ²	Европейский обыкновенный горчак – <i>Rhodeus amarus</i> Bloch, 1782	–	+	–	+	–	+	4Д V мф
23	Пескарь обыкновенный – <i>Gobio gobio</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	4П II псф
24	Белый амур <i>Ctenopharyngodon idella</i> (Valenciennes, 1844)	–	+	–	–	–	–	4П IV+V пф
25 ³	Карп европейский – <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758	+	+	–	–	–	–	4 Д II фф
26 ⁴	Серебряный карась <i>Carassius gibelio</i> (Bloch, 1782)	+	+	+	+	+	+	4 Д II фф
27 ⁴	Линь – <i>Tinca tinca</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	+	–	–	4 Д V фф
Семейство Вьюновые – Cobitidae								
28 ²	Вьюн – <i>Misgurnus fossilis</i> (Linnaeus, 1758)	+	–	–	–	–	–	3 Д I+II пф
Семейство Сомовые – Siluridae								
29 ³	Сом европейский – <i>Silurus glanis</i> Linnaeus, 1758.	+	–	–	–	–	–	4Д I+III оппсф
Семейство Лососевые – Salmonidae								
30	Микижа пресноводная – <i>Parasalmo mykiss</i> (Walbaum, 1792)	–	+	–	–	–	–	3П I лф
Семейство Щуковые – Esocidae								
31	Щука обыкновенная – <i>Esox lucius</i> Linnaeus, 1758	+	+	–	–	–	–	4Д I фф
Семейство Кефалевые – Mugilidae								
32	Кефаль сингиль – <i>Liza aurata</i> (Risso, 1810)	+	+	+	+	+	+	1П IV пф
33	Кефаль остронос – <i>L. saliens</i> (Risso, 1810)	+	+	+	+	+	+	1П IV пф
34	Кефаль пиленгас – <i>L. haematocheilus</i> (Temminck et Schlegel, 1845)	–	+	+	+	+	+	1П IV пф
35	Лобан – <i>Mugil cephalus</i> Linnaeus, 1758	+	+	+	+	+	+	1П IV пф
Семейство Атериновые – Atherinidae								
36 ³	Черноморская атерина – <i>Atherina pontica</i> (Eichwald, 1831)	+	+	+	+	+	+	1Д II+III фф
Семейство Колючковые – Gasterosteidae								
38 ²	Малая южная колючка – <i>Pungitius platygaster</i> Kessler, 1859	+	+	+	+	+	+	1Д II фф
39 ³	Трёхиглая колючка – <i>Gasterosteus aculeatus</i> Linnaeus, 1758	+	+	+	+	+	+	2Д II фф
Семейство Морские иглки – Syngnathidae								
40 ⁴	Черноморская змеевидная морская игла – <i>Nerophis teres</i> (Rathke, 1837)	+	+	+	–	+	+	1Д III в
41	Пухлощочкая рыба игла – <i>Syngnathus nigrolineatus</i> (Eichwald, 1831)	+	+	+	–	+	+	1Д II+III в
42 ⁴	Черноморская морская игла – <i>Syngnathus argentatus</i> Pallas, 1814	+	+	+	+	+	+	1Д II+III в
Семейство Лавраковые – Moronidae								
43	Обыкновенный лаврак – <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	–	+	–	–	–	–	1Д II+I пф
Семейство Окуневые – Percidae								
44 ³	Обыкновенный судак – <i>Sander lucioperca</i> (Linnaeus, 1758)	+	+	–	+	+	–	4П I фф
45 ³	Речной окунь <i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	+	+	+	–	–	+	4П I фф
46 ³	Черноморская Перкарина – <i>Percarina demidoffii</i> Nordmann, 1840	+	+	–	+	–	–	4П I лф
Семейство Собачковые – Blenniidae								
47	Морская собачка-сфинкс – <i>Aidablennius sphinx</i> (Valenciennes, 1836)	+	+	+	–	–	+	1Д II+Vo, лф
48	Красная морская собачка – <i>Parablennius anguinolentus</i> Pallas, 1814	–	–	–	–	+	+	1Д Vo, лф

Закінчення табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Семейство Бычковые – Gobiidae								
49	Мраморный бычок лысун – <i>Pomatoschistus marmoratus</i> Risso, 1810	+	+	+	–	–	+	1Д II о, млф
50	Бычок кнпювича длиннохвостый – <i>Knipowitschia longicaudata</i> (Kessler, 1877)	–	+	–	–	–	–	1Д II о, млф
51 ³	Бычок лысун кавказский – <i>Knipowitschia caucasica</i> Berg, 1916	+	+	+	–	–	+	1Д II о, млф
52 ³	Бычок кругляк – <i>Neogobius melanostomus</i> (Pallas, 1814)	+	+	+	+	+	+	2Д II о, млф
53	Бычок ратан – <i>N. ratan</i> (Nordmann, 1840)	–	+	–	+	+	+	2Д II о, лф
54	Бычок рыжик – <i>N. eurycephalus</i> (Kessler, 1874)	+	+	–	–	+	–	2Д II о, лф
55 ²	Бычок ширман – <i>N. syrman</i> (Nordmann, 1840)	+	+	+	+	–	+	2Д I о, лф
56 ²	Бычок песочник – <i>N. fluviatilis</i> (Pallas, 1814)	+	+	+	+	+	+	2Д II о, лф
57 ³	Бычок гонец – <i>N. gymnotrachelus</i> (Kessler, 1857)	+	+	–	+	+	+	2Д II о, млф
58 ³	Бычок-мезогобиус жабоголовый – <i>Mesogobius batrachocephalus</i> (Pallas, 1814)	+	+	+	+	+	+	2Д I о, лф
59	Черный бычок – <i>Gobius niger</i> Linnaeus, 1758	–	+	+	–	–	+	2Д II о, млф
60	Бычок травяник – <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> (Pallas, 1814)	+	+	+	+	+	+	1Д I о, фф
61 ²	Бычок цуцик – <i>Proterorhinus marmoratus</i> (Pallas, 1814)	+	+	–	+	+	+	2Д II о, млф
62	Звездчатая пуголовка – <i>Benthophilus stellatus</i> (Sauvage, 1874)	+	+	–	–	–	–	1Д II о, млф
Семейство Калкановые – Scopthalmidae								
63	Черноморский калкан – <i>Psetta maotica</i> (Pallas, 1814)	–	–	+	–	–	+	1Д I+II пф
Семейство Камбаловые – Pleuronectidae								
64	Глосса – <i>Platichthys luscus</i> (Pallas, 1814)	+	+	+	+	+	+	1Д I+II пф
СемействоSOLEЕВЫЕ – Soleidae								
65	Песчаный морской язык – <i>Pegusa lascaris</i> (Risso, 1810)	–	–	+	–	+	+	1Д II пф
Всего видов 65		49	44	29	27	28	37	

* Данные: 1- [1]; 2-[4]; 3- [8]; 4-[6]; 5- [9]; 6-результаты собственных исследований за 2008-2014 гг.

**В числителе над порядковым номером показано отношение таксона к определенному списку охраняемых видов: 1) Красная книга Украины (1994); 2) The Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Bern (1979); 3) IUCN Red List of Threatened Fishes The World Conservation (2006); 4) European Red List of Globally Threatened Animals (2001).

***1 – собственно морские виды; 2 – солоноватоводные виды (пonto-каспийские реликты); 3 – проходные виды; 4 – пресноводные и полупроходные виды; П – пелагические, Д – демерсальные; I – хищные, II – бентофаги, III – планктофаги, IV – детритофаги, V – фитофаги; пф – пелагофилы, фф – фитофилы, лф – литофилы, мф – малакофилы, млф – малаколитофилы, псф – псаммофилы, лпсф – литопсаммофилы, в – вынашивающие, о – охраняющие.

В составе ихтиофауны лимана в 60-е и 70-90-е гг. преобладают (пonto-каспийские) морские (18), солоноватоводные (11) и пресноводные (19) виды. В период с 2001 по 2014 гг. количество пресноводных видов рыб сократилось до 5, а морских и солоноватоводных осталось прежним. Число проходных видов за этот период сократилось с 7 до 5.

Домерсальные виды (42) преобладают над пелагическими (23). Основная масса рыб в ихтиофауне Тилигульского лимана – бентофаги (31), количество видов-хищников и планктофагов – 14, а детритофаги и фитофаги представлены 6-7 видами. По характеру размножения преобладают пелагофилы (17), фитофилы (16), литофилы (14) и малаколитофилы (8). Из встречающихся видов рыб 17 охраняют, а 3 вида вынашивают своё потомство.

Из рыб, встречающихся в Тилигульском лимане, 2 вида занесены в Красную книгу Украины, 7 видов охраняются Бернской конвенцией по сохранению европейской дикой природы и природных сред обитания, 18 видов входят в красный список находящихся под угрозой исчезновения рыб и 6 видов – в Европейский красный список животных, находящихся под угрозой глобального уничтожения.

Наиболее разнообразна ихтиофауна Тилигульского лимана была в 60-е годы. В этот период, благодаря низкой солености вод (6-10‰) и практически постоянной связи с морем, в лимане встречалось 49 видов рыб [1]. В 70-90-е гг. соленость вод лимана изменялась в широких пределах (от 0,36 до 16,7‰), что связано со значительными колебаниями пресноводного материкового стока, регулярностью и продолжительностью работы канала. Обильные паводки и связь с морем приводили к опреснению водоёма до 0,36-11,5‰; изоляция и маловодные годы – к его осолонению до 14-16,8‰. В целом такой режим был благоприятным и способствовал достаточно

высокому видовому разнообразию ихтиофауны, в состав которой входило до 44 видов рыб [4].

В период с 2000 по 2006 гг. в результате плохой работы канала лиман-море и значительного уменьшения пресноводного стока соленость вод лимана возросла до 23-28‰, что в свою очередь привело к снижению разнообразия ихтиофауны почти в два раза – до 27-29 видов рыб [9; 6; 10]. В 2008-2014 гг. гидрологический режим водоёма несколько улучшился благодаря его связи с морем. Это сопровождалось снижением солености вод лимана до 20-22‰ и повышением биоразнообразия его ихтиофауны, которая в этот период была представлена 37 видами рыб, преимущественно морскими и солоноватоводными (табл. 1).

Сравнивая коэффициенты общности видового состава ихтиофауны Тилигульского лимана в разные годы можно заключить, что наибольшее сходство ихтиофауны водоёма имела в 60 и 70-90-х гг. ($K_s=0,75$). Наиболее сильные различия в качественном составе ихтиофауны проявлялись в 2001 и в 2004 гг. ($K_s=0,57$). Также отмечается высокая степень сходства ихтиофауны между 2004, 2006 и 2014 гг. ($K_s=0,71$ и $0,78$ соответственно).

Рыбопродуктивность Тилигульского лимана, как и биоразнообразие ихтиофауны, зависят от солености вод. Максимальные уловы в водоёме отмечались в 1953-1960 гг. Этот период характеризовался значительным опреснением лимана. Соленость вод колебалась в пределах от 3-6 до 6-10‰. Ежегодно вылавливали в среднем – 1091,8 т (68,2 кг/га) карпа, плотвы, бычков, атерины, глоссы и других рыб. Максимальный улов был зарегистрирован в 1956 г. – 2349,6 т (146,9 кг/га).

С 1961 по 1971 гг. намечается тенденция к осолонению лимана: средняя соленость его вод возросла до 9-14‰, что привело к снижению рыбопродуктивности водоема с 54,9 до 17,3 кг/га, при общем падении уловов с 877,8 до 276,1 т (в среднем – 536,0 т или 33,5 кг/га). Из промысловых уловов полностью исчеза-

ют карп, плотва и глосса. Промысел базируется в основном на бычках и атерине. С 1974 года самой массовой промысловой рыбой в Тилигульском лимане становится атерина, второе место занимает тюлька.

В 1976-1979 гг. соленость вод лимана в отдельные периоды достигает 16-17‰, канал лиман-море работает не регулярно. Это отражается на уловах и составе ихтиофауны. Среднегодовой вылов не превышает 253,5 т, в том числе атерины 175,7 т (69,4 %), тюльки – 71,5 т (28,2 %), бычков – 3,9 т (1,5 %) и глоссы – 2,4 т (0,9 %). Рыбопродуктивность падает до 14,6 кг/га. К 1980 г. снижаются уловы бычка и глоссы. Промысел базируется на атерине – 580 т и тюлке – 120 т.

С 1983 по 1988 гг. канал работает эпизодически, соленость вод лимана возрастает в среднем до 16-18‰. Уловы колеблются от 192,1 до 616,0 т в год (16-38,5 кг/га соответственно). Основу промысла составляет атерина и судак. В отдельные годы в уловах значительное место занимают карп, тарань, тюлька, серебряный карась. Промышленное значение теряют бычки, глосса и кефаль.

Начиная с 1989 г. канал лиман-море работает эпизодически. На фоне дальнейшего повышения солености вод (до 20-23‰) и в связи с нерегулярной работой

канала среднегодовой улов в лимане падает до 105,1 т (6,5 кг/га), но в 1989-1990 гг. в результате некоторого опреснения (до 16-18‰) вылов вновь возрастает до 141,4-162,4 т за счет тарани и атерины, которая с 1992 г. становятся основным объектом промысла. В отдельные годы (1992; 1996; 1998; 2000 и 2001 гг.) уловы ее составляют 107-178 т., а в 2013 г. достигают максимума – 481,03 т (табл. 2).

В отдельные периоды с 1980 по 1990 гг. наблюдалось опреснение водоема до 8,5-12,5‰, которое сопровождалось увеличением численности судака, вылов которого в среднем составлял 53,3 т в год, а максимальный улов – 95,1 т был зарегистрирован в 1987 г. Последующее осолонение лимана привело к падению численности судака (наблюдалась его массовая гибель в водоеме) вплоть до полной потери его промыслового значения.

Уловы тюльки росли от начала 40-х годов до конца 50-х с 33 до 481 т. Максимальный улов был отмечен в 1956 г. – 880 т. После зарегулирования Днепра в 60-х годах тюлька появлялась в лимане эпизодически, только в годы с высокой водностью и работающем канале лиман-море. Максимум (124 т) её вылов достиг в 1973 г.

Таблица 2. Динамика уловов промысловых видов рыб (т) в Тилигульском лимане

Вид	Годы									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Глосса	0,10	0,10	–	0,02	0,10	0,10	0,10	0,04	–	0,43
Бычки	37,70	37,10	25,20	24,70	25,40	29,60	25,80	20,10	0,80	1,28
Атерина	256,30	147,10	301,60	252,20	163,20	283,60	323,10	371,40	380,60	481,03
Анчоус (хамса)	–	–	–	–	–	1,00	–	–	10,70	–
Черноморские кефали	7,90	18,50	15,00	0,04	0,40	–	4,10	20,60	0,40	0,75
Кефаль-пиленгас	0,10	1,30	0,40	0,10	0,80	1,00	2,70	3,30	–	–
Всего	302,10	204,10	342,20	277,06	189,90	315,30	356,80	415,44	392,50	483,49

Среднегодовые уловы атерины в 30–60-е годы колебались в пределах от 1,5 до 154 т. В годы, когда уловы бычков и рыб пресноводного комплекса в лимане находились на высоком уровне, промыслу атерины не уделялось особого внимания, так как рыба эта считалась сорной, малоценной. С 70-х гг. атерина становится основным объектом промысла. Официальный среднегодовой улов ее составил 204 т. В 90-х годах вылов снизился до 80 т, а с 2000 г. уловы атерины в лимане постоянно росли и в 2013 г. достигли максимума – 481,03 т (табл. 2).

Кефалевые в Тилигульском лимане в основном представлены сингилем (*L. aurata*). Два других вида – лобан (*Mugil cephalus*) и остронос (*Liza saliens*) – обычно встречались в значительно меньшем количестве. Уловы кефали всегда отличались значительной нестабильностью, что было связано с урожайностью поколений кефали в море и режимом работы канала, который и обеспечивал зарыбление водоема. С 1943 по 1950 гг. почти ежегодно в лимане вылавливали от 0,5 до 23,2 т кефали. Максимальный улов был отмечен в 1953 г., – 110,7 т (год высокоурожайного поколения кефали в море). В 1950-1955 гг. в среднем ежегодно ловили 54 т кефали. В последующие годы уловы редко превышали 20 т, а в 80-е гг. практически прекратились, что связано с отсутствием регулярной связи лимана с морем в этот период и депрессивным состоянием популяции кефалей. После реконструкции и открытия канала лиман-море в 2000 г. кефаль опять появилась в уловах. В годы нормальной работы канала вылов её составляет от 8 до 20 т.

Для повышения рыбопродуктивности Тилигульского лимана, улучшения качественного состава и биоразнообразия ихтиофауны неоднократно делались попытки

интродукции в водоем новых видов рыб, для их акклиматизации или товарного выращивания.

Первая интродукция в Тилигульский лиман 1330 экз. сеголеток кефали пиленгаса состоялась в 1973-1974 гг. Целью этих работ было формирование в лимане естественной, самовоспроизводящейся популяции кефали. Эксперимент не дал позитивных результатов. В последующие годы в лимане довольно часто ловили отдельные особи пиленгаса разного возраста, но половозрелые производители, оплодотворенная икра, личинки и мальки в акватории лимана не встречались.

В 1998-1999 гг. в лиман повторно вселили около 40 тыс. сеголеток пиленгаса из Палиевского рыбопитомника (Хаджибейский лиман). В 2001 г. было выловлено 11,8 т товарного пиленгаса, а в последующие годы (2002-2013 гг.) уловы колебались от 0,1 до 3,3 т.

Физиологическое состояние выловленных производителей и наличие в водоеме мальков пиленгаса, свидетельствует о том, что в настоящее время в Тилигульском лимане сформировалась самовоспроизводящаяся популяция этого вида. Это подтверждают данные ихтиопланктонных съемок, в ходе которых в 2002-2011 гг. в разных частях акватории лимана вылавливали развивающуюся икру пиленгаса и личинок разного возраста и размера, в том числе 5-6 суточных.

Такую гипотезу полностью подтвердила массовая гибель пиленгаса зимой 2014 г. В результате сильного шторма, скачкообразного охлаждения вод лимана и образования льда в январе 2014 г. погибло более 335 т пиленгаса [7], что свидетельствует о наличии в водоеме самовоспроизводящейся популяции и значительном промысловом запасе этого объекта, который в настоящее время недоиспользуется промыслом.

В 1977 г. в районе с. Кошары проводились экспериментальные работы по выращиванию в садках лаврака, доставленного из Франции. Цель эксперимента – формирование ремонтно-маточного стада с последующей интродукцией искусственно полученного посадочного материала в водоем для пастбищного выращивания. В условиях водоема вселенец показал высокую выживаемость и быстрый рост. Так, на естественной кормовой базе с июня по сентябрь при температуре 5,2-26,3°C масса лаврака увеличилась с 13,4 до 104,5 г, что может свидетельствовать о перспективности акклиматизации этого вида в Тилигульском лимане.

В 1976-1978 гг. в мезогалинной зоне низовий лимана проводили эксперименты по выращиванию сталевого лосося в садках на естественных кормах. Эпизодически лосося подкармливали искусственным кормом, доля которого в рационах не превышала 5-10%. За весенне-летний период в условиях лимана масса рыб увеличилась с 1,8-2,5 до 120-150 г. при высоких показателях выживания. О том, что лосось может быть успешно акклиматизирован в Тилигульском лимане, свидетельствуют факты вылова рыб, которые вышли в водоём из садков и достигли к моменту поимки (1979 г.) массы 0,5-0,8 кг.

В 1979 году в Тилигульском лимане в районе с. Калиновка проводились эксперименты по товарному выращиванию в садках белуги. На выращивание было посажено 2,5 тыс. сеголеток массой 5-15 г. За четыре месяца выращивания на естественных и искусственных кормах средняя масса белуги достигла в 450 г. После завершения эксперимента 2-х тыс. годовиков белуги выпустили в лиман. В 1980-1981 гг., по имеющимся

сообщениями, в водоеме ловили белугу массой от 1,6 до 3,8 кг, что может свидетельствует об успешной акклиматизации этого объекта к условиям лимана.

Кроме перечисленных выше видов в 90-х гг. прошлого века в делались достаточно успешные попытки акклиматизации в Тилигульском лимане кутума (*Rutilus frisii kutum*), солоноватоводный подвид вырзуза из Каспийского моря, радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), бестера и русского осетра (*Acipenser guldensadti*).

Для повышения численности бычков в лагунах северо-западного Причерноморья, в том числе и в Тилигульском лимане, достаточно эффективно используются искусственные нерестилища и рифы разнообразной конструкции. Так, применение искусственного нерестового субстрата на ограниченной акватории (в районе с. Калиновка) Тилигульского лимана в 2010-2013 гг. позволило увеличить численность бычков в 3,5-5 раз.

Принимая во внимание значительные колебания солености, в современных условиях единственный путь повышения рыбопродуктивности Тилигульского лимана и обогащения биоразнообразия его ихтиофауны – целенаправленное формирование популяции ценных видов морских и проходных рыб.

Проведенные исследования и анализ экологических особенностей потенциальных интродуцентов показали, что наиболее перспективными объектами марикультуры могут служить представители кефалевых (*Mugilidae*), осетровых (*Acipenseridae*), камбаловых (*Pleuronectidae*), калкановых (*Bothidae*), бычковых (*Gobiidae*), лососевых (*Salmonidae*) и мороновых (*Moronidae*) рыб, обладающих высокой толерантностью к солености, температуре и недостатку растворенного в воде кислорода (табл. 3).

Таблица 3. Абиотические условия товарного выращивания рыб

Перспективные объекты марикультуры	Температура, °C		Соленость, ‰	Критическая концентрация растворенного в воде кислорода, мг/дм ³
	min-max	оптимальная	min-max	
<i>Acipenser guldensadti</i>	3-26	18-24	0-22	1,20-1,80
<i>Huso huso</i>	3-30	18-24	0-18	
Бестер	3-30	18-26	0-18	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1-25	14-20	0-35	1,50-2,60
<i>Neogobius melanostoutus</i>	0-28	до 26	5-30	0,70-0,86
<i>Mesogobius barhocephalus</i>	0-28	до 26	7-10-30	
<i>Liza hematocheilus</i>	1-35	24-28	0-35	0,5-1,1
<i>Mugil cephalus</i>	5-35			
<i>Liza aurata</i>	7-35			
<i>L. saliens</i>	5-35			
<i>Platichthys luskus</i>	17-28	18-22	0-30	0,6-1,0
<i>Psetta maeotica</i>	18-36	20-23	12-30	1,1-1,4
<i>Dicentrarchus labrax</i>	до 35	22-27	до 35	2,1-2,5
<i>Morone saxatilis</i>	до 35	22-28	до 28	2,10-2,50

Учитывая естественные, экологические условия водоема, и особенности биологии предлагаемых объектов культивирования марикультуры рыб в Тилигульский лагуне может развиваться по пути пастбищного и контролируемого выращивания объектов интродукции (табл. 4).

Как важнейшее рыбохозяйственное мероприятие рассматривается строительство и обеспечение бесперебойной работы в оптимальном режиме обводно-запускного канала, который должен обеспечить водообмен между Тилигульским лиманом и сопредельными морскими акваториями.

Таблица 4. Перспективные пути развития марикультуры рыб в Тилигульском лимане

Объекты культивирования	Перспективы использования в марикультуре
Кефалевые <i>Mugilidae</i>	
<i>Liza hematocheilus</i>	Акклиматизация, формирование естественной самовоспроизводящейся популяции. Искусственное воспроизводство, пастбищное выращивание.
<i>Mugil cephalus</i> ; <i>Liza aurata</i> ; <i>L. saliens</i>	Искусственное воспроизводство, пастбищное и контролируемое выращивание в садках и изолированных участках лагуны
Камбаловые <i>Pleuronectidae</i>	
<i>Platichthys luskus</i>	Искусственное воспроизводство, пастбищное выращивание. Реакклиматизация, восстановление естественной популяции.
Калкановые <i>Bothidae</i>	
<i>Psetta maeotica</i>	Искусственное воспроизводство, пастбищное и контролируемое выращивание в садках

Закінчення табл. 4

Объекты культивирования	Перспективы использования в марикультуре
Бычковые Gobiidae	
<i>Neogobius melanostomus</i> ; <i>Mesogobius batrachocephalus</i>	Воспроизводство и пастбищное выращивание с использованием искусственных нерестилищ и рифов. Объект поликультуры при пастбищном рыбоводстве.
Осетрообразные Acipenseridae	
<i>Acipenser guldenstadti</i> ; <i>Huso huso</i> Бестер	Искусственное воспроизводство, пастбищное и контролируемое выращивание в садках
Лососевые Salmonidae	
<i>Salmo trutta</i> ; <i>Salmo gairdneri</i>	Искусственное воспроизводство, пастбищное и контролируемое выращивание в садках
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Искусственное воспроизводство и контролируемое выращивание в садках
Мороновые Moronidae	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Искусственное воспроизводство и контролируемое выращивание в садках.
<i>Morone saxatilis</i>	Искусственное воспроизводство, пастбищное и контролируемое выращивание в садках.

