

ISSN 2078-8673

БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ

НАУКОВИЙ ВІСНИК
ЧЕРНІВЕЦЬКОГО УНІВЕРСИТЕТУ

БІОЛОГІЯ

Рік заснування 1996

**Том 6
Випуск 2**

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

Чернівці
Чернівецький національний університет
2014

Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). – Т. 6, Вип. 2. – Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2014. – 122 с.

Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological System). – Vol. 6, Is. 2. – Chernivtsi: Chernivtsi National University, 2014. – 122 p.

У випуску висвітлено проблеми біохімії, молекулярної генетики, біотехнології, екології, ботаніки, збереження біоти і біоресурсів, ґрунтознавства, над якими працюють науковці Чернівецького національного університету та інших наукових установ і вузів України.

The articles of the journal highlight actual problems of biochemistry, molecular genetics, biotechnology, ecology, protection of biodiversity and acclimation, soil sciences, which are studied by the scientists of Chernivtsi National University as well as other universities and research institutes of Ukraine.

*Друкується за ухвалою вченої ради
Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича*

Редакційна колегія:

Головний редактор **М. М. Марченко**
Заступники головного редактора:
С. С. Костишин, Р. А. Волков

**І. П. Григорюк, Ю. М. Дмитрук,
Г. П. Копильчук, С. С. Руденко, І. І. Чорней**

Editorial Board:

Editor-in-Chief: **M. M. Marchenko**
Deputy Editors:
S. S. Kostyshyn, R. A. Volkov

**I. P. Hryhoryuk, Y. M. Dmytruk,
G. P. Kopylchuk, S. S. Rudenko, I. I. Chorney**

Редакційна рада:

**В. С. Акатов (Росія)
В. С. Бленер (США)
В. Гемлебен (Німеччина)
В. А. Кунах
М. Я. Співак
І. Ф. Мещишен
В. М. Решетніков (Білорусь)
С. Скіба (Польща)
Я. Собоцка (Словаччина)
О. Б. Стрельцов (Росія)
Л. Фартайш (Румунія)
М. М. Федорончук**

**Відповідальний секретар:
І. О. Шмараков**

Editorial Council:

**V. S. Akatov (Russia)
W. S. Blaner (USA)
V. Hemleben (Germany)
V. A. Kunakh
N. Ya. Spivak
I. F. Meschyshen
V. M. Reshetnikov (Bilorusia)
S. Skiba (Poland)
J. Sobotska (Slovakia)
O. B. Streltsov (Russia)
L. Fartais (Romania)
M. M. Fedoronchuk**

**Responsible Secretary:
I. O. Shmarakov**

**Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
Міністерства Юстиції України серія КВ № 15752-4224Р від 12.10.2009**

Загальнодержавне видання

**Журнал входить до переліку наукових фахових видань України,
в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття
наукових ступенів доктора і кандидата наук**

Адреса редколегії:

Інститут біології, хімії та біоресурсів
Чернівецького національного університету імені
Юрія Федьковича,
вул. Лесі Українки, 25
м. Чернівці, Україна, 58012

Adress for correspondence:

Institute of Biology, Chemistry and Natural Resources
Yuriy Fedkovych
Chernivtsi National University
Lesya Ukrainka Str., 25
Chernivtsy, Ukraine, 58012

www.bio.chnu.edu.ua/vb

E-mail: vb@chnu.edu.ua

© Чернівецький національний університет, 2014



UDC 577.112.7

GLUCOSE AND GLUTAMINE DEPRIVATIONS AFFECT THE EXPRESSION OF *MAP3K5*, *MAP4K3*, *CIB1*, *RIPK1*, AND *RIPK2* GENES IN U87 GLIOMA CELLS WITH BLOCKADE OF ERN1 SIGNALING ENZYME FUNCTION

T. V. BAKALETS¹, D. O. MINCHENKO^{1,2}, O. O. RATUSHNA¹,
O. O. RIABOVOL¹, O. H. MINCHENKO¹

¹Department of Molecular Biology, Palladin Institute of Biochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;

²Department of Pediatrics, National Bogomolets Medical University, Kyiv, Ukraine;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Protein kinases play an important role in malignant tumor growth as key regulators of different metabolic processes. We studied the effect of glucose and glutamine deprivation conditions on the expression level of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP4K3), mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5), receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1), and RIPK2 as well as protein kinase interacting protein CIB1 mRNA in U87 glioma cells. It was shown that the suppression of both enzymatic activities of sensor and signaling enzyme ERN1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, decreases the expression level of genes encoding MAP4K3, RIPK2, and CIB1 in U87 glioma cells, but increases – RIPK1 gene expression. At the same time, no significant changes were observed in MAP3K5 gene expression in glioma cells with blockade of ERN1 signaling enzyme. Glutamine deprivation condition leads to increase the expression level of RIPK1 gene and to decrease – CIB1 gene in control glioma cells, but ERN1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression most of these genes. It was also shown that the expression level of MAP3K5, RIPK1, RIPK2, and CIB1 genes did not change significantly in control glioma cells at glucose deprivation condition, but in cells with ERN1 knockdown glucose deprivation enhances the expression of RIPK1 and RIPK2 genes. Thus, suppression of ERN1 enzyme function also changes the effect of glucose deprivation on the expression of most studied genes in glioma cells. Results of this investigation clearly demonstrated that the expression of MAP4K3, RIPK1, RIPK2, and CIB1 genes in U87 glioma cells is dependent from blockade of ERN1-mediated endoplasmic reticulum stress and is mostly regulated by glutamine and glucose deprivation in dependence from ERN1 signaling enzyme function.

Key words: mRNA expression, ERN1 knockdown, MAP3K5, MAP4K3, RIPK1, RIPK2, CIB1, glutamine deprivation, glutamine deprivation, U87 glioma cells

Introduction. Nutrient deprivation conditions as well as hypoxia are important factors of malignant tumor growth and as many other factors induce the endoplasmic reticulum stress and change the expression of many genes, which control different metabolic processes and proliferation (Denko et al., 2008; Johnson et al., 2008; Lenihan and Taylor, 2013; Moenner et al., 2007). The endoplasmic reticulum stress is associated with unfolded protein response and accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (Moenner et al., 2007; Wang and Kaufman, 2012). This adaptive response is activated upon the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum and is mediated by three endoplasmic reticulum-resident sensors named PERK (PRK-like ER kinase), ERN1 (Endoplasmic Reticulum to Nucleus signaling 1) also

known as IRE1alpha (Inositol Requiring Enzyme-1alpha) and ATF6 (Activating Transcription Factor 6), however, endoplasmic reticulum to nuclei-1 is the dominant sensor (Bi et al., 2005; Fels et al., 2006; Zhang and Kaufman, 2006; Minchenko et al., 2013). Induction of endoplasmic reticulum stress is the early cellular response to the accumulation of misfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum and tends to limit the de novo entry of proteins in to the endoplasmic reticulum and facilitate both the endoplasmic reticulum protein folding and degradation to adapt cells for survival, occurring under both physiological and pathological conditions (Hetz et al., 2013; Minchenko et al., 2014; Schröder, 2008).

The ERN1 has two distinct catalytic domains: for serine/threonine kinase and endoribonuclease, which

contribute to ERN1 signalling. The ERN1-associated protein kinase activity autophosphorylates and dimerizes this enzyme, leading to the activation of its endoribonuclease domain, which is responsible for initiation of the pre-XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA splicing and degradation of a specific subset of mRNA (Acosta-Alvear et al., 2007; Korennykh et al., 2009; Pluquet et al., 2013; Romero-Ramirez et al., 2004). Mature XBP1 mRNA splice variant encodes a transcription factor that stimulates the expression of hundreds of unfolded protein response-specific genes (Aragon et al., 2009; Hollien et al., 2009). Moreover, XBP1s has some additional functions, which are important for the regulation of glucose homeostasis (Lee et al., 2011; Park et al., 2010; Zhou et al., 2011). Thus, Zhou et al. (2011) shown that XBP1s interacts with the Forkhead box O1 (FOXO1) transcription factor and directs it toward proteasome-mediated degradation. Moreover, the p38 MAP kinase phosphorylates the alternative spliced form of XBP1 and enhances its nuclear translocation. Moreover, the regulatory subunits of phosphatidylinositol 3-kinase interact with XBP1 and also increase its nuclear translocation (Park et al., 2010). At the same time, it was shown that a kinase inhibitor activates the ERN1 endoribonuclease to confer cytoprotection against ER stress. It is possible that this activation of the ERN1 endoribonuclease is a result of its interaction with other sensor-signalling systems of endoplasmic reticulum stress.

Previously was shown that the complete blockade of ERN1 signal transduction pathway had anti-tumor effects both in glioma and lung cancer (Auf et al., 2010, 2013; Drogat et al., 2007). Thus, the endoplasmic reticulum stress response-signalling pathway is tightly linked to cell proliferation process and tumor growth. Malignant gliomas are highly aggressive tumors and are characterized by marked angiogenesis and extensive tumor cell invasion into the normal brain parenchyma (Bi et al., 2005). Moreover, nutrient deprivation condition is associated to glioma development and locally induce an adaptive response which confers to tumor cells an enhanced survival and a more aggressive behaviour.

In malignant tumor growth an important role plays different protein kinases, including casein kinases, SNF1/AMP-activated protein kinases, mitogen-activated protein kinases MAP3K5 and MAP4K3, receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinases RIPK1 and RIPK2, the key regulators of different metabolic processes (Minchenko et al., 2012a, 2012b). There is data that stimulation of human aortic endothelial cells with TNF-alpha led to an increased expression of p73 protein and a reduction in the levels of p53 involving

MAP3K5, which is an apoptosis signal-regulating kinase (Rastogi et al., 2012). Moreover, high glucose-induced cell apoptosis and activation of ASK1 in mesangial cells is prevented by knockdown of thioredoxin interacting protein (TXNIP) may be via reduction of oxidative stress (Shi et al., 2011). It is interesting to note that apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer (Hayakawa et al., 2011). It was also shown that SERTAD1 (SERTA domain containing 1), also known as CDK4-binding protein P34SEI or SEI-1, inhibits ROS-induced cell death through by indirectly inducing ubiquitination of MAP3K5 (Hong et al., 2011). Protein kinase MAP4K3 activates key effectors in cell signalling, has relation to migration and invasion of cancer cells, and is required for leucine-induced mTORC1 activation (Schriever et al., 2013; Yan et al., 2010; Zhao et al., 2014). Moreover, this protein kinase orchestrates activation of BAX via the concerted posttranscriptional modulation of PUMA, BAD, and BIM (Lam et al., 2009).

Receptor-interacting serine-threonine kinase RIPK1 transduces cell-death signals the C-terminal domain of c-FLIPL specifically inhibits the interaction of the caspase 8 prodomain with the RIP1 death domain and, thereby, regulates caspase 8-dependent NF-kappaB activation (Matsuda et al., 2014). It is interesting to note that TNFSF12 (tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12), also known as TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK), induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIPK1) as well as Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8 (Ikner and Ashkenazi, 2011). Recently was shown that shikonin mediated necroptosis in glioma cells is associated with the up-regulated expression of protein kinase RIPK1 and oxidative stress (Fu et al., 2013; Huang et al., 2013). It was shown that knockdown of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2, also known as CARD-containing IL-1 beta ICE-kinase or receptor-interacting protein (RIP)-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein (CLARP) kinase, down-regulated nuclear factor kappa B (NF-kB)-dependent *PAI1* (plasminogen activator inhibitor type 1), also known as *SERPINE1* (serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1), and *VIM* (vimentin) gene expressions (Wu et al., 2012). Protein kinase RIPK2 might play an important role in hepatic cell migration and inhibition of its tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses (Tigno-Aranjuez et al., 2010).

Protein kinase interacting protein CIB1 is a novel mediator of PKD2 (polycystic kidney disease 2)-

driven carcinogenesis, may play a role in regulation of apoptosis and angiogenesis and functions as a negative regulator of stress activated MAP kinase signaling pathways as well as POLO-like kinase 3 (Armacki et al., 2014; Leisner et al., 2013; Naik and Naik, 2011; Naik et al., 2011).

The main goal of this study was investigation the role of the blockade of both kinase and endoribonuclease activity of ERN1 signaling enzyme on the expression of *MAP3K5*, *MAP4K3*, *RIPK1*, *RIPK2*, and *CIB1* genes in glioma U87 cells and its regulation by nutrient (glucose or glutamine) deprivation condition.

Materials and Methods. The glioma cells U-87 MG (ATCC HTB-14) was obtained from ATCC (USA) and grown in high glucose (4.5 g/l) Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with glutamine (2 mM), 10% fetal bovine serum (Equitech-Bio, Inc., USA), penicillin (100 units/ml; Gibco) and streptomycin (0.1 mg/ml; Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. In this study we used two sublines of this glioma cells. One subline was obtained by selection of stable transfected clones with overexpression of vector (pcDNA3.1), which was used for creation of dnERN1 (ERN1 dominant/negative constructs). This untreated subline of glioma cells (control glioma cells) was used as control 1 in the study of effects of nutrient (glutamine or glucose) deprivations on the expression level of different protein kinase and associated with kinase genes. Second subline was obtained by selection of stable transfected clones with overexpression of dnERN1 and has suppressed both protein kinase and endoribonuclease activities of ERN1 signaling enzyme (clone 1C5, which initially was obtained from prof. M. Moenner, France) (Auf et al., 2010; Drogat et al., 2007).

The expression level of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5), mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP4K3), receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1), RIPK2, and calcium and integrin binding 1 (CIB1; calmyrin) mRNAs in cells with ERN1 knockdown was compared with cells, transfected by vector (control 1). The glioma cells with blockade of ERN1 was also used as control 2 for investigation the effect of glutamine and glucose deprivation conditions on the expression level of these genes upon ERN1 knockdown. Nutrient deprivation conditions were created by changing the complete Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium on the medium without glutamine or glucose and culture plates were exposed to these conditions for 16 hrs.

The suppression level of ERN1 both enzymatic activity in glioma cells that over express a dnERN1

was previously shown by analysis of ERN1 autophosphorylation and the expression of XBP1 alternative splice variant (XBP1s), a key transcription factor in ERN1 signaling, upon induction of endoplasmic reticulum stress by tunicamycin (0.01 mg/ml, 2 hours) (Minchenko et al., 2014).

Total RNA was extracted from glioma cells using Trizol reagent according to manufacturer protocols (Invitrogen, USA). The RNA pellets were washed with 75 % ethanol and dissolved in nuclease-free water. For additional purification RNA samples were re-precipitated with 95 % ethanol and re-dissolved again in nuclease-free water. QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis. Polymerase chain reaction was performed in triplicate.

The expression levels of MAP3K5, MAP4K3, RIPK1, RIPK2, and CIB1 mRNA were measured in glioma cell line U87 and its ERN1 knockdown subline (clone 1C5) by real-time quantitative polymerase chain reaction using „Mx 3000P QPCR” (Stratagene, USA) and SYBRGreen Mix (AB gene, Great Britain).

The amplification of MAP3K5 also known as apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) cDNA was performed using forward primer (5'-aaagaggcttgctggcataa-3') and reverse primer (5'-tctgcagacatggactctgg-3'). These oligonucleotides correspond to sequences 2839 – 2858 and 3090 – 3071 of human MAP3K5 cDNA (GenBank accession number NM_005923). The size of amplified fragment is 252 bp. For amplification of MAP4K3 also known as germinal center kinase-related protein kinase (GLK) cDNA we used forward (5'-gcatggagtttggagggt-3' and reverse (5'-cactgcccagagatcacaga-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 591 – 610 and 925 – 906 of human MAP4K3 cDNA (GenBank accession number NM_003618). The size of amplified fragment is 335 bp. The amplification of RIPK1 also known as cell death protein RIP cDNA for real time qPCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-tggaaaaggcgtgatacaca-3' and reverse – 5'-gacttctctgtgggctttgc-3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 390 – 409 and 626 – 607 of human RIPK1 cDNA (GenBank accession number NM_003804). The size of amplified fragment is 237 bp. For amplification of RIPK2 also known as CARD-containing IL-1 beta ICE-kinase or receptor-interacting protein (RIP)-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein (CLARP) kinase cDNA we used forward (5'-ttcaattttgggaatttgc-3' and reverse (5'-atgcgccactttgataaacc-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 550 – 569 and 829 – 810 of

human RIPK2 cDNA (GenBank accession number NM_003821). The size of amplified fragment is 280 bp. The amplification of calcium and integrin binding 1 (CIB1; calmyrin) also known as SNK-interacting protein 2-28 (SIP2-28) cDNA was performed using forward - 5'- cattatgccttccecatctt - 3' and reverse - 5'- gctggcaagtgctggagaac -3' primers. These primers nucleotide sequences correspond to 487 - 506 and 717 - 698 of human CIB1 cDNA (GenBank accession number NM_006384). The size of amplified fragment is 231 bp. For amplification of beta-actin (ACTB) cDNA was used forward - 5'- ggacttcgagcaagatgg -3' and reverse - 5'- agcactgtgtggcgtacag -3' primers. These primers nucleotide sequences correspond to 747 - 766 and 980 - 961 of human ACTB cDNA (GenBank accession number NM_001101). The size of amplified fragment is 234 bp. The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity. The primers were received from "Sigma" (USA).

An analysis of quantitative PCR was performed using special computer program "Differential expression calculator" and statistical analysis using program OriginPro 7.5. The values of MAP3K5, MAP4K3, RIPK1, RIPK2, and CIB1 mRNA expressions were normalized to the expression of beta-actin mRNA and represent as percent of control (100 %). All values are expressed as mean \pm SEM from triplicate measurements performed in four independent experiments.

Results and Discussion. In this work we studied the effect of glucose and glutamine deprivation conditions on the expression level of two MAP kinases (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 and mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 and two RIP kinases (receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 and 2) as well as protein kinase interacting protein CIB1 mRNAs in U87 glioma cells with knockdown of ERN1, the major component of endoplasmic reticulum stress signaling. As shown in Fig. 1, the suppression of both enzymatic activities of sensor and signaling enzyme ERN1 did not change significantly the expression level of *MAP3K5* gene in U87 glioma cells. Moreover, glucose as well as glutamine deprivation condition also did not change significantly the expression level of mRNA for this protein kinase in control glioma cells, but in cells with blockade of ERN1 signaling enzyme function the expression level of *MAP3K5* gene is decreased upon both glucose and glutamine deprivation conditions: -27 % and -13 %, correspondingly (Fig. 1). Thus, blockade of ERN1 signaling enzyme function did not change the expression level of MAP3K5 mRNA, but modifies the effect of glucose

as well as glutamine deprivation condition on the expression level of this gene in U87 glioma cells.

In this study we did not find any changes in mRNA expression level of protein kinase MAP3K5, which is an apoptosis signal-regulating kinase, in glioma cells with ERN1 knockdown; however, this kinase and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in cancer (Hayakawa et al., 2011) and decreased expression of cyclin D1 in these cells (Minchenko et al., 2011) as well as up-regulated expression of MAP3K5 mRNA upon glucose and glutamine deprivation (Fig. 1) possibly contributes to suppression of cell proliferation after blockade of ERN1 (Auf et al., 2010).

Investigation of the expression of another member of mitogen-activated protein kinases, MAP4K3, demonstrates that knockdown of signaling enzyme ERN1 leads to significant (close to 2fold) decrease of its mRNA expression level in U87 glioma cells (Fig. 2). Moreover, the glutamine deprivation condition does not affect the expression level of *MAP4K3* gene in control glioma cells, but increases (+25 %) in cells with suppressed function of ERN1 signaling enzyme. At the same time, glucose deprivation condition up-regulates (+27 %) the expression level of MAP4K3 mRNA in control glioma cells, but blockade of ERN1 signaling enzyme function eliminates this effect of glucose deprivation (Fig. 2).

Thus, the regulation of MAP4K3 mRNA expression in glioma cells both by glucose and glutamine deprivation conditions is strongly depended upon ERN1 signaling enzyme function. Protein kinase MAP4K3 is multifunctional pro-proliferative kinase and decrease of its expression after knockdown of ERN1 signaling enzyme as well as elimination of this mRNA up-regulation upon glucose deprivation (Fig. 2) can contribute to anti-proliferative effect of ERN1 knockdown (Auf et al., 2010; Lam et al., 2009; Zhao et al., 2014).

As shown in Fig. 3, the *RIPK1* gene expression is up-regulated (almost to 2fold) in glioma cells with suppressed function of ERN1 signaling enzyme of endoplasmic reticulum stress. the expression level of this gene in glutamine deprivation condition is also increased (+25 %) in control glioma cells only; ERN1 knockdown eliminates this effect. At the same time, glucose deprivation condition does not affect the expression level of RIPK1 mRNA in control glioma cells, but up-regulated the level of this mRNA in glioma cells after blockade of ERN1 signaling enzyme function (Fig. 3). These results clearly demonstrated that knockdown of ERN1 modifies the dependence of *RIPK1* gene expression upon glucose and glutamine deprivation conditions.

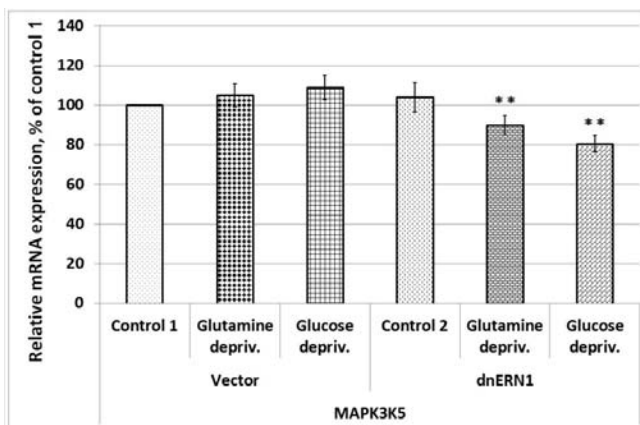


Fig. 1. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression level of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5) mRNA also known as apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in U87 glioma cells, transfected with vector pcDNA3.1 (Vector) and cells, transfected with dominant/negative constructs of ERN1 signaling enzyme (dnERN1) into vector pcDNA3.1, measured by quantitative real-time PCR. The level of this mRNA expression was normalized to the expression of beta-actin. The changes in the expression of MAP3K5 mRNA in the glutamine or glucose deprivation conditions in both types of glioma cells were compared with control 1 (100 %), but in cells, transfected with dnERN1, – with control 2; n = 4; * – $P < 0,05$ as compared to control 1, ** – $P < 0,05$ as compared with control 2.

Note: In fig. 1 – 5: Control 1 represents cells, transfected with vector pcDNA3.1 and Control 2 – cells, transfected with dnERN1.

Ikner and Ashkenazi (2011) shown that TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK or TNFSF12) induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIPK1) as well as Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8. This data correlates with our results that ERN1 knockdown strongly up-regulates the expression of *RIPK1* gene (Fig. 3) and suppressed proliferation rate of these cells (Auf et al., 2010).

We have also studied the expression level of *RIPK2* gene in glioma cells with ERN1 knockdown. As shown in Fig. 4, the expression level of *RIPK2* mRNA is strongly down-regulated (more than 4fold) in glioma cells with suppressed function of signaling enzyme ERN1. It was also shown that the expression level of *RIPK2* gene did not change significantly in control glioma cells at both glucose and glutamine deprivation conditions, but in cells with ERN1 knockdown both glucose and glutamine deprivation enhances the expression of this gene (2.5fold and +22 %, correspondingly) (Fig. 4). Thus, the blockade of ERN1 enzyme function induces the up-regulation of *RIPK2* gene expression in glioma cells

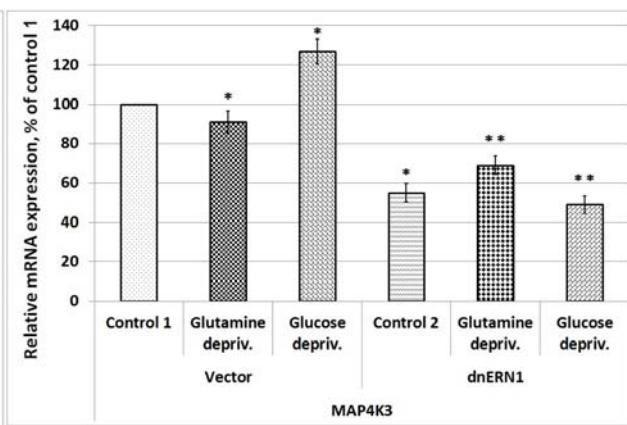


Fig. 2. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression level of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP4K3) mRNA also known as germinal center kinase-like kinase (GLK) in U87 glioma cells, transfected with vector pcDNA3.1 (Vector) and cells, transfected with dominant/negative constructs of ERN1 signaling enzyme (dnERN1) into vector pcDNA3.1, measured by quantitative real-time PCR. The level of this mRNA expression was normalized to the expression of beta-actin. The changes in the expression of MAP4K3 mRNA in the glutamine or glucose deprivation conditions in both types of glioma cells were compared with control 1 (100 %), but in cells, transfected with dnERN1, – with control 2; n = 4; * – $P < 0,05$ as compared to control 1, ** – $P < 0,05$ as compared with control 2.

both in glucose and glutamine deprivation conditions. These results is argued with anti-proliferative effect of ERN1 knockdown because there is data that protein kinase RIPK2 plays an important role in hepatic cell migration and inhibition of its tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses and down-regulated NF- κ B-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression (Tigno-Aranjuez et al., 2010; Wu et al., 2012).

Moreover, the suppression of ERN1 enzyme function in U87 glioma cells leads to decreases (almost to 2fold) mRNA level of protein kinase interacting protein CIB1 (Fig. 5). At the same time, glucose deprivation condition does not affect the expression level of gene encoding CIB1 protein both in control and ERN1 knockdown U87 glioma cells, but glutamine deprivation causes slight, but statistically significant, decrease of this mRNA expression level in both types of studied glioma cells (Fig. 5). Thus, the suppression of ERN1 enzyme function does not change significantly the effect of glucose as well as glutamine deprivation on the expression of *CIB1* gene in glioma cells.

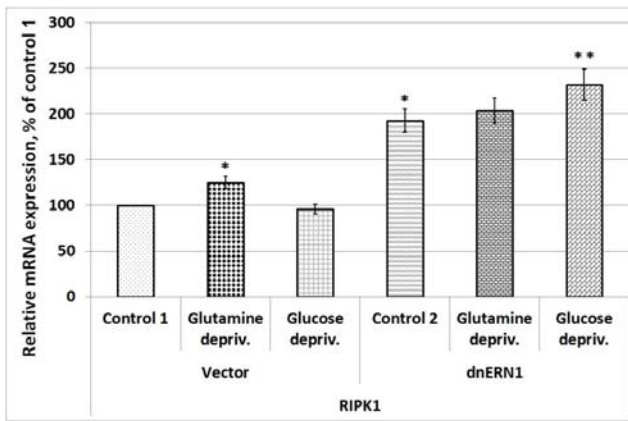


Fig. 3. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression level of receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1) also known as cell death protein RIP mRNA in U87 glioma cells, transfected with vector pcDNA3.1 (Vector) and cells, transfected with dominant/negative constructs of ERN1 signaling enzyme (dnERN1), measured by quantitative real-time PCR. The level of this mRNA expression was normalized to the expression of beta-actin. The changes in the expression of RIPK1 mRNA in the glutamine or glucose deprivation conditions in both types of glioma cells were compared with control 1 (100 %), but in cells, transfected with dnERN1, – with control 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ as compared to control 1, ** – $P < 0,05$ as compared with control 2.

Down-regulation of the expression level of protein kinase interacting protein CIB1 in glioma cells ERN1 knockdown possibly also contributes to suppression of tumor growth from these cells (Auf et al., 2010) because this protein is a mediator of carcinogenesis and participates in regulation of apoptosis and angiogenesis (Armacki et al., 2014; Leisner et al., 2013).

Results of this investigation clearly demonstrated that the expression of *MAP4K3*, *RIPK1*, *RIPK2*, and *CIB1* genes in U87 glioma cells is dependent from blockade of ERN1-mediated endoplasmic reticulum stress and is mostly regulated by glutamine and glucose deprivation in dependence from ERN1 signaling enzyme function. Significant increase of the expression of *RIPK1* as well as decrease of *MAP4K3*, *RIPK2*, and *CIB1* genes in glioma cells with knockdown of signaling enzyme ERN1 correlates with suppressed proliferation rate of these cells and possibly contributes in this effect, because encoded by these genes proteins are multifunctional and play an important role in the regulation of proliferation and apoptosis (Armacki et al., 2014; Fu et al., 2013; Hayakawa et al., 2011; Lam et al., 2009; Leisner et al., 2013; Minchenko et al., 2014; Naik et al., 2011; Schriever et al., 2013).

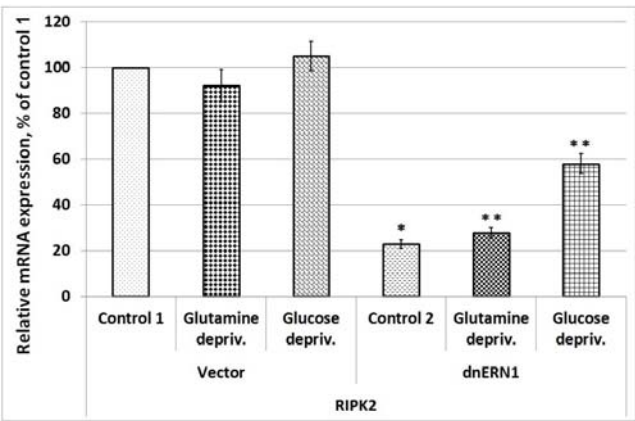


Fig. 4. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression level of receptor-interacting serine-threonine kinase 2 (RIPK2) also known as receptor-interacting protein (RIP)-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein (CLARP) kinase mRNA in U87 glioma cells, transfected with vector pcDNA3.1 (Vector) and cells, transfected with dominant/negative constructs of ERN1 signaling enzyme (dnERN1), measured by quantitative real-time PCR. The level of this mRNA expression was normalized to the expression of beta-actin. The changes in the expression of RIPK2 mRNA in the glutamine or glucose deprivation conditions in both types of glioma cells were compared with control 1 (100 %), but in cells, transfected with dnERN1, – with control 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ as compared to control 1, ** – $P < 0,05$ as compared with control 2.

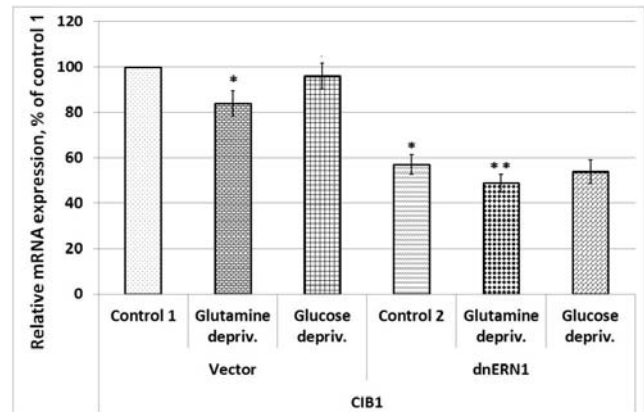


Fig. 5. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression level of calcium and integrin binding 1 (CIB1) also known as SNK-interacting protein 2-28 (SIP2-28) mRNA in U87 glioma cells, transfected with vector pcDNA3.1 (Vector) and cells, transfected with dnERN1, measured by quantitative real-time PCR. The level of this mRNA expression was normalized to the expression of beta-actin. The changes in the expression of CIB1 mRNA in the glutamine or glucose deprivation conditions in both types of glioma cells were compared with control 1 (100 %), but in cells, transfected with dnERN1, – with control 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ as compared to control 1, ** – $P < 0,05$ as compared with control 2.

Conclusions.

1. It was shown that suppression of both enzymatic functions of sensor and signaling enzyme ERN1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, decreases the expression level of genes encoding MAP4K3, RIPK2, and CIB1 in U87 glioma cells, but increases – *RIPK1* gene expression.

2. Glutamine deprivation condition leads to increase the expression level of *RIPK1* gene and to decrease – *CIB1* gene in control glioma cells, but ERN1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression most of these genes.

3. It was also shown that the expression level of *MAP3K5*, *RIPK1*, *RIPK2*, and *CIB1* genes did not change significantly in control glioma cells at glucose deprivation condition, but in cells with ERN1 knockdown glucose deprivation enhances the expression of *RIPK1* and *RIPK2* genes. Thus, suppression of ERN1 enzyme function also changes the effect of glucose deprivation on the expression of most studied genes in glioma cells.

4. Results of this investigation clearly demonstrated that the expression of *MAP4K3*, *RIPK1*, *RIPK2*, and *CIB1* genes in U87 glioma cells is dependent from endoplasmic reticulum stress mediated by ERN1 and that glutamine and glucose deprivation conditions mostly affect these gene expressions in dependence of ERN1 signaling enzyme function.

References:

1. Acosta-Alvarez D., Zhou Y., Blais A., Tsikitis M., Lents N.H., Arias C., Lennon C.J., Kluger Y., Dynlacht D.D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks // *Molecular Cell*. – 2007. – 27. – P. 53 – 66.
2. Aragón T., van Anken E., Pincus D., Serafimova I.M., Korennykh A.V., Rubio C.A., Walter P. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. // *Nature*. – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740.
3. Armacki M., Joodi G., Nimmagadda S.C., de Kimpe L., Pusapati G.V., Vandoninck S., Van Lint J., Illing A., Seufferlein T. A novel splice variant of calcium and integrin-binding protein 1 mediates protein kinase D2-stimulated tumour growth by regulating angiogenesis. // *Oncogene*. – 2014. – 33, N 9. – P. 1167 – 1180.
4. Auf G., Jabouille A., Delugin M., Guérit S., Pineau R., North S., Platonova N., Maitre M., Favereaux A., Seno M., Bikfalvi A., Minchenko D., Minchenko O., Moenner M. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. // *BMC Cancer*. – 2013. – 13, N 1. – P. 597.
5. Auf G., Jabouille A., Guérit S., Pineau R., Delugin M., Boucheccareilh M., Favereaux A., Maitre M., Gaiser T., von Deimling A., Czabanka M., Vajkoczy P., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M. A shift from an angiogenic to invasive phenotype induced in malignant glioma by inhibition of the unfolded protein response sensor IRE1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. – 107, N 35. – P. 1555 – 15558.
6. Bi M., Naczki C., Koritzinsky M., Fels D., Blais J., Hu N., Harding H., Novoa I., Varia M., Raleigh J., Scheuner D., Kaufman R.J., Bell J., Ron D., Wouters B.G., Koumenis C. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. // *EMBO J.* – 2005. – 24, N 19. – P. 3470 – 34815.
7. Denko N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. // *Nature Reviews Cancer*. – 2008. – 8. – P. 705 – 713.
8. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., Boucheccareilh M., Pineau R., Nalbantoglu J., Kaufman R.J., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. // *Cancer Res*. – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707.
9. Fels D.R., Koumenis C. The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. // *Cancer Biology & Therapy*. – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728.
10. Fu Z., Deng B., Liao Y., Shan L., Yin F., Wang Z., Zeng H., Zuo D., Hua Y., Cai Z. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. // *BMC Cancer*. – 2013. – 13. – P. 580.
11. Hetz C., Chevet E., Harding H.P. Targeting the unfolded protein response in disease. // *Nat. Rev. Drug Discov*. – 2013. – 12, N 9. – P. 703 – 719.
12. Hollien J., Lin J.H., Li H., Stevens N., Walter P., Weissman J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. // *J. Cell. Biol*. – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331.
13. Hayakawa Y., Hirata Y., Nakagawa H., Sakamoto K., Hikiba Y., Kinoshita H., Nakata W., Takahashi R., Tateishi K., Tada M., Akanuma M., Yoshida H., Takeda K., Ichijo H., Omata M., Maeda S., Koike K. Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – 108, N 2. – P. 780 – 785.
14. Hong S.W., Shin J.S., Lee Y.M., Kim D.G., Lee S.Y., Yoon D.H., Jung S.Y., Hwang J.J., Lee S.J., Cho D.H., Hong Y.S., Kim T.W., Jin D.H., Lee W.K. p34 (SEI-1) inhibits ROS-induced cell death through suppression of ASK1. // *Cancer Biol. Ther.* – 2011. – 12, N 5. – P. 421 – 426.
15. Huang C., Luo Y., Zhao J., Yang F., Zhao H., Fan W., Ge P. Shikonin kills glioma cells through necroptosis mediated by RIP-1. // *PLoS ONE*. – 2013. – 8, N 6. – P. E66326.
16. Ikner A., Ashkenazi A. TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8. // *J. Biol. Chem*. 286 (24), 21546 – 21554.
17. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications

- and global repression of transcription. // *Mutat. Res.* – 2008. – 640. – P. 174 – 179.
18. Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A., Finer-Moore J., Zhang C., Shokat K.M., Stroud R.M., Walter P. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693.
 19. Lam D., Dickens D., Reid E.B., Loh S.H., Moiso N., Martins L.M. MAP4K3 modulates cell death via the post-transcriptional regulation of BH3-only proteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2009. – 106, N 29. – P. 11978 – 11983.
 20. Lee J., Sun C., Zhou Y., Lee J., Gokalp D., Herrema H., Park S.W., Davis R.J., Ozcan U. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. // *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 10. – P. 1251 – 1260.
 21. Leisner T.M., Moran C., Holly S.P., Parise L.V. CIB1 prevents nuclear GAPDH accumulation and non-apoptotic tumor cell death via AKT and ERK signaling. // *Oncogene.* – 2013. – 32, N 34. – P. 4017 – 4027.
 22. Lenihan C.R., Taylor C.T. The impact of hypoxia on cell death pathways. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2013. – 41, N 2. – P. 657 – 663.
 23. Matsuda I., Matsuo K., Matsushita Y., Haruna Y., Niwa M., Kataoka T. The C-terminal domain of the long form of cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIPL) inhibits the interaction of the caspase 8 prodomain with the receptor-interacting protein 1 (RIP1) death domain and regulates caspase 8-dependent nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – 289, N 7. – P. 3876 – 3887.
 24. Minchenko D.O., Hubenya O.V., Terletsky B.M., Moenner M., Minchenko O.H. Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in glioma cell line U87 and its subline with suppressed activity of signaling enzyme endoplasmic reticulum-nuclei-1. *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2011. – 83, N 1. – P. 18-29.
 25. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S.V., Kharkova A.P., Minchenko O.H. Expression of casein kinase genes in glioma cell line U87: effect of hypoxia and glucose or glutamine deprivation. // *Nat. Sci.* – 2012a. – 4, N 1. – P. 38 – 46.
 26. Minchenko D.O., Minchenko O.H. SNF1/AMP-activated protein kinases: genes, expression and biological role. In: *Protein Kinases. Book 1*, Dr. Gabriela Da Silva Xavier (Ed.). InTech, 2012b. – P. 41 – 62.
 27. Minchenko O.H., Kharkova A.P., Bakalets T.V., Kryvdiuk I.V. Endoplasmic reticulum stress, its sensor and signaling systems and the role in the regulation of gene expressions in malignant tumor growth and hypoxia. // *Ukr. Biochim. J.* – 2013. – 85, N 5. – P. 5 – 16.
 28. Minchenko O.H., Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Kovalevska O.V., Kulinich A.O., Lypova N.M. Molecular mechanisms of ERN1-mediated angiogenesis. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* – 2014. – 5, N 1. – P. 1 – 22.
 29. Moenner M., Pluquet O., Bouche-careilh M., Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634.
 30. Naik M.U., Naik U.P. Calcium- and integrin-binding protein 1 regulates microtubule organization and centrosome segregation through polo like kinase 3 during cell cycle progression. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – 43, N 1. – P. 120 – 129.
 31. Naik M.U., Pham N.T., Beebe K., Dai W., Naik U.P. Calcium-dependent inhibition of polo-like kinase 3 activity by CIB1 in breast cancer cells. // *Int. J. Cancer.* – 2011. – 128, N 3. – P. 587 – 596.
 32. Park S.W., Zhou Y., Lee J., Lu A., Sun C., Chung J., Ueki K., Ozcan U. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. // *Nature Medicine.* – 2010. – 16, N 4. – P. 429 – 437.
 33. Pluquet O., Dejeans N., Bouche-careilh M., Lhomond S., Pineau R., Higa A., Delugin M., Combe C., Loriot S., Cubel G., Dugot-Senant N., Vital A., Loiseau H., Gosline S.J., Taouji S., Hallett M., Sarkaria J.N., Anderson K., Wu W., Rodriguez F.J., Rosenbaum J., Saltel F., Fernandez-Zapico M.E., Chevet E. Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α . // *Cancer Res.* – 2013. – 73, N 15. – P. 4732 – 4743.
 34. Rastogi S., Rizwani W., Joshi B., Kunigal S., Chellappan S.P. TNF-alpha response of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells involve differential utilization of ASK1 kinase and p73. // *Cell Death Differ.* – 2012. – 19, N 2. – P. 274 – 283.
 35. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D., Hammond E., Lee A.H., Yoshida H., Mori K., Glimcher L.H., Denko N.C., Giaccia A.J., Le Q.-T., Koong A.C. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. // *Cancer Res.* – 2004. – 64, N 17. – P. 5943 – 5947.
 36. Schriever S.C., Deutsch M.J., Adamski J., Roscher A.A., Ensenaer R. Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism. // *J. Nutr. Biochem.* – 2013. – 24, N 5. – P. 824 – 831.
 37. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – 65, N 6. – P. 862 – 894.
 38. Shi Y., Ren Y., Zhao L., Du C., Wang Y., Zhang Y., Li Y., Zhao S., Duan H. Knockdown of thioredoxin interacting protein attenuates high glucose-induced apoptosis and activation of ASK1 in mouse mesangial cells. // *FEBS Lett.* – 2011. – 585, N 12. – P. 1789 – 1795.
 39. Tigno-Aranjuez J.T., Asara J.M., Abbott D.W. Inhibition of RIP2's tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses. // *Genes Dev.* – 2010. – 24, N 23. – P. 2666 – 2677.
 40. Wang S., Kaufman R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease. // *J. Cell. Biol.* – 2012. – 197, N 7. – P. 857 – 867.
 41. Wu S., Kanda T., Nakamoto S., Imazeki F., Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma

- cells. // *Anticancer Res.* – 2012. – 32, N 9. – P. 3775 – 3783.
42. Yan L., Mieulet V., Burgess D., Findlay G.M., Sully K., Procter J., Goris J., Janssens V., Morrice N.A., Lamb R.F. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR. // *Mol. Cell.* – 2010. – 37, N 5. – P. 633 – 642.
43. Zhang K., Kaufman R.J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. // *Neurology.* – 2006. – 66, N 2 (Suppl 1). – P. S102 – S109.
44. Zhao B., Han H., Chen J., Zhang Z., Li S., Fang F., Zheng Q., Ma Y., Zhang J., Wu N., Yang Y. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. *Cancer Lett.* – 2014. – 342, N 1. – P. 43 – 51.
45. Zhou Y., Lee J., Reno C.M., Sun C., Park S.W., Chung J., Lee J., Fisher S.J., White M.F., Biddinger S.B., Ozcan U. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. // *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 3. – P. 356 – 365.

ДЕФІЦИТ ГЛЮКОЗИ ТА ГЛУТАМІНУ ЗМІНЮЄ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ *MAP3K5*, *MAP4K3*, *CIB1*, *RIPK1*, AND *RIPK2* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 З ВИКЛЮЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1

Т. В. Бакалець, Д. О. Мінченко, О. О. Ратушна, О. О. Рябовол, О. Г. Мінченко

*Протеїнкінази відіграють важливу роль у рості злоякісних пухлин як ключові регулятори різноманітних метаболічних процесів. Ми вивчали ефект дефіциту глюкози та глутаміну на рівень експресії мРНК протеїнкінази кінази кінази 3, що активується міогеном, 3 (*MAP4K3*), протеїнкінази кінази кінази 3, що активується міогеном, 5 (*MAP3K5*), серин-треонінової кінази 1, що взаємодіє з рецептором TNFRSF (*RIPK1*), та *RIPK2*, а також протеїну *CIB1*, що взаємодіє з протеїнкіназою у клітинах гліоми лінії U87. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1), основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулуму, знижує рівень експресії генів, що кодують *MAP4K3*, *RIPK2* та *CIB1*, але збільшує експресію гена *RIPK1*. В той же час, не спостерігалось істотних змін в експресії гена *MAP3K5* у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1. За умов дефіциту глутаміну спостерігалось збільшення рівня експресії гена *RIPK1* і зниження – гена *CIB1* у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ERN1 модифікувало ефект дефіциту глутаміну на експресію цих генів. Було також показано, що рівень експресії генів *MAP3K5*, *RIPK1*, *RIPK2* та *CIB1* істотно не змінювався у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози, в той час як у клітинах з пригніченим ERN1 дефіцит глюкози призводив до посилення експресії генів *RIPK1* та *RIPK2*. Таким чином, пригнічення функції ензиму ERN1 також змінює ефект дефіциту глюкози на експресію більшості досліджених генів у клітинах гліоми. Результати цієї роботи чітко вказують на те, що експресія генів *MAP4K3*, *RIPK1*, *RIPK2* та *CIB1* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від пригнічення опосередкованого ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулуму і переважно змінюється за умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції сигнального ензиму ERN1.*

Ключові слова: експресія мРНК, блокада ERN1, MAP3K5, MAP4K3, RIPK1, RIPK2, CIB1, дефіцит глюкози, дефіцит глутаміну, клітини гліоми лінії U87.

Одержано редколегією 07.07.2013

ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦІОНУВАННЯ ДЕЯКИХ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН В ТКАНИНАХ *LIGULARIA GLAUCA* (L.) HOFFM. І *L. SIBIRICA* (CASS.) ЗА РІЗНИХ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ

А. Є. ШЕЛИФІСТ, М. Д. ДЗВІНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Інститут біології, хімії та біоресурсів, кафедра біохімії та біотехнології
бул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000
e-mail: antonina_shel@mail.ru

На основі аналізу кількісного вмісту суми поліфенолів і флавоноїдів та поліфенолоксидазної активності експлантів *Ligularia glauca* (L.) J. Hoffm. і *L. sibirica* (Cass.) проаналізовані особливості функціонування системи антиоксидантного захисту рослин за наявності та відсутності у середовищі росту екзогенного цистеїну. Дослідженню підлягали експланти *L. glauca* і *L. sibirica*, вирощені в умовах *in vitro* за наявності у середовищі 60 мг/л цистеїну та без нього. Основою для приготування поживних середовищ служило середовище Мурасіге-Скуга. Вміст суми поліфенолів та флавоноїдів визначали спектрофотометрично у перерахунку на рутин та хлорогенову кислоту відповідно. Електрофоретичне дослідження ізоформ поліфенолоксидази проводили в нативних умовах у 5% концентруючому і 12% розділяючому поліакриламідних гелях. Як електродний буфер використовували трис-гліциновий буфер рН 8,3. Для ідентифікації ферменту гелі інкубували в 0,1% L-ДОФА у натрій-фосфатному буфері рН 7,0. В роботі показано, що експланти *L. glauca* і *L. sibirica* здатні нагромаджувати достатньо великі кількості поліфенольних сполук. Однак, за наявності у середовищі росту екзогенного цистеїну їх вміст в сировині *L. glauca* у двічі нижчий. Вміст флавоноїдів в експлантах *L. sibirica* більше ніж у два рази переважає за такої іншого виду. Ця різниця суттєво зростає за умови їх культивування у присутності екзогенного цистеїну. Від особливостей культивування залежить також поліфенолоксидазна активність експлантів. Мінімальна ферментативна активність встановлена для експлантів *L. glauca*, вирощених за відсутності в поживному середовищі екзогенного цистеїну. Її значення для обох досліджуваних видів відрізняються майже у 20 разів. Показано, що ізоферментний спектр поліфенолоксидази *L. sibirica* складається з десяти компонентів, тоді як *L. glauca* з шести. Виявлена його залежність від умов культивування. Так, на електрофореграмі *L. sibirica* стабільно виявляються дев'ять компонентів, тоді як на електрофореграмі *L. glauca* – чотири. Компонент з Rf за стресових умов росту набуває мажорного забарвлення у *L. sibirica* і з'являється у *L. glauca*. На основі якісного і кількісного аналізу компонентів ферментативної і неферментативної ланок системи антиоксидантного захисту *L. glauca* і *L. sibirica* можна говорити про більш високий адаптивний потенціал *L. sibirica*.

Ключові слова: *Ligularia glauca*, *Ligularia sibirica*, поліфенолоксидаза, поліфеноли, флавоноїди, цистеїн, *in vitro*, електрофорез, експлант.

Вступ. Одним із сучасних методів збереження рідкісних рослин є культивування їх в умовах *in vitro*. Двома червонокнижними видами *L. glauca* (L.) J. Hoffm., *L. sibirica* (Cass.) у флорі України представлений рід *Ligularia* (Cass.) родини *Asteraceae*. З них *L. glauca* є зникаючим, монокарпічним видом, чисельність якого за останні 30 років знизилась на 50-60%. Він зустрічається в ізольованих локалітетах на пн.-сх. межі ареалу (в Україні - Чернівецька, Львівська та Закарпатська області). Природоохоронний статус виду *L. sibirica* – вразливий, реліктовий, диз'юктивно поширений на межі ареалу. Більшість його популяцій представлена лише кількома десятками генеративних особин. Ареал поширення в Україні - Карпати та Мале Полісся (Червона

книга України, 2009). Враховуючи малочисельність видів в природних популяціях, були проведені роботи по їх введенню в культуру *in vitro* з метою розробки методики розмноження із залученням біотехнологічних підходів. На цьому етапі досліджень з'ясувалося, що успішне розмноження експлантів *L. glauca* і *L. sibirica* через інтенсифікацію окислювальних процесів можливе лише за умови введення до складу поживних середовищ цистеїну, який є потужним антиоксидантом (Кушнір, 2005).

У процесі життєдіяльності в клітинах утворюються вільні радикали, які є їх метаболічно-активними компонентами, що порушують обмін речовин. Їх знешкодження, як показують результати багатьох досліджень, забезпечується функціонуванням

антиоксидантної системи, що складається з ферментативної і неферментативної ланок, визначаючи значною мірою стійкість рослин до несприятливих впливів (Казначєва, 2011).

До неферментативної ланки системи антиоксидантного захисту входять сполуки фенольної природи, яким належить важлива роль у підтримці рослинного організму в необхідному для життя відновленому стані. Зокрема, одним з найважливіших класів біологічно активних речовин рослинного походження є поліфенольні сполуки та флавоноїди, які в своєму складі містять дві і більше гідроксильних груп (Карпин та Цвілінюк, 2009). Дана група речовин в фізіологічних умовах утворює окисно-відновну систему «фенол ↔ семіхінон ↔ хінон», компоненти якої легко переходять один в один. Вона відіграє роль буферної системи, а також синергіста аскорбінової кислоти у підтримці редокс-рівноваги (Алявіна и Загоскіна, 2010; Peto and Brumaghi, 2010).

Одним із ферментів антиоксидантного захисту є поліфенолоксидаза – металоензим, який містить біядерні центри міді (Fand, 2007). Даний фермент використовує молекулярний кисень для каталізу окислення фенольних сполук, утворюючи відповідні хінони. Акцептором водню в цих реакціях служить молекулярний кисень (Rozzaque et al., 2000; Sae-Soon and Woo-Yean, 2013).

Інтенсивне окислення тканин експлантів виявилось найбільш складною перешкодою при введенні в культуру *in vitro* видів *L. glauca* і *L. sibirica*. Суттєво проявлялися окислювальні процеси і безпосередньо на етапі розмноження. Подолати їх прояви вдалося за допомогою включення додаткової обробки насіння стерильним розчином аскорбінової кислоти під час стерилізації, а також введенням до складу поживних середовищ цистеїну.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити вміст поліфенолів і флавоноїдів, а також зробити порівняльний аналіз кількісного і якісного вмісту поліфенолоксидази в експлантах *L. glauca* та *L. sibirica*, культивованих за умов наявності в поживному середовищі цистеїну та за його відсутності.

Матеріали та методи. Дослідженню підлягали експланти *L. glauca* та *L. sibirica*, вирощені в умовах *in vitro* за наявності середовищі 60 мг/л цистеїну та без нього. Основою для приготування поживних середовищ служило середовище Мурасіге-Скуга (Кушнір, 2005).

Вміст суми поліфенолів і флавоноїдів визначали спектрофотометричним методом перерахунку на рутин (Чечуй, 2011) та

хлорогенову кислоту (Карпин та Цвілінюк, 2009) відповідно.

Для отримання ферментативного препарату поліфенолоксидази використовували 0,05 М Na-фосфатний буфер з рН 7,0, що містив 0,35 М КСІ і 0,5 % тритон Х-100 (Thygesen et al., 2000). Активність поліфенолоксидази визначали при довжині хвилі 420 нм, використовуючи як субстрат 100 мМ катехол в 0,1 М фосфатному буфері рН 7,0 (Sae-Soon and Woo-Yean, 2013; Živcovic, 2010).

Ферментний препарат, що підлягав електрофоретичному розділенню, отримували з використанням 100 мМ трис-гліцинового буфера рН 8,3, що містив 0,1% аскорбінової кислоти, 15% сахарозу та 0,1% цистеїн. Електрофорез проводили в нативних умовах з використанням 4% концентруючого (С 3%) і 12% розділяючого (С 4%) гелів у трис-гліциновому буфері рН 8,3. Для ідентифікації ферменту гелі інкубували в 0,1% L-3, 4 - дигідроксифенілаланін (L-ДОФА) у натрій-фосфатному буфері рН 7,0 (Fand, 2007; Mayer, 2006).

Експеримент виконували у шести біологічних повторностях. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми *Microsoft Excel* та оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. У попередніх наших дослідженнях було встановлено, що ефективно культивування в умовах *in vitro* *L. glauca* і *L. sibirica* можливе лише при наявності у поживному середовищі цистеїну. У зв'язку з цим за нормальні, тобто ті, при яких нівельована дія стресового фактору, були прийняті показники, властиві рослинам саме за таких умов вирощування. При дослідженні кількісного вмісту суми поліфенолів було встановлено, що в стресових умовах обидва види характеризуються практично однаковими їх значеннями. У той же час, при додаванні в поживне середовище цистеїну в експлантах *L. glauca* він зменшувався майже у два рази, тоді як для іншого досліджуваного виду відмінностей виявлено не було. Натомість при зміні умов культивування в сировині *L. glauca* залишається постійним вміст флавоноїдів. Слід зауважити, що він є досить незначним і меншим за такий *L. sibirica*. За нормальних умов вирощування відмінності у вмісті флавоноїдів в експлантах обох досліджуваних видів суттєво поглиблюються. Так, на тлі цистеїну, вміст флавоноїдів в тканинах *L. sibirica* переважає за такий *L. glauca* у 100 разів (табл.).

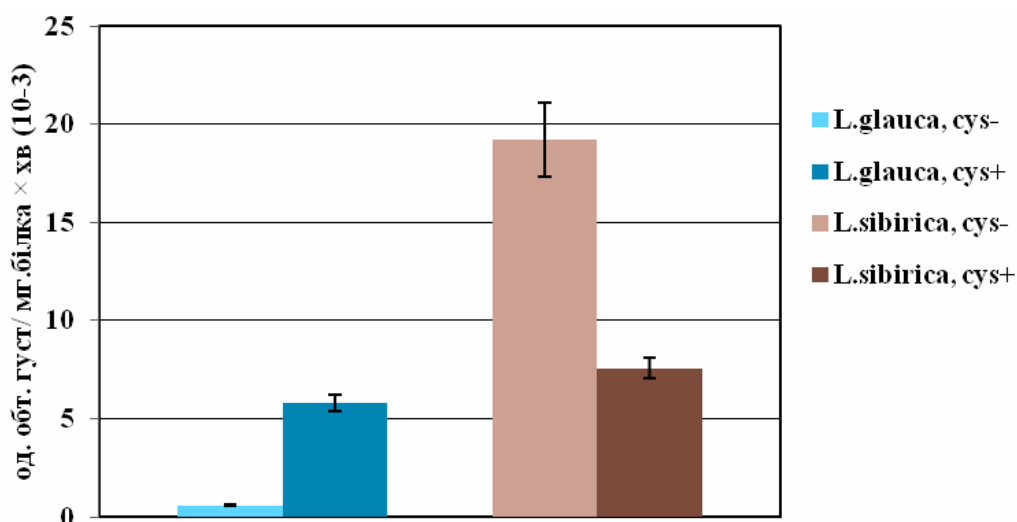


Рис.1. Поліфенолоксидазна активність експлантів *L. glauca* і *L. sibirica* за різних умов культивування

Fig.1. Polyphenol oxidase activity in explants *L. glauca* and *L. sibirica* under different culture conditions

Таблиця

Вміст поліфенолів і флавоноїдів в експлантах *L. glauca* і *L. sibirica* за наявності / відсутності в середовищі цистеїну ($M \pm m, p \leq 0,05$)

Table

The content of polyphenols and flavonoids in *L. glauca* and *L. sibirica* explants in the presence / absence of cysteine in the medium ($M \pm m, p \leq 0,05$)

Вміст %	Cys +	<i>L. glauca</i>	<i>L. sibirica</i>
поліфеноли	+	9,5±0,7*	18,3±0,19**
	-	16,9±0,9	17,6±0,91
флавоноїди	+	0,07±0,009	6,63±0,50***
	-	0,08±0,008	0,18±0,02**

Відомо, що накопичення фенолів у тканинах рослин відбувається за дії низки екстремальних зовнішніх факторів. Це дозволяє говорити про неспецифічні реакції відповіді рослин на їх вплив, що проявляється в підвищенні вмісту фенольних сполук та забезпечує стійкість рослин (Кушнір, 2005; Половникова и Воскресенская, 2008).

Щодо флавоноїдів в системі *in vitro* показано, що вони є більш потужними антиоксидантами, ніж вітаміни С і Е (Птицын, 2007), тому, на основі порівняльного аналізу кількісного вмісту флавоноїдів, можна припустити, що *L. sibirica* володіє більш високим адаптивним потенціалом. Це узгоджується із візуальними спостереженнями за станом експлантів, культивованих без цистеїну. Зокрема, з'ясовано, що окислення тканин експлантів даного виду в стресових умовах відбувається пізніше у середньому на десять днів.

Оскільки окислення фенольних сполук напряму пов'язане з функціонуванням поліфенолоксидази, наступним етапом наших досліджень був аналіз її кількісних та якісних показників. Так, при вирощуванні експлантів

обох досліджуваних видів за відсутності у поживному середовищі антиоксиданту, їх поліфенолоксидазна активність відрізняється майже у 20 разів із переважанням у *L. sibirica*. Додавання цистеїну в середовище росту призводить до суттєвих змін, наслідком яких є майже стовідсоткове вирівнювання кількісних показників: за рахунок різкого зростання значень у *L. glauca* і зниження у 2,5 рази в *L. sibirica* (рис.1). Одним із субстратів поліфенолоксидази є поліфеноли. Ймовірно, що саме через низьку поліфенолоксидазну активність в експлантах *L. glauca* у стресових умовах спостерігається підвищення вмісту поліфенольних сполук. Висока ферментативна активність в експлантах іншого досліджуваного виду свідчить про активну, хоча й не достатню з огляду на кінцевий результат, участь поліфенолів у знешкодженні вільних радикалів. Можна припустити, що в експлантах *L. glauca* за відсутності в середовищі росту цистеїну, поліфеноли виступають прооксидантами, приймаючи участь в окисленні тканин, фактично призводячи до їх більшої уразливості. В той же час, для *L. sibirica* не виявлено помітних змін у кількості поліфенолів, однак поліфенолоксидазна активність за наявності цистеїну значно нижча.

Відомо, що у видів, які володіють підвищеною стійкістю до дії стресових чинників, поліфенолоксидаза присутня і у так званій «прихованій формі». Під впливом стресових факторів може відбуватися збільшення фонду вільних форм ферменту за рахунок їх виходу із зв'язаного стану. Крім цього, підвищення активності відбувається паралельно зі збільшенням ступеня техногенного навантаження на рослини (Половникова и Воскресенская, 2008).

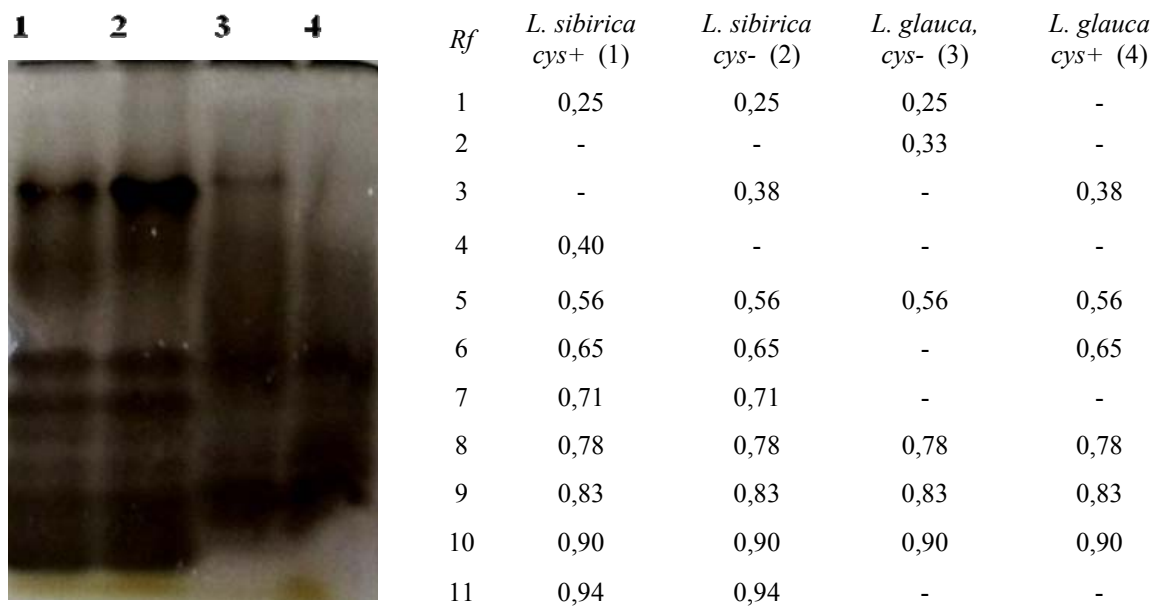


Рис. 2. Електрофоретичний розподіл поліфенолоксидази *L. glauca* і *L. sibirica* за наявності / відсутності екзогенного цистеїну в середовищі культивування

Fig. 2. The electrophoretic division of *L. glauca* and *L. sibirica* polyphenol oxidase in the presence / absence of the exogenous cysteine in the cultivating medium

Відомо також, що висока ферментативна активність призводить до посиленого виходу поліфенолів із місць депонування (Perro and Brumaghi, 2009). Відомо, що в стресових умовах, змінюється ізоферментний спектр клітинних ферментів, зокрема, з'являються нові ізоформи чи змінюється активність уже існуючих (Марченко та ін., 2008). З метою отримання відомостей щодо участі різних ізоформ поліфенолоксидази в захисті тканин експлантів від їх пошкодження внаслідок окислення, провели їх електрофоретичне розділення. Так, було встановлено, що поліфенолоксидаза *L. sibirica* представлена дев'ятьма компонентами з різною електрофоретичною рухливістю. Із них вісім присутні на електрофореграмі незалежно від умов вирощування (рис. 2). Відмінності якісного характеру стосуються тільки двох компонентів з *Rf* 0,38 та 0,40. Електрофоретичний спектр ізоформ поліфенолоксидази *L. glauca* представлений шістьма сполуками. З них стабільно виявляються чотири. На особливу увагу заслуговує компонент з *Rf* 0,25, оскільки за стресових умов росту він набуває мажорного забарвлення у *L. sibirica* і з'являється у *L. glauca*.

Отже, на підставі отриманих результатів можна стверджувати, що *L. sibirica* порівняно із *L. glauca* володіє значно вищим адаптивним потенціалом. За сприятливих умов культивування це виражається у значно вищому вмісті поліфенолів і флавоноїдів. Розвиток стресу в експлантах *L. glauca* супроводжується

суттєвим зниженням поліфенолоксидазної активності, у той же час як в експлантах *L. sibirica* вона істотно зростає. Ізоферментний спектр поліфенолоксидази в експлантах *L. sibirica* представлений більшим числом компонентів. Із них особливу роль в інтенсифікації процесів окислення тканин експлантів у стресових умовах відіграє сполука з *Rf* 0,2.

Список літератури:

1. Fand C. Characterization of polyphenol oxidase and antioxidants from pawpaw (*Asimina triloba*) Fruit / C. Fand // University of Kentucky Master's These. – 2007. – P. 603-620.
2. Mayer M. A. Polyphenol oxidases in plants end fungi: *Going places* a review / M. A. Mayer // *Phytochemistry*. – 2006. – Vol. 67. – P. 2318-2331.
3. Perro N. R. Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Bindin / N. R. Perro, J. L. Brumaghi // *Cell Biochem Biophys*. – 2009. – №53. – P. 75-100.
4. Rozzaque M. A. Purification end Characterization of polyphenoloxidase from *Guava infected* with Fruit-rot Disease / M. A. Rozzaque, Z. A. Saud, N. Absar, M. R. Karim // *Pakistan Soursnol of Biological Sciences*. – 2000. – №3. – P. 407-410.
5. Sae-Soon K. Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng / K. Sae-Soon, K. Woo-Yean // *S. Ginseng Res*. – 2013. – Vol.37, №1. – P. 117-123.
6. Thygesen P. W. Polyphenol oxidase in *Potato* / P. W. Thygesen, I. B. Dry, S. P. Robinson // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 109. – P. 525-531.

7. Zivcovic S. Pehydration – related chepges of peroxidase and polyphenol oxidase activity in fronds the resurrection fern *Asplenium ceterach* L. / S. Zivcovic, M. Popovic, S. Dregisic – Maksimovic, I. Momcilovic // *Acrr. Biol. Sci.* – 2010. – №62. – P. 1071-1081.
8. Алявина А.К. Локализация различных классов фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения / А. К. Алявина, Н. В. Загоскина // Сборник статей по матер. III Всерос. науч.-практической конференции. Биотехнология. – Волгоград, 2010. – 370 с.
9. Казначеева М. С. Дослідження кількісного вмісту активних форм кисню та антиоксидантів в тканинах цибулі ріпчастої, різних за рівнем стійкості до хвороб сортів / М. С. Казначеева // *Фізіологія рослин.* – 2011. – Вип. 13. – С. 202-205.
10. Карпин О. Антиоксидантна активність і вміст поліфенолів у рослинах *Carex hirta* L. та *Faba Vona Medic (Vicia Fabal)* за дії нафтового забруднення / [О. Карпин, О. Цвілинюк, О. Терек та ін.] // *Біологічні студії.* – 2009. – Т.3, №2. – С. 109-114.
11. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – Київ: Наукова думка, 2005. – 272 с.
12. Марченко М. М. Характеристика електрофоретичних спектрів естераз насіння *Saussurea discolor* (Willd.) DC. та *S. porcii* Degen. / М. М. Марченко, А. Є. Шелифіст, Л. М. Чебан // *Доповіді національної академії наук України.* – 2008. – №1. – С. 177-180.
13. Половникова М. Г. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды / М. Г. Половникова, О. Л. Воскресенская // *Физиология растений.* – 2008. – Т.55, №5. - С. 777-785.
14. Птицын А. В. Технология выделения флавоноидов винограда *Vitis vinifere* сорта «Изабелла» для косметики и изучение их свойств: дис. ... канд. хим. наук: 03.00.23 «Биотехнология» / Птицын Андрей Владимирович. – М., 2007. – 130 с.
15. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я. П. Дідуха. – К.: Гобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
16. Чечуй О. Ф. Вміст фенольних сполук в насінні *Glycine max* L. при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого впливом іонів кобальту та кадмію / О. Ф. Чечуй // *Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Сер. Біол.* – 2011. – Вип. 30. – С. 197-200.

THE CHARACTERISTIC OF THE FUNCTIONING OF THE SELECTED COMPONENTS OF PLANT ANTIOXIDANT SYSTEM IN *LIGULARIA GLAUCA* (L.) HOFFM. AND *L. SIBIRICA* (CASS.) TISSUES UNDER THE DIFFERENT GROWING CONDITIONS

A. E. Shelyfist, M. D. Dzvinchuk

The quantitative content of the amounts of polyphenols, flavonoids and polyphenol oxidase activity of Ligularia glauca (L.) J. Hoffm. and L. sibirica (Cass.) explants was observed by analyzing the functioning of the antioxidant protection system of plants. The plants were grown in the presence and absence of the exogenous cysteine in the growth medium. The research subjects were L. glauca i L. sibirica explants which were grown under in vitro conditions in the presence of 60 mg/l cysteine in medium and without it. The Murasihe-Skoog medium was the base for the preparation of the culture mediums. The content of the amounts of polyphenols and flavonoids was determined spectrophotometrically in terms of routine and chlorogenic acid accordingly. The electrophoretic studies of the polyphenol oxidase isoforms were performed in native conditions in the 5% concentrating and 12% sharing polyacrylamide gels. The tris-glycine buffer pH 8,3 was used as the electrode buffer. The gels were incubated in 0,1% L-DOPA in the sodium phosphate buffer pH 7,0 for the identification of enzyme. It is shown that L. glauca and L. sibirica explants are able to accumulate large enough number of the polyphenolic compounds. However, their content is twice lower in L. glauca raw in the presence of in the growth medium. In L. sibirica explants the flavonoids content is more than twice predominated by such a different species. This difference increases significantly under their cultivating condition in the presence of exogenous cysteine. The polyphenol oxidase activity of explants depends also on the cultivating peculiarities. The minimum enzyme activity is set for L. glauca explants, which were grown with the absence of exogenous cysteine in the culture medium. The activity values for both explored types are different almost in 20 times. It is shown, that the isozyme spectrum of L. sibirica polyphenol oxidase consists of ten components, while L. glauca of six. It was discovered his dependence on the cultivating conditions. Thus, L. sibirica consistently shows nine components, while L. glauca electrophoretogram – four. The component with Rf becomes majeure colour under stressful growth conditions in L. sibirica and appears in L. glauca. Now we can talk about higher adaptive capacity of L. sibirica based on the qualitative and quantitative analysis of components of the enzymatic and nonenzymatic part of the antioxidant L. glauca and L. sibirica protection system.