Только его существование позволит в современных условиях улучшить экологию водоема, оптимизировать и стабилизировать гидрохимический режим, сохранить рыбохозяйственное значение и поддерживать биоразнообразие ихтиофауны.

Высокая численность интродуцентов в лимане должна поддерживаться как за счет их искусственного воспроизводства, так и за счет формирования естественных популяций способных к воспроизводству в условиях водоема.

Выводы. Формирование состава ихтиофауны и структура промысловых уловов в Тилигульском лимане определяются его гидрологическим режимом и солоностью, которая зависит от объема пресноводного материкового стока, атмосферных осадков и поступления морских вод. Продолжительность и режим работы канала лиман-море обеспечивают не только оптимизацию гидрологического режима водоема, но и его зарыбление, что отражается на рыбопродуктивности.

Наибольшее разнообразие ихтиофауны (до 49-44 видов рыб), высокие уловы и рыбопродуктивность наблюдались в годы опреснения водоема, когда солоность вод колебалась в пределах от 3-6 до 6-10‰, а канал лиман-море работает регулярно.

Осолонение лимана до 23-28‰, наблюдавшееся в начале нынешнего столетия, связанное с уменьшением притока пресных вод и изоляцией от моря, привело к обеднению ихтиофауны (до 27-29 видов), снижению качества (ценные промысловые виды заменила атерина) и величины промысловых уловов и рыбопродуктивности.

В настоящее время восстановление связи лимана с морем обеспечило некоторое снижение солоности водоема (до 20-22‰) и его зарыбление мальками морских рыб, заходящими из моря. Это способствовало росту уловов и повышению биологического разнообразия

ихтиофауны (до 37 видов рыб), представленной в настоящее время в основном морскими и солоноватоводными формами.

Для повышения рыбопродуктивности, улучшения качественного состава и биоразнообразия ихтиофауны рекомендуется интродукция в водоем некоторых видов эвригаллиных и эвритермных рыб (осетровых, лососевых, кефалевых, камбаловых, бычковых и мороновых) для их акклиматизации, пастбищного или контролируемого товарного выращивания.

Список використаних джерел

1. Замбриборщ Ф. С. Рыбы низовьев рек и приморских лиманов северо-западной части Черного моря и условия их существования : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Ф. С. Замбриборщ. – Одесса, 1964. – 35 с.
2. Лиманно-устьевые комплексы Причерноморья: географические основы хозяйственного освоения / под ред. Г. И. Швевса. – Л. : Наука, 1988. – 303 с.
3. Мовчан М. Ю. В. Риби України / М. Ю. Мовчан. – К. : Золоті ворота, 2011. – 420 с.
4. Лиманы Северного побережья Черного моря / В. С. Полищук, Ф. С. Замбриборщ, В. М. Тимченко [и др.] – К. : Наук. думка, 1990. – 204 с.
5. Прякин Ю. В. Методы рыбохозяйственных исследований: учебн. пособие/ Ю. В. Прякин, В. А. Шкицкий. – Краснодар : Кубан. гос. ун-т, 2006. – 214 с.
6. Северо-западная часть Черного моря: биология и экология / отв. ред. Ю. П. Зайцев, Б. Г. Александров, Г. Г. Миничева. – К. : Наук. думка, 2006. – 700 с.
7. Смигирев С. М. Рыбохозяйственная оценка массовой гибели пиллгаса *Liza haematocheilus* (Temminck et Schlegel, 1845) в Тилигульском лимане зимой 2014 г. : матеріали VII Міжнар. наук.-практ. конф. "Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології" / С. М. Смигирев, С. Г. Бушуев, Г. Б. Черников [и др.] // Мелітополь ; Бердянськ, 2014. – С.219–222
8. Шекк П. В. Ихтиофауна Тилигульського лиману / П. В. Шекк // Причорноморський екологічний бюлетень. – 2004. – № 2(12). – С. 101–111.
9. Шерман И. М. Основы экологии и технологии рыбоводства в условиях астатической минерализации / И. М. Шерман, П. С. Кутищев. – К. : Высш. образование, 2007. – 143 с.

Надійшла до редакції 05.04.15

П. Шекк, д-р с.-г. наук
Одеський державний екологічний університет, Одеса, Україна

ХАРАКТЕРИСТИКА СТАНУ ІХТІОФАУНИ І ПЕРСПЕКТИВИ РИБОГОСПОДАРСЬКОГО ВИКОРИСТАННЯ ТИЛІГУЛЬСЬКОГО ЛИМАНУ

Встановлено, що якісний склад іхтіофауни та умови формування водних біоресурсів Тилигульського лиману залежать від гідролого-гідрохімічного режиму водоїми і солоності його вод. Сьогодні іхтіофауна лиману представлена 37 видами рыб. Для підвищення рыбопродуктивності, поліпшення якісного складу та біорізноманіття іхтіофауни рекомендується інтродукція у водоїму деяких видів осетрових, лососевих, кефалевих, камбалових, бичкових та інших, для їх акліматизації або товарного вирощування.

Ключові слова: іхтіофауна, гідрологічний і гідрохімічний режими, рыбопродуктивність, біорізноманіття.

P. Shekk, DSc
Odessa State Environmental University, Odessa, Ukraine

STATUS AND PROSPECTS ICHTHYOFAUNA USE OF FISHERY TILIGUL ESTUARY

It was established that the qualitative composition of the fish fauna and conditions of living aquatic resources Tyligul estuary depend on hydrological and hydrochemical regime of the water and salinity of its waters. At present, the fish fauna of the estuary represented 37 species of fish. To increase fish production, improve quality and biodiversity of fish fauna recommended the introduction of a pond of some species of sturgeon, salmon, mullets, flounder, goby and other, for their establishment or commercial breeding.

Keywords: fish fauna, hydrological and hydro-chemical regimes, fish productivity, biodiversity.

УДК 577.127:616.379-008.64

О. Харченко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВМІСТ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ І МОЛЕКУЛ СЕРЕДНЬОЇ МАСИ ПЛАЗМИ КРОВІ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МАРКЕРИ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

У результаті досліджень показано зростання вмісту трипсиноподібних ферментів в плазмі крові щурів на 3-тню та 7-му добу відворення моделі хронічної алкогольної інтоксикації. В період відміни етанолу (11-та, 21-ша та 28-доба) вміст даних протеїназ відновлювався до контрольних значень. Разом з тим виявлено підвищення вмісту МСМ в сироватці крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією в період після відміни введення етанолу: на 7-му, 11-му та 21-шу добу. Отримані результати свідчать, що хронічна алкогольна інтоксикація призводить до наростання ендоінтоксикаційних процесів в організмі, насамперед білкового походження.

Ключові слова: алкоголізм, трипсиноподібні протеїнази, молекули середньої маси, сироватка, плазма крові.

Вступ. На сьогодні проблема алкоголізму залишається однією з найважливіших не лише в нашій країні, а й в усьому світі, тому дослідження, спрямовані на розкриття патогенетичних механізмів даної патології є надзвичайно актуальними [1,2,3].

В останні роки все більшу увагу приділяють протеолітичним процесам в організмі людини та їх ролі в патогенезі різних захворювань [4]. Протеолітичні ферменти здатні викликати деградацію всіх компонентів позаклітинного матриксу тканин і судин, а їх рівень в крові регулюється складною системою білків-інгібіторів [5].

Трипсиноподібні протеїнази належать до класу серинових протеаз, що беруть участь в протеолітичному регулюванні гемопоезу. Вони володіють субстратною специфічністю і є білками гострої фази запалення. Сериновий протеоліз білків лежить в основі ферментативних каскадних реакцій багатьох фізіологічних процесів не лише у нормі, але і в умовах патогенезу. Протеоліз залучений до численних захворювань (виразки, емфізема легенів, артрити, хвороба Альцгеймера, пневмосклероз, аневризми, альвеоліти та інші), включаючи рак [6,7]. В умовах патології протеази стають надмірно активними, а їх робота не контролюється, що сприяє розвитку хвороби. Тому регулювання активності протеолітичних ферментів в організмі має важливе терапевтичне значення.

В даний час трипсиноподібні протеїнази розглядають як одні з ключових модуляторів біологічних функцій клітини. Роль протеїназ як сигнальних молекул полягає у специфічній регуляції метаболізму клітини через активацію протеїназ-активуючих рецепторів (PARs) зв'язаних з G-білками, та передають сигнал всередину клітини, що призводять до швидкої транскрипції генів медіаторів запалення [8].

Дослідження функцій і ролі протеолітичних ферментів у регуляції гомеостазу та розвитку хвороб тривають і сьогодні [9,10], зокрема, участь протеїназ в формуванні синдрому відміни етанолу залишається недостатньо вивченою. Очевидно, що проблема регулювання процесів протеолізу є актуальною для сучасної клінічної медицини.

При активації катаболічних процесів в крові з'являється велика кількість кінцевих і проміжних продуктів обміну у високих концентраціях, різноманітних біологічно активних речовин, продуктів деструкції тканин і органів, мікробних токсинів, гідроперекисів ліпідів і білків, які розподіляються в крові між плазмою і еритроцитами та характеризують стан інтоксикації [11,12]. Багато дослідників приділяють увагу оцінці змін фракційного складу білків та ліпопротеїдів, однак найбільш важливим в регуляції фізіологічної активності плазми є накопичення в ній високомолекулярних конгломератів, переважно імуноглобулінів [13], і, навпаки, низькомолекулярної фракції, так званих молекул середньої маси (МСМ).

Молекули середньої маси – це біологічно активні речовини пептидної природи з молекулярною масою до 5000 Д. Хімічний склад МСМ дуже неоднорідний і об'єд-

нує гетерогенну групу речовин. Він включає пептиди, глікопептиди, нуклеопептиди, ендорфіни, аміноцукри, поліаміни, багатоатомні спирти, деякі гуморальні регулятори – інсулін, глюкагон, адренкортикотропний гормон, вазопресин, окситоцин, ангіотензин, кальцитонін, ліпофусцин (внутрішньоклітинні комплекси ліпідів і білків), атерогенно окислені ліпопротеїни, деякі вітаміни, нуклеотиди, олігосахариди, похідні глюкуронових кислот та інші.

Накопичення МСМ є не тільки маркером ендоінтоксикації, надалі вони посилюють перебіг патологічного процесу, набуваючи ролі вторинних токсинів, впливаючи на життєдіяльність всіх систем і органів. Показник рівня МСМ вважають основним біохімічним маркером, що відображає рівень патологічного білкового метаболізму.

В зв'язку з вищевикладеним метою роботи було дослідження можливих біохімічних порушень білкового обміну при хронічній алкогольній інтоксикації та у період відміни етанолу у щурів, а саме: визначення вмісту трипсиноподібних протеїназ в плазмі крові в комплексі з рівнем молекул середньої маси в сироватці крові щурів як інтегрального показника ендотоксемії в динаміці розвитку алкогольного ураження.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах (самцях) масою 180-200 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Тварини були розділені на 2 групи: 1 – група контрольних тварин; 2 – група щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією. Розвиток експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації у піддослідних тварин відтворювали за методом [14], шляхом внутрішньошлункового введення 30% розчину етилового спирту протягом 10 діб натщесерце зондом довжиною 10 см з медичної сталі з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини раз на добу. Контрольній групі тварин, внутрішньошлунково вводили питну воду, яку використовували для розведення етанолу. Отримання матеріалу для біохімічних досліджень здійснювали через 1, 3, 7, 11, 21, 28 діб від початку експерименту. Щурів умертвляли методом дислокації шийних хребців.

Сироватку крові щурів отримували з цільної крові тварин. Для отримання сироватки кров вміщували у необроблені антикоагулянт пробірки, а для вилучення фібриногену та супутніх білків кров залишали за 37°C на 4 години у термостаті. Сироватку крові відбирали після центрифугування крові при 2000 об/хв через 10 хв [15].

Плазму крові отримували з цільної крові тварин, з додаванням розчину лимоннокислого натрію (38 г/л) у кінцевому співвідношенні 9:1. Плазму крові відбирали після центрифугування при 1500 g через 10 хв при температурі 4°C [16].

Фракцію низькомолекулярних пептидів отримували за удосконаленою методикою осадженням білкової фракції за допомогою хлорної кислоти [17]. До досліджуваного біологічного об'єкта, що знаходиться у рідкому стані (сироватка, гомогенат та т.і.) додають рівний

об'єм 1,2 М хлорної кислоти. Суміш залишають на 10 хв, після чого центрифугують 15-20 хв при 5000-9000 g. Надосад відділяють та нейтралізують 2 М K_2CO_3 (з розрахунку 0,2 мл на 1 мл надосаду). Після додавання K_2CO_3 проби залишають на льоду 15-20 хв та знову центрифугують 15-20 хв при 2500-3000 g. Після центрифугування до надосаду додають 96 % етанол (об'ємне співвідношення 4:1) та залишають на 10 хв. Осад, що утворився, відділяють центрифугуванням 10-15 хв при 2500-3000 g. Надосад, що утворився, переливають та аналізують на наявність в ньому пептидів з молекулярною масою від 7 до 0,5 кДа.

Фракцію трипсиноподібних ферментів отримували на колонці з бензамідин сефарозою [18]. Бензамідин є інгібітором трипсиноподібних ферментів, тому може бути використаний для їх отримання. В якості носія використовували бензамідин сефарозу 4В, робочий буфер – 20 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, для елюювання фракції трипсиноподібних ферментів – 50 мМ гліцин-НСІ буфер, рН 3,0. Швидкість усіх шагів хроматографічного процесу складала – 0,5 мл/хв. Зміну оптичного поглинання реєстрували за допомогою УФ-датчика при довжині хвилі 280 нм.

Результати та їх обговорення. В результаті досліджень виявлено зростання вмісту трипсиноподібних протеїназ в плазмі крові щурів на 3-тю (у 2 рази) та 7-му добу (у 1,4 рази) відносно контролю (рис. 1), що може бути пов'язано з розвитком оксидантного стресу в результаті хронічної алкогольної інтоксикації. Ці процеси, з одного боку, зумовлюють пошкодження клітинних мембран і вихід протеолітичних ферментів в кровотік [19], а з іншого боку – знижують синтез природних інгібіторів протеолізу [20], що призводить до підвищення їх активності в крові. Внаслідок дефіциту інгібіторів відбувається надмірне накопичення в крові продуктів деградації білкових компонентів, які утворюються в динаміці розвитку хронічної алкогольної інтоксикації.

В подальшому, в період відміни етанолу, на 11-ту, 21-шу та 28-добу вміст даних протеїназ відновлювався до контрольних значень. Таким чином зростання вмісту трипсиноподібних протеїназ в плазмі крові щурів може слугувати неспецифічним маркером лише гострої фази алкогольної інтоксикації (3-тя, 7-ма доба), оскільки в усі досліджені строки після відміни етанолу, починаючи з 11-тої доби (1-ша доба відміни введення етанолу), їх вміст нормалізувався до рівня контролю.

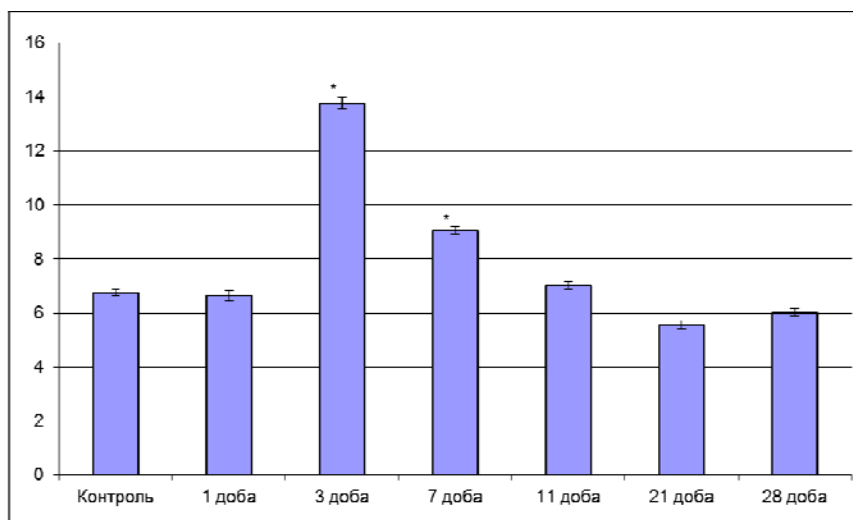


Рис. 1. Вміст трипсиноподібних ферментів в плазмі крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією (мг/мл)

11 доба – 1-ша доба після відміни введення етанолу;

21 доба – 10-та доба після відміни введення етанолу;

28 доба – 17-та доба після відміни введення етанолу.

* – $P < 0,05$ достовірність різниці порівняно з показниками контрольної групи

З метою ранньої діагностики ендогенної інтоксикації, що розвивається при алкогольних ураженнях, а також для оцінки важкості стану хворих на хронічний алкоголізм рекомендується встановлення метаболічного статусу організму за вмістом МСМ в сироватці крові.

Показано підвищення вмісту МСМ в сироватці крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією на 7-му, 11-ту та 21-шу добу в 1,6; 2,0 та 3,6 разів, відповідно, порівняно з контролем (рис. 2). Підвищення рівня МСМ на більш пізні строки дослідження (7-ма, 11-та та 21-ша доба) ніж зростання вмісту ТП-протеїназ (3-тя та 7-ма доба) є наслідком протеїназемії і може бути обумовлено недостатнім виведенням токсичних продуктів з організму і активним запальним процесом.

Підвищення вмісту МСМ в сироватці крові може бути обумовлено зниженням інтенсивності їх транспорту до органів детоксикації в результаті зменшення концентрації альбумінів крові, основним місцем синтезу яких є печінка [21]. Зниження рівня альбумінів в сироватці крові свідчить про патологічний процес в печінці, що в подальшому може спричинити розвиток таких захворювань, як гепатит, цироз та атрофія даного органу [22,23].

Зміна вмісту МСМ в сироватці крові при хронічному алкоголізмі є більш раннім критерієм розвитку ендотоксикозу в порівнянні з відхиленнями традиційних біохімічних показників (активності індикаторних ферментів (АСТ і АЛТ) та вмісту кінцевих продуктів метаболізму – сечовини, загального білірубину, креатиніну) внаслідок "запізнювання" останніх [24].

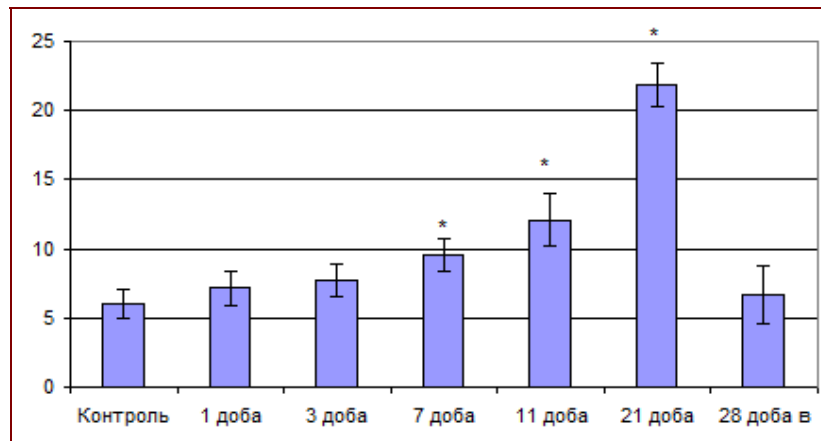


Рис. 2. Вміст молекул середньої маси в сироватці крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією (ум. од.).

11 доба – 1-ша доба після відміни введення етанолу;

21 доба – 10-та доба після відміни введення етанолу;

28 доба – 17-та доба після відміни введення етанолу.

* – $P < 0,05$ достовірність різниці порівняно з показниками контрольної групи

Таким чином, при відміні етанолу після хронічної алкогольної інтоксикації в крові відзначається порушення вмісту МСМ, що свідчить про високий рівень ендогенної інтоксикації і може, в свою чергу, ще більше активізувати протеоліз, посилити перебіг алкогольного ураження та сприяти розвитку його ускладнень.

Висновки

1. Розвиток хронічної алкогольної інтоксикації призводить до підвищення вмісту ТП-протеїназ на більш ранніх етапах дослідження (3-тя, 7-ма доба) та до зростання рівня МСМ на 7-му добу алкогольної інтоксикації та 11-ту і 21-шу добу (відповідно, 1-ша та 10-та доба після відміни введення етанолу).

2. Таким чином, визначення вмісту трипсиноподібних ферментів може слугувати маркером в період активного споживання етанолу, в той час як визначення рівня МСМ може бути використано в якості критерію об'єктивної діагностики змін метаболічного статусу організму на ранніх етапах алкогольного абстинентного синдрому.

Список використаних джерел

- MacPherson L. Development and preliminary validation of a behavioral task of negative reinforcement underlying risk-taking and its relation to problem alcohol use in college freshmen / L. MacPherson, N. T. Calvin, J. M. Richards // *Alcoholism Clinical Experimental Research*. – 2012. – Jun., 36(6). – P. 950–957.
- Nishiyama H. Problems around liver transplantation for alcoholic liver diseases—from the standpoint of alcoholic treatment / H. Nishiyama // *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. – 2012. – Oct., 47(5). – P. 242–245.
- Fischer S. The role of negative urgency and expectancies in problem drinking and disordered eating: testing a model of comorbidity in pathological and at-risk samples / S. Fischer, R. Settles, B. Collins // *Psychology of Addictive Behaviors: journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors*. – 2012. – Mar., 26(1). – P. 112–123.
- Фомочкіна І. І. Патогенетичне значення протеїназно-інгібіторної системи в розвитку локальної і системної патології / І. І. Фомочкіна, А. В. Кубишкін // *Патологія*. – 2012. – № 2(25). – С. 50–54.
- Михальчук В. Н. Трипсиноподібні протеїнази в фізіології і біології людини / В. Н. Михальчук // *Актуальні проблеми транспортної медицини*. – 2008. – № 4(14). – С. 134–139.
- Lindner I. Alpha2-macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding beta-catenin signaling / I. Lindner, N. Y. Hemdan, M. Buchold // *Cancer Research*. – 2010. – Jan., 70(1). – P. 277–287.
- Davies P. L. Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity / P. L. Davies, O. B. Spiller, M. L. Beeton // *Thorax*. – 2010. – Mar., 65(3). – P. 246–251.

8. Ossovskaya V. S. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease / V. S. Ossovskaya, N. W. Bunnet // *Physiology Review*. – 2004. – 84. – P. 579–621.

9. Late results of surgical treatment in patients, suffering complicated forms of chronic pancreatitis / V. M. Ratchyk, D. V. Orlovskyi, V. A. Makarchuk [et al.] // *Klinicheskaia Khirurgiia*. – 2014. – Dec., (12). – P. 22–25.

10. Activity of trypsin-like enzymes and gelatinases in rats with doxorubicin cardiomyopathy / Iu. A. Gordienko, Y. V. Babets, A. O. Kulnich [et al.] // *Ukrainian Biochemistry Journal*. – 2014. – Nov.–Dec., 86(6). – P. 139–146.

11. Капулер О. М. Особенности эндогенной интоксикации у больных псориазом / О. М. Капулер, Ф. Х. Камилов // *Омс. науч. вест.* – 2011. – № 1. – С. 89–91.

12. Келина Н. Ю. Биохимические проявления эндотоксикоза: методические аспекты изучения и оценки, прогностическая значимость (аналитический обзор) / Н. Ю. Келина, Н. В. Безручко, Г. К. Рубцов // *Вест. Тюмен. гос. ун-та*. – 2012. – № 6. – С. 143–147.

13. Степанец І. О. Отримання та характеристика імуноглобулінів класу G з сироватки крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією / І. О. Степанец, Н. К. Кравченко, Л. І. Остапенко // *Мед. та клін. хімія*. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 72–75.

14. Халилов М. Х. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации / М. Х. Халилов, Ш. Я. Закирхорджеев // *Вопр. клиники алкоголизма: сб. науч. тр.* – Ташкент, 1983. – С. 38–41.

15. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. – М., 1987. – 310 с.

16. Токар А. В. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові [методичні рекомендації] / А. В. Токар, Е. М. Макогоненко, Т. М. Платонова. – К., 1994. – 23 с.

17. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: метод. рекомендации / сост. Н. И. Габриэлян, Э. Р. Левицкий, А. А. Дмитриев [и др.] – М.: Медицина, 1985. – 18 с.

18. Affinity Chromatography. Principles and Methods // *Amersham Pharmacia Biotechnology*. – 2001. – AB. – P. 89–96.

19. Самохіна Л. М. Особливості участі тоніну і кальпаїнів у патогенезі серцевої недостатності / Л. М. Самохіна, С. О. Лазарева, В. І. Волков // *Досягнення біології та медицини*. – 2007. – № 1 (9). – С. 14–17.

20. Особенности острофазового ответа при различных вариантах воспалительных процессов придатков матки / С. В. Шрамко, В. Н. Зорина, Л. Г. Баженова [и др.] // *Бюл. сибир. медицины*. – 2007. – № 1. – С. 105–110.

21. Tuma D. J. Effects of Ethanol on Protein Trafficking in the Liver / D. J. Tuma, M. F. Sorrell // *Seminars in liver disease* – 1988. – Vol. 8, № 1. – P. 69–80.

22. Koton K. Serum albumin is present at higher levels in alcoholic liver cirrhosis as compared to HCV-related cirrhosis / K. Koton, M. Fukushima, Y. Horikawa // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 72–75.

23. Bernardi M. Human albumin in the management of complications of liver cirrhosis / M. Bernardi, C. Maggioli, G. Zaccherini // *Critical Care*. – 2012. – Vol. 16, № 211. – P. 1–7.

24. Сидоров П. И. О спектральных показателях крови и мочи в динамике острых алкогольных психозов / П. И. Сидоров, А. Г. Соловьев, Е. Н. Сидникова // *Физиология человека*. – 2000. – Т. 26, №3. – С. 139–141.

Надійшла до редколегії 12.05.12

О. Харченко, канд. биол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СОДЕРЖАНИЕ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ И МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В результате исследований показано повышение содержания трипсиноподобных ферментов в плазме крови крыс на 3-м и 7-м сутки развития хронической алкогольной интоксикации. В период отмены этанола (11-ые, 21-ые и 28-ые сутки) содержание данных протеиназ восстанавливалось до контрольных значений. Вместе с тем выявлено повышение содержания МСМ в сыворотке крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией в период после отмены введения этанола: на 7-ые, 11-ые и 21-ые сутки. Полученные результаты свидетельствуют, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к нарастанию эндоинтоксикационных процессов в организме, прежде всего белкового происхождения.

Ключевые слова: алкоголизм, трипсиноподобные протеиназы, молекулы средней массы, сыворотка, плазма крови.

O. Kharchenko, PhD.

Taras Shevchenko national university of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CONTENT OF BLOOD PLASMA TRYPSIN-LIKE ENZYMES AND MOLECULES OF AVERAGE MASS AS POTENTIAL MARKERS OF THE CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION

It was shown elevation in content of trypsin-like enzymes in rats' blood plasma on 3rd and 7th day of the chronic alcoholic intoxication development. In the period of ethanol termination (11th, 21st, and 28th days) these proteinases content renewed to control values. The increasing in average mass molecules in blood serum of rats with the alcoholic intoxication in the period of ethanol administration termination on 7th, 11th, and 21st day was established as well. The data obtained suggest that the chronic alcoholic intoxication leads to enhancement of endotoxycological processes in organism, first of all, of protein origin.

Key words: alcoholism, trypsin-like proteinases, average mass molecules, serum, blood plasma.

УДК 796.013.1:796.015.1

Н. Богдановська, проф., А. Голубенко, асп.
Запорізький національний університет, Запоріжжя

РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В УМОВАХ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ ВИСОКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

Досліджено особливості розвитку оксидативного стресу у дівчат 19-22 років під впливом фізичних навантажень високої інтенсивності. Виявлено об'єктивне існування достовірних відмінностей у показниках, що характеризують розвиток оксидативного стресу у групі спортсменок, виражений у збільшенні рівня генерації активних форм кисню, вмісту маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикалу та продуктів перекисного окиснення ліпідів.

Ключові слова: оксидативний стрес, фізичні навантаження.

Вступ. Згідно із загальноприйнятим на сьогодні визначенням, оксидативний стрес являє собою порушення балансу прооксидантно-антиоксидантних речовин у бік перших, серед яких ключове місце займають активні форми кисню, вивченню шляхів утворення та метаболізму яких присвячені чисельні дослідження [14;19]. Зокрема, показана роль оксидативного стресу у виникненні та розвитку патологічних станів, таких як аутоімунні (системні) [8], серцево-судинні [20] захворювання, цукровий діабет [18], хвороба Паркінсона [11]. Досліджені особливості розвитку оксидативного стресу за різних стресових станів, до яких можна віднести іонізуючу радіацію [5], вплив канцерогенів [4] та ін. Однак, очевидним є те, що особливе місце в активізації метаболічних змін займають фізичні навантаження, які відіграють ключову роль у функціонуванні антиоксидантної системи. Дійсно, дослідженню змін, що відбуваються у антиоксидантній системі під впливом фізичних навантажень різної інтенсивності та тривалості присвячена численна кількість робіт, однак вони обмежуються лише констатацією вмісту певних метаболітів, здатних або виснажувати антиоксидантну систему [9], або ж сприяти певній стабілізації балансу прооксидантно-антиоксидантних речовин [1;16]. Важливо відмітити, що у вітчизняних та закордонних дослідженнях не було приділено належної уваги вивченню оксидативного стресу в умовах відновлення організму після тривалих фізичних навантажень, зокрема відсутні дані, які би дозволили виявити такі особливості у дівчат-спортсменок високої кваліфікації віком 19-22 років. Зважаючи на важливість та актуальність окресленого питання, нами було здійснене вивчення інтенсивності оксидативного стресу у

дівчат, які не піддаються високим фізичним навантаженням та спортсменок високої кваліфікації.

Метою роботи було визначення особливостей розвитку оксидативного стресу в організмі дівчат 19-22 років в умовах відновлення після систематичних фізичних навантажень високої інтенсивності.

Матеріали і методи. У дослідженні прийняло участь 25 осіб жіночої статі, з яких було сформовано 2 групи. До складу першої групи увійшли 10 студенток вищого навчального закладу віком 19-22 роки, які займалися за програмою фізичного виховання для студентів вищих навчальних закладів. До складу другої групи увійшли 15 спортсменок-членів збірної зі спортивної аеробіки, неодноразові чемпіонки і призери України зі спортивної аеробіки, які мають спортивний розряд кандидата у майстри спорту та майстра спорту.

Дослідження було проведене в найбільш наближених умовах для двох груп, після періоду відновлення та відпочинку, який збігся для групи нетренованих осіб із закінченням зимових канікул та початком аудиторних занять, а для групи тренуваних осіб – із закінченням перехідного періоду і початком підготовчого. Перехідний період у групи спортсменок характеризується наступним розподілом годин навчально-тренувального навантаження: 25% часу відведено на тренування зі значним навантаженням, 65% – на тренування зі середнім навантаженням, 10% – тренувань з малим навантаженням. Кількість днів тренування у перехідному періоді становила 20 днів, кількість днів відпочинку – 6.

Під час дослідження плазмі крові у дівчат обох груп визначали біохімічні показники, які характеризують стан антиоксидантної системи. Для цього нами були визначені вміст маркерів різних шляхів генерації суперок-

сидного радикалу (COP), а саме вміст тромбоксану B₂ (TxB₂, пмоль·мг⁻¹ білка), лейкотриєну C₄ (LtC₄, пмоль·мг⁻¹ білка), сечової кислоти (нмоль·мг⁻¹ білка), арахідонової кислоти (нмоль·мг⁻¹ білка), продуктів деградації АТФ, ГТФ (нмоль·мг⁻¹ білка).

Визначення вмісту ейкозаноїдів, (тромбоксану B₂ та лейкотриєну C₄), проводили в спиртових екстрактах плазми крові за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними наборами реактивів фірми "Amersham" (Англія). Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми "Beckman" (Німеччина). Визначення вмісту сечової кислоти проводили в колориметричній реакції за допомогою набору реактивів фірми "Філісит-Діагностика" (Україна, м. Дніпропетровськ). Вміст вільної арахідонової кислоти визначали в ліпідному гептан-ізопропанольному екстракті плазми крові спектрофотометричним методом [6]. Визначення вмісту продуктів деградації АТФ, ГТФ проводили загальноновживаним колориметричним методом за Ю.М. Островським [2].

Рівні генерації активних форм кисню (АФК) визначали за швидкістю генерації супероксидного радикалу (в умовних одиницях), гідроксильного радикалу (в умовних одиницях) та перекису водню (пмоль·мг⁻¹ білка).

Визначення швидкості генерації супероксидного радикалу у пробах оцінювали методом J. McCord, I. A. Fridovich за зміною екстинції при окисненні цитохрому C ("Sigma", США) [15]. Визначення швидкості генерації *ОН-радикалу проводили спектрофотометрично за методом Conte D. [et al.] [12] з використанням 2-дезоксид-Д-рибози ("Sigma", США). Визначення вмісту перекису водню проводили спектрофотометрично з використанням KJ і лактопероксидази ("Sigma", США) [10].

Інтенсивність неферментативного вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК, нг·мг⁻¹ білка), малонового діальдегіду (МДА, нмоль·мг⁻¹ білка), також за вмістом вільного негемового заліза (пмоль·мг⁻¹ білка) – активатора утворення в реакції Фентона *ОН-радикала, що є ініціатором перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Визначення вмісту дієнових кон'югатів (ДК) проводили у гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометрично за методом В.Б. Гаврилова та ін. [6]. Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) проводили спектрофотометрично за методом M. Uchiyama, M. Mihara [21]. Вміст вільного негемового заліза в плазмі визначали модифікованим фотометричним методом з використанням добірки реактивів фірми "Філісит діагностика" (Україна, м. Дніпропетровськ).

Блок в плазмі крові визначали за методом О.Н. Lowry [13].

Розраховували також відносні зміни (Δ , %) біохімічних показників групи тренуваних дівчат відносно групи нетренованих осіб за формулою:

$$\Delta = (X_i - X_n) \cdot 100 / X_n$$

де X_i – значення показника у групі тренуваних дівчат; X_n – значення показника у групі нетренованих дівчат (контроль).

Крім зазначених біохімічних показників одночасно в нетренованих і тренуваних дівчат за допомогою субмаксимального тесту PWC₁₇₀ визначали загальну фізичну працездатність (PWC₁₇₀) та аеробну продуктивність (MCK) їхнього організму за формулами В. Л. Карпмана [7]:

$$PWC_{170} = [N_1 + (N_2 - N_1) \cdot (170 - ЧСС_1) / (ЧСС_2 - ЧСС_1)] / MT$$

де N_1 – потужність першого навантаження, кгм·хв⁻¹; N_2 – потужність другого навантаження, кгм·хв⁻¹; ЧСС₁ – частота серцевих скорочень наприкінці першого навантаження, хв⁻¹; ЧСС₂ – частота серцевих скорочень наприкінці другого навантаження, хв⁻¹; MT – маса тіла, кг.

$$MCK = 1,7 \cdot PWC_{170} \cdot MT + 1240,$$

де PWC₁₇₀ – відносна величина загальної фізичної працездатності, кгм·хв⁻¹·кг⁻¹; MT – маса тіла, кг; 1,7 та 1240 – постійні коефіцієнти.

Усі отримані результати були оброблені стандартними методами математичної статистики з використанням пакета Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Структура річного циклу підготовки спортсменів, які спеціалізуються у спортивній аеробіці, включає в себе три цикли підготовки, кожен із яких має свої особливості режимів навантаження та відпочинку. Найменша кількість тренувальних днів притаманна саме перехідному періоду, який є наступним після змагального, якому характерна найбільша кількість тренувальних днів, які включають понад 50% тренувань з великим та значним навантаженням.

Особливістю перехідного періоду, на якому було проведено обстеження спортсменок, є збільшена кількість днів відпочинку та переважання тренувань з середнім і низьким навантаженням. У відповідності до цієї особливості, для обстеження групи нетренованих осіб був обраний період, який найбільшою мірою відповідав такому, як для спортсменок і співпадав із закінченням зимових канікул та початком навчального семестру.

На етапі відновлення у обох групах нами були визначені показники, які характеризують функціонування оксидантно-антиоксидантної системи в групах тренуваних та нетренованих дівчат.

Таблиця 1. Вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикалу в плазмі крові тренуваних і нетренованих дівчат (M±m)

Показники	Нетреновані (контроль) (n=10)	Треновані (n=15)	Δ , %
Тромбоксан B ₂ , пмоль·мг ⁻¹ білка	1,52±0,22	4,3±0,68*	+64,65
Лейкотриєн C ₄ , пмоль·мг ⁻¹ білка	1,38±0,23	3,86±0,68*	+64,25
Сечова кислота, нмоль·мг ⁻¹ білка	2,77±0,29	4,36±0,62*	+36,47
Арахідонова кислота, нмоль·мг ⁻¹ білка	9,35±0,91	17,14±2,15*	+45,45
Продукти деградації АТФ, ГТФ, нмоль·мг ⁻¹ білка	1,53±0,31	5,14±1,06*	+70,23

Δ , % – величина відносної різниці між абсолютними значеннями показників, зареєстрованих у групах тренуваних та нетренованих дівчат; * – різниця достовірна (P<0.05) відносно значення у контролі (у нетренованих дівчат)

Було проведено визначення вмісту маркерів різних шляхів, які призводять до утворення COP, у групах тренуваних та нетренованих дівчат (таблиця 1). Варто зазначити, що процеси генерації COP були значною мірою інтенсифіковані у групі спортсменок у порівнянні із контролем, зокрема достовірно відмінність вдалося виявити за усіма показниками. Встановлено, що найбільший приріст (70,23%) спостерігався для вмісту продуктів деградації пуринових нуклеотидів, що відбувалося паралельно із збільшенням до 36,47% кінцевого продукту їх розпаду, сечової кислоти, яка утворюється при роботі ферменту ксантиоксидази. У групі тренуваних дівчат достовірно збільшеним виявився вміст протагландинів (на 64,25%), а збільшення вмісту вільної

льший приріст (70,23%) спостерігався для вмісту продуктів деградації пуринових нуклеотидів, що відбувалося паралельно із збільшенням до 36,47% кінцевого продукту їх розпаду, сечової кислоти, яка утворюється при роботі ферменту ксантиоксидази. У групі тренуваних дівчат достовірно збільшеним виявився вміст протагландинів (на 64,25%), а збільшення вмісту вільної

арахідонової кислоти становило 45,45%. Незважаючи на існування достовірної відмінності між абсолютними значеннями вмісту ейкозаноїдів у плазмі крові спортсменок у порівнянні із групою контролю, розраховані співвідношення вмісту даних метаболітів ($\text{TxV}_2/\text{LTC}_4$) становили в обох групах 1.1 у.о., що засвідчило врівноваженість між циклооксигеназним та ліпооксигеназним шляхами перетворення вільної арахідонової кислоти в обох групах.

Раніше нами встановлено [3], що причиною надмірної генерації АФК в організмі спортсменок є стрес, що неодмінно супроводжує навантаження високої інтенсивності, психоемоційне виснаження, запальні реакції,

частота яких неодмінно збільшується по мірі наближення змагального періоду внаслідок розвитку постнавантажувального імунодифіциту або імунодепресії. Зважаючи на це, беззаперечно важливими стали результати, отримані нами при визначенні рівнів генерації активних форм кисню (таблиця 2). Аналіз отриманих даних показав, що у дівчат-спортсменок швидкість генерації супероксидного радикалу була на 50% більшою, а швидкість генерації гідроксильного радикалу – на 88,74% більшою, ніж у групі нетренованих осіб. Вміст перекису водню був збільшений у спортсменок на 43,90%.

Таблиця 2. Рівні генерації АФК і вміст H_2O_2 в плазмі крові тренуваних і нетренованих дівчат ($\text{M} \pm \text{m}$)

Показники	Нетреновані (контроль) (n=10)	Треновані (n=15)	$\Delta, \%$
Швидкість генерації *O_2 , ум.од.	1,51 $\pm$ 0,25	3,02 $\pm$ 0,62*	+50,00
Швидкість генерації *OH -радикалу, ум.од.	2,15 $\pm$ 0,51	19,1 $\pm$ 3,2*	+88,74
Перекис водню, $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	5,06 $\pm$ 0,46	9,02 $\pm$ 0,72*	+43,90

$\Delta, \%$ – величина відносної різниці між абсолютними значеннями показників, зареєстрованих у групах тренуваних та нетренованих дівчат; * – різниця достовірна ($P < 0.05$) відносно значення у контролі (у нетренованих дівчат)

Відомо, що активація процесів ПОЛ значною мірою позначається на можливостях аеробного енерговиробництва, на скорочувальних функціях м'язів і, як наслідок, на працездатності спортсмена в цілому [17]. Процеси вільнорадикального окиснення, і в першу чергу ПОЛ біологічних мембран, є важливим дезадапційним чинником, що обумовлює розвиток перетворення та зниження фізичної працездатності. У відповідності до такої особливості, важливо було проаналізувати вміст вільного заліза та продуктів ПОЛ у плазмі крові дівчат обох груп (таблиця 3).

Встановлено, що вміст негемового заліза виявився достовірно збільшеним (на 48,17%) у групі спортсменок. Надмірне збільшення вмісту вільного заліза, який є ініціатором ПОЛ в реакції Фентона, може бути причиною інтенсивного утворення *OH -радикалу (таблиця 1). У групі тренуваних дівчат вміст дієнових кон'югатів перевищував вміст даного метаболіту в крові нетренованих дівчат на 43,48%. Вміст МДА був вищим на 65,47% також у групі тренуваних дівчат.

Таблиця 3. Вміст продуктів ПОЛ в плазмі крові тренуваних і нетренованих дівчат ($\text{M} \pm \text{m}$)

Показники	Нетреновані (контроль) (n=10)	Треновані (n=15)	$\Delta, \%$
Дієнові кон'югати, $\text{нг} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	3,73 $\pm$ 0,72	6,6 $\pm$ 1,25	+43,48
Малоновий діальдегід, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	16,30 $\pm$ 3,10	47,2 $\pm$ 9,6*	+65,47
Негемове залізо, $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	2,26 $\pm$ 0,32	4,36 $\pm$ 0,62*	+48,17

$\Delta, \%$ – величина відносної різниці між абсолютними значеннями показників, зареєстрованих у групах тренуваних та нетренованих дівчат; * – різниця достовірна ($P < 0.05$) відносно значення у контролі (у нетренованих дівчат)

Розраховані нами співвідношення вмісту МДА/ДК, що можуть свідчити про тривалість стадії пролонгації процесу ПОЛ, дозволили встановити наступне. Для контрольної групи нетренованих дівчат цей умовний показник становив 4,37 ум. од., тоді як для групи тренуваних дівчат – він був достовірно вищим – 7,15 ум.од. Порівнювання величини цього відношення, можемо зробити припущення про зниження функціональної потужності антиоксидантної системи групи тренуваних дівчат, порівняно із групою нетренованих, що обумовлене більшою інтенсивністю перетворення первинних продук-

тів ПОЛ в більш токсичні проміжні та кінцеві продукти у спортсменок, які спеціалізуються у спортивній аеробіці.

Досить очікуваними стали результати досліджень, спрямовані на визначення показників загальної фізичної працездатності та аеробної продуктивності (таблиця 4). Достовірно більш високою виявилася величина загальної фізичної працездатності спортсменок, що у процентному співвідношенні складало 25,82%. Показник аеробної продуктивності також був вищим у групі тренуваних дівчат (на 18,98%), але достовірної різниці між обстеженими групами за даним показником виявлено не було.

Таблиця 4. Функціональні показники у тренуваних і нетренованих дівчат ($\text{M} \pm \text{m}$)

Показники	Нетреновані (контроль) (n=10)	Треновані (n=15)	$\Delta, \%$
Загальна фізична працездатність, $\text{кг} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$	11,06 $\pm$ 1,12	14,91 $\pm$ 1,04*	+25,82
Аеробна продуктивність, $\text{мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$	38,80 $\pm$ 3,67	47,89 $\pm$ 4,32	+18,98

$\Delta, \%$ – величина відносної різниці між абсолютними значеннями показників, зареєстрованих у групах тренуваних та нетренованих дівчат; * – різниця достовірна ($P < 0.05$) відносно значення у контролі (у нетренованих дівчат)

Отже, в результаті проведеного дослідження нами було встановлено, що у спортсменок систематичні фізичні навантаження високої інтенсивності одночасно із підвищенням функціональних можливостей організму призводять до виснаження антиоксидантної системи, накопичення активних форм кисню та продуктів ПОЛ. Зважаючи на значне підвищення генерації активних

форм кисню та продуктів перекисного окиснення ліпідів та відносно невисоке зростання при цьому показника загальної фізичної працездатності, але не аеробної продуктивності у спортсменок, вважаємо доцільним профілактичне застосування в раціоні спортсменок в період систематичних фізичних навантажень високої інтенсивності екзогенних природних антиоксидантів, дія

яких була б направлена на нівелювання негативного впливу навантажень високої інтенсивності, збільшення потужності системи антиоксидантного захисту, нівелювання пошкоджувальної дії оксидативного стресу, підвищення фізичної працездатності та прискорення відновлення організму після тренувань.

Висновки. В результаті проведеного дослідження нами було встановлено, що у групі тренуваних дівчат, які піддаються систематичним фізичним навантаженням високої інтенсивності, виявлений розвиток оксидативного стресу, що позначилося на зміні наступних показників:

1. Збільшення вмісту маркерів різних шляхів генерції супероксидного радикалу, що найбільшою мірою виражено для показника продуктів деградації АТФ, ГТФ (70,23%) та продуктів перетворення арахідонової кислоти за ліпооксигеназним та циклооксигеназним шляхами (у середньому на 64,45%), що однак не вплинуло на співвідношення шляхів її метаболізму у групі контролю та у групі тренуваних осіб.

2. В плазмі крові за умов тривалих фізичних навантажень має місце дворазове збільшення генерції супероксидного радикалу, а гідроксильного радикалу – на 88,74%, а також достовірне збільшення вмісту стабільного перекису водню (на 43,90%).

3. За умов фізичних навантажень значно збільшується тривалість вільнорадикальної ланцюгової реакції ПОЛ, про що свідчить підвищення (на 65,74 %) в плазмі вмісту МДА і величини відношення МДА/ДК (від 4,37 ум.од. до 7,15 ум. од.).

4. Розвиток оксидативного стресу і збільшення тривалості неферментативного процесу ПОЛ в період систематичних фізичних навантажень високої інтенсивності у спортсменок супроводжується невисоким зростанням (на 25,82%) показника їх загальної фізичної працездатності.

Список використаних джерел

- Акімова В. М. Адаптаційні зміни лейкоцитів периферичної крові при дії дозованого фізичного навантаження : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.13 / В. М. Акімова ; Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка. – К., 2007. – 20 с.
- Биохимические методы исследования в клинике : справоч. / под ред. А. А. Покровского. – М. : Медицина. – 1969. – 652 с.
- Богдановська Н. В. Застосування антиоксидантів при виконанні навантажень високої інтенсивності / Н. В. Богдановська, А. В. Голубенко // Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. – 2014. – II (3), Issue: 21. – P. 34–37
- Вазотоксична дія свинцю: роль порушень в обміні ендогенного оксиду азоту / О. Л. Апихіна, А. В. Коцюба, Ю. П. Коркач [та ін.] // Укр. журн. з пробл. медицини праці. – 2007. – № 3. – С. 56–62.
- Вплив іонізуючої радіації та перексиду водню на показники окисно-антиоксидантної рівноваги та енергетичного обміну в тимоцитах і

гепатоцитах in vitro : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.04 / Катерина Олександрівна Дворченко ; Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка. – К., 2004. – 20 с.

6. Гаврилов В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. П. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60–63.

7. Карпман В. Л. Тестирование в спортивной медицине / В. Л. Карпман – М. : Физкультура и спорт. – 1988. – 208 с.

8. Andras P. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus / Andras Perl // Nature Reviews Rheumatology. – 2013. – № 9(11). – P. 674–686. Available from: www.nature.com

9. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance / N. B. J. Vollaard, J. P. Shearman, C. E. Cooper // Sports Medicine. – 2005. – № 35(12). – P. 1045–1062. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

10. Huwiler M. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in lactoperoxidase iodide system / M. Huwiler, H. Kohler // Eur. Journal Biochemistry. – 1984. – 141, № 1. – P. 69–74. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

11. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease / O. Hwang // Experimental Neurobiology. – 2013. – № 22(1). – P. 11–17. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

12. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage / D. Conte, K. S. Narindrasorasa, B. Sarkar // European Journal of Biochemistry. – 1996. – № 271(9). – P. 5125–5130. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

13. Protein measurement with the Folin reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275. Available from: www.jbc.org

14. Maintenance of Mitochondrial Oxygen Homeostasis by Cosubstrate Compensation / Hao Yuan Kueh, Philipp Niethammer, Timothy J. Mitchison // Biophysical Journal. – 2013. – № 104(6). – P. 1338–1348. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

15. McCord J. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems / J. McCord, I. Fridovich // Biochemistry Journal. – 1982. – № 203 (3). – P. 551–558. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

16. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training / M. C. Gomez-Cabrera, E. Domenech, J. Viña // Free Radical Biology and Medicine. – 2008. – № 44 (2). – P. 126–131. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

17. Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling / Zsolt Radak, Zhongfu Zhao, Erika Koltai [et al.] // Antioxid Redox Signal. – 2013. – № 18(10). – P. 1208–1246. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

18. Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications / Dario Pitocco, Manfredi Tesaro, Rizzi Alessandro [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – № 14(11). – P. 21525–21550. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

19. Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling / Yun Soo Bae, Hyunjin Oh, Sue Goo Rhee, Young Do Yoo // Molecules and Cells. – 2011. – № 32(6). – 491–509. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

20. Grahame T. J. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease / T. J. Grahame, R. B. Schlesinger // Particle and Fibre Toxicology. – 2012. – № 9. – P. 9–21. Available from: www.particleandfibretoxicology.com

21. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // Analytical Biochemistry. – 1978. – № 86(1). – P. 271–278. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov

Надійшла до редколегії 30.04.15

Н. Богдановская, проф., А. Голубенко, асп.
Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина

РАЗВИТИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В УСЛОВИЯХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Исследованы особенности развития окислительного стресса у девушек 19-22 лет под воздействием физических нагрузок высокой интенсивности. Выявлено объективное существование достоверных различий в показателях, характеризующих развитие оксидативного стресса в группе спортсменок, выраженное в увеличении уровня генерации активных форм кислорода, содержания маркеров различных путей генерации супероксидного радикала и продуктов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: окислительный стресс, физические нагрузки.