Keywords: *Ligularia glauca, Ligularia sibirica, polyphenol oxidase, polyphenols, flavonoids, cysteine, in vitro, electrophoresis, explant.*

Одержано редколегією 23.12.2013

ПРОФІЛЮВАННЯ ГЕНОМУ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ IRAP-ПЛР ТА REMAP-ПЛР МАРКЕРІВ

Я. І. ІВАНОВИЧ, Н. В. ТРЯПЦІНА

*Інститут садівництва НААН, відділ вірусології, оздоровлення і розмноження плодових та ягідних культур, Київ-27, 03027, с. Новосілки, вул. Садова, 23, Україна;
e-mail: ivanovych.yar@gmail.com*

Використання однорідного садивного матеріалу з підтвердженою генетичною ідентичністю – одна з головних вимог при створенні садів інтенсивного типу. Ефективність методу ідентифікації та аналізу генетичних відмінностей між різними сортами плодових культур за допомогою традиційних фенотипових ознак є недостатньою, оскільки значним чином залежить від впливу факторів зовнішнього середовища. Профілювання геномів з використанням молекулярно-генетичних маркерів є найбільш точним та надійним способом вивчення генетичного різноманіття еукаріотичних геномів. Використання ретротранспозонних генетичних маркерів є потужним засобом для генетичного профілювання еукаріотичних геномів, оскільки вони є найбільш численною групою мобільних елементів в геномі рослин та відіграють важливу роль в його реорганізації у відповідь на дію природного та штучного добору. Проблема пошуку найбільш інформативних маркерних систем для генетичного профілювання геномів сортів черешні є особливо актуальною з огляду на досить низький рівень генетичного поліморфізму у цієї культури. Це є відображенням обмеженої генетичної мінливості геноплазми сортів черешні внаслідок системи гаметофітної самонесумісності. В роботі досліджено 13 сортів черешні української селекції та два сорти закордонної селекції в якості контролю. Загальну геномну ДНК виділяли ЦТАБ-методом з деякими модифікаціями. ПЛР проводили методами IRAP та REMAP. Продукти ампліфікації розділяли в поліакриламідному гелі. Дискримінаційні можливості використаних маркерних систем оцінювали за допомогою різних показників поліморфізму для порівняння їх інформативності. Проведена робота дозволила оцінити дискримінаційні можливості та технічні особливості застосування декількох систем генетичного профілювання геномів сортів черешні української селекції з використанням IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів та виявити серед них найбільш перспективні для рутинного аналізування. Використання п'яти праймерів (IRAP-ПЛР) та двох комбінацій праймерів (REMAP-ПЛР) дозволило в сумі отримати 63 маркери, з яких 23.8 % виявилися поліморфними. Було показано, що для генетичного профілювання сортів черешні перспективним є застосування комбінації праймерів TRIM K002 +8565 й окремих праймерів TRIM K002, iPBS 2272 та iPBS 2077.

Ключові слова: IRAP-ПЛР маркери, REMAP-ПЛР маркери, генетичний поліморфізм, генетичне профілювання, сорти черешні.

Вступ. Черешня (*Prunus avium* L.) – зазвичай диплоїдна ($2n = 2x = 16$; $3x = 24$; $4x = 32$) плодова порода, походження якої пов'язують з Близько-Східним центром та Кавказьким регіоном (Ganopoulos, 2011). Черешня як плодова культура культивується у помірному кліматичному поясі та високо ціниться через плоди. В Україні за даними FAOSTAT в 2012 р. черешня вирощувалась на площі в 12500 га, а продукція цієї культури склала 72600 т (FAOSTAT). Створення сучасних інтенсивних насаджень черешні потребує використання однорідного садивного матеріалу сортів з підтвердженою генетичною ідентичністю. Існує необхідність захисту прав селекціонерів. Сорти черешні української селекції створювалися передусім з огляду на високий рівень адаптивності до умов вирощування в різних зонах плідництва в Україні. До цих пір їх генетичне різноманіття та селекційний потенціал практично не вивчалися на молекулярно-

генетичному рівні, що певним чином обмежує права вітчизняних селекціонерів та можливості маркерно-опосередкованої селекції нових сортів черешні.

Для ідентифікації та аналізу генетичних відмінностей між різними сортами черешні традиційно використовують фенотипові ознаки, на які значним чином впливають фактори навколишнього середовища. Такий вплив може підвищувати мінливість агрономічно-цінних ознак, що погіршує надійність методу (Ganopoulos, 2011).

Профілювання геномів з використанням молекулярно-генетичних маркерів є найбільш точним та надійним способом вивчення генетичного різноманіття еукаріотичних геномів. Сьогодні для генетичної паспортизації сортів плодових та ягідних культур в тому числі і черешні застосовується широкий спектр маркерів, зокрема: RAPD-, AFLP-, SSR-, ISSR-, SNP-маркери та ін. Вибір маркерної системи

залежить від конкретного завдання. Зокрема для генетичного профілювання геномів сортів черешні проблема пошуку найбільш інформативних маркерних систем є завжди актуальною, оскільки відомо, що рівень міжсортового поліморфізму більшості типів генетичних маркерів у цієї культури є досить низьким, що є відображенням обмеженої генетичної мінливості геноплазми сортів черешні (Kappel, 2012) та наслідком системи гаметофітної самонесумісності (Iezzoni, 2008).

Завданням даної роботи була перевірка придатності декількох типів IRAP- (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) та REMAP (REtrotransposon-Microsatelite Amplified Polymorphism) - маркерів для генетичного профілювання сортів черешні вітчизняної селекції, створених на Артемівській дослідній станції розсадництва та на Дослідній станції зрошуваного садівництва в м. Мелітополь.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал сортів черешні відбирався в насадженнях Мелітопольської ДСС ім. М.Ф. Сидоренка, Артемівської ДСР та Інституту садівництва НААН (табл. 1). Використано 13 сортів української селекції та два сорти закордонної селекції в якості контролю.

Загальну геномну ДНК виділяли ЦТАБ-методом (Doyle, 1987) з деякими модифікаціями. Концентрацію препаратів ДНК визначали електрофоретично.

Реакцію ампліфікації з використанням IRAP-праймерів проводили в об'ємі 15 мкл, що включали 50 нг геномної ДНК, 0.8 мкМ праймера, 0.1-0.3 мМ кожного дНТФ, 2-2.25 мМ MgCl₂, 1.5 мкл 10× Taq ДНК полімеразного буферу та 0.5 ОА Taq ДНК полімерази (СибЭнзим, Росія).

Таблиця 1.

Перелік проаналізованих сортів черешні

Table 1.

List of analyzed sweet cherry cultivars

Сорт	Оригіатор	Місце збору
Анонс	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Крупноплідна	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Валерій Чкалов	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Сказка	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Талісман	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Мелітопольська чорна	Мелітопольська ДСС	Мелітопольська ДСС
Мелітопольська мирна	Мелітопольська ДСС	ІС НААН
Темпоріон	Мелітопольська ДСС	ІС НААН
Прощальна	Артемівська ДСР	Артемівська ДСР
Василіса прекрасна	Артемівська ДСР	Артемівська ДСР
Отрада	Артемівська ДСР	Артемівська ДСР
Донецька красавиця	Артемівська ДСР	ІС НААН
Аннушка	Артемівська ДСР	ІС НААН
Регіна	Німеччина	ІС НААН
Бігарро Хатіф Бурлат	Франція	Мелітопольська ДСС

ПЛР проводили на ампліфікаторі Терцик за наступною схемою: первинна денатурація – 5 хв., 32-36 циклів, що включали 30 с при 94°C для денатурації, 60 с при 40-60°C (залежно від праймера) для анелювання, 2 хв. 30 с при 72°C для елонгації; кінцева елонгація 5 хв. при 72°C.

В роботі використано два праймери до довгих кінцевих повторів мініатюрних ретротранспозонів TRIM (Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature) (Antonius-Klemola, 2006) та три праймери до сайту зв'язування зворотньої транскриптази - iPBS (Primer Binding Site) LTR-вмісних ретротранспозонів (Kalendar, 2010). Для REMAP-ПЛР використано ISSR-праймер 8565 з якірними 5' послідовностями (Antonius-Klemola, 2006) (табл.2).

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР здійснювали в 2% агарозному та 10% поліакриламідному гелі. Забарвлення обох типів гелів проводили з використанням бромистого етидію. В якості маркера молекулярних мас використовували 100 п.н. або 1 т.п.н. (Thermo Scientific) ДНК-маркер.

Таблиця 2

Використані комбінації праймерів

Table 2

Combinations of primers used

Назва	T _a , °C	Послідовність (5' – 3')
TRIM K002	59.4	AGCTCCCAAAAGGCCTCGTGC
TRIM K008	59.1	GCGGACAATATCGTGCTACGGTG
TRIM K002 +8565	59.4	8565: GTCACCACCACCACCACCACCAC
TRIM K008 +8565	59.1	
iPBS 2272	40	GGCTCAGATGCCA
iPBS 2077	34.7	CTCACGATGCCA
iPBS 2237	56	CCCCTACCTGGCGTGCCA

Електрофореграми продуктів ампліфікації аналізувалися за допомогою програми TotalLab. Кожна реакція проводилася у трьохкратному повторенні для перевірки відтворюваності ампліфікаційних фрагментів. При створенні бінарних матриць відтворювані фрагменти в спектрах ампліфікації оцінювалися як наявні (1) чи відсутні (0). В аналіз було включено лише ті спектри, в яких було виявлено поліморфні маркери.

Для порівняння інформативності використаних маркерних систем їх дискримінаційні можливості оцінювали з використанням декількох показників поліморфізму: відсоток поліморфних локусів P (%), кількість відмінних алелів (N_a), кількість ефективних алелів (N_e), індекс інформативності Шеннона (I), очікувана гетерозиготність (H_e) та гетерозиготність, що спостерігається (H_o).

Обрахунки первинних бінарних даних проводили в програмі GenAlEx 6.501 для доміантних маркерів.

Результати та їх обговорення. Використання п'яти праймерів (IRAP-ПЛР) та двох комбінацій праймерів (REMAP-ПЛР) дозволило в сумі отримати 63 маркери, з яких 23.8 % виявилося поліморфними (табл. 3). В більшості ампліфікаційних спектрів переважали амплікони середньої довжини – від 400 до 1000 п.н. Лише в ампліфікаційних спектрах, отриманих при застосуванні праймерів TRIM K002 та TRIM K008+8565, були виявлені високомолекулярні ампліфікаційні фрагменти з розмірами вище за 2000 п.н.

IRAP-ПЛР та REMAP-ПЛР маркери є анонімними ділянками геному, що фланковані повторюваними послідовностями, зокрема в нашій роботі IRAP-ПЛР маркери - це геномні ділянки, що знаходяться між інвертованими специфічними сайтами ампліфікації на довгих кінцевих повторях двох мініатюрних ретротранспозонів (праймери TRIM K002 та

TRIM K008) та між двома інвертованими сайтами зв'язування зворотньої транскриптази у прикорових ділянках також двох мініатюрних ретротранспозонів (праймери iPBS 2272, iPBS 2077 та iPBS 22037). Потенційно використання другої групи праймерів може бути більш універсальним способом генетичного маркування рослинних геномів завдяки високій консервативності цих ділянок у всіх типах ретротранспозонів, оскільки відомо, що ретротранспозони завдяки їх інсерційній активності відіграють важливу роль в структурній еволюції геному багатьох видів рослин (Kalendar, 2010). Для отримання REMAP-ПЛР маркерів були використані комбінування праймерів TRIM K002 +8565 та TRIM K008 +8565 (рис. 1, Б, В). Відповідно отримані у такий спосіб молекулярно-генетичні маркери – це ділянки анонімної ДНК фланковані з одного боку транспозонними послідовностями, а з іншого – мікросателітними, а також ділянки між двома інвертованими транспозонними або двома інвертованими мікросателітними повторами.

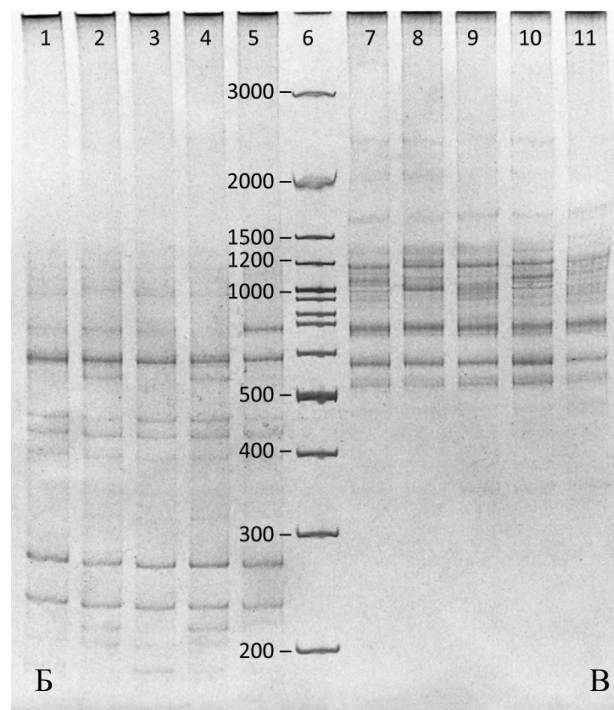
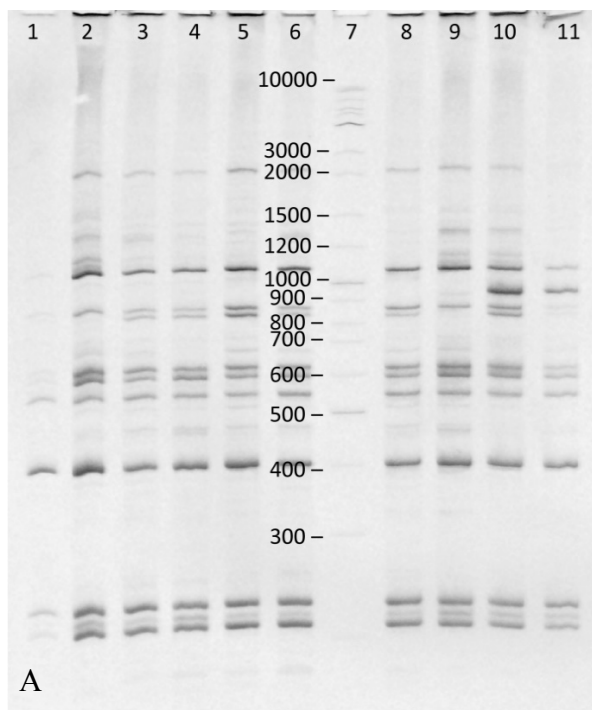


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікації.
Примітка: А – праймери TRIM K002 та геномної ДНК сортів черешні: 1 – Валерій Чкалов, 2 – Мелітопольська чорна, 3 – Крупноплідна, 4 – Темпоріон, 5 – Сказка, 6 – Анонс, 7 – маркер молекулярних мас 1 т.п.н. (Thermo Scientific), 8 – Талісман, 9 – Донецька красавиця, 10 – Регіна, 11 – Прощальна; Б – пари праймерів TRIM K002+8565, В – TRIM K008+8565 та геномної ДНК: 1, 7 – Валерій Чкалов, 2, 8 – Мелітопольська чорна, 3, 9 – Анонс, 4, 10 – Талісман, 5, 11 – Чудо-вишня (дюк), 6 – маркер молекулярних мас 100 п.н. (Thermo Scientific).

Pic. 1. Electrophoregrams of PCR-products.
Note: A – primer TRIM K002 and genomic DNA of sweet cherry cultivars: 1 – Valeriy Chkalov, 2 – Melitopol's'ka chorna, 3 – Krupnoplidna, 4 – Temporion, 5 – Skazka, 6 – Anons, 7 – molecular weight marker 1 kbp (Thermo Scientific), 8 – Talisman, 9 – Donetsk'ka krasavytsia, 10 – Regina, 11 – Proshal'na; B – primers TRIM K002+8565 and C – TRIM K008+8565 and genomic DNA: 1, 7 – Valeriy Chkalov, 2, 8 – Melitopol's'ka chorna, 3, 9 – Anons, 4, 10 – Talisman, 5, 11 – Chudo-vyshnia (duke), 6 – molecular weight marker 100 bp (Thermo Scientific).

Таблиця 3.

Дискримінаційні характеристики перевірених маркерних систем для генетичного профілювання 13 сортів черешні української селекції

Table 3.

Discriminative characteristics of tested marker systems for fingerprints of 13 Ukrainian sweet cherry cultivars

Маркерна система	Розмір фрагментів, п.н.	Кількість виявлених локусів	P (%)	N _a	N _e	I	H _e	H _o
TRIM K002	210-2100	12	25.00	1.250	1.136	0.123	0.081	0.084
TRIM K002 +8565	175-990	12	33.33	1.333	1.236	0.202	0.138	0.158
TRIM K008 +8565	535-2460	19	21.05	1.211	1.164	0.132	0.092	0.105
iPBS 2272	545-1300	9	22.22	1.222	1.137	0.114	0.076	0.079
iPBS 2077	635-1420	8	25.00	1.250	1.250	0.173	0.125	0.143

За використання праймера TRIM K008 взагалі не було отримано чітких спектрів при ампліфікації ДНК черешні, хоча відомо, що цей праймер дозволяє виявляти маркери з високими дискримінаційними можливостями при генетичному профілюванні інших представників родини Розові (Rosaceae) (Antonius-Klemola, 2006) в тому числі і сортів яблуни вітчизняної селекції (Кисельов, 2011; Тряпціна, 2012). Використання цих праймерів у комбінації з ISSR праймером 8565 дозволило отримати значно більш інформативні спектри ампліфікації. Хоча ISSR-ПЛР маркери, отримані за допомогою одного праймера 8565 у перевірених сортах виявилися виключно мономорфними. За використання пари праймерів TRIM K008+8565 виявлено найбільшу кількість локусів (19), але дискримінаційні характеристики цієї маркерної системи поступалися характеристикам маркерів, отриманих при застосуванні комбінації праймерів TRIM K002+8565, яка виявилася найбільш вдалою серед проаналізованих. Крім того, переважна більшість (>80%) генетичних маркерів при електрофоретичному розділенні утворювали в спектрі для пари праймерів TRIM K008+8565 досить щільний кластер в границях від 500 до 1000 п.н. (рис. 1, В). Така згрупованість маркерів в спектрах технічно досить ускладнює оцінку кожного окремого амплікону як у автоматичному так і у ручному режимі і при генетичному профілюванні геномів є небажаною.

Праймер iPBS 2237, застосований окремо дозволив виявити лише 3 мономорфні локуси, які не було враховано при створенні бінарних матриць. За використання двох інших праймерів із цієї групи отримано спектри з меншою кількістю ампліфікаційних фрагментів. Тим не менше рівень дискримінаційних можливостей цих маркерних систем виявився співставним з системами маркування за допомогою праймерів TRIM K008+8565 та TRIM K002. В цілому, у порівнянні з вищезгаданими системами

маркування, для ампліфікаційних спектрів праймерів iPBS 2272 та iPBS 2077 більш характерною є структурна рівномірність при електрофоретичному розділенні, що спрощує їх аналіз. Отже, для можливості рутинного генетичного профілювання геномів сортів черешні ці маркерні системи заслуговують на увагу.

Висновки. Проведена робота дозволила оцінити дискримінаційні можливості та технічні особливості аналізу декількох систем генетичного профілювання геномів сортів черешні вітчизняної селекції з використанням IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів та виявити серед них найбільш перспективні для рутинного застосування, зокрема, для генетичного профілювання сортів черешні перспективним є застосування комбінації праймерів TRIM K002 +8565 та окремих праймерів TRIM K002, iPBS 2272 та iPBS 2077.

Список літератури:

1. Кисельов Д.О., Тряпціна Н.В. Використання Malus TRIM ретротранспозона для аналізу міжсортного ДНК-поліморфізму яблуни // Зб. н. пр. Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – №10. – С.194-197.
2. Тряпціна Н.В., Кисельов Д.О. Оцінка дискримінаційних характеристик різних за походженням IRAP-маркерів для генетичного профілювання геному яблуни // Садівництво. – 2012. – №66. – С. 313-321.
3. Antonius-Klemola K. et al. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports // Theor Appl Genet. – 2006. – Vol. 112. – P. 999-1008.
4. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.
5. FAOSTAT. [Online Database]. <http://faostat3.fao.org/> (10 March 2014)
6. Ganopoulos I.V. et al. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR)

- and morpho-physiological markers // Euphytica. – 2011. – Vol. 181, № 2. – P. 237-251.
7. Iezzoni A.F. Cherries // Temperate Fruit Crop Breeding [Ed. by J.F. Hancock]. – Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media B.V., 2008. – P. 151-175.
8. Kalendar R. et al. iPBS: a universal method for DNA Fingerprinting and retrotransposon isolation // Theor Appl Genet. – 2010. – Vol. 121. – P. 1419-1430.
9. Kappel F. et. al. Cherry // Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding 8 [Ed. M.L. Badenes, D.H. Byrne]. – Ruel-Malmaison: Springer Science+Business Media LLC, 2012. – P. 459-504.

FINGERPRINTING GENOMES OF UKRAINIAN-BREED CULTIVARS OF SWEET CHERRY BY USING IRAP AND REMAP MARKERS

Y. I. Ivanovych, N. V. Triapitsyna

The using of uniform plant material with confirmed cultivar identity is the most critical factor for creating gardens of intensive type. The efficiency of identification method and analysis of genetic diversity between different fruit cultivars with traditional phenotypical traits are insufficient taking into account its high dependence from environmental factors. Genomes fingerprinting with molecular-genetic markers is a most accurate and reliable method of eukaryotic genomes studying. Retrotransposon markers have been demonstrated to be powerful tools for genetic fingerprinting of eukaryotic genomes because they are the most abundant mobile elements in the plant genome and seem to play an important role in genome reorganizations induced by natural and artificial selection. The problem of searching of most informative marker systems for genetic fingerprinting genomes of sweet cherry cultivars is always actual due to rather low level of genetic polymorphism in this culture. This is a reflection of limited genetic variability of sweet cherry germplasm due to system of gametophytic self-incompatibility. In our investigation 13 Ukrainian sweet cherry cultivars and two foreign cultivars as a control were analyzed. Total genomic DNA was extracted by CTAB-method with some modification. PCR was conducted in IRAP- and REMAP- modifications. Amplification products were separated in PAAG. A discriminative possibility of marker systems used was assessed by different indices of polymorphism for comparing their informative content. This study allowed to evaluate discriminative possibilities and technical peculiarities of some systems for molecular-genetic fingerprinting of Ukrainian sweet cherry cultivars using IRAP- and REMAP-PCR markers and to select among them the most perspective ones for routine analysis. Applying of five primers (IRAP-PCR) and two combinations of primers (REMAP-PCR) allowed to obtain 63 markers, among which 23.8 % were polymorphic. It was demonstrated that for genetic fingerprinting of sweet cherry cultivars the application of primers combination TRIM K002 +8565 and single primers TRIM K002, iPBS 2272 and iPBS 2077 are perspective.

Key words: genetic fingerprinting, genetic polymorphism, IRAP-PCR markers, REMAP-PCR markers, sweet cherry cultivars.

Одержано редколегією 17.04.2014

INSULIN RESISTANCE AFFECTS THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO THE CONTROL OF CELL GROWTH AND SURVIVING IN BLOOD CELLS OF OBESE BOYS

O. V. TIAZHKA¹, D. O. MINCHENKO^{1,2}, V. V. DAVYDOV³, O. A. BUDREIKO³,
O. S. MOLIAVKO², D. K. KULIESHOVA³, O. H. MINCHENKO^{2,*}

¹National O.O. Bohomolets Medical University, Kyiv 01601, Ukraine;

²Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine,
Department of Molecular Biology, Kyiv, Ukraine;

³SI "Institute of children and adolescent health care National Academy of Medical Science of Ukraine",
Kharkiv, Ukraine;

* e-mail: ominchenko@yahoo.com

The development of obesity and its metabolic complications is associated with dysregulation of numerous intrinsic mechanisms, which control most key metabolic processes, including insulin sensitivity as well as cell growth and surviving. We studied the expression of genes, which responsible for control of cell growth and surviving, in the blood cells of obese boys with normal and impaired insulin sensitivity as compared to the group of normal individuals (control). It was shown that the expression level of DUSP1, LOX, and HSD17B10 genes is decreased in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to control group. Insulin resistance in obese boys leads to down-regulation of DUSP1, LOX, KRT18, HSD17B2, and HSD17B10 gene expressions in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity. Results of this study provide evidence that obesity affects the expression of the subset of genes related to cell growth and surviving in blood cells and that impaired insulin sensitivity in obesity is associated with changes in the expression level of DUSP1, LOX, KRT18, HSD17B2, and HSD17B10 genes, which contribute to the development of obesity and glucose intolerance and possibly reflect the changes in fat and other tissues.

Key words: mRNA expression, LOX, DUSP1, KRT18, HSD17B2, HSD17B10, blood, obesity, insulin resistance.

Introduction. The development of obesity as well as its metabolic complications, the most profound public health problems, is associated with dysregulation of numerous intrinsic mechanisms, which control basic metabolic processes, including cell growth, surviving and insulin sensitivity (Bray and Young, 2009; Bray and Young, 2011; Huang et al., 2011; Kovac et al., 2009). Moreover, obesity as well as metabolic syndrome results from interactions between genes and environmental factors and is associated with changes in regulatory network preferentially in adipose tissue (Duong et al., 2011; Ruderman et al., 2013; Shimba et al., 2011). Adipose tissue growth is tightly associated with obesity and controlled by different regulatory factors as well as interconnected with various organs and tissues including blood (Lee and Ozcan, 2014; Ozcan et al., 2004). Obesity is a well-known risk factor for the development of secondary complications such as type 2 diabetes; however, only a part of the obese population develops secondary metabolic disorders (Meissburger et al., 2011).

The obesity and its metabolic complications have been linked to cell growth, insulin resistance, and glucose in tolerance through changing of numerous gene expressions, which control basic metabolic

processes (Bashta et al., 2014; Minchenko et al., 2013; Oberauer et al., 2010; Ratushna et al., 2012). Special interest represents protein phosphatases including a family of dual specificity phosphatases (DUSP), which play an important role in the regulation a wide array of different physiological events, including cellular growth and proliferation, mitochondrial function and biogenesis, and activity of numerous factors and enzymes (Bray and Young, 2011; Cagnol and Rivard, 2013; Groschl et al., 2013; Piya et al., 2012). These phosphatases participate in the control of cell cycle progression and cell proliferation as well as apoptosis by very precisely changing a multitude of enzymatic reactions among which protein dephosphorylation both the phosphoserine/threonine and phosphotyrosine residues their target proteins, especially kinases, which are tightly associated with cellular proliferation (Bray and Young, 2011; Cagnol and Rivard, 2013; Groschl et al., 2013; Piya et al., 2012). Thus, protein phosphatase DUSP1 is essential for the prevention of apoptosis induced by deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2 (Cagnol and Rivard, 2013). It is interesting that DUSP6, as a novel transcriptional target of TP53, regulates TP53-mediated apoptosis by modulating

expression levels of BCL2 family proteins (Piya et al., 2012).

Lysyl oxidase (LOX) plays an important role in the regulation of cell proliferation and death, because LKB1 loss of function promotes lung cancer malignancy through remodeling of extracellular matrix microenvironment (Gao et al., 2010). Keratin 18 (KRT18), also known as cell proliferation-inducing gene 46 protein, is a multifunctional protein and controls both cell proliferation and apoptosis and is a potential cell death biomarker (John et al., 2013; Koruk et al., 2012). The hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 (HSD17B10) also known as mitochondrial ribonuclease P protein 2 (MRPP2) as well as HSD17B2 is a multifunctional protein, which catalyzes the oxidation of a wide variety of fatty acids, alcohols, and steroids as well as participates in cleavage of tRNA molecules in their 5'-ends and is required for mitochondrial integrity and cell survival (Rauschenberger et al., 2010).

Endoplasmic reticulum stress is also recognized as an important determinant of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance and contributes to the expression profile of many regulatory genes resulting in peripheral insulin resistance and other obesity complications (Lee and Ozcan, 2014; Minchenko et al., 2014; Ozcan et al., 2004; Wang and Kaufman, 2012; Yuzefovych et al., 2013), although detailed molecular mechanisms cannot be ruled out.

It is possible that identification of real mechanisms of metabolic abnormalities in obesity as well as its complications at molecular and cellular levels helps to better understanding why obesity develops and why only a part of the obese individuals develops secondary metabolic disorders. However, a detailed molecular mechanism of the involvement of different genes of regulatory network in the development of obesity and its complications are not clear yet and remains to be determined.

The main goal of this work was to clarify the role of the subset of gene expressions, encoding for important cell growth and surviving factors and enzymes, in blood cells of obese boys for evaluation of its possible significance to development of obesity and insulin resistance.

Materials and Methods. The 15 boys participate in this study. They were divided into three equal groups (5 subjects in each group): normal individuals as control and patients with obesity and with or without insulin resistance. All participants gave written informed consent and the studies were approved by the local research ethics committees of Institute of Children and Adolescent Health Care of

the National Academy of Medical Science of Ukraine.

Clinical characteristics of the study participants are shown in Table 1. The normal (control) participants were individuals with mean age 14 ± 0.7 years and mean body mass index (BMI) 18.7 ± 0.12 kg/m². The obese participants with normal insulin sensitivity as well as the patients with insulin resistance were individuals with mean age (14 ± 0.6 and 14 ± 0.4 years, correspondingly) and mean BMI (31.0 ± 0.40 and 34.2 ± 2.39 kg/m², correspondingly).

Table 1.
Characteristics of the study participants

<i>Variable</i>	<i>Control</i>	<i>Obesity</i>	<i>Obesity + IR</i>
Age at visit (years) (n)	14 ± 0.73 (5)	14 ± 0.6 (5)	14 ± 0.38 (5)
Body mass index (BMI) (kg/m ²) (n)	18.7 ± 0.12 (5)	31 ± 0.40 * (5)	34.2 ± 2.39 * (5)
Insulin resistance index (HOMA) (n)	2.36 ± 0.17 (5)	2.70 ± 0.28 (5)	8.70 ± 1.41 *^ (5)
Fasting insulin μ IU/ml) (n)	13.0 ± 0.95 (5)	14.1 ± 1.35 (5)	43.4 ± 6.70 *^ (5)

*Note: Data are means \pm SEM; IR – insulin resistance; * - $P < 0.05$ versus control group; ^ - $P < 0.05$ versus obese group.*

Thus, BMI, which is a main criteria of obesity, in these last two groups of patients was significantly higher (+66 and +83 %, correspondingly; $P < 0.05$ in both cases) as compared to control individuals (Table 1). Moreover, no significant changes were found in insulin resistance index in obese individuals as compared to control group, but in obese patients with impaired insulin sensitivity, versus control boys as well as obese subjects with normal insulin sensitivity, the insulin resistance index is significantly increased (3.7 and 3.2 fold, correspondingly; $P < 0.05$ in both cases), but decreased (almost two fold; $P < 0.05$) (Table 1). Similar results were observed in the fasting insulin levels: no significant changes in obese individuals and strong increase in obese children with insulin resistance (3.3 fold; $P < 0.05$) as compared to control group.

RNA isolation. Trisol reagent (Invitrogen, USA) was used for RNA extraction from blood of lean (control) and obese individuals with or without insulin resistance.

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. The expression levels of genes related to regulation of an angiogenesis (*DUSP1*, *LOX*, *KRT18*, *HSD17B2*, and *HSD17B10*) were measured in blood cells by real-

time quantitative polymerase chain reaction of complementary DNA (cDNA). QuaniTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis. The 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Absolute QPCR SYBRGreen Mix (Thermo Scientific, UK) and pair of primers specific for each studied gene (Sigma/Aldrich, USA) were used for quantitative polymerase chain reaction.

The expression levels of genes related to regulation of an angiogenesis (*DUSP1*, *LOX*, *KRT18*, *HSD17B2*, and *HSD17B10*) were measured in blood cells by real-time quantitative polymerase chain reaction of complementary DNA (cDNA). QuaniTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis. The 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Absolute QPCR SYBRGreen Mix (Thermo Scientific, UK) and pair of primers specific for each studied gene (Sigma-Aldrich, USA) were used for quantitative polymerase chain reaction.

For amplification the cDNA for *DUSP1* (dual specificity phosphatase 1), which also known as *MKP1* (mitogen-activated protein kinase phosphatase 1), we used next primers: forward 5'-ctgcttgcacacgtctca -3' and reverse 5'-acccttctccagcattctt -3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 850 – 869 and 1009 – 990 of human *DUSP1* cDNA (GenBank accession number NM_004417). The size of amplified fragment is 160 bp.

The amplification of cDNA for *LOX* (lysyl oxidase) was performed using forward primer (5'-cagaggagagtggctgaagg -3') and reverse primer (5'-ccaggtagctggggtttaca -3'). These oligonucleotides correspond to sequences 1309 – 1328 and 1531 – 1512 of human *LOX* cDNA (GenBank accession number NM_002317). The size of amplified fragment is 223 bp.

For amplification the cDNA for *KRT18* (keratin 18) also known as cell proliferation-inducing gene 46 protein was used next oligonucleotide primers: forward – 5'- t -3' and reverse – 5'- c -3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 5 – 585 and 8 – 595 of human *KRT18* cDNA (GenBank accession number NM_000224). The size of amplified fragment is 2 bp.

The amplification of cDNA for *HSD17B2* (hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2) was performed using forward primer (5'-agtctgcctgctcatctgt -3') and reverse primer (5'-ttatctgcactggctctgtg -3'). These oligonucleotides correspond to sequences 310 – 329 and 608 – 589 of human *HSD17B2* cDNA (GenBank accession

number NM_002153). The size of amplified fragment is 299 bp.

For amplification of cDNA for *HSD17B10* (hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10) also known as mitochondrial ribonuclease P protein 2 (*MRPP2*) we used forward 5'- ccagcgagttcttgatgta -3' and reverse 5'- catcaccggatacctatgg -3' primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 373 – 392 and 613 – 594 of human *HSD17B10* cDNA (GenBank accession number NM_004493). The size of amplified fragment is 241 bp.