N. Bogdanovskaya, prof., A. Golubenko, PhD stud.
Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine

DEVELOPMENT OXIDATIVE STRESS IN TERMS PHYSICAL ACTIVITY PEAK INTENSITY

The peculiarities of the development of oxidative stress in girls 19-22 years under the influence of physical activity of high intensity. Identified the objective existence of significant differences in the indicators of the development of oxidative stress in a group of athletes, expressed in increased levels of generation of active forms of oxygen, the content of tokens of different ways of generating superoxide radical and products of lipid peroxidation.

Key words: oxidative stress, physical activity.

УДК: 575.17

М. Горпинченко, асп., Л. Атраментова, д-р біол. наук
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків

ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ, ОТРИМАНІ З ВИКОРИСТАННЯМ ПРИЗВИЩ

Представлено результати першого в Україні дослідження структури популяцій різного ієрархічного рівня з використанням прізвищ в якості квазігенетичних маркерів. Частоти прізвищ, показник випадкової ізонімії, випадкова компонента інбридингу, індекс міграції, показник різноманіття прізвищ, показник ентропії, показник надмірності розподілу прізвищ розраховано як в цілому для населення України, так і для окремих регіонів: східного, південного, центрального, північного, західного, а також усіх 25 областей країни. Результати розрахунків показали, що українські прізвища є надійним інструментом популяційно-генетичних досліджень, володіють оскільки цьому показнику притаманна висока роздільна здатність.

Ключові слова: популяція, квазігенетичний маркер, прізвища, ізонімія, інбридинг.

Вступ. Структуру генофонду населення та процеси, які в ньому протікають традиційно вивчають з використанням класичних і ДНК-маркерів. Класичні маркери – це імунологічні, біохімічні, фізіологічні ознаки, які онтогенетично незмінні і не модифікуються середовищем [1]. Для вирішення спеціальних завдань ДНК-маркери поділяють на аутосомні і однобатьківські. Останні являють собою специфічності, локалізовані в Y-хромосомі і у мітохондріальній ДНК [2]. Крім перерахованих, у популяційній генетиці використовують ще один вид маркерів, які отримали назву "квазігенетичні" [3]. До них відносять прізвища, рід, популяційно-генетичні і демографічні показники. Найбільш привабливі серед квазігенетичних маркерів прізвища, оскільки у своїх найважливіших проявах – передача в поколіннях, поширення в популяціях – вони нагадують гени. Використання прізвищ в якості квазігенетичних маркерів, досліджували на індивідуальному і популяційному рівнях багато генетиків [4, 9-17]. Взаємозв'язок між поведінкою генетичних маркерів крові і прізвищ було доведено дослідженнями [5, 6, 7, 8]. У народів з патрілінійною традицією прізвища успадковуються, як і Y-хромосома, по батьківській лінії. Ця обставина робить зрозумілим інтерес вчених до паралельного дослідження прізвищ і Y-гаплогруп [9-17].

Оцінки міжпопуляційної мінливості за генами і за прізвищами також виявляли сильний збіг, що показано, зокрема, при вивченні структури генофонду багатьох народів [6, 9-17, 18, 19, 20]. Суттєвий збіг демонстрували показники інбридингу, розраховані за даними по біо-

логічних маркерах і прізвищах, у Австрії, Бельгії, Канаді, Данії, Естонії, Фінляндії, Франції, Німеччині, Ізраїлю, Італії, Сицилії, Японії, Голландії, Норвегії, Росії, Іспанії, Швейцарії, США, Венесуелі, Китаю [1, 3, 5, 7-17, 19, 22].

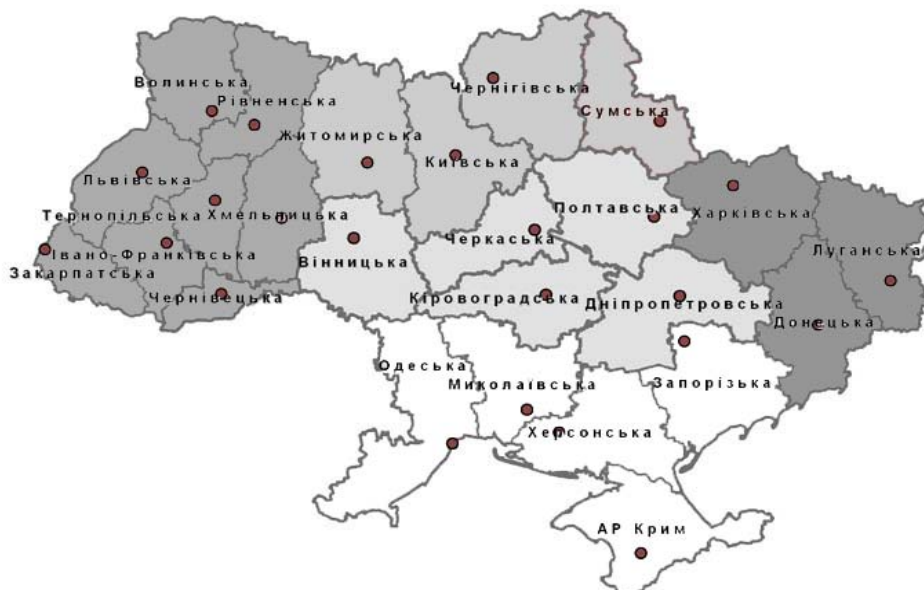
У багатьох популяціях отримано високе значення коефіцієнта кореляції між показниками, розрахованими за частотами гаплогруп Y-хромосоми і частотами прізвищ. Прізвища широко використовуються в генетиці людини для аналізу розподілу популяцій, для оцінки коефіцієнта інбридингу, при розрахунку F-статистик Райта. Масштабні дослідження з оцінки інбридингу і пов'язаного з ним тягаря спадкової патології були проведені в різних народів світу [3, 8-18, 21, 22].

Тривале існування українських прізвищ [23], їх невідповідний розподіл на територіальних одиницях країни [24], що різняться історією [25], антропологічними типами населення [26], і частотою генетичних маркерів [27, 28] дають підставу розглядати їх в якості кандидатів на роль інструмента у популяційно-генетичних дослідженнях.

Мета даного дослідження: розрахувати основні популяційно-генетичні характеристики з урахуванням ієрархічної підпорядкованості українських популяцій обласного та регіонального рівнів.

Матеріали та методи

Використаний список населення України на 2005 р. У цьому списку кожне прізвище відповідає одній людині, і всього список включає 52 414 884 прізвища. Зі списку були виключені 6 435 146 особи, які народилися за межами країни.



Мал. 1. Географічне зонування території України

В якості критерію популяції використовувалася індекс ендемічності, який розраховувався як частка наречених, які народилися в даній популяції. Сукупність населення вважали популяцією, якщо в неї надходить не більше 50% гамет [18]. Населення України, її регіонів і областей [29, 30] можуть розглядатися як окремі популяції різного ієрархічного положення, оскільки вони задовольняють даному критерію.

У дослідженні використано спосіб опису генетичної структури популяції, запропонований I. Bagrai з співавторами [10]. Наявний матеріал проаналізовано із застосуванням методичних підходів, розроблених О.В. Балановською з колегами [4]. Частоти прізвищ розраховані з урахуванням адміністративного і географічного зонування (мал. 1) території України як:

$$q_i = \frac{a_i}{N}$$

де a_i – кількість носіїв i -го прізвища, N – кількість особин у популяції.

Показник випадкової ізонімії I_r обчислений за формулою:

$$I_r = \sum q_i^2,$$

де q_i – частота i -го прізвища.

Випадкова компонента інбридингу F_{ST} визначалася як:

$$F_{st} = \sum q_i^2 / 4$$

Індекс міграції ν розрахований за формулою:

$$\nu = \frac{1 - I_r}{I_r(N - 1)}$$

де I_r – показник випадкової ізонімії, N – кількість особин у популяції ($\nu = 0$, якщо всі особи мають одне прізвище і $\nu = 1$, якщо у всіх різні прізвища).

Показник різноманітності прізвищ α розрахований за формулою:

$$\alpha = \frac{N\nu}{1 - \nu}$$

де N – кількість особин у популяції, ν – індекс міграції.

Показник ентропії H (міра апіорної невизначеності) у розподілі прізвищ розрахований за формулою:

$$H = -\sum q_i \log_2 q_i$$

де q_i – частоти прізвищ.

Обчислення приводять до такої рівності:

$$H = -\sum q_i \log_2 q_i = -\sum a_i \log_2 a_i / N + H_0$$

де a_i – чисельність носія i -го прізвища, q_i – частоти прізвищ, N – число особин,

$$H_0 = \log_2 N,$$

де N – кількість особин у популяції.

Показник надмірності розподілу прізвищ R розрахований за формулою:

$$R = 100 \left(1 - \frac{H}{H_0} \right)$$

Результати та обговорення

Показниками генетичної гетерогенності популяції є алейні поліморфізми та алейні частоти. Прізвища розглядаються як алейні варіанти віртуального гена, який вважають ім'ям роду. Частоти прізвищ q_i розра-

ховані як відношення числа носіїв даного прізвища до чисельності всього населення:

$$q_i = \frac{a_i}{N}$$

де a_i – кількість носіїв i -й прізвища, N – кількість індивідів у популяції.

На основі частот прізвищ отримані всі інші характеристики: показник випадкової ізонімії (I_r), індекс міграції (ν), показник різноманітності прізвищ (α), показник ентропії розподілу прізвищ (H), показник надмірності розподілу прізвищ (R), випадкова компонента інбридингу (F_{st}).

Зрозуміти сенс перелічених показників можна, моделюючи екстремальні ситуації. Якщо всі представники популяції мають одне прізвище ($q = 1$), індекс ізонімії максимальний і дорівнює одиниці ($I_r = q^2 = 1$). Зі збільшенням числа прізвищ показник ізонімії зменшується.

Індекс ізонімії використовується для обчислення показника випадкового інбридингу – шлюбів між родичами. Цей показник має важливе практичне значення, оскільки кривна спорідненість подружжя підвищує ймовірність спадкових хвороб серед нащадків. Численними дослідженнями показано, що ймовірність споріднення у людей з однаковими прізвищами більша, ніж у людей з різними прізвищами. Чим різноманітніший родинний склад, тим менша вірогідність шлюбу між людьми, які мають спільного предка.

Індекс випадкової ізонімії I_r в цілому для України дорівнює $2,1 \times 10^{-4}$. Мінімальне його значення властиве південному регіону ($2,2 \times 10^{-4}$), східному ($2,7 \times 10^{-4}$) і західному ($2,4 \times 10^{-4}$), більш високі значення у центральному ($3,2 \times 10^{-4}$) і північному ($3,4 \times 10^{-4}$) регіонах (табл. 1).

В межах регіонів спостерігається дисперсія показника між областями. У східному регіоні показник випадкової ізонімії варіює незначно – $2,0-2,9 \times 10^{-4}$. У південному регіоні відмінності між областями виражені сильніше – $1,6-2,6 \times 10^{-4}$. У центральному регіоні розмах ще більший: від $2,8 \times 10^{-4}$ в Дніпропетровській області до $5,3 \times 10^{-4}$ у Вінницькій. У північному регіоні від $3,5 \times 10^{-4}$ в Київській області до $5,3 \times 10^{-4}$ в Житомирській. Найвища дисперсія показника випадкової ізонімії відзначена на заході – при мінімумі $2,3 \times 10^{-4}$ у Львівській області і максимумі $6,8 \times 10^{-4}$ у Рівненській.

Показник випадкового інбридингу є похідним від показника ізонімії. В популяції, представники якої характеризуються однаковими прізвищами, коефіцієнт інбридингу максимальний і дорівнює $F_{st} = \frac{I_r}{4} = 0,25$.

Показник інбридингу F_{st} в цілому по Україні дорівнює $5,3 \times 10^{-5}$. Найвище його значення відмічено у північному регіоні ($8,1 \times 10^{-5}$), найнижче – у південному ($5,6 \times 10^{-5}$). В межах регіонів є відмінності між областями. На сході розмах показника інбридингу становить $5,1-7,3 \times 10^{-5}$. На півдні він ширше від $4,0 \times 10^{-5}$ в Криму до $6,4 \times 10^{-5}$ в Херсонській області. Південні та східні області – регіони з низьким рівнем інбридингу. У центральному регіоні показник дорівнює $7,9 \times 10^{-5}$ при мінімумі для регіону значенні в Дніпропетровській області ($7,0 \times 10^{-5}$) до максимуму у Вінницькій ($13,3 \times 10^{-5}$). Показник інбридингу в північному регіоні дорівнює $8,5 \times 10^{-5}$ (від $8,8 \times 10^{-5}$ в Київській області до $13,3 \times 10^{-5}$ в Житомирській). На заході показник інбридингу варіює від $5,8 \times 10^{-5}$ у Львівській області до $17,9 \times 10^{-5}$ у Волинській.

Міграція – один з найважливіших процесів, який впливає на структуру популяції. Чим більше мігранти генетично відрізняються від корінних жителів, і чим бі-

льше їх питома вага, тим ефективніше міграція. Зрозуміти сенс індексу міграції можна, представивши популяцію, у якій був спільний прашур. Прізвище предка природним чином стає надбанням всіх його численних нащадків. Індекс міграції в такій популяції дорівнює нулю ($v=0$). Робимо припущення, що джерелом нових прізвищ є мігранти. Вони привносять в популяцію не тільки свої прізвища, але і гени. Чим більше мігрантів, тим більше прізвищ, отже і вище генетичне різноманіття.

Кількість прізвищ та їх частоти неможливо використовувати для порівняння популяцій різної чисельності. При однакових частотах прізвищ і їх різноманітності у популяціях різної чисельності буде формуватися різне число ізонімних (в даному контексті – родинних) пар, що призведе до збільшення генетичного тягаря. Математично значення різноманітності відображається показником α , в якому присутній показник розмаїття прізвищ через індекс міграції і чисельність популяції. Питома вага ізонімних пар дорівнює сумі квадратів частот прізвищ $\sum q_i^2$, чим сильніше зміщені частоти прізвищ від пропорції, тим вище ймовірність утворення ізонімної пари.

Показник різноманітності прізвищ "а" в Україні дорівнює $47,0 \times 10^2$. Найвище його значення властиве південному регіону – $44,8 \times 10^2$. Інше джерело високого різноманіття – західний регіон. Тут значення показника різноманітності становить $41,4 \times 10^2$. При середньому значенні на сході $37,1 \times 10^2$ показник варіює від $34,3 \times 10^2$ в Харківській області до $49,0 \times 10^2$ в Донецькій. У південному регіоні найнижче значення показника різноманітності в Херсонській області ($39,1 \times 10^2$), найвище в Криму ($62,3 \times 10^2$). У центральному – показник різноманітності прізвищ знаходиться на рівні $31,7 \times 10^2$. Найнижче значення в регіоні зазначено у Вінницькій області ($18,8 \times 10^2$), найвище – у Дніпропетровській ($35,6 \times 10^2$). Північний регіон найменш різноманітний ($a = 29,4 \times 10^2$). В Житомирській області цей показник мінімальний ($18,8 \times 10^2$), у Київській області максимальний ($28,5 \times 10^2$). Особливо широко розмах мінливості показника різноманітності в західному регіоні: від $14,0 \times 10^2$ у Волинській області до $43,6 \times 10^2$ у Львівській.

Показником ступеня відхилення розподілу частот прізвищ від рівної пропорції виступає показник надмірності розподілу прізвищ R, для обчислення якого розраховують показники H (ентропія розподілу прізвищ).

Значення показника ентропії H, як міри апіорної невизначеності, полягає в тому, що він залежить від різноманіття прізвищ даного населення. Якщо в групі N особин N прізвищ, то $H_0 = \log_2 N$. Якщо всі особини мають одне прізвище, $H = 0$. Значення показника H в ці-

лому по Україні дорівнює 15,1 і незначно варіює по регіонах – 14,3-15,0 (відповідно північ-південь). Також невеликий розмах усередині регіонів, але, незважаючи на слабку різноманітність, міжрегіональна тенденція зберігається. На сході 14,6-15,0, на півдні – 14,4-15,1, в центрі – 13,5-14,5, на півночі 13,2-14 і заході – 12,8-14,1.

Змодельовавши такі граничні ситуації, зрозуміємо зміст показника надмірності розподілу прізвищ R. Якщо у всіх жителів прізвища однакові, $R = 100$, якщо у всіх різні, $R = 0$. Значення цього показника для України 40,6 при максимальному значенні на півночі (37,9) і найнижчому на півдні (34,4). Показник демонструє мінливість і у межах регіонів. При $R = 36,5$ на сході, значення для окремих областей лежать в межах 31,0-33,3. На півдні показник R варіює від 26,9 в Криму до 30,6 в Запорізькій області. У центрі ($R = 37,4$) показник по областях знаходиться в межах $R = 30,7$ (Кіровоградська область) і $R = 34,0$ (Полтавська область), на півночі ($R = 37,9$) – від $R = 33,8$ у Сумській області до $R = 35,4$ у Київській, на заході ($R = 37,1$) – від 32,5 в Тернопільській області до 36,7 в Закарпатській. Такі розбіжності між показниками по регіону і областях в ньому пояснюються тим, що при сумуванні прізвищ в регіоні спостерігається "кумулятивний" ефект, коли однакові прізвища в декількох областях додаються. Таким чином ріст кількості населення і різноманіття прізвищ відбувається не пропорційно.

Наведені результати свідчать, що генетичні показники, обчислені на основі даних про прізвища, здатні диференціювати українські популяції регіонального та обласного рівнів. Для того, щоб оцінити диференціюючу здатність обчислених показників, розраховували індекс диференціювання id , який являє собою відношення максимального значення до мінімального відповідного показника. Індекс диференціювання показників потрібний, щоб зрозуміти яку диференційну здатність має відповідний показник. Диференціююча здатність показника ізонімії I (2,23-3,40), так само як показника інбридингу (5,58-8,50) і розмаїття прізвищ α (29,4-44,83) знаходяться на однаковому рівні: $id_I = 1,52$, $id_F = 1,52$, $id_\alpha = 1,52$. У показника міграції v (3,90-5,61) цей індекс виявився трохи нижче ($id_v = 1,44$). Два останніх показника – ентропії H (14,29-15,04) і надмірності R (34,39-37,87) менш ефективні при виявленні відмінностей між популяціями: $id_H = 1,05$, $id_R = 1,1$.

Хоч всі показники і спрямовані на те щоб оцінити ймовірність інбридингу, але тільки в сукупності вони можуть дати повну картину, в той час як окремо кожен показник не зможе диференціювати близькі за характеристиками популяції.

Таблиця 1. Популяційно-генетичні показники

Популяція	$I \times 10^{-4}$	$F_{ST} \times 10^{-5}$	$v \times 10^{-4}$	$\alpha \times 10^2$	H	R
УКРАЇНА	2,13	5,32	1,01	46,99	15,14	40,56
Східний регіон	2,69	6,73	3,90	37,13	14,72	36,50
Луганська область	2,40	6,01	18,65	41,65	14,55	31,02
Донецька область	2,04	5,11	10,93	48,97	14,99	32,17
Харківська область	2,92	7,29	12,16	34,31	14,30	33,25
Південний регіон	2,23	5,58	5,61	44,83	15,04	34,39
Запорізька область	2,53	6,34	22,56	39,53	14,39	30,62
Херсонська область	2,57	6,41	34,05	39,11	14,37	28,62
АР Крим	1,61	4,03	38,23	62,31	15,07	26,94
Миколаївська область	2,41	6,03	35,64	41,63	14,52	27,95
Одеська область	2,10	5,24	20,71	47,82	14,78	30,08
Центральний регіон	3,15	7,88	3,39	31,72	14,49	37,42
Дніпропетровська область	2,81	7,03	10,94	35,60	14,54	32,79
Полтавська область	4,09	10,23	15,77	24,46	13,58	33,97
Кіровоградська область	3,59	8,97	24,18	27,94	13,96	30,65
Черкаська область	5,08	12,71	13,16	19,69	13,48	34,29
Вінницька область	5,32	13,30	9,86	18,81	13,68	34,42

Закінчення табл. 1

Популяція	$l \times 10^{-4}$	$F_{ST} \times 10^{-5}$	$v \times 10^{-4}$	$a \times 10^2$	H	R
Північний регіон	3,40	8,50	3,49	29,41	14,29	37,87
Сумська область	4,47	11,17	17,55	22,41	13,42	33,82
Чернігівська область	4,57	11,43	17,37	21,89	13,24	34,67
Київська область	3,51	8,77	6,33	28,51	14,28	35,41
Житомирська область	5,34	13,34	13,58	18,76	13,26	34,98
Західний регіон	2,40	6,01	3,76	41,63	14,72	37,11
Хмельницька область	5,05	12,62	12,99	19,83	13,67	33,43
Рівненська область	6,77	16,91	13,12	14,79	12,82	36,23
Волинська область	7,14	17,85	13,33	14,02	12,80	36,00
Тернопільська область	3,20	7,99	27,95	31,37	13,57	32,46
Чернівецька область	4,29	10,72	26,80	23,38	13,25	32,82
Івано-Франківська область	4,62	11,55	15,10	21,66	13,12	35,83
Львівська область	2,30	5,75	16,25	43,55	14,14	33,79
Закарпатська область	6,09	15,23	12,78	16,42	12,84	36,70

Примітка. l – показник випадкової ізонімії, F_{ST} – випадкова компонента інбридингу, v – індекс міграції, a – показник різноманітності прізвищ, H – показник ентропії розподілу прізвищ, R – показник надмірності розподілу прізвищ.

Різні територіальні формування мають власну історію [25], різняться етнічним складом населення [26], розподілом білкових і ДНК-маркерів [11-17, 19, 21, 27-30]. При тотальному використанні прізвищ не виникає проблема репрезентативності вибірки. Перевага прізвища перед біологічними маркерами полягає в тому, що їх використання пов'язане з меншими фінансовими і часовими витратами.

Використання прізвищ дозволяє виявляти осередки підвищеної "генетичної небезпеки" – території з підвищеною ймовірністю інбридингу.

Подяка. Авторі висловлюють глибоку подяку завідувачій лабораторії популяційної генетики людини ФГБУ "МГНЦ" РАМН професору О.В. Балановській за методичну та консультативну допомогу.