The amplification of beta-actin (*ACTB*) cDNA was performed using forward - 5'- ggacttcgagcaagatgg -3' and reverse - 5'- agcactgtgtggcgtacag -3' primers. These primers nucleotide sequences correspond to 747 – 766 and 980 – 961 of human *ACTB* cDNA (GenBank accession number NM_001101). The size of amplified fragment is 234 bp. The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity. The primers were received from "Sigma" (USA).

The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity. The amplified DNA fragments were analyzed on a 2 % agarose gel and that visualized by 5x Sight DNA Stain (EUROMEDEA). An analysis of quantitative PCR was performed using special computer program "Differential expression calculator".

Statistical analyses were performed according to Student's *t*-test using OriginPro 7.5 software. All values are expressed as mean ± SEM from four independent experiments; $P < 0.05$ was considered as significant difference.

Results and Discussion. We studied the expression of *DUSP1*, *LOX*, *KRT18*, *HSD17B2*, and *HSD17B10* genes, which preferentially responsible for control of cell growth and surviving, in the blood cells of obese boys with normal as well as impaired insulin sensitivity and compared to control lean individuals. As shown in Fig. 1, the expression level of *DUSP1* gene is decreased (-14 %; $P < 0.05$) in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to control group. Insulin resistance in obese boys leads to down-regulation of *DUSP1* gene expression (more than in 2 fold; $P < 0.05$) in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity. These data correlates with previous result concerning *DUSP1* gene expression in fat tissue of obese men with normal glucose tolerance (Bashta et al., 2014), because in subcutaneous fat tissue as well as in blood cells obesity decreases the expression level of *DUSP1* gene.

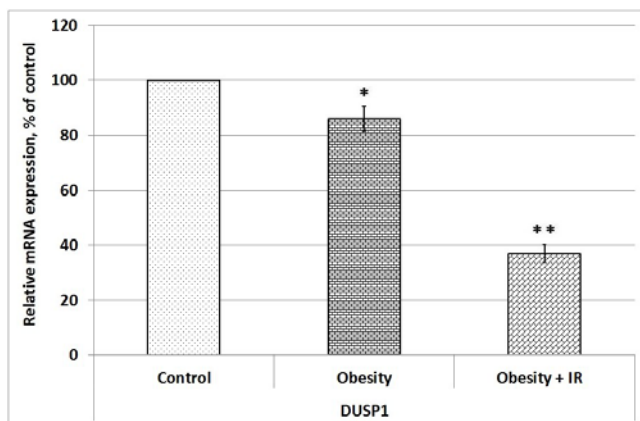


Fig. 1. Relative expression level of dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) mRNA in blood cells of lean boys (control) and obese individuals without (obesity) and with insulin resistance (obesity + IR). The values of DUSP1 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); n = 4; * - P < 0.05 vs group of control individuals; ** - P < 0.05 vs group with obesity and normal insulin sensitivity.

It is possible that decreased expression of *DUSP1* gene in obesity contributes to fat tissue growth through control of cell cycle and apoptosis (Cagnol and Rivard, 2013) as well as to insulin resistance, because in obese children with insulin resistance we observed additional two-fold down-regulation of this gene expression. Results of *LOX* gene expression is presented in Fig. 2. The expression level of *LOX* gene is also decreased (-16 %; P < 0.05) in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to control patients. Moreover, in obese boys with insulin resistance we observed additional down-regulation of *LOX* gene expression (-12 %; P < 0.05) in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity (Fig. 2).

Decreased expression of lysyl oxidase gene, that plays an important role in the regulation of cell proliferation and death, also agrees to data of other researcher, which have been shown increased lung cancer malignancy through remodeling of extracellular matrix microenvironment in case of LKB1 loss of function (Gao et al., 2010). Thus, our results demonstrate that down-regulation of *LOX* expression may contribute to development of obesity and possibly to impairment insulin sensitivity, because insulin resistance is associated with additional decreasing of this gene expression.

As shown in Fig. 3, the expression level of *KRT18* gene does not change significantly in blood cells of obese individuals with normal insulin sensitivity as compared to control group.

At the same time, development of insulin resistance in obese boys leads to down-regulation of *KRT18* gene expression (-20 %; P < 0.05) in blood cells as compared to obese children with normal

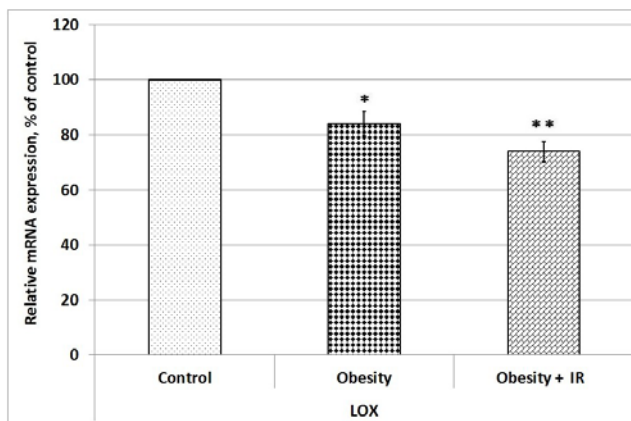


Fig. 2. Relative expression level of lysyl oxidase (LOX) mRNA in blood cells of lean boys (control) and obese individuals with and without insulin resistance (obesity + IR). The values of LOX mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); n = 4; * - P < 0.05 vs group of control individuals; ** - P < 0.05 vs group with obesity and normal insulin sensitivity.

insulin sensitivity. Decreased expression of multifunctional protein keratin 18, which controls apoptosis and is a potential cell death biomarker, possibly also reflects its contribution to obesity through down-regulation of cell apoptosis (John et al., 2013).

We also studied the expression of *HSD17B2* gene in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity and compared this data to control group (Fig. 4). As shown in Fig. 4, the expression level of *HSD17B2* gene does not change significantly in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to control group, but insulin resistance in obese boys leads to down-regulation of *HSD17B2* gene expression (-22 %; P < 0.05) in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity.

As shown in Fig. 5, the expression level of *HSD17B10* gene is also decreased (-14 %; P < 0.05) in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to group of control children. Furthermore, impaired glucose tolerance in obese individuals induces additional suppression of *HSD17B10* gene expression (-37 %; P < 0.05) in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity.

Decreased expression level of *HSD17B2* and *HSD17B10* genes in obesity with impaired insulin sensitivity possibly reflects dysregulation of numerous metabolic processes at this disease including mitochondrial dysfunction as a result of endoplasmic reticulum stress (Casteel et al., 2010; Duong et al., 2011; Rauschenberger et al., 2010; Wang and Kaufman, 2012).

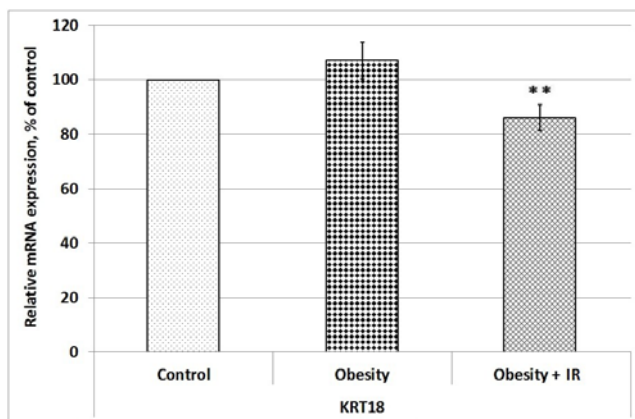


Fig. 3. Relative expression level of keratin 18 (KRT18), also known as cell proliferation-inducing gene 46 protein, mRNA in blood cells of lean boys (control) and obese individuals with and without insulin resistance (obesity + IR). The values of KRT18 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 4$; * - $P < 0.05$ vs group of control individuals; ** - $P < 0.05$ vs group with obesity and normal insulin sensitivity.

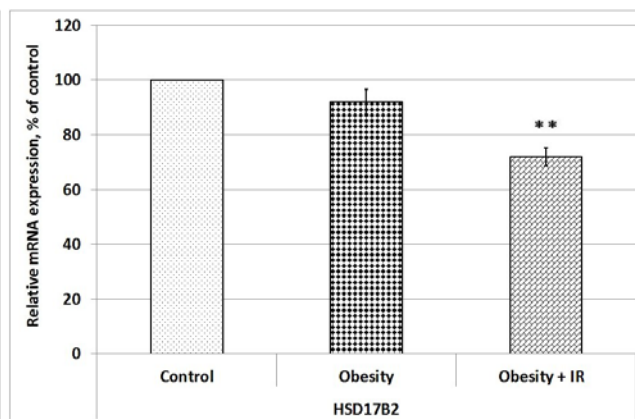


Fig. 4. Relative expression level of hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (HSD17B2) mRNA in blood cells of lean boys (control) and obese individuals with and without insulin resistance (obesity + IR). The values of HSD17B2 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 4$; * - $P < 0.05$ vs group of control individuals; ** - $P < 0.05$ vs group with obesity and normal insulin sensitivity.

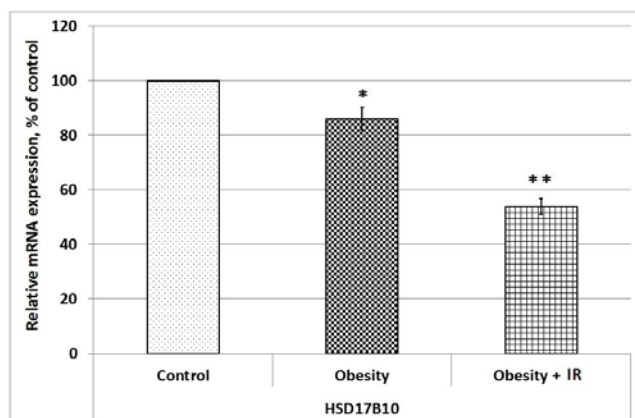


Fig. 5. Relative expression level of hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 (HSD17B10), also known as mitochondrial ribonuclease P protein 2 (MRPP2), mRNA in blood cells of lean boys (control) and obese individuals with and without insulin resistance (obesity + IR). The values of HSD17B10 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 4$; * - $P < 0.05$ vs group of control individuals; ** - $P < 0.05$ vs group with obesity and normal insulin sensitivity.

Moreover, the development of endoplasmic reticulum stress in obesity and its metabolic complication as well as changes in the expression level of genes, which control cell growth and apoptosis, have some similarity with that in cancer initiates hypothesis that obesity is a major risk factor for cancer (De Pergola and Silvestris, 2013).

Thus, insulin resistance in obese boys leads to down-regulation of gene expressions in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity. Results of this study provide evidence that obesity affects the expression of the subset of genes related to cell growth and surviving in blood cells and that insulin resistance in obesity is associated with changes in the expression level of *DUSP1*, *LOX*, *KRT18*, *HSD17B2*, and *HSD17B10* genes, which contribute to the development of obesity and glucose intolerance and possibly reflect the changes in fat and other tissues.

Conclusions. 1. It was shown that the expression level of *DUSP1*, *LOX*, and *HSD17B10* genes is decreased in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to control group.

2. Glucose intolerance in obese boys leads to down-regulation of *DUSP1*, *LOX*, *KRT18*, *HSD17B2*, and *HSD17B10* gene expressions in blood cells as compared to obese patients with normal insulin sensitivity.

3. Results of this study provide evidence that obesity affects the expression of the subset of genes related to cell growth and surviving in blood cells and that insulin resistance in obesity is associated with changes in the expression level of *DUSP1*, *LOX*, *KRT18*, *HSD17B2*, and *HSD17B10* genes, which contribute to the development of obesity and glucose intolerance.

References:

1. Bashta Y.M., Minchenko D.O., Bova D.O., Kovalevska O.V., Minchenko O.H. Expression of

- protein phosphatase DUSP genes in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal and impaired glucose tolerance. *Biol. Systems.* – 2014. – 6, N 1. – P. 3–9.
2. Bray M.S., Young M.E. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease // *Obes. Rev.* – 2009. – 10, Suppl 2. – P. 6–13.
 3. Bray MS, Young ME: Regulation of fatty acid metabolism by cell autonomous circadian clocks: time to fatten up on information? // *J. Biol. Chem.* – 2011. – 286, N 14. – P. 11883–11889.
 4. Cagnol S., Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition // *Oncogene.* – 2013. – 32, N 5. – P. 564–576.3.
 5. Casteel M., Nielsen C., Kothlow S., Dietrich R., Martlbauer E. Impact of DUSP1 on the apoptotic potential of deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2 // *Toxicol. Lett.* – 2010. – 199, N 1. – P. 43–50.
 6. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J. Obes.* – 2013. – 2013. – P. 291546.
 7. Duong H.A., Robles M.S., Knutti D., Weitz C.J. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback // *Science.* – 2011. – 332. – P. 1436–1439.
 8. Gao Y., Xiao Q., Ma H., Li L., Liu J., Feng Y., Fang Z., Wu J., Han X., Zhang J., Sun Y., Wu G., Padera R., Chen H., Wong K.K., Ge G., Ji H. LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – 107, N 44. – P. 18892–18897.
 9. Groschl B., Bettstetter M., Giedl C., Woenckhaus M., Edmonston T., Hofstadter F., Dietmaier W. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation // *Int. J. Cancer.* – 2013. – 132, N 7. – P. 1537–1546.
 10. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism // *J. Clin. Invest.* – 2011. – 121. – P. 2133–2141.
 11. Casteel M., Nielsen C., Kothlow S., Dietrich R., Martlbauer E. Impact of DUSP1 on the apoptotic potential of deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2 // *Toxicol. Lett.* – 2010. – 199, N 1. – P. 43–50.
 12. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J. Obes.* – 2013. – 2013. – P. 291546.
 13. Duong H.A., Robles M.S., Knutti D., Weitz C.J. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback // *Science.* – 2011. – 332. – P. 1436–1439.
 14. Gao Y., Xiao Q., Ma H., Li L., Liu J., Feng Y., Fang Z., Wu J., Han X., Zhang J., Sun Y., Wu G., Padera R., Chen H., Wong K.K., Ge G., Ji H. LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – 107, N 44. – P. 18892–18897.
 15. Groschl B., Bettstetter M., Giedl C., Woenckhaus M., Edmonston T., Hofstadter F., Dietmaier W. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation // *Int. J. Cancer.* – 2013. – 132, N 7. – P. 1537–1546.
 16. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism // *J. Clin. Invest.* – 2011. – 121. – P. 2133–2141.
 17. John K., Wielgosz S., Schulze-Osthoff K., Bantel H., Hass R. Increased plasma levels of CK-18 as potential cell death biomarker in patients with HELLIP syndrome // *Cell Death Dis.* – 2013. – 4. – P. E886.
 18. Koruk I, Ozdemir H, Aydinli M, Bekmen N, Tarakcioglu M and Koruk M. The relation between serum cytokeratin 18 and acute pancreatitis: can it be a serological predictive marker? *Turk J Gastroenterol.* – 2012. – 23, N 6. – P. 759–763.
 19. Kovac J, Husse J, Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock // *Mol. Cells.* – 2009. – 282. – P. 75–80.
 20. Lee J., Ozcan U. Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases // *J. Biol. Chem.* – 2014. – 289, N 3. – P. 1203–1211.
 21. Meissburger B., Ukropec J., Roeder E., Beaton N., Geiger M., Teupser D., Civan B., Langhans W., Nawroth P.P., Gasperikova D., Rudofsky G., Wolfrum C. Adipogenesis and insulin sensitivity in obesity are regulated by retinoid-related orphan receptor gamma // *EMBO Mol. Med.* – 2011. – 3. – P. 637–651.
 22. Minchenko O.H., Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Kovalevska O.V., Kulinich A.O., Lypova N.M. Molecular mechanisms of ERN1-mediated angiogenesis // *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* – 2014. – 5, N 1. – P. 1–22.
 23. Minchenko D., Ratushna O., Bashta Y., Herasyenko R., Minchenko O. The expression of TIMP1, TIMP2, VCAN, SPARC, CLEC3B and E2F1 in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance // *CellBio.* – 2013. – 2, N 2. – P. 25–33.
 24. Oberauer R., Rist W., Lenter M.C., Hamilton B.S., Neubauer H. EGFL6 is increasingly expressed in human obesity and promotes proliferation of adipose tissue-derived stromal vascular cells // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – 343, N 1-2. – P. 257–269.
 25. Ozcan U., Cao Q., Yilmaz E., Lee A.H., Iwakoshi N.N., Ozdelen E., Tuncman G., Gorgun C., Glimcher L.H., Hotamisligil G.S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes // *Science.* – 2004. – 306. – P. 457–461.
 26. Piya S., Kim J.Y., Bae J., Seol D.W., Moon A.R., Kim T.H. DUSP6 is a novel transcriptional target of p53 and regulates p53-mediated apoptosis by modulating expression levels of Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett.* – 2012. – 586, N 23. – P. 4233–4240.
 27. Ratushna O.O., Minchenko D.O., Danilovskiy S.V., Klimes I., Minchenko O.H. Expression of anti-angiogenic genes in subcutaneous adipose tissue of the obese individuals with pre-diabetes and type 2 diabetes // *Studia Biologica.* – 2012. – 6, N 2. – P. 17–32.
 28. Rauschenberger K., Scholer K., Sass J.O., Sauer S., Djuric Z., Rumig C., Wolf N.I., Okun J.G., Kolker S., Schwarz H., Fischer C., Grziwa B., Runz H., Numann A., Shafqat N., Kavanagh K.L., Hammerling G.,

- Wanders R.J., Shield J.P., Wendel U., Stern D., Nawroth P., Hoffmann G.F., Bartram C.R., Arnold B., Bierhaus A., Oppermann U., Steinbeisser H., Zschocke J. A non-enzymatic function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 is required for mitochondrial integrity and cell survival // *EMBO Mol. Med.* – 2010. – 2, N 2. – P. 51 – 62.
29. Ruderman N.B., Carling D., Prentki M., Cacicedo J.M. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome // *J. Clin. Invest.* – 2013. – 123, N 7. – P. 2764 – 2772.
30. Shimba S., Ogawa T., Hitosugi S., Ichihashi Y., Nakadaira Y., Kobayashi M., Tezuka M., Kosuge Y., Ishige K., Ito Y., Komiyama K., Okamoto-Ogura Y., Kimura K., Saito M. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation // *PLoS One.* – 2011. – 6. – P. e25231.
31. Wang S., Kaufman R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease // *J. Cell. Biol.* – 2012. – 197, N 7. – P. 857 – 867.
32. Yuzefovych L.V., Musiyenko S.I., Wilson G.L., Rachek L.I. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice // *PLoS One.* – 2013. – 8, N 1. – P. e54059.

РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ДО ІНСУЛІНУ ЗМІНЮЄ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ РІСТ ТА ВИЖИВАННЯ КЛІТИН, У КЛІТИНАХ КРОВІ ДІТЕЙ ЧОЛОВІЧОЇ СТАТІ ЗА УМОВ ОЖИРІННЯ

**О. В. Тяжка, Д. О. Мінченко, В. В. Давидов, О. А. Бурдейко, О. С. Молявко,
Д. К. Кулешова, О. Г. Мінченко**

Розвиток ожиріння та його метаболічних ускладнень асоціюється з дисрегуляцією численних важливих механізмів, що контролюють більшість ключових метаболічних процесів, включаючи чутливість до інсуліну та ріст і виживання клітин. Ми вивчали експресію генів, що відповідають за контроль процесів росту і виживання клітин, у клітинах крові у дітей чоловічої статі з ожирінням і нормальною або порушеною чутливістю до інсуліну у порівнянні з дітьми без ожиріння (контроль). Встановлено, що рівень експресії генів DUSP1, LOX та HSD17B10 зменшується у клітинах крові дітей з ожирінням з нормальною чутливістю до інсуліну порівняно з контрольною групою. Резистентність до інсуліну у дітей з ожирінням призводить до пригнічення експресії генів DUSP1, LOX, KRT18, HSD17B2, та HSD17B10 у клітинах крові при порівнянні з дітьми, що мали ожиріння і нормальну чутливість до інсуліну. Результати цього дослідження продемонстрували, що ожиріння порушує експресію групи генів, які контролюють процеси росту і виживання клітин і що резистентність до інсуліну асоціюється зі змінами в рівні експресії генів DUSP1, LOX, KRT18, HSD17B2 та HSD17B10, які задіяні у розвитку ожиріння та резистентності до інсуліну і можливо віддзеркалюють зміни у жировій та інших тканинах.

Ключові слова: експресія мРНК, LOX, DUSP1, KRT18, HSD17B2, HSD17B10, кров, ожиріння, резистентність до інсуліну.

Одержано редколегією 01.09.2014

ОТРИМАННЯ РОСЛИН-ТРАНСФОРМАНТІВ, ЩО НЕСУТЬ РЕПОРТЕРНИЙ ГЕН ПІД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА *APX2*

Т. О. РУСНАК, І. І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
бул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

Аскорбатпероксидаза (*APX*) являє собою фермент, що бере участь у захисті рослинних клітин від оксидативного стресу. У *Arabidopsis thaliana*, *APX* кодується малою мультигенною родиною, що включає 8 генів. 8 ізоформ *APX* присутні в хлоропластах, пероксисомах і цитозолі та диференційно активуються у відповідь на абіотичний стрес. *Arx2* є типовим стрес-індукованим геном, який експресується тільки за стресових умов. Для того, щоб з'ясувати стрес-залежну експресію промотора гену *Arx2* в різних органах і тканинах *A. thaliana*, ця ділянка була ампліфікована за допомогою ПЛР та клонована. Промотор був об'єднаний з репортерним геном *uidA*, що кодує β-глюкоронідазу та введений в рослини *A. thaliana* дикого типу, з використанням методу агробактеріальної трансформації. Трансгенні рослини були ідентифіковані за допомогою гербіциду *BASTA*. Наявність рекомбінантного конструкту у рослин було підтверджено за допомогою ПЛР. В цілому було відібрано 7 незалежних ліній, в складі яких містився рекомбінантний конструкт *Pro-APX2: GUS*.

Ключові слова: промотор *Arx2*, бінарний вектор, трансгенні рослини, *BASTA*, репортерний ген

Вступ. Для рослинних організмів характерна наявність мультигенних родин. Причиною цього є те, що ферменти які кодуються членами цих родин функціонують у різних клітинних компартментах та у різних рослинних тканинах (Arondel et al., 2000; Li et al., 2002; Chen et al., 2011; Grégoire et al., 2012).

Одну з мультигенних родин утворюють гени, що кодують аскорбат пероксидазу (*APX*) – фермент, що розщеплює пероксид водню і відіграє важливу роль у захисті клітини від оксидативного стресу. У арабідопсису відомо 8 генів, що кодують цитозольні, хлоропластні та мікосомальні ізоформи *APX* (Shigeoka et al., 2002; Dabrowska et al., 2007). Наявність декількох ізоформ *APX* вказує на їх індивідуальну спеціалізацію, яка пов'язана з функціонуванням у різних клітинних компартментах, диференційною експресією в онтогенезі (Dabrowska et al., 2007; Panchuk et al., 2002). Згідно сучасним уявленням *Arx2* є типовим стресовим геном, який кодує цитозольну ізоформу *APX*. Транскрипти *Arx2* практично відсутні у клітині за оптимальних умов культивування, але рівень їх різко зростає в умовах стресу. Зокрема за дії теплового шоку експресія *Arx2* може зростати у тисячі разів (Panchuk et al., 2002). Було показано, що крім того експресія *Arx2* зростає за дії абсцизової кислоти, сольового та осмотичного стресів, а також у відповідь на поранення та в умовах надмірного освітлення (Karpinski et al., 1997; Chang et al., 2004; Rossel et al., 2006; Galvez-Valdivieso et al.,

2009; Suzuki et al., 2012). Поряд з цим низка інших абіотичних факторів, зокрема підвищені концентрації іонів важких металів та дія гербіциду паракват не впливає на експресію *Arx2*.

Вважається, що експресія *Arx2* контролюється транскрипційними факторами HSF (Heat Shock Transcription Factor) (Panchuk et al., 2002) та *Zat10* (Mittler et al., 2006). Проте, регуляція експресії гену *Arx2* у різних органах та тканинах рослин залишається не вивченою. Тому метою нашої роботи, було створення рекомбінантного конструкту, що містить репортерний ген під контролем промотора *Arx2* та трансформація отриманої рекомбінантної ДНК у *A. thaliana* для подальшого вивчення характеру його експресії у різних органах рослини за дії теплового стресу.

Матеріали та методи. Рослинну ДНК виділяли використовуючи лізуючий буфер, який містив: 3% цетавлон; 20 мМ ЕДТА; 5М NaCl та 1М трис-HCl. Отриману ДНК використовували як матрицю у ПЛР. Для ампліфікації промоторної ділянки гену *Arx2* використовували праймери *APX2-DON* (GATATGCTACGTTTT TACATCTCCATTTCTTACTTTCG) та *APX-PB* (CTATACGCGTTTTTTTCAAATTCGCTTCCSTTC), які містили на 5 кінці додатковий сайт впізнавання для рестриктази *Mlu* I, необхідний для клонування у векторну плазмиду pLitmus38. Кількість ДНК для проведення ПЛР складала близько 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1x буфер

для ПЛР (Phusion HF Buffer, Finnzymes), суміш dNTP – 0.2 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (Phusion DNA Polymerase, Finnzymes) – 1 од. активності на реакцію та 25 мМ MgCl₂. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл.

ПЛР проводилася з використанням приладу MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95°C, 2 хв; (2) денатурація ДНК – 94°C, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 56°C, 50 с; (4) синтез ДНК – 72°C, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72°C, 1 хв; (6) припинення реакції – 4°C. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Для аналізу результатів ПЛР використовували електрофорез у 1% агарозному гелі. Продукти ПЛР реакції обробляли рестриктазою *Mlu* I, лігували у pLitmus38 та перевіряли ідентичність клонованої послідовності сиквенуванням. Після цього промоторну ділянку *Arx2* переклоновували у бінарний вектор pGPTV, який містив репортерний ген *uidA*, що кодує β-глюкоронідазу (GUS).

Лігування проводили з використанням Т4 ДНК лігази (Fermentas, Литва). Лігазну суміш інкубували за 22°C протягом двох годин. Продукти лігування трансформували у компетентні клітини лінії *Escherichia coli* лінії XL-blue або *Agrobacterium tumifaciens* лінії GV3101 методом електропорації з використанням приладу *E. Coli* Pulser (BioRad, США). Присутність вставки у складі рекомбінантних плазмід підтвердили методом рестриктазного картування або з використанням ПЛР.

Визначення довжини продуктів рестриктазної реакції або ПЛР здійснювали в 1 % агарозному гелі. В якості ДНК-маркера використовували GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Візуалізацію ДНК проводили в ультрафіолетовому світлі з використанням програмного забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Сиквенування отриманих рекомбінантних плазмід проводили з використанням Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST.

Для трансформації використовували квітучі рослини *Arabidopsis thaliana*, екотип Col 0. Трансформацію гаметофітів рослин проводили методом вакуумної інфільтрації. Трансформацію

проводили з використанням інфільтраційного середовища, в склад якого входить: 0.5X поживне середовище Мурасіге-Скуга; вітамін B5 112мг/л; 5% сахароза; 0.005% Silwet Gold; 0.44 мкМ БАП (Bechtold et al., 1993).

Для скринінгу рослин-трансформантів використовували гербіцид BASTA у концентрації 1 мл/л.

Результати та обговорення. Першим кроком нашої роботи було отримання ДНК повнорозмірного промотора *Arx2* шляхом ПЛР ампліфікації. Для цього нами було проведено пошук нуклеотидних послідовностей для гену *Arx2* арабідопсису у базі даних Genbank. Знайдену послідовність було проаналізовано, визначено границі промотора та створено праймери для ампліфікації.

Електрофоретичний аналіз отриманих ПЛР-продуктів показав наявність лише одного ампліфікату. Його довжина становила 741 пн, що відповідає теоретично очікуваному розміру.

Отримані ампліфікати обробляли рестриктазою *Mlu* I та клонували у бактеріальний вектор pLitmus38. Використання методу *blue-white colony selection* для скринінгу, що дало можливість ідентифікувати серед бактерій-трансформантів 25 білих колоній, 4 з яких (А-01, А-02, А-03, А-04) було відібрано для подальшої роботи. Після виділення із цих колоній рекомбінантних плазмід їх обробляли рестриктазою *Mlu* I. Після електрофоретичного аналізу отриманих продуктів рестрикції в кожному випадку було ідентифіковано по два фрагмента, довжина одного з яких відповідала довжині вектора, а іншого – очікуваній довжині ПЛР продукту промотора *Arx2*, що клонувався.

Для перевірки ідентичності клонованої ДНК промотора *Arx2* було проведено сиквенування двох рекомбінантних плазмід – pArx2_A-01 та pArx2_A-02. Порівняння отриманих сиквенсів показало, що послідовність обох клонів була ідентичною з наявною у Genbank, що дозволило використати ці клони для подальшої роботи.

Для трансформації рослин необхідно було мати послідовність промотора *Arx2*, яка контролює експресію репортерного гену *uidA*. Щоб створити відповідний рекомбінантний конструкт (рис. 1), необхідно було у бажаній орієнтації перенести клонований нами промотор *Arx2* до складу бінарного вектору pGPTV-BAR (Becker et al., 1992). Для забезпечення направленного клонування було розроблено пару праймерів які додатково несли на 5-кінці із сайтами впізнавання різних рестриктаз. Прямий праймер містив сайт впізнавання рестриктази *Nhe* I, а зворотній – для *Mlu* I.

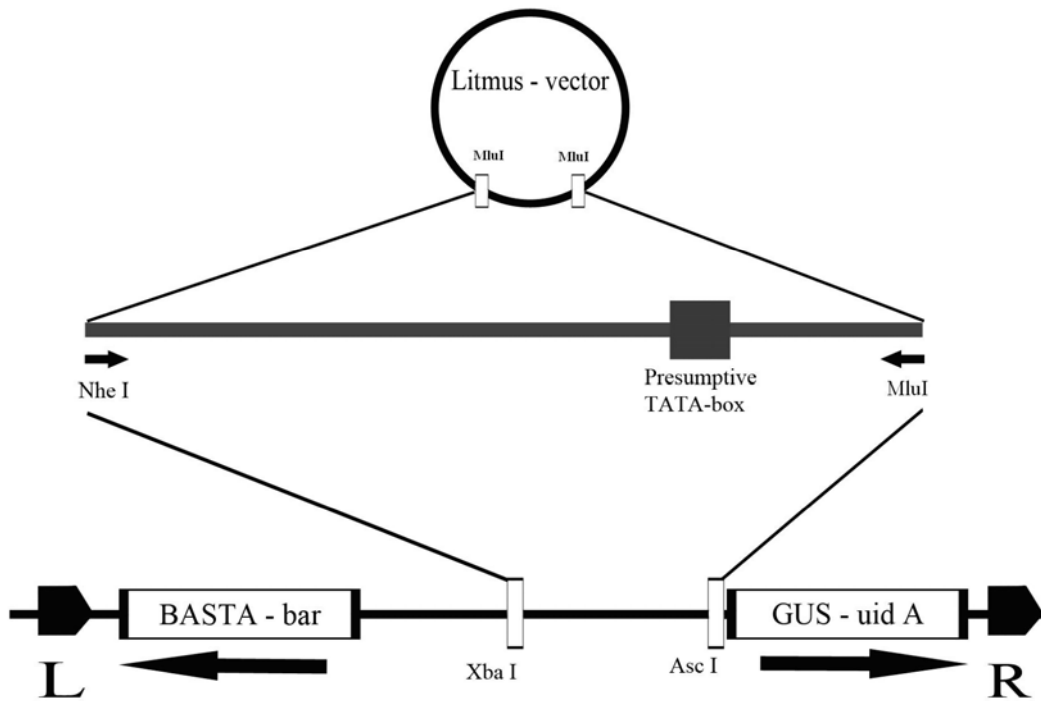


Рис. 1. Рекombінантний конструктор Pro-APX2:GUS.

Fig. 1. Recombinant construct Pro-APX2:GUS.

Липкі кінці, що утворюються в результаті розщеплення ДНК цими рестриктазами комплементарні до таких, що утворюються в результаті дії рестриктаз *Xba I* та *Asc I*, які наявні у полілінкерному сайті бінарного вектора.

Як матрицю для ПЛР було використано клон рАрх2_A-01. Отриманий ПЛР продукт було розщеплено відповідними рестриктазами та лігровано у бінарний вектор рGPTV-BAR (Becker et al., 1992). Цей бінарний вектор біля правої границі Т-ДНК містить репортерний ген глюкокоронази (*uidA*), а біля лівої границі Т-ДНК – селективний маркер – ген стійкості до гербіциду BASTA, який використовується для скринінгу трансформованих рослин.

Переклювання промоторної ділянки *Arx2* у бінарний вектор проводили між цими генами. Крім того, вектор рGPTV-BAR несе ген, який забезпечує стійкість до антибіотику канаміцину. Після трансформації у агробактерії на селективному середовищі, яке містило антибіотики канаміцин, гентаміцин та рифампіцин було відібрано 6 колоній, з яких було виділено ДНК. Методом ПЛР була показана присутність інсерції (рис. 2), яка являє собою послідовність промотора *Arx2*. Для подальшої трансформації у рослини була відібрана колонія рАрх2_A-01-1.

Для проведення трансформації рослин клітини дводенної культури *Agrobacterium tumifaciens* лінії GV3101, що містили рекombінантний конструктор, інкубували протягом 2 днів при

температурі 28°C. Середовище для інкубування містило 10 г пептону; 5г дріжджового екстракту; 10г NaCl та антибіотики канаміцин 50 мг/мл, гентаміцин 40 мг/мл, рифампіцин 50 мг/мл. Клітини осаджували центрифугуванням при 4 тис.об/хв. протягом 10 хв. та вносили в інфільтраційне середовище такого складу: 0.5 X поживне середовище Мурасіге-Скуга; вітамін B5 112 мг/л; 5% сахароза; 0.005% Silwet Gold; 0,44 мкМ БАП. Концентрацію клітин в інфільтраційному середовищі визначали за оптичною густиною клітин при довжині хвилі 590 нм. Необхідна оптична густина поглинання становила 0,9. Цією агробактеріальною культурою трансформували гаметофіти.

З рослин, гаметофіти яких було трансформовано, збирали насіння та висаджували його у ґрунт. Для зручності проведення маніпуляцій для висадки насіння використовували ємність з низькими бортами та великою площею. Десяти- та 14- денні проростки обприскували гербіцидом BASTA. В результаті такої обробки було виявлено 7 резистентних рослин, що представляють собою перше покоління рослин-трансформантів (T1).

Для підтвердження того, що рослини дійсно містять бажаний рекombінантний конструктор, з кожної індивідуальної рослини була виділена ДНК, яка слугувала матрицею для ПЛР. При цьому було використано праймери, комплементарні до гену *uidA*.

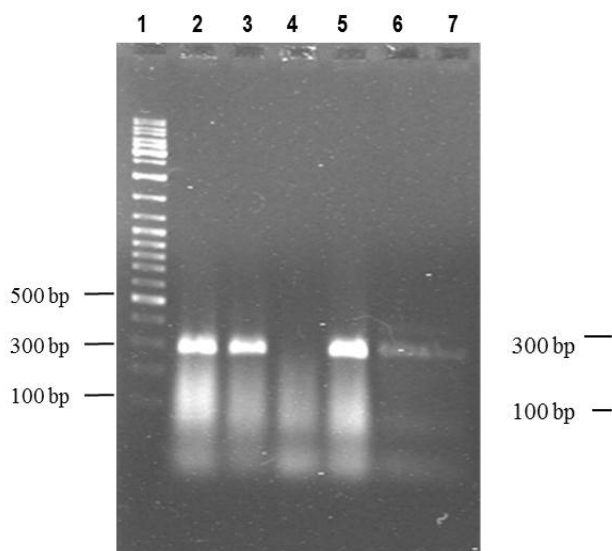


Рис. 2. Скринінг колоній *Agrobacterium tumifaciens*, трансформованих рекомбінантним конструктом *Pro-APX2:GUS*.

Примітка: 1 – маркер молекулярних мас GeneRuler Smo331; 2-7 – ПЛР-ампліфікати промотору гену *Apx2*, отримані з використанням в якості матриці ДНК агробактерії.

Fig. 2. Screening colonies of *Agrobacterium tumifaciens*, transformed with a recombinant construct *Pro-APX2: GUS*.

Note: 1 – molecular weight marker GeneRuler Smo331; 2-7 – PCR amplification products of *Apx2* gene promoter, when agrobacteria DNA was used as a matrix.

Такий дизайн праймерів забезпечував утворення ПЛР-продукту тільки в тому випадку, якщо рослина дійсно містила рекомбінантний конструкт. Аналіз продуктів ПЛР після електрофоретичного розподілу дозволив нам ідентифікувати 7 ліній рослин: ProAPX2-3, ProAPX2-4, ProAPX2-5, ProAPX2-6, ProAPX2-8, ProAPX2-10, ProAPX2-13 (рис. 3), що містили конструкт *Pro-APX2:GUS*, у складі якого присутній *Apx2* промотор та ген *uidA*.

Висновки. Для дослідження стрес-індукованої експресії гену *Apx2* у різних органах та тканинах арабідопсису було створено рекомбінантний конструкт, який складається з повнорозмірного промотора *Apx2* (Pro-*Apx2*) та гену β-глюкоронідази (*GUS*). Після проведення трансформації гаметофітів *A. thaliana* клітинами *Agrobacterium tumifaciens* лінії GV3101 отримано лінії рослин T1, сім з яких несли рекомбінантний конструкт *Pro-APX2:GUS*.

Список літератури:

1. Arondel V., Vergnolle C., Canterl C., Kader J.-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* – 2000. – Vol.157, № 1.- P. 1-12.

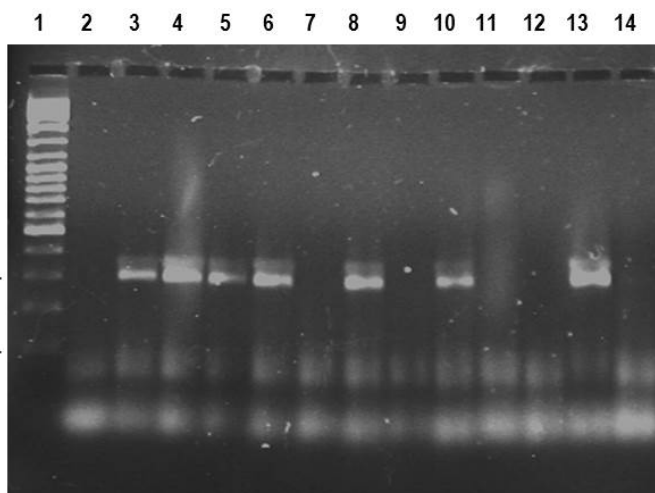


Рис. 3. Скринінг рослин *Arabidopsis thaliana*, трансформованих рекомбінантним конструктом *Pro-APX2:GUS*.

Примітка: 1 – маркер молекулярних мас GeneRuler Smo331; 2-14 – ПЛР-ампліфікати репортерного гену *uidA* (*GUS*), отримані з використанням в якості матриці ДНК рослин T1.

Fig. 3. Screening of plant *Arabidopsis thaliana*, transformed with a recombinant construct *Pro-APX2: GUS*

Note: 1 – molecular weight marker GeneRuler Smo331; 2-14 – PCR amplification products of *uidA* (*GUS*) reporter gene, when T1 plant DNA was used as a matrix.

2. Bechtold N., Ellid J., Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* – 1993. – Vol. 316. – P.1194-1199.
3. Becker D., Kemper E., Schell J., Masterson R. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 20. – P.1196-1197.
4. Chang C., Chen C., Ball L., Fryer M.J., Baker N.R., Karpinski S., Mullineaux P.M. Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis // *The Plant J.* – 2004. – Vol. 38. – P.499-511.
5. Chen X., Wang M.L., Holbrook C. Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut // *Plant. Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 29, №2. – P.389-403.
6. Dabrowska G., Kata A., Goc A., Szechynska-Hebda M., Skrzyptek E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family // *Acta Biologica Cracoviensia.* – 2007. – Vol. 49. – P. 7-17.
7. Galvez-Valdivieso G., Fryer M.J., Lawson T., Slatery W., Truman W., Smimof N., Asami T., Davies W.J., Jones A.M., Baker N.R., Mullineaux P.M. The high light response in *Arabidopsis* involves

8. Grégoire C., Rémus-Borel W., Vivancos J., Labbé C., Belzile F., Bélanger R.R. Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense* // *Plant J.* – 2012. – Vol. 72, № 2. – P. 320–330.
9. Karpinski S., Escobar C., Karspinska B., Creissen G., Mullineaux P.M. Photosynthetic electron regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis thaliana* excess light stress // *The Plant Cell.* – 1997. – Vol. 9. – P.627-640.
10. Li Y., Darley C.P., Ongaro V., Fleming A., Schipper O., Baldauf S.L., McQueen-Mason S.J. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 128. – P.854-864.
11. Mittler R., Kim Y.S., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J. Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress // *FEBS Letters.* – 2006. - № 580. – P. 6537-6542.
12. Panchuk I., Volkov R., Schöffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129, № 6. – P. 838-853.
13. Rossel J.B., Walter P.B., Hendickson L., Chow W.S., Poole A., Mullineaux P.M., Pogson D.J. A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance // *Plant Cell.* – 2006. – Vol. 29. – P.269-281.
14. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – P.1305-1319.
15. Suzuki N., Miller H., Sejima H., Harper J., Mittler R. Enhanced seed production under prolonged heat stress condition in *Arabidopsis thaliana* plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2 // *J. Exp. Bot.* – 2012. – P. 1-11.

OBTAINING TRANSGENIC PLANTS BEARING REPORTER GENE UNDER CONTROL OF APX2 PROMOTER

T. O. Rusnak, I. I. Panchuk

Ascorbate peroxidase (APX) represents an enzyme involved in plant cell protection against oxidative stress. In Arabidopsis thaliana, APX is encoded by a small multigenic family comprising 8 genes. The 8 isoforms of APX present in chloroplasts, peroxisomes and cytosol are differentially activated in response to abiotic stress. Especially, Apx2 is a typical stress-inducible gene, which is transcriptionally active only upon stressful conditions. In order to elucidate stress-dependent expression of Apx2 in different organs and tissues of A. thaliana promoter region of the gene was amplified by PCR and cloned. The promoter was fused with uidA reporter gene coding for β -glucuronidase and introduced into A. thaliana wild type plants applying Agrobacterium-mediated transformation. Transgenic plants were identified using treatment with herbicide BASTA. Presence of the recombinant construct in plants was confirmed by PCR. In total, 7 independent lineages bearing Pro-APX2:GUS fusion construct were isolated.

Key words: Apx2 promoter, binary vector, transgenic plants, BASTA, reporter gene.

Одержано редколлегією 08.09.2014

BIOTECHNOLOGY FOR OBTAINING THE RECOMBINANT HEAT SHOCK PROTEIN (HSP-60) OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* AND EVALUATION OF THE PERSPECTIVES OF ITS USE IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS

O. YU. GALKIN^{1,2}, O. B. BESARAB^{1,2}, A. S. GRYSHYNA³,
O. M. DUGAN¹, YU. M. GURZHENKO⁴

¹ National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

² Hema Ltd, Kyiv, Ukraine

³ Macquarie University, Sydney, Australia

⁴ Institute of Urology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Identification of humoral immune responses to 60 kDa heat shock protein of Chlamydia trachomatis (HSP-60) is of great diagnostic value, as evidence of probable autoimmune process and risk of pathology of female reproductive system. To develop a highly ELISA kit for the detection of anti-HSP-60 antibodies should be used recombinant antigen of the pathogen. A methodological development of biotechnology of recombinant HSP-60 (rHSP-60) with its accumulation in the cytoplasm of E. coli in soluble form has been performed: the optimal parameters of cultivation producer (growth medium, temperature, concentration of expression inducer and biosynthesis duration) providing a preferential (79%) accumulation of the target protein in a soluble form. Purification technology was based on the usage of affinity chromatography on glutathione-sepharose and enzymatic hydrolysis of GST-containing proteins using a clotting factor Xa, and gel filtration on Sephadex G-75 for final purification. We carried out comparative studies of the activity of the obtained rHSP-60 as a part of immunosorbent in ELISA for detecting specific IgG antibodies in human serums. The experiment results for the group of positive serums were assessed based on the positivity index (a ratio of the average arithmetic value of optical density in ELISA for positive and negative (cut off) serums). At the same recombinant protein concentration in the immunosorbent for our obtained rHSP-60, we obtained a 30% higher PI compared to the analogue commercial protein. Of interest were the results of a comparison of the immunological activity of our obtained HSP-60 and its conjugate with GST – positivity indices using these two proteins in the immunosorbent composition were comparable – 2.2 and 2.4, respectively. At the same time, no interaction between serum immunoglobulins and GST enzyme was detected. Such data indicate on absolute possibility of the use of the GST-conjugated rHSP-60 protein for immunodiagnostic purposes. It has been proven that the obtained rHSP-60 preparations as well as its GST-conjugate were highly effective when used in the immunosorbent composition in ELISA for the detection of specific IgG-antibodies.

Keywords: heat shock protein, Chlamydia trachomatis, recombinant protein, biosynthesis, chromatographic purification.

Introduction. Urogenital chlamydiosis (UC) is one of the most common sexually transmitted infections. According to the World Health Organization data, approximately 90 million people are infected sexually with the pathogen *Chlamydia trachomatis* every year (Гончарук, 2008). In Ukraine, UC incidence is 80 people per 100 thousand residents. About 16% of pregnant women are infected with *Ch. trachomatis*. The etiological role of chlamydia has been established in 50-60% of tubal infertility cases. A quarter of the cases of ophthalmopathy and respiratory diseases in newborns and young children are related to chlamydia infection (Исаков и др., 2010). One of the most important components of the fight against the UC spread is effective diagnostic of this disease, which is carried out by both direct (detection of antigens, nucleic acids, microscopy, and cultivation

of the causative agent) and indirect (detection of specific antibodies) methods. One of the methods, which became widely used in UC diagnostics, is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), application of which allows differential diagnostics to determine the stage and nature of the disease course. For this purpose, studies of human blood serum (plasma) and biological secrets for the content of IgM, IgA, and IgG antibodies specific to the causative agent antigens are conducted. With long-term persistence of *Ch. trachomatis*, there is an increase in the expression of a 60 kDa heat shock protein (HSP-60), which has high homology degree with the analogue protein of human cells. Its production results in a molecular mimicry phenomenon that in its turn frequently causes autoimmune processes. An increased level of the immune system stimulation by the heat shock

protein that occurs in a reinfection or persisting infection results in chronic inflammation and tissue cicatrization and can play a role in the pathogenesis of endometrium and uterine appendage lesions. Such immunopathological reactions can be a cause of extrauterine pregnancy and tubal infertility (Исаков и др., 2010; Мавров и др., 2010; Мукантаев и др., 2012). Therefore, an examination of patients infected with *Ch. trachomatis* for the presence of IgG antibodies to HSP-60 is of great importance. It is obvious that for the creation of an appropriate high informative ELISA test-kit, reference antigens of the causative agent are necessary to have. The most modern way to obtain the antigen proteins is genetic engineering and molecular biotechnology methods that ensure not only the standardization of the obtained protein but also give an opportunity to develop progressive technologies of protein extraction and purification.

The goal of this study was to develop a technology for obtaining and purification of *Ch. trachomatis* recombinant HSP-60 as well as to evaluate its use in immune diagnostics.

Materials and methods. *Plasmid.* The recombinant pET42a/ChtHSP-60 plasmid used in our work was constructed based on the pET42a(+) expression vector (Novagen, USA) and contains a full-size insert of the *Ch. trachomatis* HSP-60 gene under control of the lac-operon promoter. The recombinant pET42a/ChtHSP-60 plasmid also contains the kanamycin resistance (Kan) gene, a sequence encoding the glutathione-S-transferase (GST) enzyme and T7 transcription terminator.

Growth media. Three variants of growth media were used in the study: LB medium (0.5% yeast extract, 1.5% tryptone, 0.5% NaCl); TB medium (10% yeast extract, 10% peptone, 0.94% K₂HPO₄, 0.22% KH₂PO₄, 0.8% glycerin), medium no. 3 (2.4% yeast extract, 1.2% tryptone, 0.5% glucose, 0.0195% MgSO₄). The antibiotic kanamycin (50 µg/ml) was added to each growth medium.

Recombinant Ch. trachomatis HSP-60 expression in the E. coli bacterial system. *E. coli* BL21 (DE3) strain cells transformed with the pET42a/ChtHSP-60 plasmid were cultivated in different growth media and at different temperatures in the presence of kanamycin (50 µg/ml) and with intensive shaking (250 rpm) until obtaining optical density OD₆₀₀ = 0.4. To induce the recombinant protein expression, isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG) solution was added. After incubation, the cells were collected by centrifugation at 4000 g for 20 min, the cell pellet was washed with chilled buffered saline, frozen and stored at -70 °C. Cultivation parameters such as temperature, time, IPTG concentration and growth medium composition were the study objects.

Affinity purification of the recombinant Ch. trachomatis HSP-60. The purification was performed at 4°C. The cell pellet (2.0-2.5 g) was re-suspended and lysed in 15 ml of lysing buffer (10 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 1% tryptone X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) in the presence of the protein kinase inhibitor set (Roche, France). The cells were homogenized by mechanical grinding with sand; the obtained lysate was centrifuged at 17000 g for 20 min. A 50% glutathione-sepharose suspension (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) in lysing buffer was added to the supernatant and incubated for 2 hours while stirring. Glutathione-sepharose was intensively washed with 50 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl with 0.05 % Twin-20 three times for 5 min and twice with 50 mM tris-HCl, pH 8.0. The proteins were eluted from the affinity sorbent with 50 mM reconstituted glutathione in 50 mM tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl while stirring for 5 min. The glutathione-sepharose was precipitated by centrifugation at 3000 rpm for 1 min. This operation was repeated three times. The obtained eluates were pooled and dialyzed against a buffer containing 20 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol for glutathione extraction. Concentration of GST-conjugated protein was measured by Bradford method. Proteins were stored at -20 °C in 50% glycerin.

For isolation of the recombinant *Ch. trachomatis* HSP-60 (rHSP-60) from the GST-conjugate (rHSP-60-GST) Xa factor (Sigma, USA) was used. The GST-conjugated protein bound to the glutathione-sepharose and equilibrated with a buffer containing 50 mM tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ was subjected to proteolysis. The factor Xa was added to the sorbent suspension at a quantity of 2 µg per 100 µg of protein. The reaction was performed at room temperature for 5 hours while stirring. The sorbent was precipitated by centrifugation at 3000 rpm for 1 hour. The supernatant was collected and transferred to the ultracentrifugation column Ultracel YM-50 (Millipore, USA) and centrifuged for 20 min at 10000 rpm. The filtrate was collected, the protein concentration was measured by Bradford method, and protein electrophotometric analysis was carried out.

Gel-filtration. This type of chromatography was used to transfer the protein into another buffer and as a method for purification of the target product from minor proteins. The procedure was carried out on a 1.5 × 20 cm column with sephadex G-75 (Sigma, USA). The elution of the preparation was performed at a rate of 1 ml/min. Protein peak retention time was registered spectrophotometrically at 280 nm, buffer retention time was measured conductometrically.

Electrophoresis and densitometry. Electrophoretic analysis of cell biomasses and proteins was carried out in a 15% polyacrylamide gel (PAAG) in the presence of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) in tris-tricine buffer system (Рахматулина и др., 2012). Following molecular weight (MW) markers (Sigma, USA) were used: trypsin inhibitor, soybean (20.0 kDa), trypsinogen, bovine pancreas (24.0 kDa), carbonic anhydrase, bovine erythrocytes (29.0 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle (36.0 kDa), ovalbumin, chicken egg (45.0 kDa), glutamic dehydrogenase, bovine liver (55.0 kDa), albumin, bovine serum (66.0 kDa), phosphorylase B, rabbit muscle (97.0 kDa), β -galactosidase, *E. coli* (116.0 kDa), myosin, porcine heart (200.0 kDa). Scanning of stained polyacrylamide gels and calculation of the target protein content were carried out by TotalLab 1.10 software.

Indirect ELISA procedure. Antigen sorption was done in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4 °C at a concentration of 4 μ g/ml. Free areas of the well plate were occupied by incubation with bovine serum albumin solution. One hundred μ l of the studied human sera were added into wells, incubated for 1 hour at 37°C, and washed three times with phosphate buffered saline with addition of 0.05% twin-20 (PBST), pH 7.2-7.4. For detection of the conjugated antibodies, the monoclonal anti-human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase were added to the plate wells and incubated for 30 min at a 37°C. The plate was washed three times with PBST and once with water. As a substrate we used a 0.003% hydrogen peroxide solution in 0.15 M citrate buffer, pH 5.0, and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a chromogen. The reaction was stopped with 2 M sulfuric acid. The absorbance at a wavelength of 450/620 nm was measured on a spectrophotometer.

Results and discussion. *E. coli* BL21 (DE3) strain cells were transformed with the recombinant pET42a/ChtHSP-60 expression plasmid as well as with a vector without the *Ch. trachomatis* HSP-60 fragment. Kanamycin-resistant bacterial transformants were examined for their ability to synthesize the recombinant protein in the presence of 0.1 mM IPTG by electrophoretic analysis. The analysis of the obtained results showed that the protein with a MW of 85 kDa (corresponds to the MW of the GST-conjugate of *Ch. trachomatis* HSP-60) was presented in the soluble and insoluble protein fractions in the detergent solution (Fig. 1). Thus, the target product was accumulated both in inclusion bodies and in a soluble form. In this regard, we conducted studies aimed to optimize the cultivation conditions for the recombinant protein producer and to increase its expression in *E. coli*

cells in the soluble form. Among optimization parameters, we determined the followings: temperature and cultivation time, inducer concentration (IPTG) as well as the growth medium composition.

First of all, we conducted studies to determine an optimal cultivation temperature based on the maximum output of the target product in soluble form. From described in literature different temperature schemes for the cultivation of the prokaryotic producers of recombinant proteins, two basic approaches can be highlighted: first of them proposes the cultivation of recombinant bacteria at a stable temperature of 37°C (both for biomass accumulation and for the target product synthesis) (Славченко и др., 2003), another – transition from the temperature of biomass increase (37°C) to the temperature of recombinant protein synthesis (25-28°C) (Чінов, 2005) that ensures more optimal conditions for folding of the polypeptide chain of the recombinant protein and can have effect on its solubility degree and thus on further strategy of its extraction and purification. Another methodological approach is the so-called thermal shock (40-43°C) using a strain with thermoinducible recombinant gene (Gardella et al., 1990), which was not applicable in our case.

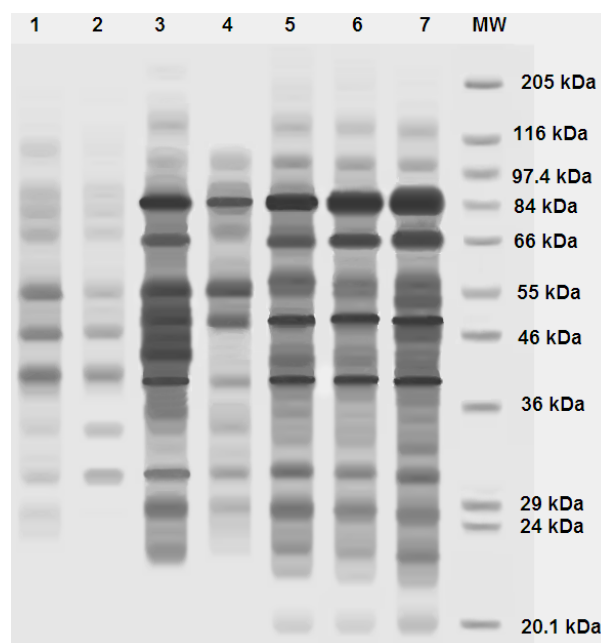


Fig. 1. Electrophoregram of rHSP-60-GST expression results in *E. coli* BL21 (DE3) strain cells.

Note: 1 – cells transformed with the vector without insert; 2 – culture without expression induction; 3 – fraction of total cell proteins; 4 – fraction of triton-soluble proteins; 5-7 – cells after 2, 3, and 4 hours of expression induction; MW – molecular weight markers.

A study of the effect of cultivation temperature *E. coli* cell concentration in the cultural fluid regime on target protein accumulation in the soluble (OD₆₀₀ decreased by 30%) and gradual increase in the fraction was conducted in parallel with the soluble recombinant protein content up to the maximum determination of optimal concentrations of the value of 0.41 mg/ml. When IPTG concentration was expression inducer: a series of parallel studies was increased in a range of 0.3–0.5 mM, we observed a carried out at different temperature regimes (37°C; decrease in not only the biomass output but also in the 37°C/28°C) and different IPTG concentrations (0–0.5 target product concentration. We relate such a mM). Herein, the inducer was added when OD₆₀₀ = 0.4 phenomenon to an increase of the toxic effect of the was reached and cultivation proceeded for 2 more recombinant product on producer cells: extremely high hours; LB medium was used. The process was assessed accumulation rate of the target protein (foreign for based on cultural fluid optical density values and target *E. coli*) results in not only a switch of the recombinant protein concentrations in the soluble fraction calculated protein accumulation predominantly in the form of by the densitometry method (Fig. 2). The study results inclusion bodies but also in a delay of the accumulation showed that the most effective temperature regime at of the biomass itself. Fig. 3 shows results of the almost all IPTG concentrations was bacterial culture calculation of the total cell-produced recombinant growing at a stable temperature of 37°C. The protein (at a stable cultivation temperature of 37°C) and recombinant protein concentrations at different its soluble fraction ratio. As it is seen from the obtained temperature regimes after adding 0.4 mM IPTG were results, the highest portion of the target protein in the statistically equivalent. However, this concentration of soluble form (almost 79%) is identified at an IPTG the IPTG was not optimal – the highest output of the concentration of 0.3 mM. Thus, the results of this stage soluble recombinant protein (0.41 mg/ml) was recorded of the study showed that the optimal cultivation after adding 0.3 mM IPTG. It is important that with an conditions were a temperature of 37°C and IPTG increase of the inducer concentration in the medium in a concentration of 0.3 mM. range of 0–0.3 mM, we observed a gradual decrease in

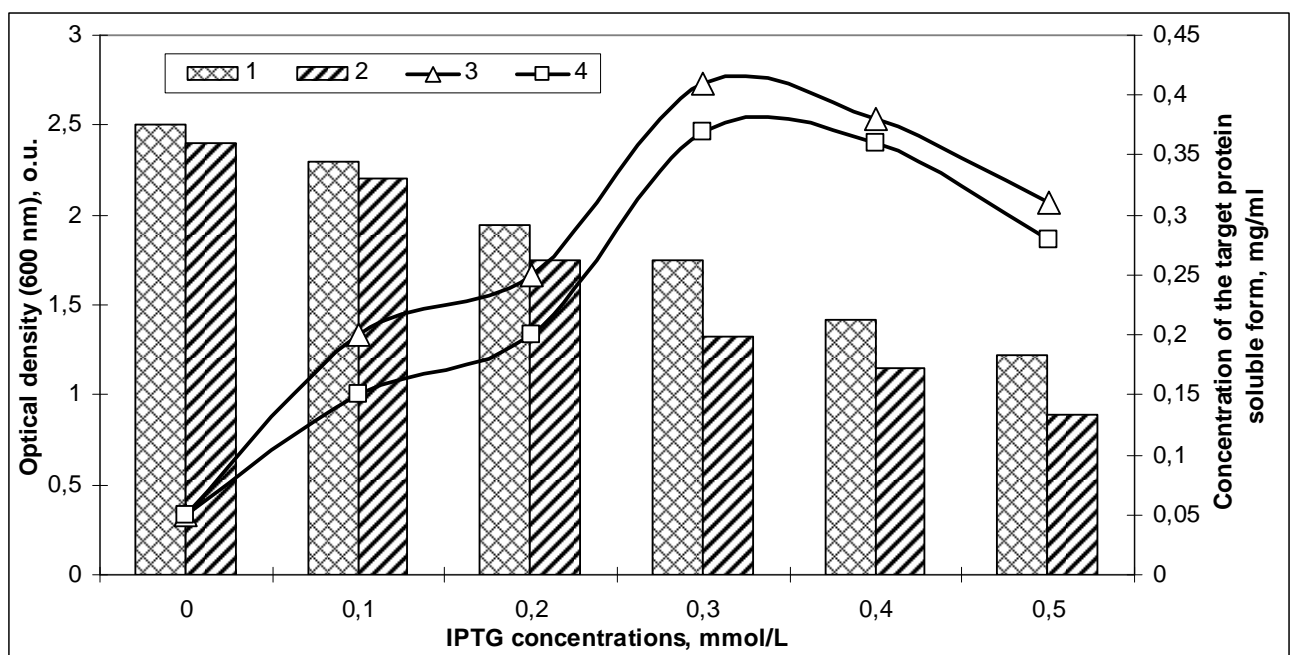


Fig. 2. Determination of the optimal IPTG concentrations and temperature parameters for the cultivation of the recombinant protein producer strain

Note: 1 and 2 – OD₆₀₀ for temperature regimes of 37°C and 37°C/28°C, respectively; 3 and 4 – dynamics of the accumulation of a soluble form of the target protein for temperature regimes of 37°C and 37°C/28°C, respectively.

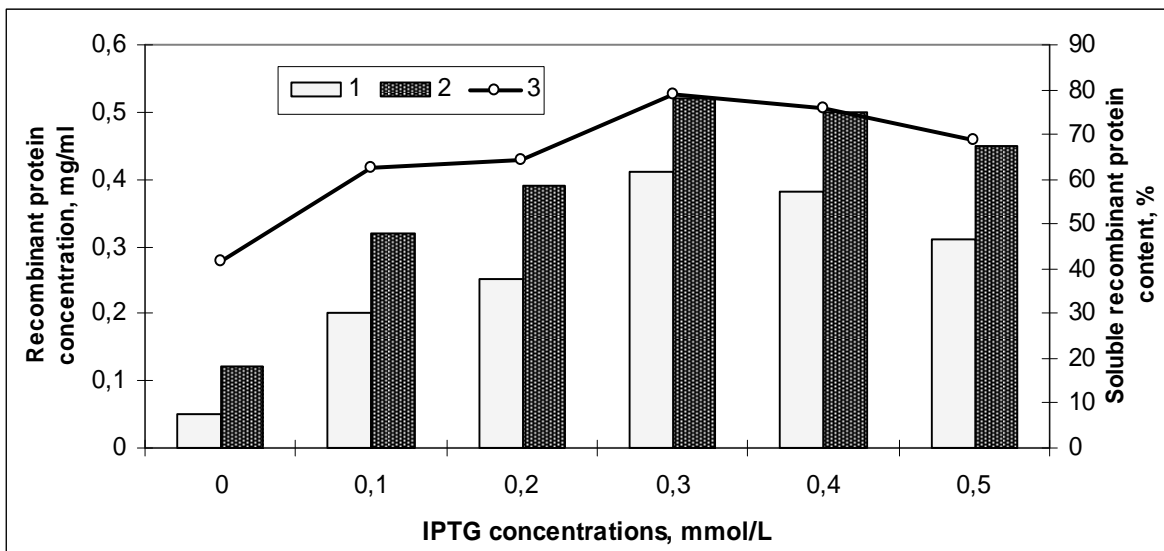


Fig. 3. Dependence of the recombinant protein content in a soluble form on the IPTG concentration.

Note: 1 – total content; 2 – soluble form concentration; 3 – portion of the soluble form.

The following block of the studies was aimed to determine the optimal cultivation time and optimal growth medium. These studies were conducted at a stable cultivation temperature of 37°C and IPTG concentration of 0.3 mM. The results of respective experiments are shown on the Fig. 4. A significant increase in the concentration of the soluble form of recombinant product was observed within the first 3 hours upon addition of the inducer; therefore we can make a conclusion that the optimal cultivation time in this case is 3 hours. The best medium for producer cultivation was LB medium; the worst results were

obtained using TB medium. The dynamics of the change of a part of the target product in a soluble form in time (Fig. 5) confirms the correctness of the established optimal temperature for producer cultivation. The absolute content of a soluble fraction of the recombinant protein gradually increases within 1÷3 hours of the cultivation upon inducer addition; however, its portion starts to drop after the 2nd hour of the cultivation. Thus, it is not advisable to carry out the biosynthesis stage for over 3 hours.

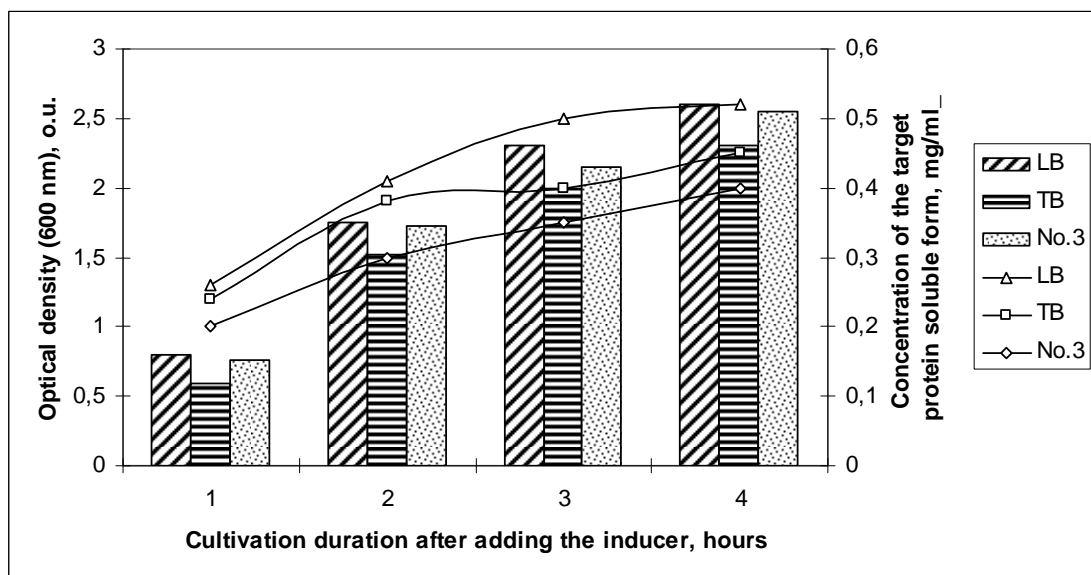


Fig. 4. Determination of the optimal growth medium and cultivation time for the recombinant protein producer strain

Note: histograms – OD₆₀₀ for the growth media LB, TB, and №3; graphs – accumulation dynamics for a soluble form of the target product in the growth media LB, TB, and №3

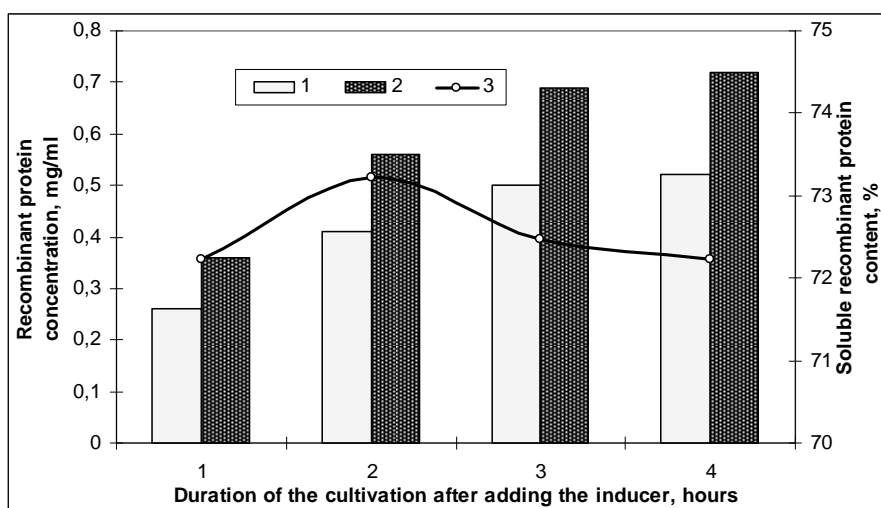


Fig. 5. Dependence of the recombinant protein content in a soluble form on the cultivation time of the producer strain on LB medium

Note: 1 – total content; 2 – soluble form concentration; 3 – portion of the soluble form)

The following block of the experiments was aimed to develop the technologies of the target product extraction and purification. It is necessary to note that the recombinant pET42a/ChtHSP-60 plasmid used in our work assumed obtaining rHSP-60 in the form of a conjugate with GST that implied the use of affinity chromatography on glutathione-sepharose as a basic element for extraction and purification of the target product. Purity control of rHSP-60-GST after the affinity purification procedure was carried out by electrophoresis in PAAG with SDS. The obtained results (Fig. 6) showed that besides a minor block with a MW close to 85 kDa, several additional bands of minor proteins with lower MWs were detected in the preparation after affinity chromatography. Such data also could indicate on the non-specific binding of minor proteins with the affinity column. For verification this assumption, we carried out an additional experiment, which involved the incubation of the affinity sorbent with a solution of tryptone-soluble proteins of a non-transformed *E. coli* strain and electrophoretic analysis of the eluted solution (fig. 6). The obtained results ruled out the non-specific interaction of bacterial proteins with the affinity sorbent. An alternative explanation of the presence of minor protein components in the eluate after affinity chromatography is the partial hydrolysis of the obtained recombinant protein or incomplete rHSP-60-GST translation. A study of the stability of the recombinant protein stored at a temperature of 4°C for 7 days showed no accumulation of the minor protein portion (data are not presented), hence, the most probable explanation of the accumulation of a certain amount of minor proteins is incomplete translation. This assumption was confirmed at the following stages of the work –

when assessing the perspective of the use of the obtained recombinant protein for human anti-HSP-60 IgG detection in ELISA. To do this, a fraction of minor proteins was preliminarily separated from the major protein by gel-filtration on Sephadex G-75 (fig. 7).