Список використаних джерел

1. Генофонд і геногеографія народонаселення. Генофонд населення Росії і сопредельных стран / Ю. Г. Рычков / под ред. Ю. Г. Рычкова. – СПб.: Наука, 2000. – Т. 1. – 611 с.
2. Лимборская С. А. Этногеономика и геногеография народов Восточной Европы / С. А. Лимборская, Э. К. Хуснутдинова, Е. В. Балановская. – М.: Наука, 2002. – 261 с.
3. Ревазов А. А. Пригодность русских фамилий в качестве "квазигенетического" маркера / А. А. Ревазов, Г. М. Парадеева, Г. И. Русакова // Генетика. – 1986. – № 22. – С. 699–703.
4. Балановская Е. В. Русский генофонд на Русской равнине / Е. В. Балановская, О. П. Балановский. – М.: Луч, 2007. – 416 с.
5. Генетика и антропология таёжных охотников-оленьеводов Сибири. Сообщение I. Родовая структура, субизолаты и инбридинг в Эвенкийской популяции / Ю. Г. Рычков, Н. Е. Таусик, Т. Н. Таусик [и др.] // Вопр. антропологии. – 1974. – Вып. 47. – С. 3.
6. Рычков Ю. Г. Этническая генетика: Соотношение адаптивной и нейтральной генетической дифференциации этносов / Ю. Г. Рычков, Е. В. Балановская // Генетика. – 1990. – № 26. – С. 541–549.
7. Шереметьева В. А. Популяционная генетика народов Северо-Восточной Азии / Ю. Г. Рычков. – М.: Изд-во МГУ. – 1978. – С. 148.
8. Использование фамилий для изучения факторов динамики популяционной структуры / Б. Н. Казаченко, А. А. Ревазов, Л. В. Тарлычева, В. А. Лавровский // Генетика. – 1980. – Т. 16, № 11. – С. 2049–2057.
9. Macintyre S. Non-paternity and prenatal genetic screening / S. Macintyre, A. Sooman // The Lancet. – 1991. – Vol. 338(8771). – P. 869–871. Available from: lib.gen.in/next/MTAuMTAxiN8wMTQwLTy3MzYwOTEpOTEmTMTdA==macintyre1991.pdf
10. Microevolution in Ferrara: Isonymy 1890–1990 / I. Barrai, G. Formica, C. Scapoli [et al.] // Annals of Human Biology. – 1992. – Vol. 19(4). – P. 371–385. Available from: lib.gen.in/ocean/da0ceaf19fef7156159322e687444afb/barrai1992.pdf
11. Sykes B. Surnames and the Y chromosome / B. Sykes, I. Irvn // American Journal of Human Genetics. – 2000. – Vol. 66(4). – P. 1417–1419. Available from: sci-hub.bz/ba744fe93755c62cb4303dbe37eb7e77/sykes2000.pdf
12. From surnames to the history of Y chromosomes: the Sardinian population as a paradigm / G. Zei, A. Lisa, O. Fiorani, C. Magri, L. Quintana-Murci, O. Semino, A. S. Santachiara-Benerecetti // European Journal of Human Genetics. – 2003. – Vol. 11(10). – P. 802–807. Available from: lib.gen.in/ocean/a176d1af64f5c11218ea018ef9d2f5d3/zei2003.pdf
13. Y-chromosomal STR haplotype analysis reveals surname associated strata in the East German population / U.D. Immel, M. Krawczak, J. Udoth, A. Richter, H. Rodig, M. Kleiber, M. Klitschlar // European Journal of Human Genetics. – 2006. – Vol. 14(5). – P. 577–582. Available from: lib.gen.in/next/MTAuMTAxiN8wMTQwLTy3MzYwOTEpOTEmTMTdA==immet2006.pdf

14. McEvoy B. Y-chromosomes and the extent of patrilineal ancestry in Irish surnames / B. McEvoy, D. G. Bradley // Human Genetics. – 2006. – Vol. 119(1–2). – P. 212–219. Available from: sci-hub.bz/e74f80dbef1fe9e21aac8a35a073769a/mcevoy2006.pdf

15. A Y-chromosome signature of hegemony in Gaelic Ireland / L. T. Moore, B. McEvoy, E. Cape, K. Simms, D. G. Bradley // American Journal of Human Genetics. – 2006. – Vol. 78(2). – P. 334–338. Available from: lib.gen.in/next/MTAuMTAxiN8wMTQwLTy3MzYwOTEpOTEmTMTdA==moore2006.pdf

16. King T. E. Founders, drift, and infidelity: the relationship between Y chromosome diversity and patrilineal surnames / T. E. King, M. A. Jobling // Molecular Biology and Evolution. – 2009. – Vol. 26(5). – P. 1093–1102. Available from: sci-hub.bz/a58a9de550051bd93f7146fb3a1952e/king2009.pdf

17. King T. E. What's in a name? Y chromosomes, surnames and the genetic genealogy revolution / T. E. King, M. A. Jobling // Trends in Genetics. – 2009. – Vol. 25(8). – P. 351–360. Available from: lib.gen.in/ocean/49ca72ba6f2c5f3b3c22808109b30596/king2009.pdf

18. Ельчинова Г. И. Опыт применения методов популяционно-генетического анализа при изучении популяций России с различной генетико-демографической структурой: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Г. И. Ельчинова. – М., 2001. – 48 с.

19. Структура генофонда населения Белгородской области: квазигенетические, биохимические, молекулярно-генетические и популяционно-демографические параметры / М. И. Чурносков, И. Н. Сорокина, И. Н. Костоглодова, В. Ю. Песик, Н. А. Рудых, И. К. Аристова, М. С. Жерлицына, Е. В. Балановская // Экология и демография человека в прошлом и настоящем. – М., 2004. – С. 289–290.

20. Почешхова Э. А. Топография фамилий и генетических расстояний (адыги Западного Кавказа) / Э. А. Почешхова // Мед. генетика. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 21–29.

21. Гинтер Е. К. Генетическая структура популяций и особенности территориального распределения аутосомно-рецессивных заболеваний в Кировской области / Е. К. Гинтер, Р. А. Мамедова, О. В. Брусничева // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 1. – С. 107–111.

22. Сорокина И. Н. Изучение популяционно-демографической структуры населения Белгородской области: Автореф. дисс. канд. биол. наук / И. Н. Сорокина. – М., 2005. – 24 с.

23. Редько Ю. К. Сучасні українські прізвища / за ред. І. І. Ковалик. – К., 1966. – 216 с.

24. Редько Ю. К. Довідник українських прізвищ / за ред. Івана Варченка. – К., 1968. – 256 с.

25. Грушевський М. Ілюстрована історія України. – К.: Наук. думка, 2002. – 544 с.

26. Українці / ред. Н. С. Полищук, А. П. Пономарев. – М.: Наука, 2000. – 535 с.

27. Тимошенко Л. И. Распределение эритроцитарных антигенов и белковых факторов крови среди населения некоторых геногеографических зон Украинской ССР / Л. И. Тимошенко, Л. Н. Лавровская // Цитология и генетика. – 1978. – Т. 12, № 6. – С. 535–540.

28. Variation of paternal, maternal and autosomal genetic markers on intra-ethnic (Ukrainians) and inter-ethnic (Europe) level supports Y chromosomal marker bias / A. Pshenichnov, E. Balanovska, O. Balanovsky, L. Atramentova, M. Churnosov, D. Soloviova, V. Zaporozhchenko // International Society for Applied Biological Sciences. – Split. 2007. – P. 128.

29. Атраментова Л. А. Генетико-демографический анализ популяций западной Украины. Брачная структура популяций Хмельницкой области по национальности и месту рождения / Л. А. Атраментова, М. Л. Ищук, О. М. Утевская // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 8 – С. 1131–1137.

30. Филиппова О. В. Генетико-демографические процессы в урбанизированных популяциях Восточной Украины: дис. ... канд. биол. наук / О. В. Филиппова. – Х., 1998. – 162 с.

Надійшла до редколегії 30.04.15

М. Горпинченко, асп., Л. Атраментова, д-р биол. наук
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, Украина

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАМИЛИЙ

Представлены результаты первого в Украине исследования структуры популяций разного иерархического уровня с использованием фамилий в качестве квазигенетических маркеров. Частоты фамилий, показатель случайной изонимии, случайная компонента инбридинга, индекс миграции, показатель разнообразия фамилий, показатель энтропии, показатель избыточности распределения фамилий рассчитаны как в целом для населения Украины, так и для отдельных регионов: восточного, южного, центрального, северного, западного, а также всех 25 областей страны. Результаты расчетов показали, что украинские фамилии являются надежным инструментом популяционно-генетических исследований, поскольку обладают достаточно высокой дифференцирующей способностью.

Ключевые слова: популяция, квазигенетический маркер, фамилии, изонимия, инбридинг.

M. Gorpynchenko, PhD student, L. Atramentova, DSc
V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkov, Ukraine

POPULATION GENETIC CHARACTERISTICS OF THE POPULATION OF UKRAINE OBTAINED WITH THE USE OF SURNAMES

The article presents the results of the first study in Ukraine of the population structure at different hierarchical levels inferred using surnames as quasigenetic markers. The surnames frequencies, random isonymy index, random component of inbreeding, migration index, rate of names diversity, index of entropy and index of redundancy of surnames diversity were calculated in total for the population of Ukraine, as well as for major geographic regions: Eastern, Southern, Central, Northern, Western and also for all the 25 administrative regions of the country. Our results show that Ukrainian surnames are a reliable tool for the population genetic studies, as they have a rather high differentiating ability.

Keywords: population, quasigenetic marker, surnames, isonymy, inbreeding.

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

А. Драницина, канд. біол. наук, К. Дворченко, д-р біол. наук,
О. Моргаснко., канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *TLR2* В ЕПІТЕЛІОЦИТАХ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРИДРІЇ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР

Показано зростання рівня експресії гена *Tlr2* в епітеліоцитах ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії досліджуваного гена в епітеліоцитах ворсинок та крипт наближався до контрольних значень.

Ключові слова: шлункова гіпоацидність, дванадцятипала кишка, експресія гена *Tlr2*, мультипробіотик.

Вступ. Останніми роками все більшого поширення у населенні різних країн набувають гастроентерологічні захворювання, серед яких помітне місце належить групі захворювань, що класифікуються як кислотозалежні: пептична виразка, синдром Золлінгера-Еллісона тощо. Особливу увагу вчених, клініцистів привертають фармакологічні засоби, які здатні гальмувати секрецію хлоридної кислоти паріетальними клітинами шлунка. Сьогодні поширеним інгібітором протонної помпи (ІПП) є омепразол [1, 2]. Хоча безпечність ІПП є достатньо високою, їх тривалий прийом призводить до ряду побічних ефектів: порушення всмоктування вітамінів, підвищений ризик інфекцій, гіпергастринемії [3]. Крім цього, розвиток дисбіозу – один із ключових наслідків тривалої гіпоацидності, при якому спостерігається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ) умовно-патогенною мікрофлорою, що викликає тривалу ендogenous інтоксикацію та є додатковим чинником, який, окрім гіпергастринемії, сприяє шлунковому канцерогенезу, а також виникненню спорадичних пухлин в інших ділянках ШКТ, зокрема у дванадцятипалій кишці (ДПК) [4, 5]. Накопичення прозапальних молекул із джерела ендogenous запалення і вплив клітинних та секреторних компонентів дисбіотичної мікрофлори можуть призводити до розвитку запального процесу, наслідком чого є потужна генерація активних форм кисню (АФК) та ініціація окисного стресу (ОС), зокрема активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [6-7].

Ген *Tlr2* (кодує Toll-like рецептор 2) експресується в ентероцитах, колоноцитах, клітинах неспецифічного імунітету (макрофаги, мастоцити тощо). Продукт даного гена *TLR2* відіграє ключову роль у розпізнаванні компонентів клітинної стінки грам-позитивних бактерій, наяв-

них у пристінковому шарі кишечника, та підтриманні толерантності до власної мікрофлори [8-9]. Показано підвищення експресії *TLR2* внаслідок дисбіотичних змін за умов розвитку ентеропатій, запальної хвороби кишечника (IBD), хвороби Крона, виразкового коліту тощо, як у людини, так і в тварин [8, 10-12].

Для корекції структурно-функціональних порушень у ШКТ застосовують пробіотичні препарати, які виконують важливу роль у підтриманні загального гомеостазу організму за рахунок оптимізації його мікроекологічного статусу [13, 14]. Мультипробіотичні препарати групи "Симбітер® ацидофільний" концентрований (далі Симбітер) є максимально наближеною до природних мікробіоценозів організму людини та тварин концентрованою біомасою живих клітин мультикомпонентного симбіозу пробіотичних бактерій (біфідобактерій, лактобактерій, молочнокислих стрептококів та пропіоновокислих бактерій) [13, 15].

При аналізі наукової літератури не було знайдено даних стосовно характеру експресії вищезазначеного гена в епітеліоцитах ДПК щурів за умов експериментальної гіпоацидності шлунка. Крім цього, лишається невисвітленою дія пробіотичних препаратів на експресію гена *Tlr2* в ДПК за таких умов.

Метою роботи було проаналізувати експресію гена *Tlr2* в епітеліоцитах ДПК щурів за довготривалого пригнічення кислотоутворення в шлунку (і, відповідно, за підвищених концентрацій гастрину в крові) та при введенні мультипробіотичного препарату.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців з масою 180-200 г, яких утримували на стандар-

тному раціоні віварію. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій для проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин відповідно до "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів або в інших наукових цілях".

Тварин розділяли на чотири групи. У контрольній (першій) групі використовували щурів, яким протягом 28 діб вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тварини другої групи протягом 28 діб перорально отримували Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") у дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Моделювання гіпоацидного стану (третя група) проводили за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу 1 раз на добу протягом 28 діб [16]. Четверта група щурів одночасно з інтраперитонеальним введенням омепразолу перорально отримувала Симбітер у вищезазначеній дозі. Кількість тварин у кожній експериментальній групі – 6.

Вміст дієвих кон'югатів визначали спектрофотометричним, а шифових основ – флюорометричним методами [17]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [17]. Вміст загального білка визначали за методом Лоурі [18].

Епітеліоцити ворсинок та крипт із ДПК ізолювали за допомогою низькотемпературного методу [19]. РНК отримували за методом Chomczynski [20]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкл РНК, 1 мМ dNTP, 200 од. зворотної транскриптази (3Т) "Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase", відповідний буферний розчин, 20 од. рибонуклеазного інгібітору "Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor" ("Thermo Scientific", Литва), 1 мкМ зворотного праймеру. Синтез тривав за наступних умов: 65° С – 5 хв, 45° С – 1 год. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкл кДНК, буферний розчин для ПЛР, по 200 мкМ кожного dNTP ("Thermo Scientific"), по 1 мкМ кожного праймера, до 2,5 мМ MgCl₂ та 1 од. *Taq* ДНК полімерази ("*Taq* DNA Polymerase (recombinant)", "Thermo Scientific"). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: початкова денатурація 95° С – 3 хв.; дали 35 циклів (для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – 28 циклів): денатурація ДНК 95° С – 1 хв.; гібридизація праймерів 45° С – 45 с для *Tlr2* (456 п. н.) та 49° С – 40 с. для *Actb* (521 п. н.); добування ланцюга 72° С – 1 хв. 15 с. (для *Tlr2*) або 1 хв. (для *Actb*). Після цього проводили добудову ампліфікатів при 72° С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Tlr2* – прямий – GGAGGTCTCCAGGTCAAATCT та зворотний – TGATGTTTCCCCAGTGTCC ; для *Actb* – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення ПЛР на кДНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів.

Розділення продуктів ПЛР проводили електрофоретично в 1,6% агарозному гелі ("Agarose LE", "Roche", Німеччина), у 0,5-кратному ТВЕ-буферному розчині при напруженні електричного поля 5-10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s ("NIH",

США). Індокси експресії гена визначали для кожного зразка за Konturek [et al.] [21].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакету GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Показано інтенсифікацію ПОЛ за досліджуваних умов. Так, введення омепразолу щурам упродовж 28 діб призводило до суттєвого підвищення концентрації первинних, проміжних та кінцевих продуктів пероксидації ліпідів у клітинах ДПК: в епітеліоцитах ворсинок – в 1,7 ($p \leq 0,001$), 1,6 ($p \leq 0,001$), 1,5 ($p \leq 0,001$) раза, у крипах – у 2,1 ($p \leq 0,001$), 2,3 ($p \leq 0,001$), 1,8 ($p \leq 0,001$) раза, відповідно, у порівнянні з контрольними значеннями [22]. У щурів, котрі разом з омепразолом отримували мультипробіотик, зазначені показники наближались до контрольних значень, у той час як у тварин другої групи вміст продуктів ПОЛ переважно був нижчим за контроль [22].

Отже, на першому етапі дослідження виявлено активацію ліпідної пероксидації у клітинах ДПК за гіпоацидних умов та показано пригнічення процесів ПОЛ за умов введення мультипробіотика Симбітер.

У результаті проведених нами експериментальних досліджень було виявлено експресію мРНК гена *Tlr2* (продукт 3Т-ПЛР розміром – 456 п.н.) у зразках епітеліоцитів ворсинок і крипт ДПК як контрольної, так і другої групи тварин, які отримували мультипробіотик Симбітер (рис. 1).

Рівні експресії гена *Tlr2* в контрольній та другій групі епітеліоцитів крипт значуще не відрізнялися, так само як і у ворсинках, на відміну від типів епітеліальних клітин. Рівні експресії цього гена в третій та четвертій групах як ворсинок, так і крипт епітелію ДПК значуще відрізнялися, як і між типами епітеліальних клітин ($p \leq 0,0001$) (рис. 1.).

Було показано, що рівень експресії гена *Tlr2* в епітеліальних клітинах ворсинок і крипт ДПК щурів у контролі становив, відповідно, $0,092 \pm 0,0098$ та $0,101 \pm 0,0087$ відносно *Actb* (рис. 1). За умов тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка щурів цей показник був вищим: в епітеліоцитах ворсинок – у 3,2 раза ($p < 0,0001$), в епітеліоцитах крипт – у 2,6 раза ($p < 0,0001$) відносно контролю. Таким чином, виявлене нами підвищення рівня експресії гена *Tlr2* епітеліальних клітин ворсинок та крипт ДПК щурів за умов довготривалого пригнічення кислотоутворення в шлунку свідчить про бактеріальну колонізацію ДПК.

Показано, що рівень мРНК гена *Tlr2* в епітелії ворсинок ДПК щурів, які разом з омепразолом отримували мультипробіотик, був у 5 та 1,6 раза нижчим ($p < 0,0001$), ніж у тварин третьої і контрольної груп, відповідно. За аналогічних умов зазначений показник у клітинах епітелію крипт знизився в 1,6 раза ($p < 0,0001$) по відношенню до показників групи з гіпоацидним станом шлунка та збільшився в 1,7 раза ($p < 0,0001$) відносно контролю.

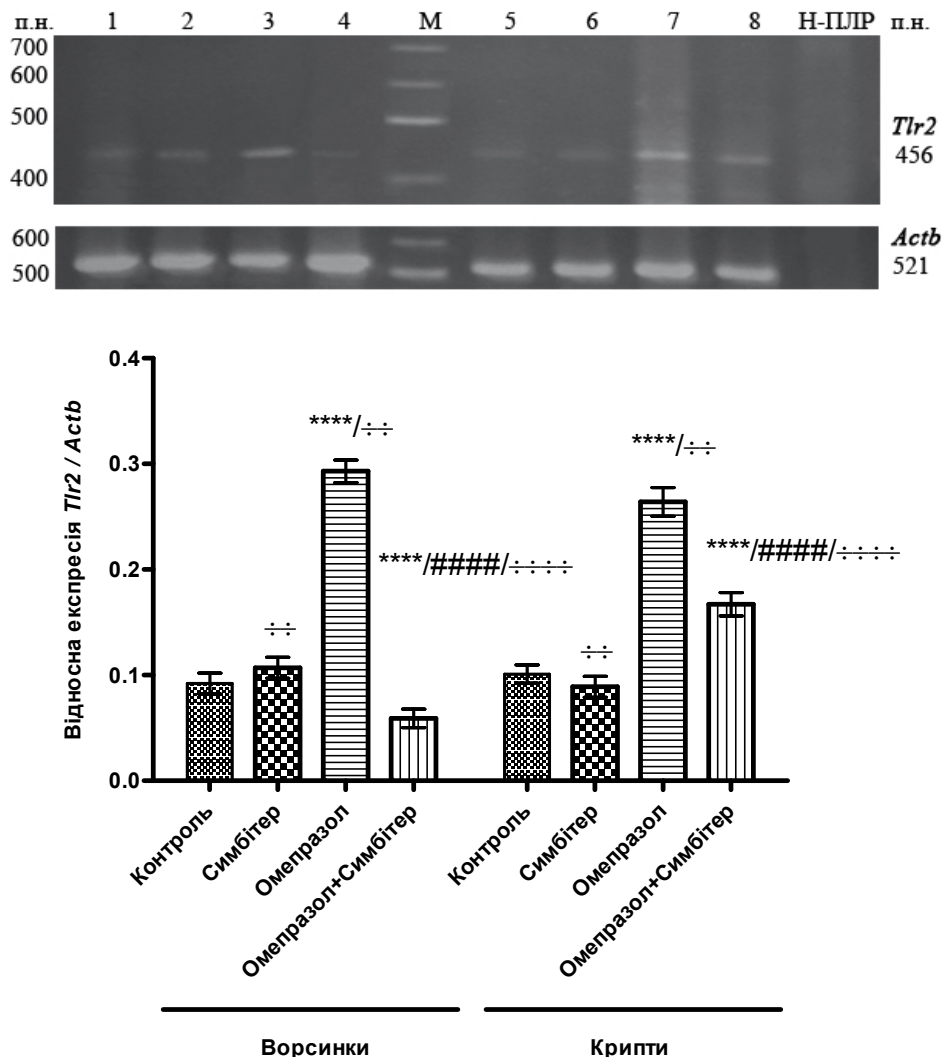


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Tlr2* в різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер.

М – маркер молекулярної маси; епітеліоцити ворсинок: 1 – контроль; 2 – Симбітер; 3 – омепразол; 4 – омепразол + Симбітер; епітеліоцити крипти: 5 – контроль; 6 – Симбітер; 7 – омепразол; 8 – омепразол + Симбітер; Н-ПЛР – негативний контроль ПЛР; **** – $p \leq 0,0001$ відносно контролю; ##### – $p \leq 0,0001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол; **** – $p \leq 0,0001$, ++ – $p \leq 0,01$ ворсинки порівняно з криптами

TLR – давня та еволюційно консервативна родина рецепторів, які відіграють важливу роль у формуванні вродженого імунітету та запальних процесів [23]. TLR розпізнають консервативні патоген-асоційовані молекулярні патерни (PAMPs), які є властивими великій групі мікроорганізмів, і залучені до індукції вродженої та набуті імунної відповіді [23, 24].

Ентероцити можуть не відповідати на дію TLR-агоністів. За відсутності хвороби клітини кишковика синтезують TLR3 і TLR5 і на низькому рівні TLR2 та TLR4. Недостатність TLR2 і TLR4 є можливою причиною нечутливості клітин кишковика до коменсальних бактерій. Крім того, у цих клітинах синтезується у великій кількості TOLLIP, який інгібує TLR2- і TLR4-шляхи, тим самим захищаючи від хронічної запальної відповіді до коменсальних бактерій [8].

Тривала гіпоацидність шлунка призводить до бактеріальної колонізації ДПК та розвитку дисбіозу. За цих умов відбувається активація Toll-like рецепторів на поверхні епітеліальних клітин, що узгоджується з виявленим нами підвищенням експресії гена *Tlr2*, наслідком чого є розвиток запального процесу [8, 10-12]. При цьому відбувається вивільнення прозапальних цитокінів,

зокрема ІЛ-2, ІЛ-8, ФНП- α тощо на фоні зниження прозапального ІЛ-10 [24]. Вищезазначені цитокіни індукують синтез молекул клітинної адгезії (МКА) на плазматичній мембрані нейтрофілів й ендотеліоцитів, що, у свою чергу, призводить до міграції нейтрофілів із мікроциркуляторного русла в тканини ДПК [4]. Активація нейтрофілів зумовлює подальше збільшення продукування прозапальних цитокінів, зростання синтезу МКА, підвищення проникності судин та генерації АФК в епітеліоцитах ДПК. Вивільнення цитокінів та зростання синтезу МКА сприяють ще більшій міграції нейтрофілів, що, у свою чергу, обумовлює цикл запалення, наслідком чого стає посилена генерація АФК та розвиток ОС [4, 24].

Отже, встановлені зміни експресії гена *Tlr2* в епітеліоцитах ворсинок та крипти за умов тривалої шлункової гіпоацидності свідчать про розвиток патологічних процесів у тканині ДПК, зокрема запалення. При цьому продемонстровано ключову роль саме дисбіозу травного тракту в ініціації пошкодження епітеліоцитів та визначено, що до біохімічних механізмів ушкодження ДПК за умов тривалої шлункової гіпоацидності залучаються реакції ліпідної пероксидації, що посилюється за цих умов, та експресія гена *Tlr2*, рівень якої зростає як від-

повідь на патогенну мікрофлору. Виявлені відмінні рівні експресії та змін експресії проаналізованого гена в епітеліальних клітинах ворсинок і крипт обумовлені структурно-функціональними особливостями клітин ДПК, зокрема наявністю в складі крипт клонів низькодиференційованих проліферативних клітин, яким властива менша стійкість до ОС порівняно з високодиференційованими ворсинками [4]. Окрім цього, відомо, що на ранніх стадіях запальних захворювань тонкої кишки, зокрема ДПК, у першу чергу пошкоджуються епітеліоцити крипт за рахунок міграції нейтрофілів із судин у просвіт крипт, що призводить до формування криптових абсцесів [4].

Нормалізація експресії гена *Tlr2* при застосуванні мультипробіотичного препарату також свідчить про істотний внесок дисбіотичних порушень у патологічні процеси, що відбуваються в епітеліоцитах ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Щодо можливих механізмів впливу мультипробіотика Симбітер на експресію генів у ДПК, перш за все, слід зазначити його здатність еліминувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз [13, 14]. Ефективність дії досліджуваного препарату пов'язана з широким спектром його біологічної активності (продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, представлених в препараті Симбітер: вітаміни, імуномодулятори тощо володіють антиоксидантними властивостями, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток ОС та знижувати інтенсивність запальних і деструктивних процесів у ШКТ й асоційованих органах) та високим рівнем безпечності для організму [7, 14-16 25].

Висновки. Показано, що тривале експериментальне гальмування кислотної секреції шлунка супроводжується зміною експресії гена *Tlr2* в епітеліоцитах ДПК щурів. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії цього гена в епітеліоцитах ворсинок і крипт наближався до контрольних значень. Отримані дані можуть свідчити про залучення гена *Tlr2* в розвиток запального процесу в ДПК, обумовленого дисбіотичними змінами за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Список використаних джерел.