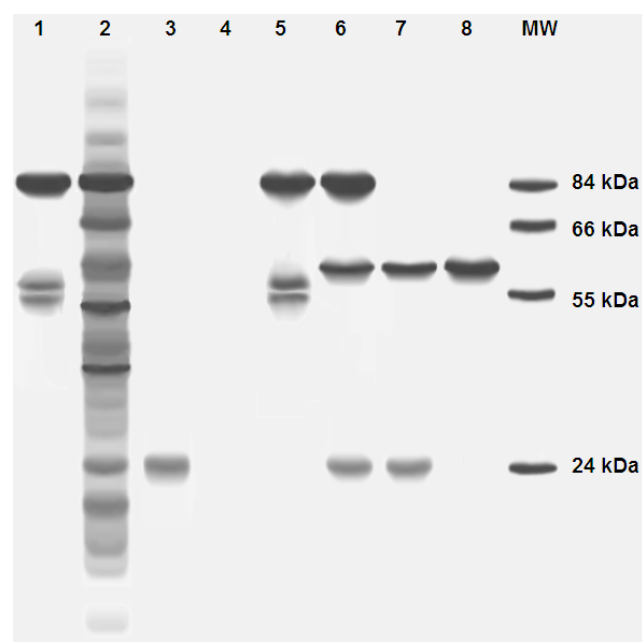


Fig. 6. Electrophoregram of preparations during purification of recombinant protein

Note: 1 – rHSP-60-GST before chromatographic purification, 2 – cells in 2 hours after expression induction, 3 – GST; 4 – proteins from lysates of non induced cells which were adsorbed on the affine sorbent; 5 – proteins from lysates of induced cells which were adsorbed on the affine sorbent; 6, 7 – cleavage of rHSP-60-GST, proteins after 1 h and 6 h, respectively; 8 – reference preparation of rHSP-60; MW – molecular weight markers.

When constructing the pET42a/ChtHSP-60 plasmid, we introduced a nucleotide sequence coding the amino acid sequence, which is a specific site for the recognition of the factor Xa. The activated coagulation factor Xa (Stuart-Prower factor) is a serine proteinase, which specifically recognizes and hydrolyzes the amino acid sequence Ile-Glu (Asp)-Gly-Arg-↓-X (X ≠ Pro) (Ludeman et al, 2003). Taking into account that factor Xa recognition site is absent in the amino acid sequence of *Ch. trachomatis* HSP-60 (GenBank: AAS19618.1), there is a possibility for enzymatic cleavage of the synthesized recombinant rHSP-60-GST conjugate and extraction of rHSP-60. Hydrolysis of the recombinant conjugate was carried out on an affinity sorbent: factor Xa was added to glutathione-sepharose suspension with immobilized rHSP-60-GST protein conjugate. During this procedure, *Ch. trachomatis* HSP-60 passed into solution and eluted from the column. Enzyme separation was done by ultracentrifugation with the use of the commercial set Ultracel YM-50.

Within the framework of additional experiments, we determined optimal conditions for the recombinant protein proteolysis. The proteolytic enzyme was used at a concentration of 10 µg per 1 mg of the rHSP-60-GST conjugate. At the same time, at a temperature of 37°C, which was reported by other authors (Nagai and Thogersen, 1987; Schagger and von Jagow, 1987), we observed an insignificant accumulation of non-specific hydrolysis products (the possibility of non-specific protein cleavage was reported in the information provided by the enzyme manufacturer). When the enzymatic reaction temperature was decreased to room temperature, it was possible to neutralize the non-specific proteolysis. When studying the degree of the recombinant conjugate hydrolysis in time, it was found that full rHSP-60-GST cleavage occurred within 6 hours (Fig. 6): after 6 hours of the proteolytic cleavage, a band corresponding to MW of the recombinant conjugate disappeared – only two bands corresponding to rHSP-60 and GST proteins, were recorded on the electrophoregram. Output of rHSP-60 after the protein conjugate proteolysis composed 59% of the quantity of the protein immobilized on the affinity sorbent that composed 84% of the theoretical output.

To assess the perspectives of the use of the obtained rHSP-60 for the creation of highly sensitive and specific means for *in vitro* diagnostics, we carried out comparative studies of the activity of the obtained *Ch. trachomatis* HSP-60 as a part of immunosorbent in ELISA for detecting corresponding specific antibodies of the IgG class in human serums.

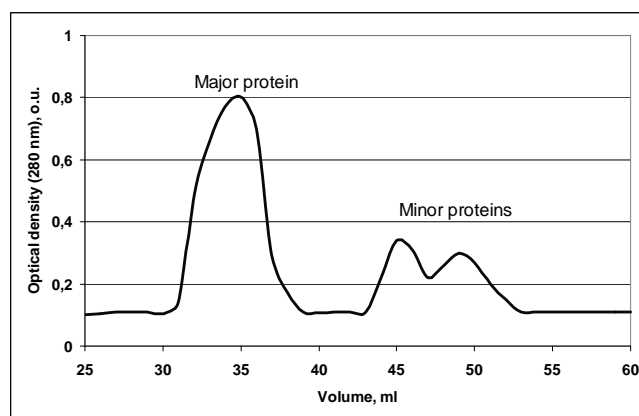


Fig. 7. Gel-filtration of rHSP-60-GST conjugate on Sephadex G-75

During preliminary stages, we created an evaluation serum panel (10 samples), including samples preliminarily tested in commercial immunoassay sets for the content of IgG-antibody to the major protein of the *Ch. trachomatis* outer membrane and IgG-antibodies to *Ch. trachomatis* HSP-60.

As immobilization antigens in plate wells we used: the obtained rHSP-60 and its protein conjugate rHSP-60-GST, commercial recombinant *Ch. trachomatis* HSP-60 protein (Bioclone Inc, USA) and GST. Additionally, we carried out an assessment of the immunological activity of minor protein fractions contained in the eluate after the affinity chromatography on glutathione-sepharose. The experiment results for the group of positive serums were assessed based on the positivity index (PI) – a ratio of the average arithmetic value of optical density in ELISA for positive and negative (cut off) serums. Fig. 8 shows the results of this study block: using the same recombinant protein concentration in the immunosorbent, for our obtained rHSP-60, we obtained a 30% higher PI compared to the analogue commercial protein. Of interest were the results of a comparison of the immunological activity of our obtained rHSP-60 and its conjugate with GST – positivity indices using these two proteins in the immunosorbent composition were comparable – 2.2 and 2.4, respectively. At the same time, no interaction between serum immunoglobulins and GST enzyme was detected. Such data indicate on absolute possibility of the use of the GST-conjugated HSP-60 protein for immunodiagnostic purposes. These experiments also confirm our previous assumptions on the nature of minor proteins contained in the eluate after the affinity chromatography on glutathione-sepharose: presence of insignificant immunological activity (PI = 1.12) unambiguously evidences that these proteins are products of the incomplete translation of the recombinant protein.

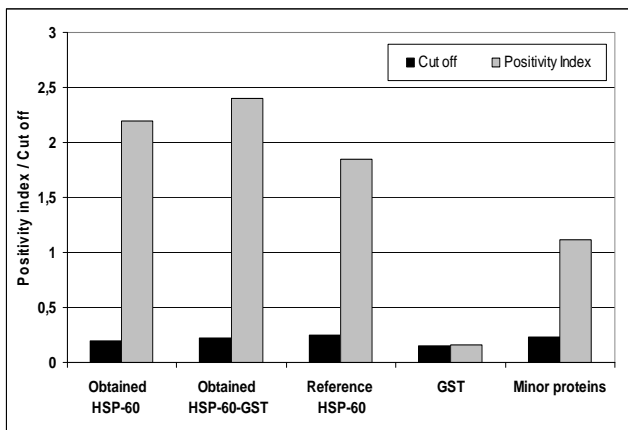


Fig. 8. Comparative evaluation of the immunological activity of *Ch. trachomatis* rHSP-60 and rHSP-60-GST conjugate

Conclusions.

1. We have developed and justified optimal technological parameters for obtaining and purification of the recombinant *Ch. trachomatis* HSP-60. It has been shown that the recombinant protein accumulates in *E. coli* BL21 (DE3) strain cells both in a soluble form and in inclusion bodies. We determined optimal cultivation conditions for the producer-strain for maximum accumulation of the soluble form of the target product (79%): LB medium, stable temperature of 37°C, IPTG concentration 0.3 mM, and cultivation time 3 hours.

2. The developed method for the target product purification is based on the use of the affinity chromatography on glutathione-sepharose (obtaining the rHSP-60-GST protein conjugate) and enzymatic hydrolysis of the GST-containing protein using the coagulation factor Xa (obtaining rHSP-60) as well as gel-filtration on Sephadex G-75 for final purification.

3. It has been proven that the obtained rHSP-60 preparations as well as its GST-conjugate are highly effective when used in the immunosorbent composition in ELISA for the detection of specific IgG-antibodies that makes possible their use for the development of highly specific and sensitive immunodiagnostic methods.

References:

1. Гончарук С.А. Мембранные белки семейства KCNE: создание эффективных бактериальных штаммов-продуцентов, очистка и изучение структурных особенностей / Автореферат дис.

...канд. наук: 03.00.02 – Биофизика. – М., 2008. – 24 с.

2. Исаков В.А., Куляшова Л.Б., Березина Л.А., Нуралова И.В., Гончаров С.Б., Ермоленко Д.К. Патогенез, диагностика и терапия уrogenитального хламидиоза: Руководство для врачей / Под редакцией А. Б. Жебруна. – СПб.: Тактик-Студио, 2010. – 112 с.
3. Мавров Г.И., Щербакова Ю.В., Чинов Г.П. Лечение осложненного уrogenитального хламидиоза с применением азитромицина («Сумамед») в сочетании с патогенетической терапией // Венерология. – 2010. – № 3. – С. 123-127.
4. Мукантаев К.Н., Шустов А.В., Сыдыкнаби Ы. и др. Диагностические свойства синтезированного в *Escherichia coli* рекомбинантного антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – №2. – С. 1-10.
5. Рахматулина М.Р., Попов Д.В., Плахова К.И. Современные представления об эпидемиологии, клинике, диагностике и терапии неосложненных и осложненных форм уrogenитальной хламидийной инфекции у мужчин // Вестник дерматологии и венерологии. – 2012. – №6. – С. 35-41.
6. Славченко И.Ю., Шмидт В.А., Черных С.И., Кордюм В.А. Особенности экспрессии целевого гена в составе вектора на основе бактериофага лямбда и изучение путей ее оптимизации // Біополімери і клітина. – 2003. – Т. 19, № 1. – С. 81-88.
7. Чинов Г.П. Поширеність і клінічна характеристика хламідіозу й трихомоніазу – двох найчастіших статевих інфекцій // Венерология. – 2005. – № 1. – С. 74-81.
8. Gardella T.J., Rubin D., Abou-Samra A.B., Keutmann H.T. et al. Expression of human parathyroid hormone-(1-84) in *Escherichia coli* as a factor X-cleavable fusion protein // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265 (26). – P. 15854-15859.
9. Ludeman J.P., Pike R.N., Bromfield K.M., Duggan P.J. et al. Determination of the P1', P2' and P3' subsite-specificity of factor Xa // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2003. – Vol. 35 (2). – P. 221-225.
10. Nagai K., Thogersen H.C. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli* // Methods Enzymol. – 1987. – Vol. 153. – P. 461-481.
11. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 166. – P. 368-379.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКУ (HSP-60) *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ТА ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВ ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ У СЕРОЛОГІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

О. Ю. Галкін, О. Б. Бесараб, А. С. Гришина, О. М. Дуган, Ю. М. Гурженко

Виявлення гуморальної імунної відповіді на білок теплового шоку масою 60 кДа *Chlamydia trachomatis* (HSP-60) має велике діагностичне значення, адже свідчить про ймовірний аутоімунний процес та ризик патології репродуктивної системи у жінок. Для розробки високоінформативного імуноферментного набору для виявлення анти-HSP-60 антитіл необхідно мати у розпорядженні відповідні біологічні компоненти, передусім очищений білок HSP-60. Найбільш сучасним є отримання білків-антигенів за допомогою методів генної інженерії та молекулярної біотехнології, що забезпечує не тільки стандартизацію отриманого білка, але й дає можливість розробляти прогресивні технології виділення та очищення останнього. Проведено науково-методичну розробку біотехнології отримання рекомбінантного HSP-60 (rHSP-60) із накопиченням останнього у цитоплазмі клітин *E. coli* у розчинному вигляді: встановлені оптимальні параметри культивування продуценту (поживне середовище, температура, концентрація індуктора експресії та тривалість біосинтезу) забезпечують переважне (79%) накопичення цільового білка у розчинній формі. Технологія очистки rHSP-60 базується на використанні афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі та ферментативного гідролізу GST-вмісного білку із використанням фактора згортання крові Ха, а також гель-фільтрації на Sephadex G-75 для доочищення. Для оцінки перспектив використання отриманого rHSP-60 нами були проведені порівняльні дослідження активності отриманого HSP-60 *Ch. trachomatis* як частини імуносорбенту у ІФА для виявлення відповідних специфічних антитіл класу IgG у сироватках крові людини. У якості антигенів для іммобілізації у лунках планшету використовували: власно отримані rHSP-60 та його білковий кон'югат rHSP-60-GST, комерційний аналог та GST. Додатково проводили оцінку імунологічної активності фракції мінорних білків, що містилися у елюаті після афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі. Результати експериментів для групи позитивних сироваток оцінювали за індексом позитивності – співвідношенням середнього арифметичного значення оптичної густини у ІФА для позитивних та негативних (cut off) сироваток. Для отриманого rHSP-60 було отримано індекс позитивності на 30% вищий у порівнянні із аналогічним комерційним протеїном. Порівняння імунологічної активності отриманого rHSP-60 та його кон'югату із GST засвідчили, що індекси позитивності при використанні двох даних білків у складі імуносорбенту були зіставними – 2,2 та 2,4, відповідно. Було доведено, що отримані нами препарати rHSP-60, а також його GST-кон'югату є високоактивними при їх використанні у складі імуносорбенту у імуноферментному аналізі для виявлення специфічних IgG-антитіл.

Ключові слова: білок теплового шоку, *Chlamydia trachomatis*, рекомбінантний білок, біосинтез, хроматографічна очистка.

Одержано редколегією 12.08.2014

HIGH-CALORIE DIET AS A FACTOR OF OBESITY DEVELOPMENT IN RATS

T. P. KARPOVETS, N. V. SHABANOVA, V. V. KONOPELNYUK,
O. M. SAVCHUK, L. I. OSTAPCHENKO

*Taras Shevchenko Kyiv National University, NEC "Institute of Biology",
Biochemistry department
e-mail: konopelnyuk@rambler.ru*

Increase intake of foods with high calorie content can carry some risk of obesity, and to provoke the emergence of such pathological conditions as pereddiabetic condition, type 2 diabetes and metabolic syndrome. Discovery of the mechanisms underlying the violation of metabolic processes in the body when receiving a significant amount of high-calorie foods, can afford to offer a new and promising approach to the correction of pathological conditions associated with these disorders. Given the preliminary data on the involvement of serotonergic system in the development pereddiabetic status and type 2 diabetes, is of some interest analysis of the components of this system in the development of obesity, which is caused by the consumption of large quantities of high-calorie foods. The analysis of the development of obesity in rats that were on high-calorie diet, which consisted of a standard feed (60%), animal fat (10%), eggs (10%), sugar (9%), peanuts (5%), milk (5%) and sunflower oil (1%). Shown a significant change in parameters such as feed intake, final body mass index L_i , body mass index, in the group of rats treated with high-energy diet. Found changes in these indicators show the excessive accumulation of body weight in rats of the experimental group as a result of hyperphagia. Analyzed the content of serotonin in blood serum and brain of experimental animals using ion-exchange method of chromatography on CM-sepharose. Shows the change in the content of serotonin in the brain and serum of animals that eat high-calorie foods, indicating a direct involvement of serotonergic system in the pathogenesis of obesity. Past studies have shown some promising a more in-depth analysis of individual components of the metabolism of serotonin by obesity caused by consumption of excessive amounts of energy-dense foods.

Key words: obesity, high-calorie diet, body mass increase, feed consumption, serotonin.

Introduction. Obesity is a complex and multifactorial disease characterized by the high weight accumulation due to excessive accumulation of adipose tissue, which could significantly impair health. This disease is prevalent in both developed and developing countries; affects people of all ages and social classes, and is a major factor in the development of chronic and disabling diseases (Овсянникова, 2010). According to the latest WHO estimates (World Health Organization, 2013), obesity in the world today affects about 1.5 billion people and 350 million more prone to this disease. In Ukraine, obesity affects about 15% of the population and every year the number of new cases of obesity is steadily increasing (Пономарьов, 2009). Today the epidemic increase in the number of new patients with obesity is the result of high-energy diets consumption alongside with a reduction in energy use due to sedentary lifestyle (Astrup, 1994; Lissner, 1995). It is known that obesity is an endocrine disease, development of which is associated with an imbalance in the system of serotonin – a neurotransmitter and a hormone that regulates the processes of vasoconstriction, smooth muscle contraction, pain reception, sleep control, emotional and eating behavior and energy

homeostasis of the organism. The secretion of serotonin is crucial in the formation of a feeling of satiety: it was shown that an increase of its level in hypothalamic structures causes a feeling of satiety and the reduction of eating behavior, and a decrease – on the contrary (Kang, 2004). Today the relationship between the serotonergic system malfunction and the development of obesity and related diseases such as: hypertension, coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus, is clear, but the mechanisms of this connection remain poorly understood.

Therefore, the aim of this study was to investigate the development of obesity and the content of the central and peripheral serotonin in rats that were on a high-calorie diet.

Materials and Methods. Experiments were carried out on white nonlinear female rats with initial weighing of 135-140 g in compliance with the standards of the Convention of Bioethics of the Council of Europe in 1997, European Convention for the protection of vertebrate animals that used for experimental and other scientific purposes, the general ethical principles of animal experiments approved by first National Congress of Bioethics of

Ukraine (September 2001) and other international agreements and national legislation in this field.

During the first week, all rats received standard food «Purina rodent chow» and water ad libitum. On the 8th day the animals were randomly divided into 2 groups. Animals of the first group ("Control") have been fed with a standard food and water for 10 weeks. Animals of the second group ("Ob") were on a high-calorie diet, which consisted of a standard meal (60%), pork fat (10%), eggs (10%), sugar (9%), peanuts (5%), dry milk (5%) and sunflower oil (1%) (Xiu-Hua Shen, 2010). Body weights were recorded once a week and feed intake were recorded daily in all animal groups.

The content of serotonin in the brain and serum analysis was performed by the ion-exchange chromatography on KM-Sephrose method (Максименко, 2000). Measurement of serotonin was performed on Shimadzu fluorescence spectrophotometer at an excitation wavelength of 295 nm and absorption wavelength of 550 nm against samples containing distilled water (Weissbach, 1957).

Statistical analysis was performed using statistical analysis applications of Microsoft® Excel. To assess inter-group differences the parametric Student test was used. The difference between the parameters was considered statistically significant at $p < 0,05$.

Results and Discussion. Studies indicate the development of key indicators of obesity in rats that consumed high-calorie food compared to the control group. Figure 1A shows the dynamics of body weight increase in rats throughout the study period. The initial weight of the animals in the control group was $142 \pm 2,081$ g, after 10 weeks of an experiment a

gradual increase of this indicator was shown. On the last week of studies the weight of the animals in the control group was $229 \pm 1,154$ g, which was 87 g more than the initial. It was shown that in the group of rats that were on a high-calorie diet the increase of weight was significantly higher and was 118 g more than the initial after 10 weeks of an experiment. The dynamics of food consumption in the form of average accumulation in animals of control and experimental groups is shown in Figure 1 B. Our results revealed that for 10 weeks daily food consumption of rats of the control group was unchanged and amounted to $13,5 \pm 1$ g of consumed feed by one rat per day. The total amount of consumed feed by rats of the control group at the end of the experiment was 950 g per rat. We have shown a significant increase in daily feed intake in the group of animals that were on high-calorie diet starting from the 10th day of the experiment. After 10 weeks of consumption of high-calorie foods the total amount of consumed feed by animals of the experimental group was 1200 g per rat that is 250 g more than the control group (Fig. 1 B).

The data shown in a Table 1 summarize the daily food intake and body weight dynamics of control and HCD groups, that were displayed on the Figures 1 A and 1 B. Also, the Table 1 shows the body mass index (BMI) as a body weight (g) /nose-to-anus length² (cm²) and Lee index as cube root of body weight (g) /nose-to-anus length (cm) of control and HCD animals. Studies showed the increase of BMI of HCD group animals in almost 0,1 point compared to control after 10 weeks of experiment. The Lee index of HCD group was also increased on 0,02 points compared with control rats.

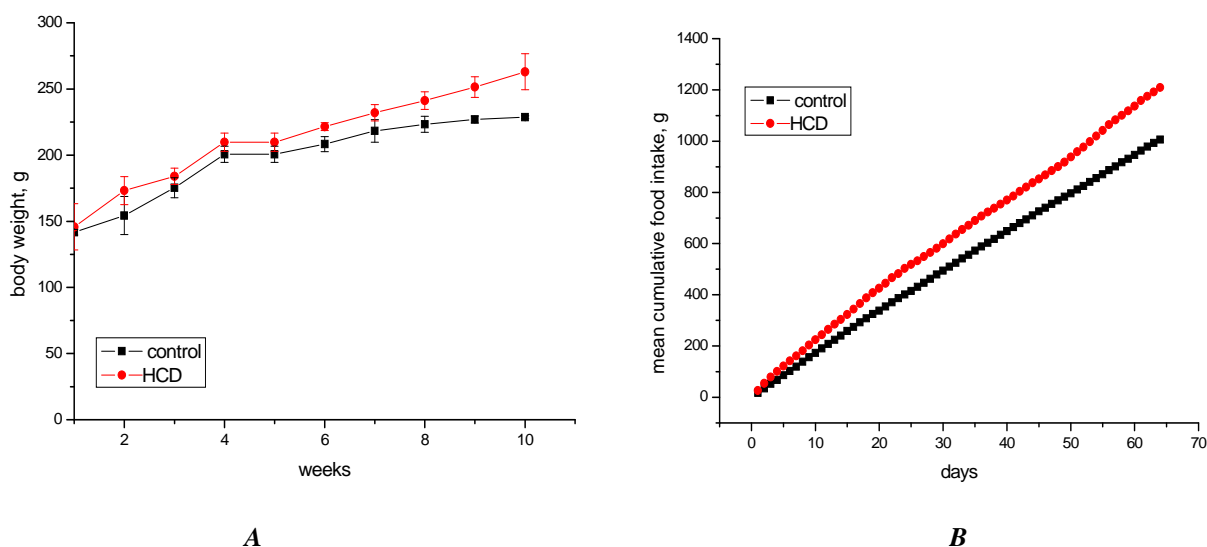


Fig. 1. The dynamics of body mass increase (A) and feed consumption (B) of the control animals ("Control") and rats that were on a high-calorie diet ("Ob") ($M \pm m$; $n = 10$)

Note: * - $p < 0.05$ differences credible with respect to the control

Table 1. General characteristics of the control animals ("Control") and rats that were on a high-calorie diet ("HCD")

	Food intake (g/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	BMI (g/cm ²)	Lee index
Control	15,7±1,283	142±2,081	229±1,154	0,49	0,28
HCD	18,9±2,795*	145±17,481	263±13,631*	0,58*	0,3*

These results suggest the development of obesity in rats of experimental group. Excessive body weight of the "Ob" rats is probably associated with the accumulation of adipose tissue. This accumulation may be the result of an imbalance between the amount of energy consumed by rats and the amount of energy spent, because alongside with the increasing amount of consumed feed by the animals of the experimental group, the amount of energy received was increased either due to high caloric content of food. Based on these data, it can be argued that the development of obesity in rats of experimental group arises from the phenomenon of hyperphagia, which is probably the result of an imbalance of a number of neurotransmitter and hormonal systems, including serotonergic system and number of gastrointestinal hormones. It is known that leptin, a hormone that is synthesized and secreted by the adipose tissue, is involved in the regulation of appetite and energy metabolism. Leptin binding to the corresponding receptor causes intracellular signaling and allocation of serotonin in the ventromedial nucleus of the hypothalamus (satiety center), which in turn signals the brain that an adequate amount of food was consumed and reduces appetite (Trayhurn, 2001). Development of hyperphagia in the "Ob" rat group refers to a possible breach of serotonin signaling system, leading to a lack of a feeling of fullness and, consequently, to an increase in food intake. So the next stage of our work was to determine the content of serotonin in the brain and serum of rats of studied groups.

Our results show a reduction of serotonin content in the brain of rats that consumed high-calorie food by 1.42 times ($p < 0,05$) compared to the control group (Fig. 2A). Determination of peripheral serotonin content showed an increase of this parameter in serum of "Ob" rats by 2.09 times ($p < 0,05$) compared with controls (Fig. 2 B).

These results suggest the possible development of an imbalance in the functioning of the central and peripheral serotonergic systems in rats that were on a high-calorie diet. Decrease in the amount of serotonin in the brain of "Ob" rats can be caused by a decrease in production of the neurotransmitter, resulting in an imbalance in the system of its synthesis, and violation of metabolic processes aimed at maintaining physiological levels of serotonin in the body. Also, reduction of serotonin in the brain of animals of the experimental group could be due to the increasing catabolism of serotonin. Since serotonin does not pass the blood-brain barrier, the peripheral synthesis of the hormone has no effect on the content and functioning in the brain. Increase of serotonin levels in the serum of "Ob" group rats may be related to dysfunction of enterohromaffin (EC) cells of the gastrointestinal tract, which release serotonin in response to the consumption of food. From the literature it is known that EC dysfunction is observed in the diabetes mellitus. It was shown that during this disease the morphological changes occur in the structure of these cells, resulting in their enhanced synthesis and secretion of serotonin (Glisić, 2006). Peripheral serotonergic system is also closely linked to the metabolism of glucose and insulin system. Thus, it is known that the selection of serotonin by EC stimulates the release of insulin by β -cells of the pancreas and reducing blood glucose (Sugimoto, 1990).

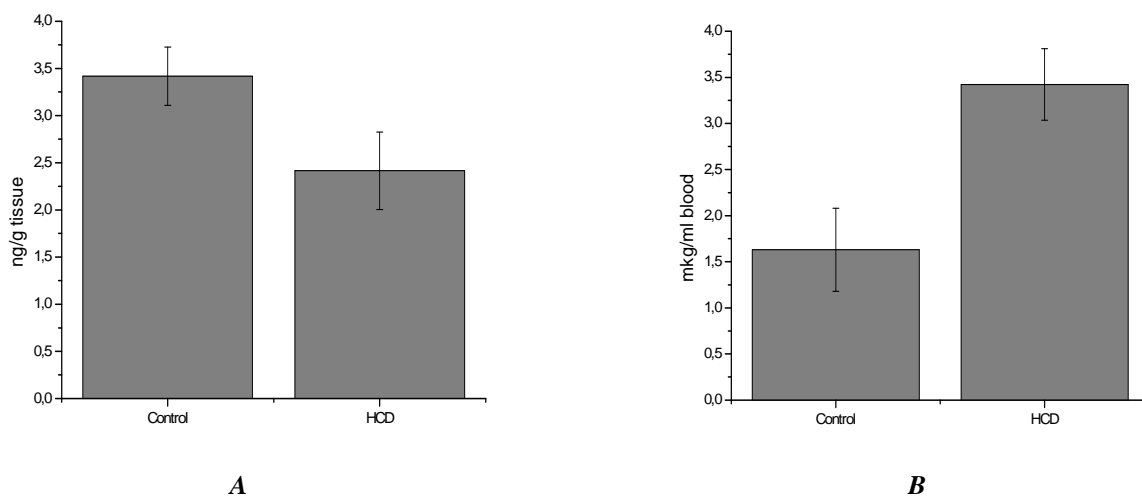


Fig. 2. Contents of serotonin in the brain (A) and serum (B) of the control animals ("Control") and rats that were on a high-calorie diet ("Ob") ($M \pm m$; $n = 10$).

Note: * - $p < 0.05$ differences credible with respect to the control

Therefore, the increase in the content of serotonin in the blood serum of rats that were on a high-calorie diet may be related to the violation of glucose metabolism in these animals due to the development of insulin resistance and prediabetes that have been shown in our previous studies (Karpovets, 2014).

Conclusion. Thus, it is shown that a 10-week consumption of high-calorie food resulted in the development of obesity in rats of experimental group due to excessive food consumption and, based on the increased caloric content of HCD group feed, excessive energy accumulation and causing an imbalance in the functioning of the central and peripheral serotonergic systems. These results suggest a direct involvement of serotonin in the pathogenesis of obesity and its complications, indicating the need for in-depth study of the functioning of the central and peripheral serotonergic systems for the development of new methods of correction and prevention of obesity.

References:

1. Максименко Е.Г. Уровень триптофана и серотонина в условиях судорожной активности головного мозга. // Вісник Харківського нац. університету ім. В.Н. Каразіна. Медицина. – 2000. – № 494. – С. 40-43.
2. Овсянникова Т.В., Боровкова Е.И., Шешукова Н.А., Куликов И.А. Современный взгляд на проблему избыточной массы тела и ожирения. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2010. – №2. – С.72-76
3. Пономарьов П. Х. Потенційна небезпечність швидкої їжі // Вісник Львівської комерційної академії. – 2009. – №10. – С.6-10
4. Astrup A., Buemann B., Western P., Toubro S., Raben A. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. // The American Journal of Clinical Nutrition. – 1994. – №59. – P. 350-355.
5. Glišić R., Koko V., Todorović V., Drndarević N., Cvijić G. Serotonin-producing enterochromaffin (EC) cells of gastrointestinal mucosa in dexamethasone-treated rats // Regulatory Peptides. – 2006. – № 64. – P. 30-39.
6. Karpovets T. P., Konopelnyuk V. V., Galenova T. I., Savchuk A. N., Ostapchenko L. I. High-Calorie Diet as a Factor of Prediabetes Development in Rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – №156. – P. 639-641
7. Lissner L., Heitmann B.L. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. // **European** Journal of Clinical Nutrition. – 1995. – №49. – P. 79-90.
8. Sugimoto Y, Kimura I, Yamada J, Watanabe Y, Takeuchi N, Horisaka K. Effects of serotonin on blood glucose and insulin levels of glucose- and streptozotocin-treated mice. // Japanese Journal of Pharmacology. – 1990. – №54. – P. 93-96
9. Trayhurn P., Beattie J.H. Physiological role of adipose tissue: with adipose tissue as an endocrine and secretory organ. // Proceedings of the Nutrition Society. – 2001. – №60. – P. 329-339.
10. Weissbach H. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine // The Journal of Biological Chemistry. – 1957. – № 230. – P. 865-871.
11. World Health Organization. Obesity and overweight // WHO Fact sheet. – 2013. – №311. – P. 1-2.
12. Kang, Y.M. et al. Serotonin modulates hypothalamic neuronal activity // International Journal of Neuroscience. – 2004. – 114, № 3. – P. 299-319.
13. Xiu-Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang, Wei Cai. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. // Experimental Biology and Medicine. – 2010. – №235. – P. 47-51.

РОЗВИТОК ОЖИРІННЯ У ЩУРІВ ВНАСЛІДОК СПОЖИВАННЯ ВИСОКОКАЛОРИЙНОЇ ДІЄТИ

Т. П. Карповець, Н.В. Шабанова, В. В. Конопельнюк,
О. М. Савчук, Л. І. Остапченко

Збільшення споживання продуктів, що мають високу калорійність може нести в собі певний ризик розвитку ожиріння, та провокувати виникнення таких патологічних станів організму, як переддіабетичний стан, цукровий діабет 2 типу, метаболічний синдром. Розкриття механізмів, які лежать в основі порушення метаболічних процесів в організмі при надходженні значної кількості висококалорійної їжі, може дозволити запропонувати нові, перспективні підходи до корекції патологічних станів, пов'язаних з цими порушеннями. Зважаючи на попередні дані по залученню серотонінергічної системи у розвиток переддіабетичного стану та діабету 2 типу, представляє певний інтерес аналіз компонентів цієї системи за розвитку ожиріння, що спричинене споживанням значних кількостей висококалорійних продуктів. Проведено аналіз розвитку ожиріння у щурів, які знаходились на висококалорійній дієті, яка складалась зі стандартного корму (60 %), тваринного жиру (10 %), яєць (10%), цукру (9 %), арахісу (5 %), сухого молока (5 %) та соняшникової олії (1 %). Показано значну зміну таких параметрів, як споживання корму, кінцева маса тіла, індекс ЛІ, індекс маси тіла, у групі щурів, що отримували висококалорійну дієту. Знайдені зміни у перерахованих показниках говорять про надмірне накопичення маси тіла у щурів дослідної групи внаслідок розвитку гіперфагії. Проаналізовано вміст серотоніну у сироватці крові та мозку піддослідних тварин, використовуючи метод іоно-обмінної хроматографії на КМ-сефарозі. Показано зміну вмісту серотоніну в мозку та сироватці крові тварин, які споживали висококалорійну їжу, що свідчить про безпосереднє залучення серотонінергічної системи в патогенез ожиріння. Проведені дослідження показують певну перспективність у більш поглибленому аналізі окремих компонентів системи метаболізму серотоніну за розвитку ожиріння, спричиненого споживанням надмірних кількостей висококалорійних продуктів.

Ключові слова: ожиріння, висококалорійна дієта, індекс маси тіла, споживання їжі, серотонін.

Одержано редколегією 25.08.2014

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИРОЩУВАННЯ *ANABAENA HASSALII* (KUTZ.) WITTR. ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

Л. М. ЧЕБАН, І. В. МАЛІЩУК, В. Р. ЛИСАК, М. М. МАРЧЕНКО

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: larisa.cheban@mail.ru

Робота присвячена оцінці ефективності культивування альгологічно чистої культури *Anabaena hassalii* (Kutz.) Witttr. на різних середовищах. Продуктивність культури аналізували за накопиченням білку та фотосинтезуючих пігментів (хлорофілу *a* та каротиноїдів). Досліджувану водорість вирощували на штучному середовищі Фітцджеральда № 11 в модифікації Цендера і Горхема та на воді із установок замкнутого водопостачання, стандартизований за показниками рН та загальної мінералізації. Ефективність культивування мікроводорості на скидній воді не відрізнялась від такої за умов використання штучного середовища. В процесі культивування на обох досліджуваних середовищах відмічене постійне збільшення біомаси, що сягала свого максимуму на 40 добу. Подібні тенденції встановлені і при вивченні динаміки вмісту загального білка та хлорофілу *a*. Максимальним вмістом білка, що знаходився в межах 22-23 %, культура *A. hassalii* характеризувалася на 40 добу вирощування. Також до 30 доби культивування включно спостерігалось поступове збільшення кількості хлорофілу *a*, що сягало рівня 17-21 мг/г сухої біомаси на обох середовищах культивування. Відмічене лінійне накопичення каротиноїдів в клітинах *A. hassalii* впродовж всього терміну культивування. Максимальний вміст каротиноїдів припадає на стаціонарну фазу росту культури *A. hassalii* на обох живильних середовищах. Культивування мікроводорості *A. hassalii* як на середовищі Фітцджеральда, так і на воді із рибоводної установки має подібні темпи росту та дозволяє отримати активно ростучу культуру, що характеризується постійним приростом біомаси, високим вмістом загального білка та основних фотосинтезуючих пігментів. Отриману таким чином продуктивну культуру можна використовувати для подальшої переробки чи продовжувати пасажувати на свіжому живильному середовищі.

Ключові слова: *Anabaena hassalii*, біомаса, хлорофіл *a*, каротиноїди, скидні води із рибоводної установки замкнутого водопостачання.

Вступ. Перевагою біотехнологій є те, що при контрольованому культивуванні фотосинтезуючих мікроорганізмів практично немає втрат цінної біомаси, яку використовують як в нативному, так і в переробленому стані (Золотарьова, 2008). Важливим при цьому є нетоксичність отриманої альгомаси, що дозволяє застосовувати її в якості харчових та кормових добавок чи преміксів (Макарова, 2009).

Можливість всебічного використання мікроводоростей потребує активного скринінгу високопродуктивних штамів і оптимізацію умов їх культивування за показниками продуктивності альгокультур. Для встановлення ефективності культивування мікроводоростей визначають приріст біомаси, сумарний вміст білків та пігментів, які є строго видоспецифічною ознакою (Кардаш, 2010). Мінеральний склад живильного середовища і умови культивування змінюють співвідношення фотосинтетичних пігментів, фракційний склад білків та значно впливають на продуктивність мікроводоростей (Мушак, 2007).

Найважливішими елементами мінерального живлення альгокультур є неорганічний вуглець, різні форми азоту (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) та фосфор. В той же час, широкий діапазон адаптаційних можливостей мікроводоростей дозволяє використовувати для їх культивування комплексні живильні середовища та стічні води різного походження (Голуб, 2013, Макарова, 2009). В якості живильного середовища можна розглядати і скидні води із рибоводних установок, які збагачені біогенними елементами, зокрема різними формами азоту. Такий підхід дозволить значно зменшити витрати на живильні середовища і при цьому отримати біомасу мікроводоростей, збагачену цінними сполуками.

Метою даної роботи була оцінка ефективності вирощування альгологічно чистої культури *Anabaena hassalii* (Kutz.) Witttr. за умов застосування штучного поживного середовища та скидних вод із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ).

Матеріали та методи. Дослідження проводили з використанням альгологічно чистої

культури синьо-зеленої водорості *A. hassalii* (НРДР), отриманої з колекції Інституту гідробіології НАН України.

Мікрowodорість культивували в стерильних умовах на середовищі Фітцджеральда № 11 в модифікації Цендера і Горхема (Золотарьова, 2008) та на скидних водах із УЗВ. Воду автоклаували при температурі 121 °С протягом 30 хв та стандартизували за показниками рН (7,5 – 8) та загальної мінералізації (495±5 ppm). Культивування проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 500 мл при температурі 21 ± 2°С, освітленні люмінесцентними лампами близько 2500 лк та 16-ти годинному фотоперіоді (Гайсіна, 2008). Інокуляцію проводили у співвідношенні інокулят : живильне середовище - 1:10.

Кількість біомаси визначали за густиною культури з використанням оптичних показників при 450 та 750 нм (Гудвилович, 2005) на СФ-46. Перехід від одиниць оптичної густини (D_{750}) до величини абсолютно сухої біомаси (АСБ) здійснювали через емпіричний коефіцієнт k :

$$\text{АСБ} = k \times D_{750}.$$

Коефіцієнт k ($k = \text{г/л/од.опт.густини}$) для культури *A. hassalii* визначали експериментально у трьох незалежних повторях (Горбунова, 2010).

Суспензію мікрowodорості центрифугували при 8 тис. об./хв. протягом 15 хв на Biofuga stratos "Herauses". У оводнених клітинах визначали кількість білку (Біохімія гідробіонтів, 2009), хлорофілу a (Campbell, 1998) та сумарних каротиноїдів (Sanchez, 2008), отримані показники перераховували на абсолютну суху масу. Після центрифугування біомасу мікрowodоростей дезінтегрували на УЗДН-2Т. Пігменти екстрагували із клітин мікрowodорості 100 % ацетоном. Спектри екстрактів пігментів вимірювали спектрофотометрично на СФ-46 в діапазоні довжин хвиль 400 – 800 нм. Розрахунок концентрації пігментів проводили за формулами (Geffrey, 1975) за значеннями оптичної густини при довжинах хвиль, що відповідають максимумам поглинання хлорофілу a та сумарних каротиноїдів.

В процесі культивування контролювали фізико-хімічні показники: рН (іонометр U-160 MU) та загальну мінералізацію середовища (кондуктометр Water Quality Tester COM – 100).

Вміст у воді розчиненого кисню, амонію, нітритів, нітратів та фосфатів визначали за загальноприйнятими гідрохімічними методами (Методи, 2006).

Ефективність вирощування оцінювали в динаміці культивування на 5, 10 та наступні кожні 10 діб до 60-ої доби включно.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Відмінності отриманих результатів, вірогідні при рівні значимості $p \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента.

Результати та обговорення. Одним із показників стану альгокультур є продуктивність фотосинтезу, яку можна оцінити за накопиченням первинної біомаси (Отуріна, 2010). Швидкість росту біомаси в першу чергу залежить від складу живильного середовища та умов культивування (інтенсивність освітлення, тривалість фотоперіоду, температура, тощо).

Наші дослідження засвідчили, що впродовж перших 5 діб вирощування *A. hassalii* на середовищі Фітцджеральда та на скидних водах з УЗВ, спостерігається низька ростова активність культури, що, очевидно, зумовлено адаптацією мікрowodорості до нових умов (рис.1А). З 10-ї доби культивування відмічено посилення ростових процесів в досліджуваній культурі. Найінтенсивніший ріст біомаси спостерігався у період з 10-ї до 40-ї доби культивування, на яку припадає максимальна продуктивність культури *A. hassalii*. Починаючи з 40-ї доби експерименту кількість біомаси монокультури *A. hassalii* починає знижуватися, оскільки альгокультура переходить у фазу відмирання, а її ріст лімітується зменшенням доступних живильних елементів та накопиченням продуктів метаболізму в культуральній рідині.

У експоненційній фазі паралельно з приростом біомаси активуються також процеси біосинтезу. На цьому етапі мікрowodорості практично не обмежені компонентами мінерального живлення, тому якісний та кількісний склад білка в клітинах характеризується найвищим вмістом (Мікрowodорості, 2007). Нами відзначене поступове збільшення вмісту білка (рис. 1В) в клітинах *A. hassalii* з 10-ї по 40-ву добу культивування, як на середовищі Фітцджеральда, так і на воді із УЗВ, що на 40 добу експерименту сягали максимальних значень. Крім того, постійний контроль фізико-хімічних показників стану культурального середовища дав можливість встановити оптимальну тривалість культивування *A. hassalii*, яка становить 40 діб. Саме за такий термін вдається отримати активно ростучу культуру, що характеризується максимальною кількістю біомаси (4-5 г/л) та вмістом білка у сухій масі на рівні 23 %. Отриману таким чином продуктивну культуру можна використовувати для подальшої переробки чи продовжувати пасажувати на свіжому живильному середовищі.

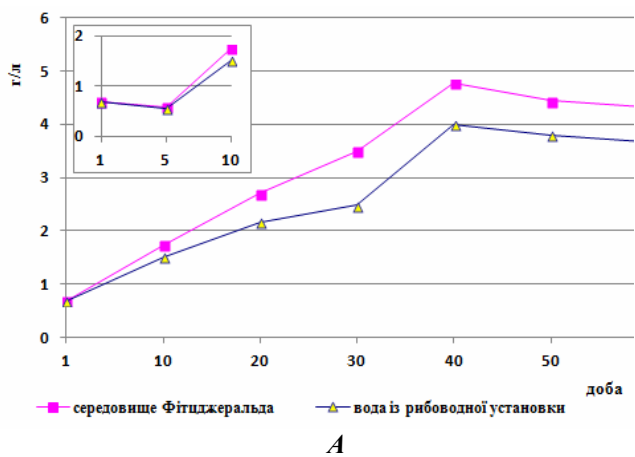


Рис. 1. Рівень біомаси (A) та кількість загального білка (B) в культурі *A. hassalii*

Продуктивність альгокультур оцінюють також за показниками накопичення фотосинтезуючих пігментів, зокрема хлорофілу *a*, який є єдиним типом хлорофілу у ціанобактерій. Залежність ефективності фотосинтезу від елементів мінерального живлення визначається їх необхідністю як для формування фотосинтетичного апарату, так і для його оновлення в процесі функціонування (Sanchez, 2008).

Зазвичай динаміка концентрації хлорофілу *a* в процесі культивування співпадає з динамікою збільшення концентрації клітин у культурі (Боровков, 2012). При культивуванні *A. hassalii* також спостерігали поступове збільшення кількості хлорофілу *a*, що сягали свого максимуму в стаціонарній фазі росту культури (рис. 2A). Так, кількість хлорофілу *a* в монокультурі *A. hassalii* під час інокуляції та проходження *lag*-фази майже не відрізнялась. Починаючи з 10-ї доби культивування

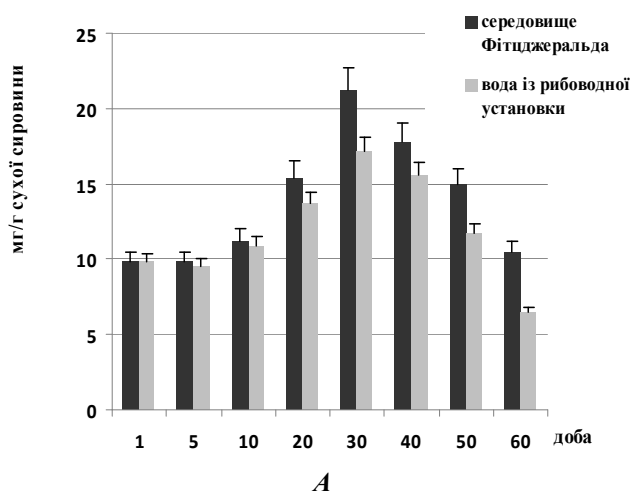


Рис. 2. Вміст хлорофілу *a* (A) та каротиноїдів (B) в культурі *A. hassalii*.

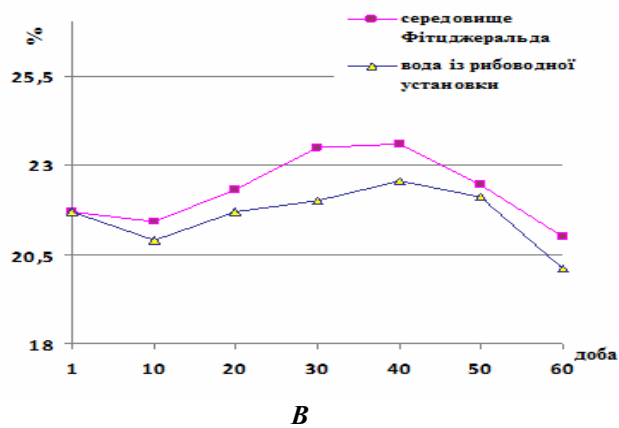


Fig 1. The level of the biomass (A) and protein content (B) in the culture of *A. hassalii*

спостерігалось поступове збільшення кількості пігменту. На 30 добу експерименту значення вмісту хлорофілу *a* в клітинах *A. hassalii* були максимальними, і сягали 21,2 мг/г сухої маси за умов культивування на середовищі Фітцджеральда та 17,2 мг/г сухої маси при вирощуванні на воді із УЗВ.

При подальшому культивуванні відмічене незначне зменшення кількості хлорофілу *a* на обох живильних середовищах. Таку динаміку пігментів в циклі росту альгокультури можна пояснити особливостями накопичувального культивування. Так, при тривалому культивуванні збільшення кількості клітин призводить до виснаження живильного середовища та дефіциту деяких мінеральних речовин. В той же час, спостерігається затінення культури мікроводоростей внаслідок її високої щільності, що поступово призводить до встановлених нами закономірностей розвитку монокультури *A. hassalii*.

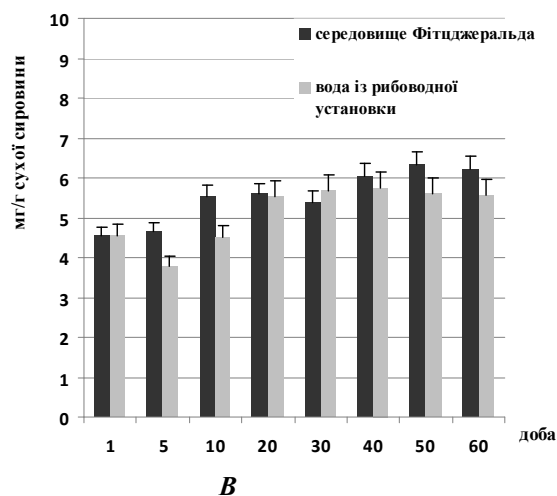


Fig. 2. The content of the chlorophyll (A) and carotenoids (B) in the culture of *A. hassalii*

Зміни кількості сумарних каротиноїдів відображають адаптивні властивості клітин мікроводоростей та здатність альгокультури пристосовуватись до умов культивування (Гудвиллович, 2005). Кількісний склад каротиноїдів в клітинах ціанобактерій може коливатися в залежності як від фази росту альгокультури, так і від кількості доступних біогенних елементів живильного середовища, зокрема азоту та фосфору (Комаристая, 2010). Так, нами відмічено, що максимальний вміст каротиноїдів припадає на стаціонарну фазу росту культури *A. hassalii* (рис. 2В). На 30 добу культивування цей показник сягав 6,23 мг/г сухої маси при застосуванні середовища Фітцджеральда і 5,58 мг/г сухої маси при вирощуванні *A. hassalii* на воді із УЗВ. При подальшому культивуванні кількість каротиноїдів в клітинах *A. hassalii* дещо збільшувалась, однак достовірно не відрізнялася від максимальних значень, встановлених на 30 добу культивування. При цьому динаміка накопичення каротиноїдів не корелювала із такою при визначенні кількості хлорофілу *a* та кількості біомаси. На відміну від двох останніх показників нами відмічене лінійне накопичення каротиноїдів в клітинах *A. hassalii* впродовж всього терміну культивування на обох живильних середовищах.

Отже, культивування *A. hassalii* на скидних водах із УЗВ дозволяє отримати активно ростучу культуру, що характеризується постійним приростом біомаси, високим вмістом загального білка та основних фотосинтезуючих пігментів. При цьому ефективність культивування на зворотній воді із УЗВ практично не відрізняється від такої за умови використання штучного середовища Фітцджеральда.

Застосування в якості живильного середовища скидних вод із рибоводної установки дасть можливість значно знизити собівартість біотехнології отримання альгомаси та при цьому дозволить звільнити скидні води рибоводних систем від біогенних елементів.

Список літератури

1. Біохімія гідробіонтів / Вогнівенко Л.П., Євтушенко М.Ю., Шевряков М.В. та ін. – Херсон: Олді-плюс, 2009. – 536 с.
2. Гайсина Л.А. Современные методы выделения и культивирования водоростей // Л.А. Гайсина, А.И. Фазлутдинова, Р.Р. Кабиро – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152с.
3. Голуб Н.Б. Культивування мікроводоростей за використання відходів / Н.Б. Голуб // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2013. – №. 6/10 (66). – С. 4 – 9.
4. Горбунова С.Ю. Ростовые и ассимиляционные характеристики культуры *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. при различных концентрациях фосфора в питательной среде / С.Ю. Горбунова, А.Б. Боровков // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80. – С. 34 – 40.
5. Гудвиллович И.Н. Динамика суммарных каротиноидов и хлорофилла *a* в клетках *Dunaliella salina* в квазинепрерывной культуре / И.Н. Гудвиллович, Н.М. Берегова, А.Б. Боровков // Экология моря. – 2005. – Вып. 6. – С. 52 – 55.
6. Золотарьова О.К. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. / О.К. Золотарьова, Є.І. Шнекова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко / Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес., 2008. – 234с.
7. Кардаш О.В. Пігменти синьозелених водоростей та їх використання / О.В. Кардаш, А.В. Курейшевич, О.А. Васильченко / Проблеми екологічної біотехнології. – 2010. – № 2. – С. 16 – 29.
8. Комаристая В.П. Культивирование *Dunaliella salina* Teod. при субоптимальных концентрациях азота и фосфора и исключения их из среды / В.П. Комаристая, С.П. Антоненко, А.Н. Рудась // Альгология. – 2010. – Т.20, №1. – С. 42 – 55.
9. Макарова Е.И. Прикладные аспекты применения микроводоростей – обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурина, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 20. – С. 120 – 133.
10. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О.М. Арсан, О.А. Давидова, Т.М. Дьяченко та ін.; За ред. В.Д. Романенка. – НАН України. Ін-т гідробіології. – К.: Логос, 2006. – 408с.
11. Мікроводорості як кормові об'єкти личинок мідій і устриць: автореферат дисертації на здобуття вченого ступеня канд. біол. наук: 03.00.17 / Л.В. Ладигіна; НАН України, Ін-т біології півд. морів ім. О.О. Ковалевського. – Севастополь, 2007. – 24 с.
12. Мушак П.О. Внутрішньовидова та міжвидова реакція альгологічно чистих культур синьозелених водоростей на зміни умов вирощування / П.О. Мушак // Ukr. botan. Journ. – 2007. - Vol. 64 (1). – Р. 132 – 139.
13. Определение содержания хлорофилла в планктоне пресных водоемов / Сост. Л.А. Сиренко, А.В. Курейшевич – Киев.: Наук. думка, 1982. – 52 с.
14. Отурина И.П. Особенности динамики основных фотосинтетических пигментов и накопление биомассы у микроводоросли *Scenedesmus sp.* – представителя микроальгофлоры пресноводных экосистем. / И.П. Отурина, Е.И. Макарова, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. – Вып. 2. – С. 84 – 91.
15. Campbell D.N. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation / D.N. Campbell, V.H. Hurry, A.K. Clarke // Microbiol.

- Mol. Biol. Rev. — 1998. — № 62 (3). — P. 667 – 683.
16. Geffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations // Biochem. Physiol. Pflanzen. – 1975. – Vol. 167. – P. 191 – 194.
17. Sanchez D.M. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanos as cosolvent / D.M. Sanchez, C.M. Serrano, M.R. Rodriguez at al. // Journal of Separation Science. – 2008. -№ 31. – P. 1352 – 1362.

THE EFFICIENCY OF GROWING *ANABAENA HASSALII* (KUTZ.) WITTR. UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS

L. M. CHEBAN, I. V. MALISCHUK, V. R. LYSAK, M. M. MARCHENKO

*Chernivtsi National University named after Y. Fedkovych,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: larisa.cheban@mail.ru*

*This paper is devoted to the estimation of cultivation efficiency of the unialgal culture *Anabaena hassalii* (Kutz.) Wittr. on the different kinds of medium. The productivity of culture was analyzed by the accumulation of protein and photosynthetic pigments (chlorophyll a and carotenoids). The investigated algae was grown on the Fitzgerald's artificial medium number 11 in the modification of Zehnder and Gorham and on the water from RAS (Recirculation Water System), that was standardized with the indicators pH and total mineralization. The efficiency of *A. hassalii* cultivation on the waste water did not differ from the efficiency of cultivation on artificial medium. During the cultivation on both investigated media it was noted the constant increase of algae biomass, that has reached its maximum on the 40-th day. The similar tendencies were set also during the study of total protein content dynamics and chlorophyll a dynamics. The culture of *A. hassalii* was characterized with maximum content of total protein, that was within 22-23% on the 40-th day of cultivation. It was also observed a gradual increasing of the number of chlorophyll a, which have reached the level of 17-21 mg / g of the dry biomass till the 30-th day of cultivation inclusive on both culture media. It was noticed a linear accumulation of carotenoids in the cells of *A. hassalii* during the whole period of cultivation. The maximum content of carotenoids is observed in the stationary growth phase of culture *A. hassalii* on both nutrient media. The cultivation of microalgae *A. hassalii* on the Fitzgerald's medium and on the water from RAS has similar growth rates and allows to get the actively growing culture that is characterized by constant increase of biomass, high content of total protein and major photosynthetic pigments. The resulting so productive culture can be used for further processing or can continue to cultivate of the fresh culture medium.*

*Keywords: *Anabaena hassalii*, biomass, chlorophyll a, carotenoids, waste water from recirculation water system*

Одержано редколлегією 15.10.2014

ВМІСТ ЕСЕНЦІАЛЬНИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

К. О. ДВОРЩЕНКО

*НДЛ «Біохімії» відділення біологічних і біомедичних технологій ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
e-mail: k21037@gmail.com*

Патологічні стани верхнього відділу шлунково-кишкового тракту, які супроводжуються зниженням синтезу гідрохлоридної кислоти, можуть призвести до гіпергастринемії, дисбіозу та навіть пухлином шлунка. Більше того, тривала гіпоацидність, викликана інгібіторами протонної помпи, є фактором ризику для розвитку гострого панкреатиту та навіть малігнізації підшлункової залози. На сьогоднішній день загальні фактори та механізми структурно-функціональної реорганізації підшлункової залози при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії вивчені недостатньо. Для відновлення гомеостазу шлунково-кишкового тракту застосовують мультипробіотики, які володіють широким спектром біологічної активності. Важливу фізіологічну роль в організмі виконують мінеральні речовини, які забезпечують всі процеси життєдіяльності. Досліджено мікроелементний склад (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn та Se) підшлункової залози щурів при тривалому пригніченні кислотної секреції шлунка та при введенні мультипробіотичного препарату. Досліди проводили на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях. Гіпоацидний стан моделювали внутрішньочеревним введенням 14 мг/кг омепразолу 1 раз на добу протягом 28 днів. Щурам іншої групи одночасно з введенням омепразолу перорально вводили мультипробіотик у дозі 0,14 мл/кг. Контрольним щурам 28 днів вводили внутрішньочеревно 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Визначення вмісту мікроелементів у тканині підшлункової залози проводили з використанням методу мас-спектрометрії. Встановлено, що у щурів при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії у підшлунковій залозі знижується вміст марганцю, міді, цинку та селену, при цьому зростає рівень ванадію, хрому, заліза та кобальту. Показано, що мультипробіотик сприяє відновленню порушеного мікроелементного гомеостазу в досліджуваному органі щурів з гіпоацидним станом шлунка, що вказує на важливе значення нормофлори у підтримці фізіологічного рівня досліджуваних мінеральних речовин.

Ключові слова: тривала шлункова гіпохлоргідрія, підшлункова залоза, мікроелементи, мультипробіотик

Вступ. У спектрі захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) значне місце займають гіпоацидні стани. Зниження кислотності шлункового соку призводить до таких негативних наслідків як порушення травлення, гіпергастринемія та дисбіози, які сприяють формуванню запальних процесів та неопластичних змін у органах травної системи. Багато фахівців розглядають тривалі гіпоацидні стани шлунка як важливу сучасну проблему, що потребує розробки ефективних методів для її профілактики та лікування. Зокрема, для корекції цих розладів варто використовувати пробіотичні препарати, які здатні ефективно та безпечно відновлювати порушений мікробіоценоз організму та сприяти відновленню структурно-функціонального стану органів травної системи (Lu et al., 2010; Gratz et al., 2010). Згідно даних літератури та проведених нами досліджень існує зв'язок між тривалою шлунковою гіпохлоргідрією та можливим розвитком патологічних змін у підшлунковій залозі

(Sundstrom et al., 2006; Youssef et al., 2005; Дворщенко та ін., 2013).

Важливе фізіологічне значення в організмі виконують мінеральні речовини. Вони входять до складу клітин і тканин та забезпечують всі процеси життєдіяльності: обмін речовин, ріст, дихання, кровотворення, роботу центральної нервової системи та ін. (Нагорная и др., 2008) За ступенем фізіологічного значення елементи поділяють на життєво важливі (есенціальні), до яких належать всі макроелементи (H, O, N, C, Ca, Cl, F, K, Mg, Na, P, S) та 8 мікроелементів (Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se, Zn) та умовно есенціальні (B, Co, Ge, Li, Si, V), які є життєво необхідними, але за умов надлишку здатні викликати патологічні зміни в організмі. Тому відхилення в концентрації хімічних елементів можуть викликати порушення різного ступеня вираженості: фізіологічні зміни в межах звичайної регуляції; значні порушення метаболізму та специфічні захворювання (Горелова и др., 2005; Молодовець, 2008).

В зв'язку з вищевикладеним метою роботи було вивчити мікроелементний склад підшлункової залози шурів при гіпоацидному стані шлунка та при введенні мультипробіотичного препарату.

Матеріали та методи. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Першій групі тварин (контроль) вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій один раз на добу упродовж 28 діб. Другій групі тварин (контроль на введення пробіотику) вводили перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик «Симбітер[®] ацидофільний» концентрований («Симбітер[®]»), розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 діб. Третій групі тварин (модель тривалої шлункової гіпохлоргідрії) вводили інтраперитонеально 14 мг/кг омепразол один раз на добу упродовж 28 діб. Четвертій групі тварин сумісно вводили інтраперитонеально 14 мг/кг омепразол, розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій, та перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик «Симбітер[®]», розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 діб.

Кількісний аналіз вмісту мікроелементів в тканині підшлункової залози проводили з

використанням методу мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою на приладі фірми Varian (USA), модель 820-MS. Вміст елементів визначали за допомогою калібрувальних графіків, які були побудовані з використанням відповідних розчинів стандартних зразків. Вимірювання для кожної проби проводили не менше трьох разів. Результати аналізу виражали в мкг × г⁻¹ сухої речовини (Hsiung et al., 1997). Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента (Лакин, 1990).

Результати та обговорення. Встановлено, що при тривалому зниженні шлункової секреції гідрохлоридної кислоти омепразолом, у підшлунковій залозі знижується вміст наступних мікроелементів: марганцю – в 1,3 раза (p < 0,05), міді – в 1,6 раза (p < 0,01), цинку – в 1,4 раза (p < 0,05) та селену – в 1,9 раза (p < 0,01) порівняно з контрольною групою тварин (табл. 1). За цих же умов експерименту у тканині підшлункової залози зростає рівень ванадію і заліза – в 2,2 раза (p < 0,01), хрому – в 2,1 раза (p < 0,01) та кобальту – в 1,4 раза (p < 0,05) відносно контролю (табл. 1).

У тварин, яким разом з омепразолом вводили мультипробіотик «Симбітер[®]», у підшлунковій залозі досліджувані мікроелементи частково повертаються до контрольних значень. Так, зростає вміст марганцю – в 1,3 раза (p < 0,05), міді – в 1,2 раза (p < 0,05), цинку – в 1,4 раза (p < 0,05) та селену – в 1,7 раза (p < 0,01) порівняно з щурами з гіпоацидним станом шлунка.

Табл. 1. Вміст мікроелементів у підшлунковій залозі шурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії, мкг × г⁻¹ (M ± m, n = 10)

Table 1. Microelement content in the pancreas upon long-term gastric hypochlorhydria, mcg × g⁻¹ (M ± m, n = 10)

Групи тварин / Показник	Контроль	Мультипробіотик	Омепразол	Омепразол + мультипробіотик
V	0,41 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,91 ± 0,08**	0,64 ± 0,06**/#
Cr	1,17 ± 0,09	1,25 ± 0,12	2,42 ± 0,22**	1,83 ± 0,17**/#
Mn	1,51 ± 0,14	1,62 ± 0,16	1,16 ± 0,09*	1,54 ± 0,13#
Fe	23,71 ± 2,28	23,04 ± 2,27	52,73 ± 5,19**	37,31 ± 3,69**/#
Co	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,015 ± 0,001*	0,011 ± 0,001#
Cu	1,72 ± 0,15	1,62 ± 0,16	1,08 ± 0,08**	1,34 ± 0,09*/#
Zn	18,33 ± 1,81	19,01 ± 1,84	13,41 ± 1,28*	19,01 ± 1,87#
Se	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,19 ± 0,01**	0,33 ± 0,03###

Примітка: * – p < 0,05; ** – p < 0,01 відносно контролю; # – p < 0,05; ## – p < 0,01 відносно групи тварин, яким вводили омепразол

При введенні мультипробіотичного препарату на фоні тривалої шлункової гіпохлоргідрії у тканині підшлункової залози знижується рівень ванадію, заліза і кобальту – в 1,4 раза ($p < 0,05$) та хрому – в 1,3 раза ($p < 0,05$) відносно групи тварин, яким вводили лише омепразол (табл. 1).

Збільшений вміст ванадію у підшлунковій залозі шурів з гіпоацидним станом шлунка може спричинювати генотоксичну дію на клітини. Відомо, що солі ванадію володіють мутагенними, канцерогенними та ембріотоксичними властивостями. Крім того, підвищений рівень ванадію може впливати на проникність мітохондріальних мембран та пригнічувати синтез холестерину. Подібний негативний ефект на клітини підшлункової залози може спричинити збільшений вміст хрому, який при високій концентрації володіє мутагенними та канцерогенними властивостями. Генотоксичний ефект хрому пов'язаний з пригніченням процесів стабільності синтезу ДНК та з активацією оксидативного (супероксид- та гідроксил-опосередкованого) пошкодження ДНК. Іони хрому (Cr^{3+} та Cr^{6+}) дозозалежно викликають індукцію апоптозу або затримку клітин на певній стадії клітинного циклу, що має важливе значення у поетапному механізмі метал-індукованого канцерогенезу (Кудрин і Громова, 2007).

Встановлене при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії зниження у підшлунковій залозі вмісту марганцю свідчить про можливе зниження активності мітохондріальної супероксиддисмутази, кофактором якого він є. Крім того, зменшення рівня марганцю може вплинути на стабілізацію і компактизацію молекул ДНК, на білковий та фосфорний обмін, окисно-відновні процеси в клітинах підшлункової залози. Також може змінитись активність багатьох інших ферментативних процесів, в яких бере участь даний мікроелемент (Кудрин і Громова, 2007).

В умовах гіпоацидного стану шлунка підвищення рівня заліза у підшлунковій залозі може сприяти активації вільнорадикальних процесів у даному органі, оскільки відомо, що іони двовалентного заліза є індукторами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (реакції Хабер-Уейса). Крім того надлишок заліза може сприяти індукції розривів ДНК, мутагенезу та канцерогенезу (Букин і Драудин-Крыленко, 2000; Кос et al., 2008).

У підшлунковій залозі в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії вміст кобальту зростає, що може негативно вплинути на клітини досліджуваного органу. Іони кобальту (Co^{2+}) подібно іонам заліза (Fe^{2+}) активують ПОЛ, пригнічують синтез ДНК у лімфоцитах та

індукують синтез даними клітинами фактору некрозу пухлин- α . Тривала експозиція солей кобальту сприяє розвитку пухлин. Таким чином, кобальт є генотоксичним металом. Одним з механізмів дії кобальту на клітини є активація індукованого гіпоксією фактора – HIF. Кобальт імітує в клітині стан гіпоксії, що потім призводить до активації апоптозу, гліколізу, ангиогенезу та еритропоезу. Також ідентифіковані 85 генів, експресія яких змінюється у відповідь на високі дози кобальту. До білків, що кодують ці гени належать білки-переносники кобальту, супресори і транскрипційні фактори пухлин та білки, що продукуються у відповідь на стрес (Bruck, 2003; Malard et al., 2007).

Зниження вмісту міді у підшлунковій залозі при тривалому зниженні кислотності шлункового соку може сприяти порушенню багатьох метаболічних процесів. Головною біологічною функцією міді є участь у тканинному диханні та кровотворенні. Фізіологічні концентрації міді також сприяють стабілізації клітин за рахунок їх присутності як кофактору в активному центрі цитозольної супероксиддисмутази, яка є важливим ферментом антиоксидантного захисту. Виникає потреба в міді при розвитку запальних процесів, анемії, лейкозі та інфекційних захворюваннях. Відомо, що мідь та цинк є синергістами, які посилюють дію один одного (Нагорная и др., 2008; Кудрин і Громова, 2007).

Нами встановлено, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії у підшлунковій залозі також знижується вміст цинку. Нестача цинку негативно впливає на метаболічні процеси в клітині, оскільки цей мікроелемент є компонентом багатьох металозалежних ферментів (цитозольна супероксиддисмутаза, алкогольдегідрогеназа, ДНК- і РНК-полімерази та ін.) та транскрипційних факторів. При дефіциті цинку порушується клітинний цикл, процеси денатурації ДНК стають незворотними, відмічається зниження стійкості ядер клітин до негативних чинників, посилюються вільнорадикальні процеси. Крім того нестача цинку в клітинах може знизити активність окисно-відновних ферментів (сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази), зменшити загальний рівень енергетичних процесів та порушити процеси тканинного дихання (Ребров і Громова, 2008; Maret, 2013).

Істотне зниження вмісту селену в підшлунковій залозі при введенні шурам омепразолу може вплинути на структурно-функціональний стан клітин, оскільки він взаємодіє з ферментами, вітамінами та

біологічними мембранами, приймає участь у регуляції метаболізму, в обміні білків, вуглеводів і жирів, а також у окисно-відновних реакціях. Селен входить до складу активного центру антиоксидантних ензимів, ферментів метаболізму нуклеїнових кислот, ліпідів, гормонів (глутатіонпероксидази, йодотиронін-дейодинази, тіоредоксинредуктази, фосфоселенфосфатази, фосфоліпід-гідропероксид-глутатіонпероксидази та ін.). Селен є важливим генопротектором, який блокує пошкодження ДНК продуктами ПОЛ, металами та регулює процеси їх системної елімінації в організмі (Beckett and Arthur, 2005; Boosalis, 2008; Vera et al., 2013).