- Shin J. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases / J. Shin, O. Vagin, K. Munson [et al.] // Cell and molecular life sciences. – 2008. – Vol. 65, N 2. – P. 264–281. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study / A. Sundstrom, K. Blomgren, L. Alfredson [et al.] // Pharmacoeconomics and drug safety. – 2006. – Vol. 15, N 3. – P.141–149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Johnson D. A. Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use / D. A. Johnson, I. V. EC Oldfield // Clinical gastroenterology and hepatology. – 2013. – Vol. 11 – P.458–464. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Physiology of the gastrointestinal tract. 4th edition / K. Barrett, F. Ghishan, J. Merchant [et al.] – New York : Academic Press, 2006. – 2080 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
- Safety of long-term use of proton pump inhibitors / A. Thomson, M. Sauve, N. Kassam [et al.] // World journal of gastroenterology. – 2010. – Vol. 16, N 19. – P.2323–2330. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Zhang R. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation / R. Zhang, M. L. Brennan, Z. Shen [et al.] // The journal of biological chemistry. – 2002. – Vol. 277. – P.46116–46122. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Дворченко К.О. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGF- β і HGF у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер / К.О. Дворченко, О.О. Берник, А.С. Драницина [та ін.] // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, №5. – С. 114–123.
- Frolova L. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases:

upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis / L. Frolova, P. Drastich, P. Rossmann [et al.] // Journal of histochemistry and cytochemistry. – 2008. – Vol. 56. – P.267–274. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Takeuchi O. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components / O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai [et al.] // Immunity. – 1999. – Vol. 11. – P.443–451. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. McMahon L. Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease / L. McMahon, A. House, B. Catchpole [et al.] // Veterinary immunology and immunopathology. – 2010. – Vol. 135. – P.158–163. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Burgener I. A. Upregulation of Toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs / I. A. Burgener, A. König, K. Allenspach [et al.] // Journal of veterinary internal medicine. – 2008. – Vol. 22. – P.553–560. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Szebeni B. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease / B. Szebeni, G. Veres, A. Dezsofi [et al.] // Clinical and experimental immunology. – 2008. – Vol. 151. – P. 34–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Абдулахад К. Ф. А. Дослідження впливу мультипробіотиків групи "Симбітер" на секреторну функцію шлунка у щурів в умовах тривалої гіпергастринемії: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.13 / Абдулахад Кусай Ф. Абдулахад; Київ: нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2012. – 20 с.

14. Culligan E. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects / E. Culligan, C. Hill, R. Sleator // Gut pathogens. – 2009. – Vol.1, N 19. – P.38–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

15. Iankovsky D. Microbiota and human health / D. Iankovsky, G. Dymant. – Kyiv : LLC Chervona Ruta-Turs, 2008. – 552 p.

16. Tsyriuk O. I. Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats / O.I. Tsyriuk, T.V. Beregova // Bulletin of biological and medical issues. – 2007. – N 3. – P.38–43. Available from: <http://www.irbis-nbuv.gov.ua>

17. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.П. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60–63.

18. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // The journal of biological chemistry. – 1951. – 193, N 1. – P.265–275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

19. Flint N. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis / N. Flint, F. L. Cove, G. S. H. Evans // Biochemical journal. – 1991. – Vol. 280 (Pt 2). – P.331–334. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

20. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analytical biochemistry. – 1987. – Vol. 162. – P.156–159. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

21. Konturek P. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase COX-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats / P. Konturek, T. Brzozowski, P. Pierzchalski [et al.] // Alimentary pharmacology and therapeutics. – 1998. – Vol. 12 (8). – P. 767–777. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

22. Савко У. В. Біохімічні механізми пошкодження епітеліоцитів дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04 / Савко Ульяна Вікторівна; Київ: нац. ун-т ім. Т. Шевченка. – К., 2014. – 20 с.

23. Aderem A. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response / A. Aderem, R. J. Ulevitch // Nature. – 2000. – Vol. 406, № 6797. – P. 782–787. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

24. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages / T. Matsuguchi, T. Musikacharoen, T. Ogawa [et al.] // The journal of immunology. – 2000. – Vol. 165. – P.5767–5772. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

25. Lutgendorff F. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis / F. Lutgendorff, L. M. Trullsson, L. P. van Minnen [et al.] // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. – 2008. – Vol. 295, N 5. – P.1111–1121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 10.04.15

А. Драницина, канд. біол. наук, Е. Дворченко, д-р біол. наук, А. Моргаченко, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *TLR2* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОХЛОРИДРИИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ МУЛЬТИПРОБИОТИКА СИМБИТЕР

Показано увеличение уровня экспрессии гена *Tlr2* в эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки крыс в гипоацидных условиях. При введении мультипробіотика "Симбітер" в тех же условиях уровень экспрессии данного гена в эпителиоцитах ворсинок и крипт приближался к контрольным значениям.

Ключевые слова: желудочная гипоацидность, двенадцатиперстная кишка, экспрессия гена *Tlr2*, мультипробіотик.

A. Dranitsina, PhD., K. Dvorchshenko, DSc, O. Morgaienko, PhD., L. Ostapchenko, DSc.
Taras Shevchenko national university of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF *TLR2* GENE IN RAT DUODENAL UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA AND WITH ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC SYMBITER

The increasing of Tlr2 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells upon gastric hypoacidic conditions was shown. The level of Tlr2 expression both in villus and crypt epitheliocytes approached to the control value upon the treatment of hypoacidic rats with multiprobiotic "Symbiter".

Key words: gastric hypoacidity, duodenal, *Tlr2* gene expression, multiprobiotic.

УДК 611.018.83:615.373]-092.4

Н. Храновська, канд. біол. наук, О. Скачкова, канд. біол. наук, О. Горбач, мол. наук. співр.
Національний інститут раку, Київ,
Г. Потебня, д-р мед. наук, проф.,
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є.Кавецького НАН України, Київ,
Р. Сидор, асп.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ФЕНОТИПОВІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕНЕРОВАНИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ПІСЛЯ ОБРОБКИ ЦИТОТОКСИЧНИМИ ЛЕКТИНАМИ *B. subtilis* B-7025

*Розглянуто фенотипові та функціональні властивості генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025.*

Ключові слова: дендритні клітини, цитотоксичні лектини, *B. subtilis* B-7025, фенотипові та функціональні властивості.

Вступ. Відомо, що найбільш потужні антигенпрезентуючі клітини імунної системи – дендритні клітини (ДК) відрізняються високою пластичністю, та, в залежності від умов мікрооточення, можуть досягати функціонального дозрівання та набувати імуногенності. Так, залежно від складу середовища, умов культивування клітин-попередників, факторів дозрівання та ін. можна отримати ДК з різними властивостями. Одні з них будуть індукувати імунну відповідь за Тх1 / Тх2 типом, інші, навпаки, активувати регуляторні Т-лімфоцити (Трег) і призводити до імуносупресії (толерогенні ДК). Відомо, що фактори дозрівання, які додають до ДК при інкубації з антигеном, істотно впливають на їх здатність до міграції в лімфатичні вузли та презентації антигенів Т-лімфоцитам [1]. Дозрівання ДК індукують різноманітні стимули, наприклад, прозапальні цитокіни, с-KitL та FLT3L (ліганди тирозин-кіназного рецептора), зв'язування рецептора CD40, взаємодія певних макромолекул вірусів та бактерій (двуспіральна РНК, ДНК, ліпополісахарид (ЛПС), простагландин E2 (PGE2) та CpG послідовності ДНК бактерій з певними рецепторами сімейства Toll Like (TLR) [2,3].

Разом з тим, слід зазначити, що найбільш оптимальні комбінації індукторів дозрівання та способи навантаження пухлинними антигенами для використання ДК в імунотерапії раку не встановлені, а протоколи одержання функціонально зрілих ДК не стандартизовані, тому пошук найбільш оптимальних поєднань факторів для одержання функціонально зрілих ДК, придатних для використання у складі протипухлинних вакцин, залишається актуальною проблемою [4].

Відомо, що бактеріальні штами продукують поверхневі лектини. Показано, що бактерії *B. subtilis* B-7025 (штам депонований в Інституті мікробіології і вірусології Національної академії наук України) мають підвищену здатність синтезувати позаклітинні цитотоксичні лектини (ЦЛ) з унікальними властивостями. За хімічною природою ці лектини є глікопротеїнами, молекулами, що складаються з трьох поліпептидних ланцюгів з MM 8300 Da, утворюючи конгломерати. ЦЛ мають імуномодулюючу та протипухлинну активність. Вони здатні вибірково стимулювати Т- і В-лімфоцити, стимулювати продукцію інтерферонів (IFN) в різних біологічних системах. Ці ЦЛ використовують в якості компонента в протипухлинних вакцинах. Лізати пухлинних клітин, одержані за допомогою ЦЛ, були використані нами для

навантаження ДК при створенні протипухлинної вакцини на основі цих клітин [5]. Разом з тим, ефекти ЦЛ на фенотипові та функціональні властивості генерованих ДК людини не досліджені.

Мета роботи полягала у дослідженні фенотипових та функціональних властивостей генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025.

Матеріали і методи. Для генерації ДК були використані мононуклеарні клітини периферичної крові 10 практично здорових людей. Клітини в концентрації 1×10^6 кл / мл поміщали в 24-лункові планшети для культивування протягом 2 годин в 3 мл повного живильного середовища RPMI-1640, 100 мкг/мл гентаміцину і 5% ембріональної телячої сироватки. Фракцію клітин, що не прилипали, видаляли, а ті, що залишилися, інкубували в повному культуральному середовищі в присутності 40нг / мл гранулоцит-макрофаг колоніє стимулюючого фактору (GM-CSF) протягом 6 діб при 37° С в CO₂-інкубаторі при 5% CO₂. Після 6 діб культивування до незрілих ДК додавали ЦЛ *B. subtilis* B-7025 в концентраціях 0,04, 0,1 або 0,4 мг/мл та інкубували ще протягом 24 години.

Фенотиповий аналіз генерованих ДК проводили за допомогою методу проточної цитофлуориметрії за експресією поверхневих маркерів: CD83, CD86, HLA-DR. Рівень експресії генів інтерлейкін (IL)-12p40, IL-12p35, фактор некрозу пухлини (TNF)(α), IL-10, трансформуючий фактор росту (TGF)- β визначали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням специфічних праймерів, TaqMan зондів або флуорохромів SYBRGreen. Рівні експресії генів-мішеней оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta Ct$ з нормуванням щодо експресії ендogenous контролю.

З метою дослідження активності ДК в реакції змішаної культури лейкоцитів (ЗКЛ), їх інкубували з аутологічними лімфоцитами протягом 20 діб. Після закінчення інкубації визначали кількість CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ та CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IFN- γ ⁺ – лімфоцитів в культурі.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програмного пакету Statistica 6.1. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою методів параметричної (t – критерій Стюдента) і непараметричної статистики (критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні). Відмінності вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати та обговорення. На сьогоднішній день цитокіновий "коктейль" TNF- α , IL-1- β , IL-6 і PGE2 прийнятий в якості "золотого стандарту" для стимуляції дозрівання ДК. Однак, він характеризується істотним недоліком – нездатністю посилювати продукцію ДК IL-12p70 та інших Th1-поляризуючих цитокінів, які мають важливе значення для індукції ефективної протипухлинної імунної відповіді, опосередкованої Th1 і цитотоксичними Т-лімфоцитами (ЦТЛ) [6]. Тому подальший пошук полягає у використанні альтернативних цитокі-

нових коктейлів, що включають замість PGE2 ліганди TLR, зокрема, LPS або Poly I: C [6,7,8].

Як показали результати досліджень, ЦЛ у найменшій із досліджуваних концентрацій (0,04 мг/мл) сприяють посиленню експресії на генерованих ДК молекул CD86 та HLA-DR, які відповідають за презентацію антигенів (рис. 1). Рівень експресії молекул перевищував такий у ДК, генерованих в присутності LPS. Разом з тим, ця концентрація ЦЛ не вплинула на експресію молекули CD83, яка характеризує ступінь зрілості ДК. Найбільш ефективними щодо підвищення рівня експресії молекули CD83 були ЦЛ в концентрації 0,1 мг/мл та LPS.

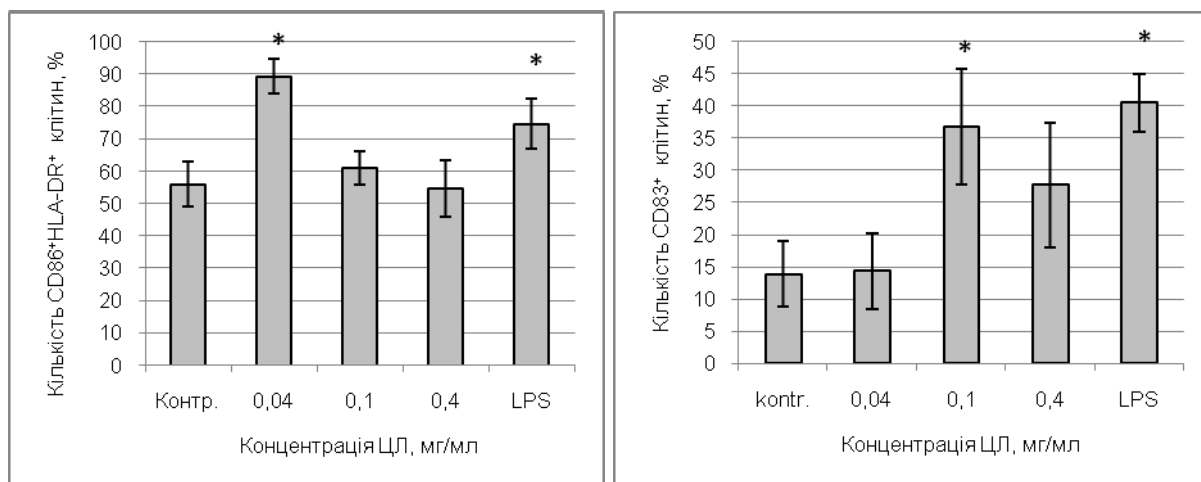


Рис. 1. Фенотипова характеристика ДК, оброблених ЦЛ *B. subtilis* B-7025

Результати наступного дослідження показали, що ЦЛ сприяють змінам функціональної активності генерованих ДК, при цьому найбільший вплив зареєстровано від застосування ЦЛ в концентрації 0,1 мг/мл (рис. 2). Так, рівні мРНК Th1-поляризуючих цитокінів IL-12p35, IL-12p40 та TNF- α в ДК зростали в 3-5 разів у разі інкубації з ЦЛ в цій концентрації порівняно з контролем. Разом з тим, відмічено зростання в декілька разів і рівня мРНК імуносупресорного цитокіна IL-10 з одночасним пригніченням активності гена TGF- β . Слід зазначити, що спрямованість змін в цитокіновому профілі генерованих ДК під дією ЦЛ та LPS практично співпадали.

Виходячи із встановленого факту активації гена імуносупресорного цитокіна IL-10, який сприяє активації Трег, було проведено дослідження толерогенної активності генерованих ДК у реакції ЗКЛ. Для цього ДК, одержані у присутності ЦЛ *B. subtilis* B-7025, довготривало

культивували з аутологічними лімфоцитами та визначали кількість CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-4⁺ та CD8⁺IFN- γ ⁺ – клітин в культурі лімфоцитів. Оскільки доза ЦЛ 0,4 мг/мл виявилася токсичною для ДК, в наступних дослідженнях ми її не застосовували.

Як показали результати досліджень, ДК, оброблені ЦЛ *B. subtilis* B-7025 в концентрації 0,1 мг/мл, практично не впливали на кількість Трег клітин з фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ в культурі, але сприяли деякому збільшенню кількості CD4⁺IFN- γ ⁺-клітин та суттєвому збільшенню кількості CD8⁺IFN- γ ⁺-лімфоцитів (рис. 3 та рис. 4). Це свідчить про важливість балансу між прозапальними та протизапальними та імуносупресорними цитокінами, що продукують ДК, який багато в чому визначає наступну форму імунної відповіді або сприяє розвитку толерантності.

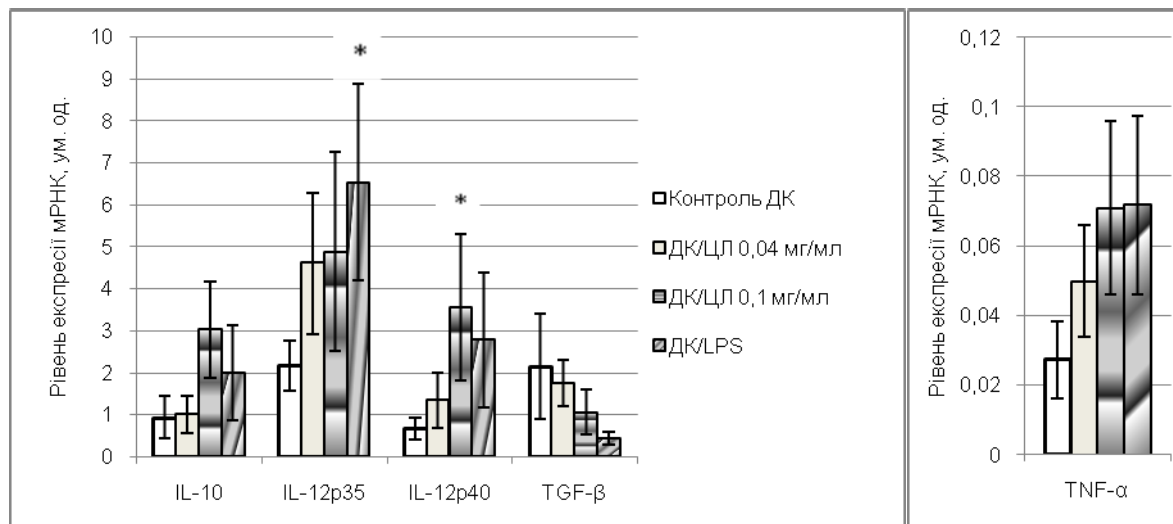


Рис.2. Рівень експресії мРНК цитокінів в ДК моноцитарного походження, оброблених ЦЛ *B. subtilis* B-7025

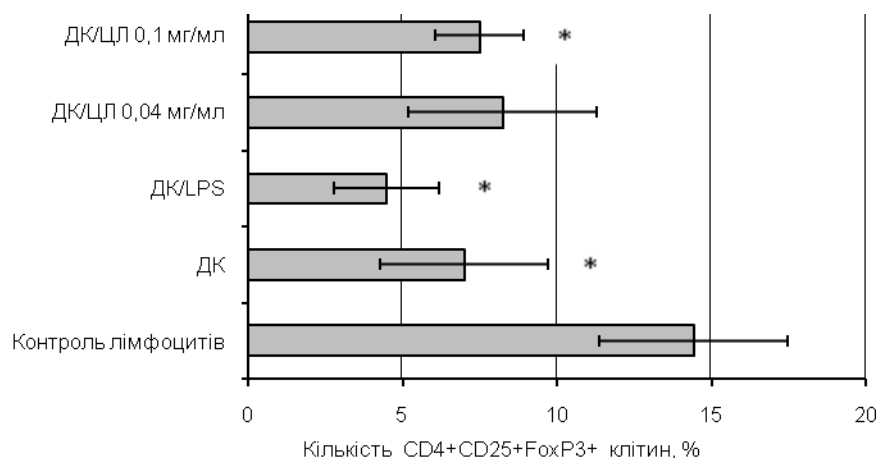


Рис. 3. Кількість Трег після інкубації з ДК, обробленими цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025

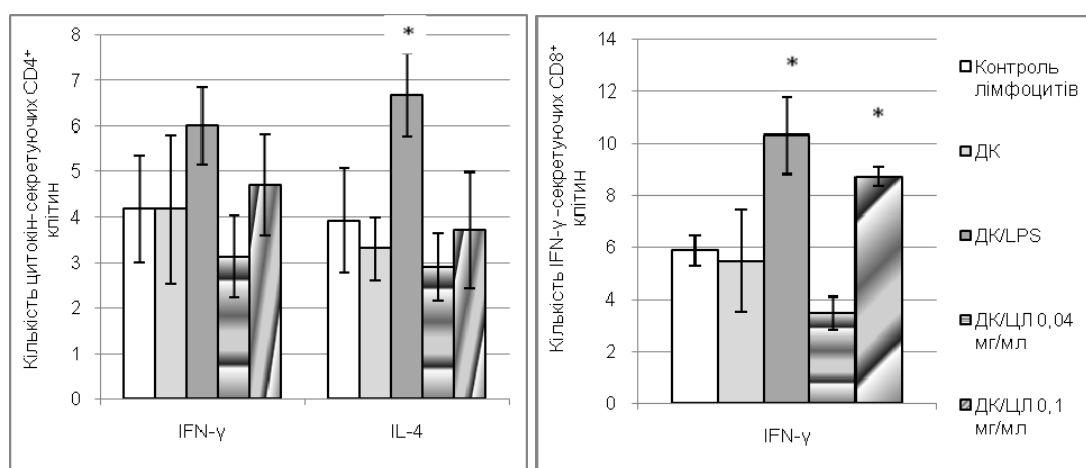


Рис. 4. Кількість цитокін-продуруючих CD4+ та CD8+ клітин після інкубації з ДК, обробленими цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025

Найбільш виражений вплив щодо пригнічення Трег та активації цитокінсекреторної активності Т-лімфоцитів зареєстровано під дією ДК, оброблених LPS, що свідчить про доцільність його застосування з метою індукції функціонального дозрівання генерованих ДК.

Механізми, за рахунок яких ЦЛ активують ДК, досі не зрозумілі. Разом з тим, припускається, що їхня дія опосередковується зв'язуванням з TLR або лектиновими рецепторами на ДК та активацією відповідних сигнальних шляхів.

Висновки. Одержані результати свідчать, що ЦЛ *B. subtilis* B-7025 сприяють Тх1 – поляризації генерованих ДК людини, не індукуючи при цьому їхні толерогенні властивості. У концентрації 0,04 мг/мл ЦЛ сприяють посиленню експресії на генерованих ДК молекул CD86 та HLA-DR, які відповідають за презентацію антигенів. У концентрації 0,1 мг/мл ЦЛ сприяють підвищенню рівня експресії молекули CD83 в 3-5 разів та зростанню рівнів мРНК Тх1-поляризуючих цитокінів IL-12p35, IL-12p40 та TNF-α. Таким чином, одержані дані обґрунтовують доцільність використання ЦЛ *B. subtilis* B-7025 у протоколах генерації Тх1-поляризуючих ДК.

Список використаних джерел

- Schmidt S. V. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation / S. V. Schmidt, A. C. Nino-Castro, J. L. Schultze // *Frontiers in Immunology / Antigen Presenting Cell Biology*. – 2012. – Vol. 3.

– P. 1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3432880/>

- Synergistic effect of microbe-associated molecules on human monocyte-derived dendritic cell maturation in vitro / L. M. Skivka, Yu. V. Shevts, N. M. Khramovskaya et. al. // *Biopolymers & Cell*. – 2012. – № 1. – P. 50–55.

- Kalinski P. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies / P. Kalinski, R. Muthuswamy, J. Urban // *Expert Rev. Vaccines*. – 2013. – 12(3). – P. 285–295. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/erv.13.22>

- Clinical use of dendritic cells for cancer therapy / S. Anguille, E. L. Smits, E. Lion et. al. // *Lancet Oncol*. – 2014. – N 15. – P. e257–267. Available from: [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045\(13\)70585-0.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(13)70585-0.pdf)

- Влияние дендритноклеточной аутовакцины на эффективность лечения больных раком яичника / Н. Н. Храмовская, Ю. А. Гриневич, Г. П. Потебня [и др.] // *Вопр. онкологии*. – 2012. – № 6. – P. 781–786.

- Kalinskia P. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors / P. Kalinskia, H. Okada // *Seminars in Immunology*. – 2010. – Vol. 22. – P. 173–182. Available from: www.elsevier.com/locate/ysmim

- Comparison of α-Type-1 polarizing and standard dendritic cell cytokine cocktail for maturation of therapeutic monocyte-derived dendritic cell preparations from cancer patients / R. Trepiakas, A. E. Pedersen, M. H. Hansenc et. al. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 2824–2832. Available from: www.elsevier.com/locate/vaccine

- Differential effect of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy / D. Raich-Regue, M. Naranjo-Gomez, L. Grau-Lopez et. al. // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – P. 378–387. Available from: www.elsevier.com/locate/vaccine

Н. Храновская, канд. биол. наук, О. Скачкова, канд. биол. наук, Н. Свергун, канд. биол. наук, О. Горбач, млад. науч. сотр.
Национальный институт рака, Киев, Украина,
Г. Потебня, д-р мед. наук, проф.
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина,
Р. Сидор, асп.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЕНЕРИРУЕМЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ ЛЕКТИНАМИ *B. subtilis* B-7025

Рассмотрены фенотипические и функциональные свойства генерируемых дендритных клеток человека после обработки цитотоксическими лектинами B. subtilis B-7025.

Ключевые слова: дендритные клетки, цитотоксические лектины, B. subtilis B-7025, фенотипические и функциональные свойства.

N. Khranovska, PhD., O. Skachkova, PhD, N. Svergun, PhD, O. Gorbach, Junior Researcher
National Cancer Institute, Ukraine, Kyiv, Ukraine,
G. Potebnya, MD, Prof.
RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv Ukraine,
R. Sydor, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kyiv, Ukraine

THE PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE GENERATED HUMAN DENDRITIC CELLS AFTER TREATMENT WITH CYTOTOXIC LECTINS *B. subtilis* B-7025

The article describes the phenotypic and functional properties of human dendritic cells generated after treatment with cytotoxic lectins B. subtilis B-7025.

Keywords: dendritic cells, cytotoxic lectins, B. subtilis B-7025, phenotypic and functional properties.

UDC УДК 591.33:57.086.13

O. Shtapenko, PhD.
Institute of Animal Biology NAAS, Lviv,
A. Madich, D. Sc., Ph.D.,
Human Genome Campus, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge University, UK.

VITRIFICATION OF PRONUCLEAR-STAGE MOUSE EMBRYOS USING DIFFERENT CRYOPROTECTANTS AND THEIR SUBSEQUENT DEVELOPMENT IN VITRO WITH OR WITHOUT OVIDUCT EPITHELIAL CELLS TO THE BLASTOCYST STAGE

The results of experimental researches on vitrification of PN mice embryos on solid surface with use of different cryoprotectants and evaluation their viability and subsequent development in vitro after vitrified-warmed are resulted in this article.

Key words: vitrification, pronuclear stage mouse embryos, oviduct epithelial cells.

Introduction. Cryopreservation of mouse embryos is a cost-effective approach for the maintenance of scientifically important stocks, strains, and lines [15]. Vitrification as an ultra rapid cooling technique has been used in cryopreservation of embryo at low temperatures by creating a completely vitreous (glass-like) state [19]. Improvements in ice formation have been made by selecting the most appropriate cryoprotectants (CPAs) and using a mixture of CPAs, macromolecules and nonpermeating agents [14].

Ethylene glycol, a permeating compound, has an important function in stabilizing the cellular membrane during freezing, though it also has some harmful effects on embryo development [18]. In the use of PVP for 2-cell stage mouse embryos, Kim C.G. *et al.* [10] reported that addition of PVP macromolecules significantly reduced the incidence of zona and cellular damage, but exposure of embryos to PVP was deleterious to their subsequent development.

Cryopreservation causes morphological and biochemical alterations including damages to membranes and mitochondrial [4], cytoplasmic disorganizations [1], and DNA fragmentation [6], which in turn may decrease development and implantation capabilities of embryos. An alternative way of improving the developmental ability of embryos at the pronuclear stage after cryopreservation may be their *in vitro* cultivation to avoid the stresses caused by inappropriate vitrification conditions by the prevention of stresses that arise during vitrification. Several culture systems have been used for improve *in vitro* embryo development and most of them include somatic cells such as granulosa cells [16], oviductal cells [21], uterine cells,

Vero cells [11], as the co-culture support [7]. Based on these observations and our recent finding that co-culture with oviduct epithelial cells enhances the *in vitro* development of the embryos [8], it seems that improvement in the post warming culture conditions by using oviduct epithelial cells can affect the embryo development and the quality of resulting blastocysts.

The purpose of this study was to evaluate the effects of cryoprotectant treatment of the pronuclear stage on the developmental ability of vitrified mouse zygotes, its developmental ability to the blastocyst stage. We compared various components vitrification solutions to find a more suitable composition for vitrification of PN embryos. Finally, in a series of experiments we investigated the developmental competence of vitrified-warmed pronuclear-stage mouse zygotes in co-culture system using oviduct epithelial cells.

Materials and methods. Animals and embryo collection Eight to twelve weeks old female C57BL/6 mice were superovulated by an intraperitoneally injection of 5IU PMSG (Sigma) followed 48 h later by 5 IU hCG (Pregnyl, Organon, Netherlands). Females were placed with the same strain males immediately after hCG administration. Females were checked up for mating by the presence of vaginal plugs 16 h later. Approximately 19-20 h post-hCG injection oviducts were excised and pronuclear-stage embryos with the rest of cumulus cells were flushed from oviduct ampoules with M2. Zygotes have been collected and transferred into M2 medium supplemented with a hyaluronidase (80 IU/ml) for 3 min. Embryos have been rinsed three times into few M2 medium droplets and classified as pronuclear-stage embryos (PN embryos),

dead/fragmented zygotes and unfertilized eggs. The PN embryos divided to three groups for vitrification and have been kept in CO₂ incubator at 37°C in M16 medium drops under mineral oil until time they have been used.

Vitrification and warming of embryo All solutions were prepared using M2 as a basic medium. The solid-surface vitrification (SSV) and warming procedure were modified from the method described by Dinnyes *[et al.]* [5]. The two-step vitrification procedure was used in our experiments. In the first step the PN embryos were equilibrated by 15 min incubation in the holding medium M2 with 4% EG and 10% FBS at 37°C. After equilibration, groups of 25-30 PN embryos were washed three times in M2+10% FBS for 30 sec each in 20-μl droplets of second vitrification solution consisting of different concentration of cryoprotectant agents: Group 1 of 40% EG and 0.5M sucrose; Group 2 of 35% EG with 5% PVP and 0.5M sucrose and Group 3 of 28% EG with 12% DMSO and 0.5M sucrose. PN embryos were sucked into a glass capillary in groups of 20 to 25 with 2 μl droplets of these vitrification solutions and finally dropped onto the cold and dry surface of a piece of aluminum foil (10 × 15 cm²) floating on the surface of liquid nitrogen. Then the vitrified spherical droplets have been placed by using forceps in 1.8 ml cryotubes and were immersed into liquid nitrogen.

Warming was accomplished by direct transfer the droplets into warming 37°C solution containing 0.5M sucrose + 10% FBS in M2 for 1 min. Afterward, the PN embryos were warmed in three-step into various solutions of sucrose. They were consecutively transferred into the 500μl droplets of M2 medium consisted of 0.2M sucrose at RT for 1 min, 0.1M sucrose for 1 min and 0.05M sucrose for 1 min and finally collected into M2 and kept during 10 min. Vitrified-warmed PN embryos of three groups were transferred into 4-well dishes separately, filled with 1ml DMEM with antibiotics + 10% FBS per a well. Embryos were cultured overnight at 37°C in the CO₂ incubator to reach 2-cell stage.

Assessment of embryo survival and development after warming Survival rate of post-warming PN embryos were evaluated by observing morphological appearance, including membrane integrity and blastomeres after warming. Embryos with a normal spherical shape and a visible perivitelline space and without any injuries in zona pellucida were considered normal and were selected for further investigation.

Two-cell embryos obtained from frozen-warmed PN embryos in different vitrification solution divided to two groups each as Groups+ suggesting embryo co-culture in DMEM with OEC+10% FBS+1% penicillin/streptomycin solution and Groups- suggesting embryo culture in

DMEM+10% FBS+1% penicillin/streptomycin solution without OEC. The viability of embryos has being determined every 24 h without replacement a fresh medium by subsequent development to 4-, 8-cell stage, morula and blastocyst during in vitro culture for 72 h.

Oviduct Epithelial Cells Culture (OEC) performance

The oviducts from the rabbit females were used as a source of OEC. After PN embryos were flushed the oviducts transferred into Petri dishes with DMEM and 1% penicillin-streptomycin solution + 2% FBS. The oviduct ampoules were squeezed by eye-forceps to get the clamps of epithelial tissue. Concentrated suspension of epithelial cells was sucked throughout 200 μl pipette tip 10 times and squeezed throughout 27g surgical needle 25 times until almost single cell suspension was reached [13]. The cells have been left in the CO₂- incubator at 37°C for 30 min to let them put down. The upper layer of the medium has been discarded then and fresh DMEM + 20% FBS (just in this step) added to reach a desirable rate of cell proliferation. The cells have been left in the CO₂-incubator at 37°C for 3 days. After old condition medium was discarded and fresh DMEM + 10% FBS + 1% antibiotic solution were added again the OEC culture was ready to use as a cell feeder substrate for 2-cell embryos developed from thawed PN embryos. All percentage data of this study were performed using MS Excel.

Results and discussion. Effect of the different vitrification solutions on survival rate of PN mouse embryos. Rapid vitrification procedures need much higher concentrations of cryoprotectants than conventional slow freezing. Different CPs have different toxicity, penetration rate, and transition temperature [17]. The combination of different CPs can result to increase viscosity, transition temperature and reduce the level of toxicity. In the present study we examined various components to find a more suitable composition for vitrification of PN embryos.

One hour after warming, survival of embryos was assessed by observing the intactness of blastomeres and zona pellucida. Embryos with an abnormal appearance, dark or a wrinkled cytoplasm membrane and blebs in the intracellular zone, were considered as damaged during vitrification. As it is shown in Table 1, high survival rate of warmed PN embryos with normal morphology being observed in all groups: 92% (115 out of 125) vitrified with 40% EG in Group SSV 1; 90.8% (218 out of 240) vitrified with 35% EG + 5% PVP in Group SSV 2 and 96.7% (232 out of 240) vitrified with 28% EG + 12% DMSO in Group SSV 3 at droplet vitrification.

Table 1. Effect of different cryopreservation agents on survival rate and development vitrified-warmed pronuclear stage mouse embryos to the 2-cell stage

Index /Groups with different vitrification solution	SSV-1 40%EG	SSV-2 35%EG+5% PVP	SSV-3 28%EG+12%DMSO
No. of vitrified PN embryos	125	240	240
No. of warmed and survived zygotes	115	218	232
Survival rate (%)	92.0	90.8	96.7
No. of cleaved zygotes (2-cell embryos)	46	94	122
Cleavage rate (%)	40.0	43.1	52.6

Developmental stage and morphological quality of vitrified-warmed embryos are the primary parameters affecting their survival rate. About 40% PN embryos of vitrified in the solution with 40% EG were developed to 2-cell stage after warming, what is less than the 2-cell cleavage rate in group vitrified with 35% EG + 5% PVP (43.1%, 94 out of 218) and significantly lower than vitrified in solution with EG partial replaced with DMSO (52.6%, 122 out of 232).

The loss of viability can be influenced by the type and concentration of cryoprotectant, the cryoconservation protocol, developmental stage of the embryo. In our study we frozen PN mouse embryos by drop vitrification, where the vitrification solution contained as cryoprotectant EG and combination EG with PVP or DMSO. Such cryoprotectants as EG, PVP or DMSO were successfully used in many studies on cryopreservation of embryos in

different stage and of different animal species. In particular, our research results are consistent with Levent Keskindepe [9] studies demonstrating that post-warming survival rates and development to blastocyst of pronuclear embryos cryopreserved in the presence of DMSO were higher ($P < 0.05$) than those cryopreserved with either PG or EG. Such improved survival was demonstrated, when rabbit oocytes were vitrified in combination with EG and DMSO as cryoprotectants [3]. Liebermann *et al.* [12] noted that vitrification of pronuclear stage human embryos with ethylene glycol and DMSO was a good alternative to vitrification with 1,2-propanediol and DMSO.

Further development PN embryos exposed in solutions with different cryopreservation agents and co-cultured with OEC. The post-warming survival rates of embryos vitrified in different cryoprotectants combination from

first experiment, were used for testing effect of culture media DMEM and culture system OEC for *in vitro* developments of embryos. As shown in Table, there were some differences in developmental rates at 4-cell and 8-cell stages between both experimental groups at different culture conditions.

The rates of development to 4-cell stage were higher in both SSV 3 group cultured in medium in and without OEC compared to another experimental groups. The survival rate of 4- and 8-cell embryos in the SSV 2 (-) group with 35% EG and 5% PVP were lower than the vitrified-warmed embryos in the SSV 2 (+) group were co-cultured into feeder epithelial cells monolayer. Hypothetically, the supporting effect of the OEC could reduce the possible toxicity of the PVP in SSV 2 and to be found for increased number of the compacted morula and blastocysts for next 24 h.

Table 2. Comparison of *in vitro* development of vitrified-warmed 2-cell mouse embryos to blastocysts obtained from vitrified-warmed pronuclear stage embryos in different vitrification solution after culture with or without OEC

Groups		No of embryos developed to				
		2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	Morula (%)	Blastocysts (%)
Groups (†) co-culture with OEC monolayer in culture media	SSV1-40% EG	23	19-82.61%	14-60.87%	13-56.52%	12-52.17%
	SSV2-35%+5%PVP	47	40-85.11%	31-65.96%	24-51.06%	24-51.06%
	SSV3-28%EG+12% DMSO	61	52-85.25%	43-70.49%	40-65.57%	40-65.57%
Groups (‡) Culture media only	SSV1-40% EG	23	20-86.96%	16-69.57%	13-56.52%	12-52.17%
	SSV2-35%+5%PVP	47	39-82.98%	30-63.83%	24-51.06%	21-44.68%
	SSV3-28%EG+12% DMSO	61	54-88.52%	42-68.85%	39-63.93%	36-59.02%

Post-warming development to the morulae stages of embryos vitrified in solution containing EG and DMSO were higher (i.e. 65.57% into SSV 3(+) and 63.93% into SSV3(-) than embryos frozen in solution with 40% EG (56.52%) and 35% EG with 5% PVP (51.02%), respectively. The developing rate to morulae stage between SSV 1 and SSV 2 groups in both culture systems was similar.

When compared the rate of the development to blastocyst stage were observed some differences between SSV 3 (+) and SSV 3(-) groups (i. e. 65.57% vs 59.02%) and between SSV 2 (+) and SSV 3(-) groups (i. e. 51.06% vs 44.68%). More detailed analyses showed that division rate and ability to create a blastocyst cavity from previous morula stage in SSV 3 group was better when embryos were cultured in presence of OEC (from 65.57 to 65.57%) than without OEC (from 63.93 to 59.02%). At the end of cultivation all morula were developed to the blastocysts stage in culture system containing OEC monolayer.

These observations may be related to a beneficial effect of oviduct cell on the developmental frozen-warmed embryos. The feeder monolayers cells may have more effective biophysical and biochemical properties, which assisted the embryo to continue its development. The features of the oviduct epithelial cells like their changing protein profile, a high proliferative speed, secreting oviduct-specific glycoprotein [2], specific growth factors [20] suggests that monolayer of mammalian oviduct epithelial cells possesses properties that used in co-culture experiments to improve embryonic development of *in vitro*.

Conclusions. Our present results show that droplet vitrification of pronuclear-stage mouse embryos with using the combination of different CP allow a moderate decrease in CP concentration so as to minimize its toxic and osmotic hazardous effects and it can be successfully cryopreserved for PN mouse embryos. This study shows that PVP, as a macromolecule, could be used for reducing toxicity of an EG-based vitrification solution, but combination of EG and 15% DMSO in a vitrification protocol is advantageous to the the survival and development of PN mouse embryos.

Co-culture with oviduct epithelial cells combined with simple culture media DMEM enhances the *in vitro*

development of the vitrified-warmed mouse embryo. Additionally, embryos generated from our culture system appeared to produce better quality blastocysts.

This study was supported by an NCI Fellowship (project N PO 4A 040 30 "Mechanism of Hsf1 induced apoptosis").

References

1. Ahn H. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos / H. Ahn, I. Sohn, H. Kwon [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2002. – Vol. 61 (4). – P. 466–476. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com>
2. Buhi W. S. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein / W. S. Buhi // *Reproduction*. – 2002. – Vol. 123. – P. 355–362. Available from: <http://www.biochemj.org>
3. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes / X. Y. Cai, G. A. Chen, Y. Lian, X. Y. Zheng, H. M. Peng // *Human Reproduction*. – 2005. – Vol. 20(7). – P. 1969–1974. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
4. Characterization of cellular damage in female gametes and embryos after cryopreservation / A. A. Carvalho, L. R. Faustino, S. V. Castro [et al.] // *Acta Scientiae Veterinariae*. – 2012. – Vol. 40(3). – P. 1046. Available from: www.ufrgs.br/actavet
5. Solid surface vitrification (SSV): an efficient method for oocyte and embryo cryopreservation in cattle, pig and mouse / A. Dinneyes, X. Z. Yang, X. L. Li [et al.] // *Cryobiology*. – 2001. – Vol. 43. – P. 332–338.
6. Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts / D. Fabian, J. O. Gjonret, F. Berthelot [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2005. – Vol. 70 (2). – P. 155–165. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20129>
7. Farha N. Optimal *in vitro* Culture Conditions for Sustainable Development of Preimplantation Mouse Embryos during Prolonged Culture / N. Farha, V. Marcela // *Health and the Environment Journal*. – 2010. – Vol. 1 (2). – P. 3–11. Available from: www.hej.kk.usm.my
8. Вплив фідерних клітин яйцепроводів на дозрівання ембріонів овець до трансферабельних стадій / І. І. Гевкан, О. В. Штапенко, А. В. Мадич [та ін.] // *Науково-технічний бюлетень ІТ УААН*. – 2005. – № 90. – С. 92–97.
9. Use of cryopreserved pronuclear embryos for the production of transgenic mice / L. Keskindepe, Y. Agca, G. A. Pacholczyk, A. Machnicka, J. K. Critser // *Biology of Reproduction*. – 2001. – Vol. 65(2). – P. 407–411. Available from: <http://www.biolreprod.org/content/65/2/407>
10. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5 % of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos / C. G. Kim, H. Yong, G. Lee, J. Cho // *Journal of Reproduction and Development*. – 2008. Vol. 54(4). – P. 250–253. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18490859>
11. Vero cells, but not oviductal cells, increase the hatching frequency and total cell count of mouse blastocyst partly by changing energy substrate concentrations in culture medium / Y. L. Lee, J. S. Xu, S. T. Chan, P. C. Ho, W. S. Yeung // *Journal of Assisted Reproduction and*

Genetics. — 2001. — Vol. 18(10). — P. 566–574. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699129>

12. Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update / J. Liebermann, F. Nawroth, V. Isachenko // Reproductive Biomedicine Online. — 2001. — Vol. 19 (4). — P. 105–114. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034409>

13. Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології : навч.-метод. посіб. / А. В. Мадіч, В. І. Шеремета, І. І. Гевкан [та ін.]. — К. : АртЕконом, 2012. — 144 с.

14. Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals / A. Massip // Reproduction in Domestic Animals. — 2001. — Vol. 36(2). — P. 49–55. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0531.2001.00248>

13. Mazur P. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions / P. Mazur, S.P. Leibo, G.E. Seidel // Biology of Reproduction. — 2008. — Vol. 78(1). — P. 2–12. Available from: <http://www.biolreprod.org/content/78/1/2.full>

14. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization / S. A. Nottola, R. Heyn, A. Camboni, S. Correr, G. Macchiarelli // Microscopy Research and Technique. — 2006. — Vol. 69(6). — P. 508–516. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.20309>

15. Do physical forces contribute to cryodamage? / J. Saragusty, H. Gacitua, I. Rozenboim, A. Arav // Biotechnology and Bioengineering. — 2009. — Vol. 104(4). — P. 719–728. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22435>

16. Sommerfeld V. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification / V. Sommerfeld, H. Niemann // Cryobiology. — 1999. — Vol. 38 (2). — P. 95–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10191033>

17. Vajta G. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // Theriogenology. — 2006. — Vol. 65. — P. 236–244. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289262>

18. Temporal effect of human oviductal cell and its derived embryotrophic factors on mouse embryo development / J.S. Xu, T. M. Cheung, S. T. Chan, P. C. Ho, W. S. Yeung // Biology of Reproduction. — 2001. — Vol. 65(5). — P. 1481–1488. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673265>

19. Yeung W. S. B. The oviduct and development of the preimplantation embryo / W. S. B. Yeung, C. K. F. Lee, J. S. Xu // Reproductive Medicine Review. — 2002. — Vol. 10(1). — P. 21–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/S0962279902000121>

Received to editorial board 12.05.15

О. Штапенко, канд. с.-г. наук

Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна,

А. Мадіч, д-р с.-г. наук

Кембриджський університет, Кембридж, Великобританія

ВІТРИФІКАЦІЯ ЕМБРІОНІВ МИШЕЙ НА СТАДІЇ ПРОНУКЛЕУСІВ ПРИ ВИКОРИСТАННІ РІЗНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ ТА ЇХ ЗДАТНІСТЬ ДО ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ НА КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВІДІВ ДО БЛАСТОЦИСТИ

Наведено результати досліджень з кріоконсервування ембріонів мишей на стадії пронуклеусів методом вітрифікації на твердій поверхні із використанням різних кріопротекторів та оцінено їх життєздатність і подальший розвиток in vitro після деконсервування.

Ключові слова: вітрифікація, ембріонів мишей на стадії пронуклеусів, клітини яйцепровідів

О. Штапенко, канд. с.-х. наук

Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна,

А. Мадіч, д-р с.-х. наук

Кембриджський університет, Кембридж, Великобританія

ВИТРИФИКАЦИЯ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ НА СТАДИИ ПРОНУКЛЕУСОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ДАЛЬНЕЙШЕМУ РАЗВИТИЮ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЯЙЦЕПРОВОДОВ К БЛАСТОЦИСТЫ

Приведены результаты исследований по кріоконсервированию эмбрионов мышей на стадии пронуклеусов методом витрификации на твердой поверхности с использованием различных криопротекторов и оценена их жизнеспособность и дальнейшее развитие in vitro после деконсервирования.

Ключевые слова: витрификация, эмбрионов мышей на стадии пронуклеусов, клетки яйцепроводов.

УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3

G. Shayakhmetova, PhD

Public Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS of Ukraine", Kiyv

DISORDERS OF ANTENATAL AND POSTNATAL DEVELOPMENT IN LONG-TERM ALCOHOL EXPOSED MALE WISTAR RATS' OFFSPRING

It was established increase of CYP2E1 mRNA expression in rats' testes under chronic 15% ethanol solution administration. In addition, study results suggest significant alteration of locomotor and emotional reactivity in offspring of chronically alcohol-treated males as compared with control. Decrease of horizontal, vertical and exploration activities were recorded. Thus, a direct relationship between paternal alcohol exposure and offspring health and behaviour exists.

Keywords: CYP2E1 mRNA expression, rats' testes, ethanol.

It is well-known that chronic alcohol dependence causes testicular abnormalities and sexual dysfunctions both in humans and animals [1, 2]. Studies that included alcohol as a subject of investigation point to alcohol negative effect on all three factors that influence the male reproductive function: hypothalamus-hypophysis-gonads system, endocrine glands, and hormones [3]. The less attention has the paternal effects of alcohol-addicted male on the posterity. Relatively early epidemiological studies indicate an association between lowered birth weight in offspring and paternal alcoholism [4]. Adolescent sons of alcoholics and non-alcoholics were compared on a battery of intellectual, neuropsychological, personality, and behavioral measures. The former group demonstrated certain neuropsychological deficits in perceptual-motor ability, mem-

ory, and language processing [5]. Moreover, adoption studies suggest positive associations between hyperactivity and lowered cognitive abilities in offspring and alcoholism in the biological father but not the adoptive father [6].

It is evident that the human data on preconceptional alcohol consumption paternal effects are limited. And, what about the rodents' data, they are insufficient and contradictory due to great diversity of animal species/strains and models of alcoholism [7]. Due to these facts findings from studies in which males consume alcohol chronically are difficult to interpret, and they are potentially confounded. Moreover, multiple causal mechanisms for a paternal effect (including mutagenicity and epigenetic changes) have been suggested, but none seems satisfactory to explain all findings [7].

Based on this information and considering that alcoholism is chronic disease highly prevalent in the world population, the present work reports the effects of long-term preconceptional 15% alcohol consumption by male Wistar rats on the testicular *CYP2E1* gene expression level, as well as antenatal and postnatal development of these males' offspring. It should be noted that testicular *CYP2E1* has attracted your attention, first of all, because this isoform could be involved in production of metabolites with genotoxic properties inducing germ cell mutations and having adverse effects on offspring [8].

Material and methods.

Wistar albino male rats, initial body weight of 150 g to 170 g, were used in the study. They were kept under a controlled temperature (from 22 °C to 24 °C), relative humidity of 40 % to 70 %, lighting (12 h light-dark cycle), and on a standard pellet feed diet ("Phoenix" Ltd., Ukraine).

The study was performed in accordance with the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

For the experimental (chronic alcoholism) model, reproducing male rats were selected according to the method for measuring voluntary alcohol self-administration in rats, which provides a continuous choice between an alcohol solution and water (two-bottle preference test) [9].

Ten selected rats were used for chronic alcoholism modelling by replacing water with a 15 % ethanol solution during 150 days. The consumption of 15 % ethanol was measured as ml and was calculated as $g \times kg^{-1} \times day^{-1}$ of pure ethanol. On this regimen daily ethanol consumption was in average $10 g \times kg^{-1} \times day^{-1}$. Ten intact male rats (of the same age and weight) were used as controls. From the beginning of the experiment, they were kept in the same conditions as experimental animals, but were given only water *ad libitum*.

Following 150 days of 15% ethanol solution repeated self-administrations, the males from both groups were mated with virgin females in proestrus at the ratio 1 male : 2 females. According to generally accepted guidelines for the fertility study in laboratory rats [10] first day of pregnancy was established by vaginal cytology (first day of sperm detection in vagina). Most males were mated within the first 5 days of cohabitation (i.e. at the first available oestrus), but some of them demonstrated infertility. This fact was taken into account for evaluation of effect of ethanol on male fertilizing capacity, which was determined by the index:

$$\frac{\text{number of pregnant females}}{\text{number of females mated with males}} \times 100\%$$

After mating, both the experimental and control male rats were sacrificed under a mild diethyl ether anaesthesia by decapitation.

Testes were used for investigation of the expression of *CYP2E1* mRNA by a reversed transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Testes samples (25 mg) were collected, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C before RNA extraction. The isolation of total mRNA was carried out with a TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, Inc., USA). The integrity and concentration of RNA was analysed in a 2 % agarose gel. First-strand complementary

DNA (cDNA) was synthesized using a First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany) according to the manufacturer's protocol. The reaction mixture contents for PCR, amplification protocol, and specific primers for the *CYP2E1* gene were chosen according to Lankford [et al.] [11]. The primer sequences were: sense, 5'-CTTCGGGCCAGTGTTAC-3' and anti-sense, 5'-CCCATATCTCAGAGTTGTGC-3'. RT-PCR with primers of β - actin sense, 5' -GCTCGTCGTCGACAACGGCTC - 3' and antisense 5' - CAAACATGAT CTGGGTCATCTTCT - 3') was carried out for internal control. All of the primers were synthesized by "Metabion" (Germany). The MyCycler thermocycler (BioRad, USA) was used for amplification. PCR products (*CYP2E1*-744 bp and β -actin-353 bp) were separated in a 2 % agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under a UV transilluminator (BIORAD, USA). Data analysis was carried out with Quantity One Software (USA) and presented in relative units as *CYP2E1* mRNA contents / β -actin mRNA ratio.

Part of females was sacrificed under mild ether anaesthesia via decapitation on day 20 of gestation for determination of embrional/fetal development indices. The numbers of corpora lutea in ovaries, of implantation sites and of live and dead fetuses in each uterine horn were counted after laparotomy of pregnant females. Indices of embryonic death at pre- and postimplantation periods of development were calculated according to standard procedures [12, 13].

Part of females was kept until natural delivery for examination of offspring postnatal development according to standard procedures [12, 13]. Litter size was evaluated as the total number of pups in the litter, dead or alive. Sex ratio was determined as the number of male pups divided by the number of females in the litter.

The behavioural of offspring was studied in the open-field and in hole board tests [14]. In the open-field during a 2-min trial the number of sections crossed, vertical standing positions, defecations (fecal boli) and urinations were recorded. The open-field was cleaned after every trial. 3 daily open-field trials were considered appropriate to test the emotional reactivity.

Numerical data are represented as means $\pm$ S.E.M. and were compared using unpaired Student's t-test to find out the level of significance between control and experimental data. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion.

Many reviews describe an essential role of cytochrome P-450 2E1 (*CYP2E1*) in ethanol-induced toxic effects [15, 16], but interrelations between ethanol-caused testicular *CYP2E1* induction and male reproduction remain out of sight of most researchers. It must be stressed, that series of studies clearly demonstrated presence of *CYP2E1* in testis, suggesting its possible role in bioactivation of chemicals to their toxic metabolites directly in male gonads [17-19]. In keeping with this idea we performed RT-PCR to evaluate the effect of chronic alcohol intoxication on *CYP2E1* transcriptional activation in testes.

It was demonstrated that the mRNA expression of *CYP2E1* in alcohol-treated rats' testes was three times as much as compared with control group (Fig.).

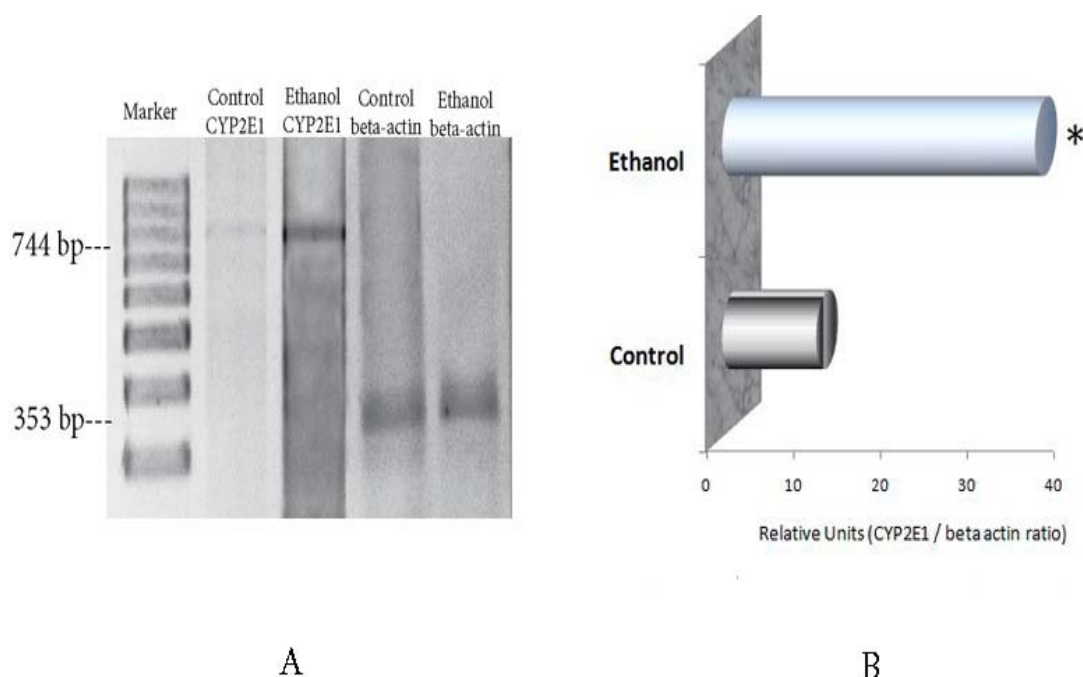


Figure. CYP2E1 mRNA in alcohol-treated rats'.

Representative electrophoregrams of CYP2E1 (744 b.p) and reference-gene β -actin (353 b.p.) RT-PCR products are shown in panel A. Average rate of CYP2E1 mRNA expression is shown in panel B, $M \pm S.E.M.$, $n=6$

*– $P<0.05$ in comparison with control

In our opinion activation of CYP2E1-dependent metabolizing systems in testes, at least partially, could determine gonadal toxicity of alcohol. Possibly induction of CYP2E1 also and may contribute to late paternal effects on offspring.

It should be noted that in our experiment we have fixed only slight decrease (15%) of male fertility (table 1). In experimental group of 20 mating females 16 became pregnant, while in the control group – 19.

Table 1 Rats male fertility index following 150 days alcohol consumption

Groups	Number of mated females	Number of pregnant females	Fertility index, %
Control	20	19	95
Chronic alcoholism	20	16	80

Thirteen females from control group and ten – from experimental group were sacrificed on day 20 of gestation for determination of embryonal/fetal development indices. Six females from each group were kept until natural delivery for examination of offspring postnatal development.

The comparison of embryogenesis indices in experimental and control groups demonstrated great negative impact of long-term alcohol treatment on preimplantational lethality level (table 2), it was 32%, while in control group – 9.6%. The level

of postimplantational embryonal and fetal death had no differences between groups.

The total embryonal/fetal death in alcoholic group increased 22% in comparison with control (table 2).

We found that female fecundity was not significantly reduced by mating with alcohol-treated males (Table 2). Group differences in litter size for foetuses also were not significant (Table 2).

Table 2. Effects of paternal alcohol exposure on intact females' fecundity and embryogenesis/fetogenesis parameters on day 20 of gestation

Indices	Groups	
	Control	Chronic alcoholism
Number of pregnant females	13	10
Total number of corpora lutea	146	128
Number of corpora lutea per one female, mean $\pm$ S.E.M	11.23 $\pm$ 0.73	12.80 $\pm$ 0.90
Total number of implantational sites	132	87
Number of implantational sites per one female, mean $\pm$ S.E.M	10.15 $\pm$ 0.55	8.70 $\pm$ 0.87
Preimplantational loss, abs / %	17 / 9.58	41 / 32.03
Preimplantational loss per one female, mean $\pm$ S.E.M	1.31 $\pm$ 0.41	4.10 $\pm$ 0.88*
Postimplantational loss, abs / %	10 / 7.58	8 / 9.19
Postimplantational loss per one female, mean $\pm$ S.E.M	0.76 $\pm$ 0.32	0.80 $\pm$ 0.36
Total number of living foetuses, abs / %	125 / 94.69	81 / 93.10
Number of living foetuses per one female, mean $\pm$ S.E.M	9.62 $\pm$ 0.40	8.10 $\pm$ 0.82
Total embryonal/fetal death, %	14.38	36.72

*– $P<0.05$ statistically significant in comparison with control

It should be noted that these results seem to contradict those of Randall [et al.], who have reported no effects on prenatal mortality observed on day 19 of gestation, following chronic ethanol treatment of male mice for a month [20]. But our findings are in good accordance with another study demonstrating significant increase of total embryonic deaths following preconceptional alcohol consumption by male Long-Evans rats [21].

We didn't indicate negative effects of alcohol consumption on litter size (table 3). Accidents of dead born were not fixed in the control group, while in experimental group two accidents were recorded (table 3).

The percentage of males in litters sired by alcohol-treated males was slightly higher than the percentage sired by intact fathers, as well as sex ratio index (table 3).

Table 3. Effects of paternal alcohol exposure on some indices of fetuses state in the first day of postnatal development

Indices	Groups	
	Control	Chronic alcoholism
Number of pregnant females, abs.	6	6
Total number of fetuses, abs	56	78
Alive fetuses, abs.	56	76
Dead born fetuses, abs.	0	2
Females/males, %	59 / 41	56 / 44
Sex ratio	0.69	0.78

Important indicator of the newborn is their survival during the first three weeks of postnatal life, and key terms for these observations is the 4th, 7th, 14th and 21th days after birth. The data of table 4 evidence increase of

newborns mortality at 4th and 14th days in alcoholic offspring. The total mortality in this group within 21 days of postnatal development was 10% (table 4).

Table 4. Effects of paternal alcohol exposure on newborns mortality (abs./ %)

Groups	Number of new-borns	Terms of observation, days after delivery				Total mortality, abs. (%)
		4 th abs. (%)	7 th abs. (%)	14 th abs. (%)	21 th abs. (%)	
Control	56	- (0 %)	- (0 %)	- (0 %)	- (0 %)	- (0 %)
Chronic alcoholism	76	2 (2.6 %)	- (0 %)	6 (8,0 %)	- (0 %)	7 (10 %)

Newborn body weight is important indicator of its state. These data are presented in table 5.

Table 5. Effects of paternal alcohol exposure on newborns body weight

Groups	Number of new-borns	The weight of one litter, g				
		1 st day	4 th day	7 th day	14 th day	21 th day
Control	56	5.98±0.15	9.38±0.67	11.61±0.99	21.89±2.20	35.05±4.93
Chronic alcoholism	76	6.56±0.16*	9.71±0.45	14.67±0.96	24.56±0.89	42.50±4.23

It was recorded, that on the first postnatal day the weight of one litter in alcoholic group significantly increased as compared with control. In the further terms of observations the litter weight in this group has no significant difference with control (table 5).

Normal physical development of offspring is characterized by timely appearance of certain external

features, which inherent in each individual during postnatal life. Results on offspring physical development are presented in table 6. And according to it, prolonged paternal consumption of alcohol has no significant effects on terms of appearance of all investigated external features.

Table 6. Effects of paternal alcohol exposure on offspring physical development

Parameters	Groups	
	Control	Chronic alcoholism
Pinna detachment appearance day	2.18±0.06	2.1±0.04
Hair growth appearance day	4.74±0.07	4.78±0.06
Teeth eruption appearance day	6.0±0	6.0±0
Eye opening appearance day	13.63±0.08	14.0±0
Testes descent day	23.0±0	23.0±0
Vaginal opening day	31.21±0.12	32.0±0.15

Offspring, which was obtained from intact females and alcohol-addicted males, were checked for the essential reflexes and locomotor development on the first postnatal day (surface righting, cling, tail pull, rotation, linear movement, climb, exploration). It was shown that all reflexes in both males and females pups were within normal limits.

The evaluation of behavioural effects is an important component in developmental toxicity studies. In the table 7 we represent the results of alcohol-addicted males' offspring behaviour in the open field in comparison with control group.

Table 7. Effects of paternal alcohol exposure on offspring behaviour in the open field (mean $\pm$ S.E.M.; n=24)

Parameters		Groups	
		Control	Chronic alcoholism
Latent period, sec		1,29 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,30
Horizontal activity, number of sections crossed within 3 min	peripheral sections	92,83 $\pm$ 4,60	62,09 $\pm$ 6,90*
	central sections	20,50 $\pm$ 2,60	12,00 $\pm$ 1,40*
Vertical activity, number of rearing within 3 min		11,41 $\pm$ 0,94	8,40 $\pm$ 1,01*
Exploration activity, number of looking into holes within 3 min		9,95 $\pm$ 0,78	6,37 $\pm$ 0,82*
Grooming behavior, number of reactions within 3 min		1,25 $\pm$ 0,17	1,68 $\pm$ 0,37
Urinations, number within 3 min		1,0 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,13
Defecations, number within 3 min		1,25 $\pm$ 0,25	1,12 $\pm$ 0,19

The present findings suggest significant alteration of locomotor and emotional reactivity in offspring of chronically alcohol-treated males as compared with control. Particularly, in experimental group we recorded decrease of horizontal (number of crossed peripheral and central sections were less than in control 32% and 44% respectively), vertical (26%) and exploration activities (46%). Thus, our data provide support for relationship between offspring's open field activity and paternal alcohol intake.

By contrast, E.L. Abel have uncovered opposite behavioural effects of paternal alcohol exposure. Notably, 18-day-old offspring of male rats intubated with 3 or 2 g/kg ethanol twice a day for 7 month were more active in the open field compared with controls, and they took a greater number of trials to complete a passive avoidance learning task [22]. Our data on behaviour are more consistent with another study of the same author demonstrating dose-dependent decreases in physical activity of alcohol addicted mice males' offspring at 20 and 24 days of age [23].

Also our results partially are in accordance with other similar laboratory studies, which have indicated that exposure of male mice and rats to alcohol has numerous effects on their offspring, including reduced litter size, developmental retardation, increased mortality, and compromised immunity as well as behavioural deficiency, such as impaired discrimination on spatial tasks and altered aggressive, risk taking, and anxiety-like behaviour [24-29]. The severity of these effects was related to the duration and dosage of ethanol exposure. There were also interspecies differences. But, in general, our current investigation, as well as studies of other authors, provides evidences that the exposure of males to ethanol can lead to behavioral changes in offspring, likely via the paternal germline.

Here it is important to note that remains difficult to disentangle the effects of mutations from epigenetic modifications in perpetuating paternal effects, but there are some evidences for speculation on the role of epigenetic factors in explaining the effects of paternal alcohol consumption on offspring. For example D.M. Bielawski [et al.] have revealed reductions in DNA-methyltransferase RNA in sperm, as well as reductions in offspring weight after chronic alcohol treatment of male rats. These results suggest that alterations in DNA methylation in the germ line may lead to physical abnormalities in offspring [309]

On the other hand it is known that induction of CYP2E1 leads to prominent epigenetic effects [16]. Probably, in our experiments the activation of testicular CYP2E1 triggered epigenetic events leading to paternal effects on posterity.

In sum, the paternal effects of ethanol described above are consistent with a growing body of evidence for the existence of transgenerational response phenomena (i.e., the transmission of environmentally induced states from exposed generations to unexposed generations. The mechanisms are likely to involve alcohol-induced

epigenetic changes in the gametes or, alternatively, selection effects within the germ line [7].

Conclusion. Our findings suggest that offspring not directly exposed to alcohol *in utero* may nevertheless be born with developmental abnormalities if their father consumed alcohol prior to conception. Thus, a direct relationship between paternal alcohol exposure and offspring health and behaviour exists.

References

1. Muthusami K. R. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality / K. R. Muthusami, P. Chinnaswamy // *Fertility and Sterility*. – 2005. – Vol. 84, №4. – P. 919–924. Available from: www.yourfertility.org.au
2. El-Sokkary G. H. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat / G. H. El-Sokkary // *Neuro Endocrinology Letters*. – 2001. – Vol. 22 – P. 93–99. Available from: www.researchgate.net
3. Emanuele M. A. Alcohol and the Male Reproductive System / M. A. Emanuele, N. Emanuele // *Alcohol Research and Health*. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 283–287. Available from: www.degruyter.com
4. Little R. E. Father's drinking and infant birth weight: report of an association / R. E. Little, C. F. Sing // *Teratology*. – 1987. – Vol. 36. – P. 59–65. Available from: www.alcoholbabies.com
5. Static ataxia: a possible marker for alcoholism / A. M. Hegedus, R. E. Tarter, S. Y. Hill [et al.] // *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 1984. – Vol. 8. – P. 580–582. Available from: www.researchgate.net
6. Adolescent sons of alcoholics: neuropsychological and personality characteristics / R. E. Tarter, A. M. Hegedus, G. Goldstein [et al.] // *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 1984. – Vol. 8. – P. 216–222. Available from: www.researchgate.net
7. Haycock F. C. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: The Epigenetic Perspective / F. C. Haycock // *Biology of reproduction*. – 2009. – Vol. 81. – P. 607–617. Available from: www.bioreprod.org/content/81/4/607.full.pdf
8. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect / B. I. Ghanayem, K. L. Witt, L. El-Hadri [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2005. – Vol. 2, №1. – P. 157–163. Available from: www.bioreprod.org/content/72/1/157.full
9. Richter C. P. Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats / C. P. Richter, K. H. Campbell // *Science*. – 1940. – Vol. 91. – P. 507–508. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC2376626/
10. Boekelheide K. Male reproductive toxicology / K. Boekelheide, R. Chapin // *Current Protocols in Toxicology*. – New York : Maines MD eds, John Wiley & Sons Inc, 2005. – P. 16.0.1–16.0.2. Available from: www.researchgate.net
11. Lankford S. M. Cloning of Canine Cytochrome P-450 2E1 cDNA: Identification and Characterization of Two Variant Alleles / S. M. Lankford, S. A. Bai, J. A. Goldstein // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2000. – Vol. 28, № 8. – P. 981–986. Available from: www.dmd.aspetjournals.org/content/28/8/981.long
12. Clegg E. D. Assessment of male reproductive toxicity / E. D. Clegg, S. D. Perreault, G. R. Klinefelger // *Principles and Methods of Toxicology*, 4th edition. – Philadelphia, PA: Taylor & Francis, 2001. – P. 1263–1300. Available from: www.scielo.br
13. Tyl R. W. In Vivo Models for Male Reproductive Toxicology / R. W. Tyl // *Current Protocols in Toxicology*. – New York : Maines MD eds, John Wiley & Sons Inc, 2005. – P. 2.2.10. Available from: www.researchgate.net
14. File S. E. The reliability of the hole-board apparatus / S. E. File, A. G. Wardill // *Psychopharmacologia*. – 1975. – Vol. 44. – P. 47–51. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC2396234/
15. CYP2E1, oxidative stress, post-translational modifications and lipid metabolism / M. R. Lakshman, M. Garige, M. A. Gong [et al.] // *Subcellular Biochemistry*. – 2013. – Vol. 67. – P. 199–233. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC2691491
16. French S. W. The importance of CYP2E1 in the pathogenesis of alcoholic liver disease and drug toxicity and the role of the proteasome

/ S. W. French // Subcellular Biochemistry – 2013. – Vol. 67. – P. 145–164. Available from: <https://tratamentecancer.wordpress.com/category/tratamento>

17. Quintans L. N. Oxidation of ethanol to acetaldehyde and free radicals by rat testicular microsomes / L. N. Quintans, G. D. Castro, J. A. Castro // Archives Toxicology – 2005. – Vol. 79, №1. – P. 25–30. Available from: www.hindawi.com/journals/

18. The detection of cytochrome P450 2E1 and its catalytic activity in rat testis / Y. Jiang, C. L. Kuo, S. J. Pernecky, W. N. Piper // Biochemical and Biophysical Research Communications – 1998. – Vol. 246, №3. – P. 578–583. Available from: www.applications.emro.who.in

19. Muroño E. P. Microsomal ethanol-oxidizing system in purified rat Leydig cells / E. P. Muroño, V. Fisher-Simpson // Biochimica and Biophysica Acta. – 1987. – Vol. 918, №2. – P. 136–140. Available from: www.researchgate.net

20. The effect of paternal alcohol consumption on fetal development in mice / C. L. Randall, T. A. Burling, E. A. Lochry, P. B. Sutker // Drug and Alcohol Dependence – 1982. – № 9. – P. 89–95. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7084025

21. Paternal effects of ethanol in the long-evans rat / R. F. Mankes, R. LeFevre, K. F. Benitz [et al.] // Journal of Toxicology Environmental Health. – 1982. – Vol. 10, № 6. – P. 871–878. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3860549/

22. Abel E. L. Effects of physostigmine on male offspring sired by alcohol-treated fathers / E. L. Abel // Alcoholism: Clinical Experimental Research – 1994. – Vol. 18. – P. 648–652. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3860549/

23. Abel E. L. Paternal alcohol exposure affects offspring behavior but not body or organ weights in mice / E. L. Abel, J. A. Lee // Alcoholism: Clinical Experimental Research – 1988. – № 12. – P. 349–355. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3864776/

24. Abel E. L. Paternal contribution to fetal alcohol syndrome / E. L. Abel // Addiction Biology – 1988. – № 9. – P. 127–133. Available from: fasdcenter.samhsa.gov/.../references1.aspx

25. Abel E. L. Effects of paternal alcohol consumption on pregnancy outcome in rats / E. L. Abel, S. E. Tan // Neurotoxicology and Teratology. – 1988. – № 10. – P. 187–192. Available from: pubs.niaaa.nih.gov/publications/.../37-46.pdf

26. Abel E. L. Paternal alcohol exposure: paradoxical effect in mice and rats / E. L. Abel, P. Bilitzke // Psychopharmacology (Berl) – 1990. – Vol. 100. – P. 159–164. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3864776/

27. Ledig M. Paternal alcohol exposure: developmental and behavioral effects on the offspring of rats / M. Ledig, R. Misslin, E. Vogel [et al.] // Neuropharmacology. – 1998. – Vol. 37. – P. 57–66. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3432506/

28. Acute paternal alcohol use affects offspring development and adult behavior / L. R. Meek, K. Myren, J. Sturm, D. Burau // Physiology Behavior Journal – 2007. – Vol. 91. – P. 154–160. Available from: www.champagnelab.psych.columbia.edu/.../curleyhb

29. Paternal alcohol consumption in the rat impairs spatial learning performance in male offspring / D. F. Wozniak, T. J. Cicero, L. Kettinger, E. R. Meyer // Psychopharmacology (Berl). – 1991. – Vol. 105. – P. 289–302. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3864776/

30. Paternal alcohol exposure affects sperm cytosine methyltransferase messenger RNA levels / D. M. Bielawski, F. M. Zaher, D. M. Svinarich, E. L. Abel // Alcoholism: Clinical Experimental Research – 2002. – Vol. 26. – P. 347–351. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../PMC3860549/

Надійшла до редколегії 22.05.15

Г. Шаяхметова, канд. біол. наук

Державна установа "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", Київ

ПОРУШЕННЯ АНТЕНАТАЛЬНОГО ТА ПОСТНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ НАЩАДКІВ ЩУРІВ-САМЦІВ ЛІНІЇ ВІСТАР, ТРИВАЛО СПОЖИВАННЯ АЛКОГОЛЮ

Було встановлено зростання експресії мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів за умов хронічного введення 15% розчину етанолу. У той же час було показано значний негативний вплив довгострокового споживання самцями алкоголю на рівень доімплантаційної смертності їх потомства. Таким чином, існує прямий зв'язок між впливом алкоголю на батька та здоров'ям і поведінкою потомства.

Ключові слова експресії мРНК CYP2E1 сім'яниках щурів, етанол.

А. Шаяхметова, канд. біол. наук

Государственное учреждение "Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины", Киев

НАРУШЕНИЕ АНТЕНАТАЛЬНОГО И ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПОТОМСТВА КРЫС-САМЦОВ ЛИНИИ ВИСТАР, ДЛИТЕЛЬНО ПОТРЕБЛЯВШИХ АЛКОГОЛЬ

Было установлено рост экспрессии мРНК CYP2E1 в семенниках крыс в условиях хронического введения 15% раствора этанола. В то же время было показано значительное негативное влияние долгосрочного потребления самцами алкоголя на уровень доимплантационной смертности их потомства. Таким образом, существует прямая связь между воздействием алкоголя на отца и здоровьем и поведением потомства.

Ключевые слова экспрессии мРНК CYP2E1 семенниках крыс, этанол.

Наукове видання



ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
БІОЛОГІЯ
Випуск 1(69)

Друкується за авторською редакцією

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та матеріали на електронних носіях не повертаються.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 10,23. Наклад 300. Зам. № 214-7245.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 3.
Підписано до друку 24.12.14

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
http: vpc.univ.kiev.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02