Виявлене при введенні мультипробіотика «Симбітер®» відновлення досліджуваного мікроелементного спектру тканини підшлункової залози щурів пов'язано з важливою функцією мікрофлори травного тракту – регуляцією засвоєння всіх основних есенціальних хімічних елементів (Аряев и др., 2006; Бережной и др., 2004). Зокрема, молочна кислота, яка утворюється молочнокислими бактеріями (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*) сприяє більш повному засвоєнню заліза, фосфору та кальцію. Доведено, що пробіотичні препарати чинять виражену дію на обмін мінеральних речовин. Як свідчать літературні данні, пробіотики можуть суттєво впливати на функціонування елементного гомеостазу організму як за умов норми, так і за умов розвитку різних патологічних станів (Транковская и др., 2003; Янковский и др., 2009; Янковский и Дымент, 2006). Крім того, бактерії, що входять до складу пробіотиків, володіють широким спектром біологічної дії: корегують мікроекологічний статус, стимулюють неспецифічний імунітет, регулюють травлення макроорганізму, забезпечують синтез багатьох макро- і мікронутрієнтів та задовольняють потреби організму у вітамінах групи В (В₁, В₂, В₆, В₈, В₁₂), вітамінах К, С, нікотинової, фолієвої, пантотенової, ліпоєвої кислотах. Це все в цілому може сприяти відновленню мікроелементного статусу підшлункової залози щурів з гіпоацидним станом шлунка.

Висновки. Таким чином, порушення балансу досліджуваних есенціальних мікроелементів (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn та Se) у підшлунковій залозі щурів при тривалій гіпоацидності шлункового соку може бути викликано наявністю хронічного запального процесу у ШКТ, який в свою чергу може зумовити порушення засвоєння мікроелементів та спричинити їх дефіцит в організмі. Розлади мінерального обміну в тканині підшлункової

залози в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії можуть порушити баланс практично всіх обмінних процесів у досліджуваному органі, що може сприяти розвитку важких патологічних станів. Введення тваринам з гіпоацидним станом мультипробіотичного препарату сприяє відновленню рівноваги досліджуваних мікроелементів, що свідчить про важливу роль дисбіотичних порушень у розвитку дисбалансу мікроелементів у підшлунковій залозі на фоні тривалого пригнічення кислотної секреції шлунка.

Список літератури:

1. Gastric juice acidity in upper gastrointestinal diseases / P.-J. Lu [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, № 43. – P. 5496–5501.
2. Gratz S.W. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases / S.W. Gratz, H. Mykkanen, H.S. El-Nezami // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 403–410.
3. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study / A. Sundstrom [et al.] // *Pharmacoevidemiol. Drug Safe.* – 2006. – Vol. 15, № 3. – P. 141–149.
4. Acute pancreatitis associated with omeprazole / S.S. Youssef [et al.] // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2005. – Vol. 43, № 12. – P. 558–561.
5. Дворщенко К.О., Вакал С.С., Драницина А.С., Сенін С.А., Остапченко Л.І. Стрес-респонсивні системи підшлункової залози щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика «Симбітер®» // *Український біохімічний журнал.* – 2013. – Т. 85, № 2. – С. 62–71.
6. Макро- и микроэлементы: значение для организма человека в норме и патологии / Нагорная Н.В. [и др.] // *Міжнарод. вісн. мед.* – 2008. – Т. 1, № 3–4. – С. 209–215.
7. Горелова Ж.Ю. Нарушение обмена микроэлементов при заболеваниях желудочно-кишечного тракта / Ж.Ю. Горелова, С.Б. Александровский, О.И. Орлова // *Микроэлементы в медицине* – 2005. – № 1. – С. 21–22.
8. Молодовець О.Б. Вплив мікроелементних порушень на стан перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантного захисту у хворих на хронічний атрофічний гастрит / О.Б. Молодовець // *Архів клінічної медицини.* – 2008. – Т. 13. – № 1. – С. 70–72.
9. Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry / C.S. Hsiung [et al.] // *Clin. Chem.* – 1997. – Vol. 43, № 12. – P. 2303–2311.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

11. Кудрин А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии / А. Кудрин, О. Громова. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2007. – 548 с.
12. Букин Ю.В. Молекулярно-биологические механизмы гастроканцерогенеза и подходы к профилактике рака желудка / Ю.В. Букин, В.А. Драудин-Крыленко // Усп. биол. хим. – 2000. – Т. 40. – С. 329–356.
13. Кос М. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats / М. Кос, Н. Imik, F. Odabasoglu // Biol. Trace. Elem. Res. – 2008. – Vol. 126. – № 1-3. – P. 222–236.
14. Bruick R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor / R.K. Bruick // Genes Dev. – 2003. – Vol. 17. – P. 2614–2623.
15. Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt / V. Malard [et al.] // BMS Genomics. – 2007. – Vol. 8. – P. 147–164.
16. Ребров В.Г. Витамины, макро- и микроэлементы. / В.Г. Ребров, О.А. Громова. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2008. – 960 с.
17. Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life / W. Maret // Adv. Nutr. – 2013. – Vol. 4. – P. 82–91.
18. Beckett G.J. Selenium and endocrine systems / G.J. Beckett, J.R. Arthur // J. Endocrinol. – 2005. – Vol. 184. – P. 455–465.
19. Boosalis M.G. The role of selenium in chronic disease / M.G. Boosalis // Nutr. Clin. Pract. – 2008. – Vol. 23. – P. 152–160.
20. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? / S. Bera [et al.] // Mutagenesis. – 2013. – Vol. 28. – P. 127–134.
21. Клиническое значение пробиотиков в профилактике и лечении антибиотик–ассоциированной диареи у детей / Н.Л. Аряев [и др.] // Современная педиатрия. – 2006. – Т. 3. – № 12. – С. 148–151.
22. Микрофлора человека и роль современных пробиотиков в ее регуляции / В. Бережной [и др.] // Здоровье женщины. – 2004. – № 1 (17). – С. 134–139.
23. Транковская Л.В. Особенности микроэлементного гомеостаза у детей с хроническими заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки / Л.В. Транковская, В.Н. Лучанинова, Г.Г. Иванова // Российский педиатрический журнал – 2003. – № 5. – С. 14–17.
24. Янковский Д.С. Особенности отечественных мультипробиотиков / Д.С. Янковский, Р.А. Моисеенко, Г.С. Дымент // Современная педиатрия. – 2009. – № 3, Т. 25. – С. 79–86.
25. Янковский Д.С. Пробиотики – лекарства XXI столетия / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент // Здоров'я України. – 2006. – Т. 140. – № 7. – С. 1–11.

THE CONTENT OF ESSENTIAL TRACE ELEMENTS IN THE RAT PANCREAS UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA AND WITH ADMINISTRATION OF THE MULTIPROBIOTIC

K. O. Dvorschenko

The pathological conditions of the upper gastrointestinal tract, which are accompanied by reduced synthesis of hydrochloric acid, may lead to hypergastrinemia, dysbiosis or even gastric tumors. Moreover, long-term hypoacidity evoked by proton pump inhibitors is the risk factor for acute pancreatitis development or even pancreatic malignization. But common factors and mechanisms of pancreatic structural and functional reorganization upon long-term gastric hypochlorhydria are still poorly understood. Probiotics are widely used for restoration of gastrointestinal tract homeostasis, since they have a broad spectrum of the biological activity. The microelements perform the important physiological role in the organism providing all the vital processes. The microelement composition (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn and Se) of the rat pancreas tissue with long-term inhibition of gastric acid secretion and upon administration of the multiprobiotic substance was investigated. Experiments were carried out on white non-strain male rats. Hypochlorhydria was induced by 28-day long abdominal omeprazole injection (14 mg/kg once a day). The rats of another group simultaneously with omeprazole were treated with multiprobiotic (0.14 ml/kg per os). Control animals were treated with water: 0.2 ml abdominally + 0.5 ml orally during 28 days. The content of analyzed microelement was determined in pancreatic tissue with method of mass spectrometry. The content of manganese, copper, zinc and selenium were decreased, while the level of vanadium, chromium, iron, and cobalt were increased in the pancreas upon long-term gastric hypochlorhydria. It was shown, that multiprobiotic promotes restoration of the microelement homeostasis in investigated rat's organ indicating the important role of normal flora in the maintaining of physiological level of studied minerals.

Key words: long-term gastric hypochlorhydria, pancreas, microelements, multiprobiotic.

Одержано редколлегією 25.08.2014

ВМІСТ РІЗНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА, М. Г. СКРИПНИК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000
e-mail: kopilchuk@gmail.com

У роботі досліджено рівень загального гемоглобіну та його основного деривату – оксигемоглобіну в гемолізатах еритроцитів крові щурів за умов аліментарної депривації протеїну. Водночас значна увага приділялася визначенню вмісту глікозильованого гемоглобіну – маркеру порушень вуглеводного обміну в організмі за умов білкової недостатності. З метою дослідження особливостей даних біохімічних показників за умов аліментарної депривації протеїну дослідних тварин протягом 28 днів утримували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні з урахуванням принципу парного харчування. Гемолізат еритроцитів отримували методом Драбкіна із подальшим видаленням їх ретикулярної стромы. Визначення концентрації загального гемоглобіну проводили гемоглобінціанідним методом, оксигемоглобіну – спектрофотометричним методом шляхом співвідношення молярних коефіцієнтів екстинкції при досягненні максимального рівня оксигенації молекули. Рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA_{1c}) в гемолізаті еритроцитів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою. Встановлено, що за умов білкової недостатності в гемолізаті еритроцитів крові щурів відбувається зниження концентрації загального гемоглобіну та оксигемоглобіну в 1,4 рази порівняно з показниками контролю. Слід відмітити, що зниження вмісту гемоглобіну за умов білкової недостатності, з одного боку, може бути пов'язане з порушеннями синтезу поліпептидних ланцюгів глобіну внаслідок дефіциту амінокислот, з іншого, – порушенням синтезу гему. Водночас у дослідній групі тварин спостерігається зниження вмісту основної лігандної форми гемоглобіну – оксигемоглобіну, що може свідчити про порушення процесів зв'язування та віддачі кисню і, як наслідок, зміни спорідненості гемоглобіну до кисню. Водночас нами досліджено, що в гемолізаті еритроцитів крові щурів, які перебували на низькопротеїновій дієті, відбувається двократне підвищення рівня глікозильованого гемоглобіну порівняно із показниками контролю, що розглядається як прогностичний показник метаболічної гіперглікемії, оскільки відображає відсоткову кількість гемоглобіну крові, незворотно з'єднаного із глюкозою). Глікозильований гемоглобін внаслідок міцного зв'язку з киснем важко віддає його тканинам, тому підвищення його вмісту в крові спричинює виникнення тканинної гіпоксії, що пов'язано із недостатнім насиченням киснем базальних мембран

Ключові слова: гемоглобін, оксигемоглобін, глікозильований гемоглобін, гемолізат, еритроцити, низькопротеїновий раціон

Вступ. Гемоглобіни (Hb) – гетерогенна родина залізовмісних функціональних білків еритроцитів, що містять в якості простетичної групи протопорфірин IX (гем). Окрім транспорту кисню, вони виконують низку важливих функцій: зв'язування оксиду азоту та сульфідів, взаємодію з активними метаболітами Оксигену та Нітрогену тощо (Boas and Franceschini, 2011; Осипов и др., 2007). Сьогодні в літературі (Топунов и Петрова, 2001; Дудок, 2010; Shibayama et al., 2014) часто обговорюється питання структурно-функціонального стану молекули гемоглобіну та кількісного співвідношення його лігандних форм, зокрема, дезокси- (RHb), окси- (HbO₂), карбокси- (HbCO), сульфо- (SHb) та метгемоглобіну (MetHb) за умов розвитку патологічних станів різного генезу.

Не викликає сумніву, що за умов білково-енергетичної недостатності (БЕН) актуальним залишається визначення рівня гемоглобіну та його основних дериватів, зокрема

оксигемоглобіну – основного компоненту гемоглобінової системи, оскільки за умов вираженого дефіциту екзогенного надходження протеїну відбувається інтенсифікація окислювальних процесів у тканинах (Копильчук та Бучковська, 2013), що виявляє негативний ефект на ступінь дисоціації HbO₂ і, як наслідок, може спричинювати дисбаланс кисневого гомеостазу та розвиток тканинної гіпоксії (Васильева, 2005).

У сучасних наукових джерелах (Martin and Tomlinson, 2014; Ladyzynski et al., 2014; Радченко, 2008; Ильин и др., 2008) широко обговорюється одна із мінорних форм гемоглобінів – глікозильований гемоглобін (HbA_{1c}), кількість якого складає близько 5-10%. Вміст HbA_{1c} вважається маркерним показником порушень вуглеводного обміну (Скибчук та Соломенчук, 2005; Калиман, 2008). Переважно сайтами глікозилювання гемоглобіну є аміногрупи N-кінцевої амінокислоти валіну обох

β -ланцюгів, а також ϵ -аміногрупи деяких залишків лізину α - і β -ланцюгів глобіну (Ladyzynski et al., 2014). Глікозильований гемоглобін має підвищену спорідненість до кисню, і збільшення його рівня може погіршити оксигенацію тканин. Однак, з іншого боку, утворення HbA_{1c} також може бути пристосувальною реакцією організму для збільшення кисневої ємності периферичної крові (Радченко, 2008; Ильин и др., 2008).

Метою даної роботи було дослідження рівня загального, окси- та глікозильованого гемоглобіну в гемолізатах еритроцитів крові щурів за умов низькопротеїнового раціону.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 100-120 г. Тварин утримували у пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до води. Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування (Mashiko et al., 2007) Усі маніпуляції здійснювали згідно із «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Дослідні тварини були поділені на групи:

1 – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К) (Reeves et al., 1993);

2 – тварини, які протягом 28 днів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну) (НПР).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 28 добу експерименту. Для дослідження використовували цитровану кров, взятую із *vena portae hepatis* загальноприйнятим методом. Еритроцитарну масу відділяли від плазми центрифугуванням при 500 g. Еритроцити відмивали від білків плазми крові ізотонічним розчином NaCl. Відмиті еритроцити гемолізували з подальшим центрифугуванням для видалення їх ретикулярної стромы за методом Драбкіна (Drabkin, 1949).

Визначення концентрації загального гемоглобіну (Hb) проводили гемоглобінціанідним методом з використанням стандартного набору реактивів «Філісіт-Діагностика» (Україна). Вміст гемоглобіну виражали в г/л.

Кількісне визначення лігандної форми гемоглобіну – оксигемоглобіну (HbO₂) проводили спектрофотометричним методом (Логвиненко А.Г, Логвиненко С.И., 1990), що ґрунтується на співвідношенні молярних коефіцієнтів екстинкції (E_{λ}) вибраної аналітичної довжини хвилі ($D'_{\max} = 560 - 580$ нм; $D''_{\max} = 535 - 560$ нм) при досягненні максимального рівня оксигенації молекули. Результати відносного вмісту HbO₂ отримували шляхом розрахунку та виражали у відсотках до кількості гемоглобіну.

Вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA_{1c}) в гемолізаті еритроцитів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою з використанням тест-системи «Реагент» (Україна). Стіяка форма глікозильованого гемоглобіну містить 1-дезоксигуанозил-1-(N-валіл)-фруктозу. При нагріванні з фосфорною кислотою вуглеводний залишок гідролізується до 5-оксиметил-2-фуральдегіду, що при взаємодії з 2-тіобарбітуратом проявляє забарвлення, інтенсивність якого визначали фотометрично. Вміст HbA_{1c} розраховували за співвідношенням концентрації фруктози та кількості гемоглобіну в гемолізаті й виражали в мкмоль фруктози/г гемоглобіну.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Порівняння між двома групами здійснювали за допомогою програми *Microsoft Excel*, використовуючи двовибірковий *t*-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Вірогідними вважали відмінності між групами при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що в гемолізаті еритроцитів крові щурів, які перебували на низькопротеїновій дієті, спостерігається зниження концентрації загального гемоглобіну в 1,4 рази порівняно із показниками контрольної групи (рис. 1). Відомо, що усі компоненти гемоглобіну – α - та β -ланцюги, гем синтезуються у збалансованих кількостях. Вірогідно, зниження вмісту гемоглобіну за умов білкової недостатності, з одного боку, може бути пов'язане з порушеннями синтезу поліпептидних ланцюгів глобіну внаслідок дефіциту амінокислот, з іншого, – порушенням синтезу гему.

За даними літератури (Schechter, 2008; Vinogradov and Moens, 2008; Wajzman and Mogadkhani, 2011) найважливіше значення в синтезі глобіну належить есенціальним амінокислотам, зокрема, гістидину, лізину та триптофану, відсутність або недостатність яких у харчовому раціоні, супроводжується порушенням гематопоезу, і, як наслідок, зниженням кількості еритроцитів та пригніченням синтезу молекули гемоглобіну.

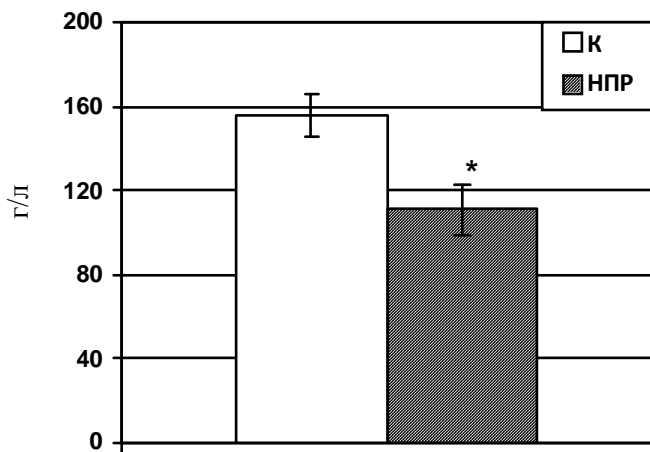


Рис. 1. Вміст загального гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов низькопротеїнового раціону

Примітка (тут і надалі): К – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами; НПР – тварини, які протягом 4 тижнів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну); * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$.

Fig. 1. The content of total hemoglobin in the hemolysate of the rats erythrocytes on condition of the low-protein ration

Note (here in after): K – animals that were kept on a semisynthetic diet balanced in all nutrients; НПР – animals that received a semisynthetic low-protein diet (1/3 of the conventional rules of the daily requirement of protein) are within 4 weeks before the experiment; * – statistically significant difference compared to control values, $P \leq 0,05$

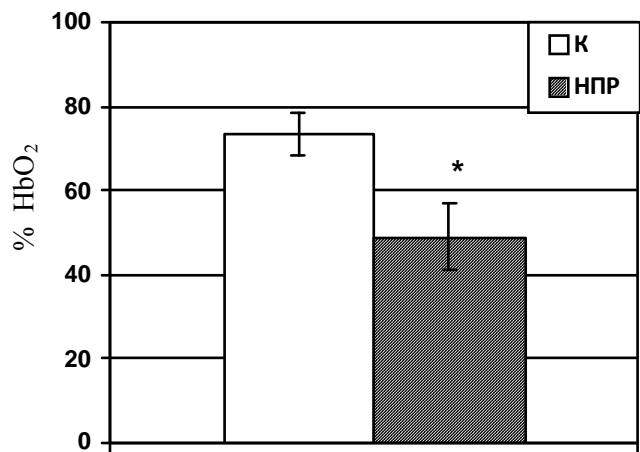


Рис. 2. Вміст оксигемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов низькопротеїнового раціону

Fig. 2. The content of total oxyhemoglobin in the hemolysate of the rats erythrocytes on condition of the low-protein ration

Слід відмітити, що гістидин виступає зв'язуючою ланкою між глобіном та гемом (Дудок та ін., 2002; Nabil, 2008), оскільки займає певне координаційне положення іона Fe^{2+} в складі феропротопорфірину – проксимальний залишок His F8 та дистальний His E7, який знаходиться поблизу кисеньзв'язуючої ділянки гему, але не має з нею безпосереднього зв'язку (Zhao et al., 2014). Окрім того, синтез поліпептидних ланцюгів глобіну відбувається тільки при наявності гему, який відразу ж зв'язується з білком (Clark and Thein, 2004). Дані літератури (Jones et al., 2012; Jackya et al., 2012) засвідчують, що субстратами для синтезу порфіринового циклу гему є гліцин та сукциніл-КоА – інтермедіат циклу трикарбонових кислот. Можна припустити, що зниження вмісту загального гемоглобіну за умов перебування тварин на низькопротеїновому раціоні безпосередньо пов'язано із порушенням синтезу гему, оскільки пул сукциніл-КоА в організмі, окрім його утворення із α -кетоглутарату, поповнюється шляхом метаболічних перетворень метіоніну, ізолейцину та валіну. Окрім того, гем після звільнення з гемоглобіну повторно не використовується для ресинтезу нової молекули

білка, а його порфіриновий цикл перетворюється в жовчеві пігменти, які виводяться з організму.

Унікальною особливістю гемоглобіну є його здатність зворотньо зв'язувати O_2 внаслідок позитивної кооперативної взаємодії між субодинами, яка проявляється в збільшенні спорідненості Hb із кожною наступною молекулою кисню (Артюхов и др., 2004; Космачевская и Топунов А.Ф., 2009; Люта та ін., 2013).

В ході експериментальних досліджень нами виявлено, що в гемолізаті еритроцитів крові щурів, які протягом 28 днів зазнавали білково-енергетичної недостатності, спостерігається зниження вмісту оксигемоглобіну в 1,5 рази порівняно з показниками контролю. Відомо, що координаційні властивості гему визначають здатність молекули гемоглобіну до приєднання молекулярного кисню завдяки утворенню зв'язків між іоном Fe^{2+} і амінокислотними залишками поліпептидних ланцюгів глобіну. Ймовірно, недостатність білка в харчовому раціоні призводить не тільки до деформації структурно-просторової організації гемоглобіну, а й до порушення функціонування кисеньзв'язуючої ділянки.

За даними літератури (Васильєва, 2005; Дудок та ін., 2010) близько 7-10% гемоглобіну зв'язано з мембраною еритроцита. У свою чергу, модифікація структури компонентів еритроцитарних мембран є причиною їхньої функціональної дестабілізації, з якою пов'язана система транспорту іонів (Cl^- , H^+) та газів (O_2 , CO_2). У нашому випадку зниження рівня оксигемоглобіну може бути пов'язано не лише зі зменшенням концентрації загального Hb, але й порушенням процесів зв'язування та віддачі гемоглобіном кисню, а також зміною співвідношення вмісту окремих лігандних форм гемоглобіну, наприклад окси- та карбоксигемоглобіну (Boas and Franceschini, 2011).

Відомо (Ryter and Tytrel, 2000; Люта та ін., 2013), що конформаційні порушення в оточенні гему, зміна його гідрофобності, поява аніонів у цьому просторі призводить до відщеплення Оксигену у формі супероксидного аніона і переходу $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$. Можна припустити, що утворений супероксид при взаємодії з NO, надмірна кількість якого продукується за умов білкової недостатності (Копильчук и Бучковская, 2014) може призводити до утворення більш токсичного продукту – пероксинітриду ($ONOO^-$).

Дані літератури (Зинчук, 2003) засвідчують, що гемопротейни є прямими мішенями дії пероксинітриду. При взаємодії $ONOO^-$ з оксигемоглобіном відбувається утворення метформи гемопротейнів, пошкодження порфіринового кільця з подальшою деградацією гему, що супроводжується окисненням заліза та нітрування залишків тирозину. Нітрування гемоглобіну призводить до зміни конформації білка, внаслідок якої гем виходить із гідрофобної кишені, й, отже, підвищується ймовірність його вивільнення та руйнування (Осипов, 2007; Блюм та ін., 2009). Вірогідно, виявлене нами зменшення вмісту оксигемоглобіну – основного деривату Hb може бути наслідком модифікації глобінового компонента, а також порушення зв'язку гему з глобіном, що супроводжується змінами спорідненості гемоглобіну до кисню (Рогаткин, 2012).

Відомо, що більшість білків організму, зокрема, гемоглобін, трансферин, колаген тощо, підлягають процесу неферментативного глікозилювання (Вельков, 2008; Калиман, 2008). Глікозилювання гемоглобіну продовжується протягом усього життя еритроцита і триває в середньому 120 днів. У межах цього терміну найбільший прогностичним вважається рівень HbA_{1c} за останні 30 днів, коли формується приблизно 50% даного протеїну. У сучасній

літературі (Радченко, 2008; Скрипник, 2012) рівень глікозилюваного гемоглобіну розглядають як інтегрований показник компенсації вуглеводного обміну, оскільки він відображає відсоткову кількість гемоглобіну крові, незворотно з'єднаного з глюкозою.

У наших дослідженнях встановлено двократно підвищення рівня глікозилюваного гемоглобіну в гемолізаті крові щурів, які споживали низькопротеїновий раціон, порівняно зі значеннями контрольної групи тварин. Вірогідно, зростання даного показника за умов білкової недостатності, відбувається внаслідок порушення толерантності до глюкози, що супроводжується розвитком метаболічної гіперглікемії (Goldstein et al., 2004; Ильин и др., 2008). Глікозилюваний гемоглобін внаслідок міцного зв'язку з киснем важко віддає його тканинам, тому підвищення його вмісту в крові спричинює виникнення тканинної гіпоксії, що пов'язано із недостатнім насиченням киснем базальних мембран (Скибчук та Соломенчук, 2005). Таким чином, зростання рівня глікозилюваного гемоглобіну з одночасним зниженням його оксоформи свідчить про порушення кисеньтранспортної функції в цілому, що, в свою чергу, може призвести до порушення рівноваги між процесами вільнорадикального окислення й антиоксидантного захисту в організмі.

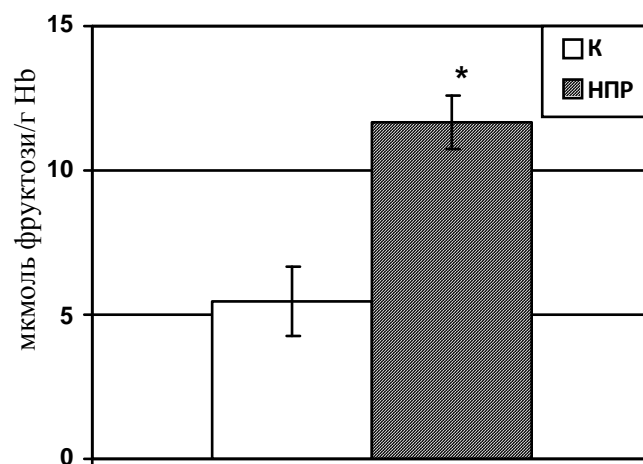


Рис. 3. Вміст глікозилюваного гемоглобіну в гемолізаті еритроцитів щурів за умов низькопротеїнового раціону.

Fig. 3. The content of total glycosylated hemoglobin in the hemolysate of the rats erythrocytes on condition of the low-protein ration.

Висновки. Отже, за умов білкової недостатності в гемолізаті крові щурів відбувається зниження загального та оксигемоглобіну з одночасним підвищенням його глікозильованої форми.

Список літератури:

1. Аргюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В. Динамика оксигенации нативного и УФ-модифицированного гемоглобина человека в присутствии оксида азота // Физиология человека. – 2004. – Т. 30, № 2. С. 110–116.
2. Блюм Я.Б., Красиленко Ю.А., Ємець А.І. Нітрування тирозину як регуляторна посттрансляційна модифікація протеїнів // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 5 – 15.
3. Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 119 – 126.
4. Дудок К.П., Влох І.Й., Влох Р.О. Структурно-функціональний стан еритроцитів, вміст лігандних форм гемоглобіну і молекул середньої маси у крові людей, хворих на шизофренію // Біологічні студії. – 2010. – Т 4, № 1. – С. 15 – 26.
5. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 33 – 45.
6. Ильин А.В., Арбузова М.И., Князева А.П. Гликированный гемоглобин как ключевой параметр при мониторинге больных сахарным диабетом. Оптимальная организация исследований // Сахарный диабет. – 2008. – № 2. – С. 60 – 64.
7. Калиман В.П. Роль гликированного гемоглобина и альбумина в диагностике гипергликемических состояний // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2008. – № 1. – С. 53 – 55.
8. Копильчук Г.П., Бучковська І.М. NO-синтазна активність у клітинах печінки щурів за умов різної забезпеченості протеїном // Біологічні системи. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 147 – 151.
9. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структуры и функций: обзор // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 6. – С. 627 – 653.
10. Логвиненко А.Г., Логвиненко С.И. Спектрофотометрический метод определения оксигемоглобина в крови // Лаб. дело. – 1990. – №3. – С.42 – 43.
11. Люта М., Федорович А., Бурда В. та ін. Вплив агматину на фізико-хімічні властивості гемоглобіну щурів за експериментального цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2011. – Вип. 55. – С. 39 – 46.
12. Люта М., Ференц І., Бурда В. та ін. Кисеньтранспортна функція гемоглобіну при введенні агматину за експериментального цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2013. – Вип. 62. – С. 46 – 54.
13. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов // Успехи биол. хим. – 2007. – Т. 47. – С. 259 – 292.
14. Радченко О.М. Глікозильований гемоглобін – метаболічний маркер пошкодження // Проблеми ендокринної патології. – 2008. – № 1. – С. 104 – 107.
15. Рогаткин Д.А. Физические основы оптической оксиметрии // Медицинская физика. – 2012. – № 2. – С. 97 – 114.
16. Скибчук В.А., Соломенчук Т.М. Глікозильований гемоглобін – фактор підвищеного ризику мікро- і макросудинних ускладнень у хворих на цукровий діабет // Український медичний часопис. – 2005. – № 5(49) – С. 81 – 88.
17. Скрипник Н.В. Діагностичне значення глікованого гемоглобіну в клінічній практиці // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. 12, № 2(40). – С. 142 – 147.
18. Топунов А.Ф., Петрова Н.Э. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 199 – 228.
19. Boas D.A., Franceschini M.A. Haemoglobin oxygen saturation as a biomarker: the problem and a solution // Phil. Trans. R. Soc. – 2011. – Vol. 369. – P. 4407 – 4424.
20. Chung J., Chen C., Paw B.H. Heme metabolism and erythropoiesis // Current Opinion in Hematology. – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 156 – 162.
21. Clark B.E., Thein S.L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders // Clin. Lab. Haem. – 2004. – № 26. – P. 159 – 176.
22. Drabkin D.A simplified technique for largescale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. – 1949. – Vol. 21. – P. 224 – 226.
23. Goldstein D.E., Little R.R., Lorenz R.A. et al. Tests of glycemia in diabetes // Diabetes Care. – 2004. – Vol. 27, № 7. – P. 1761 – 1773.
24. Jones E.M., Balakrishnan G., Spiro T.G. Heme Reactivity is Uncoupled from Quaternary Structure in Gel-encapsulated Hemoglobin: A Resonance Raman Spectroscopic Study // J Am Chem Soc. – 2012. – Vol. 134, № 7. – P. 3461 – 3471.
25. Ladyzynski P., Foltynski P., Bak M. et al. Validation of a hemoglobin A 1c model in patients with type 1 and type 2 diabetes and its use to go beyond the averaged relationship of hemoglobin A 1c and mean glucose level // J Transl Med. – 2014. – Vol. 12, № 1. – P. 328 – 336.
26. Martin J., Tomlinson P. Hepatic complications in poorly controlled type 1 diabetes mellitus: a case report // N. Z. Med J. – 2014 – Vol. 127. – P. 95 – 97.
27. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H. et al. Pair-Feeding Study Reveals That a Y5 Antagonist Causes Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice by Modulating Food Intake and Energy Expenditure // Molecular pharmacology. – 2007. – Vol. 71, № 2. – P. 602-608.
28. Nabil G.M. A Biophysical Study on Hemoglobin Molecule Irradiated by near Ultraviolet Waves // Global Veterinaria. – 2008. – № 2(4). – P. 165 – 168.
29. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of

- the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet // The journal of nutrition. – 1993. – № 5. – P. 1939-1951.
30. Ryter S.W., Tyrrell R.M. The heme synthesis and degradation pathway: role in oxidant sensitivity // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – № 8. – P. 289 – 309.
 31. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // Blood. – 2008. – Vol. 112, № 10. – P. 3927 – 3938.
 32. Shibayama N., Sugiyama K., Tame J. et al. Capturing the Hemoglobin Allosteric Transition in a Single Crystal Form // J. Am. Chem. Soc. – 2014. – Vol. 136, № 13. – P. 5097 – 5105.
 33. Vinogradov S.N., Moens L. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283. – P. 8773 – 8777.
 34. Wajcman H., Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection and characterization // Indian J Med Res. – 2011. – Vol. 134. – P. 538 – 546.
 35. Zhao J., Serrano V., Franzen S. A Model for the Flexibility of the Distal Histidine in Dehaloperoxidase-Hemoglobin A Based on X-ray Crystal Structures of the Carbon Monoxide Adduct // Biochemistry. – 2014. – Vol. 53, № 15. – P. 2474 – 2482.

THE LEVEL OF DIFFERENT FORMS OF HEMOGLOBIN IN THE HEMOLISAT OF THE ERYTHROCYTES OF RATS BLOOD ON CONDITION OF THE LACK OF PROTEIN

G. P. Kopylchuk, I. M. Buchkovska, M. G. Skrypnyk

In this work has been researched the general level of hemoglobin and its main derivative - oxyhemoglobin in hemolysates of the rats' erythrocytes under conditions of nutritional deprivation of protein. At the same time considerable attention was paid to the determination of glycosylated hemoglobin content - marker of disruptions of carbohydrate metabolism in the body under conditions of protein deficiency. In order to study the characteristics of these biochemical indicators under conditions of nutritional protein deprivation experimental animals were kept for 28 days on a semi-synthetic low-protein diet on the principle of pair food. Hemolysate of erythrocytes was obtained by Drabkin method with subsequent removal of the reticular stroma. Determination of total hemoglobin was made by a hemoglobincyanide method, oxyhemoglobin - by a spectrophotometric method by means of the molar extinction coefficient at achieving the maximum level of oxygenation of the molecule. The level of glycosylated hemoglobin in red blood cells' hemolysate was determined by reaction with the thiobarbituric acid. It was found out that under conditions of protein deficiency in rats' blood hemolysate is a decrease in the concentration of total hemoglobin and oxyhemoglobin 1,4 times compared to the control indicators. It should be noted that the decrease of hemoglobin under conditions of protein deficiency on the one hand, it may be due to impaired synthesis of globin polypeptide chains due to a deficiency of aminoacids, on the other hand - a disruption of heme synthesis. At the same time in the experimental group of animals has been observed the decrease of main ligand form of hemoglobin - oxyhemoglobin, which may indicate the disruption of binding and kickback of oxygen and the resulting changes in the affinity of hemoglobin for oxygen. At the same time we studied that hemolysate of red blood cells of rats who were on a low-protein diet has double increase in glycosylated hemoglobin compared to control indicators, which is considered as a prognostic indicator of metabolic hyperglycemia, because it reflects percentage of hemoglobin, irrevocably connected to glyucose. Glycosylated hemoglobin due to a strong relationship with oxygen gives it hard to tissues, so increasing of its content in the blood causes the occurrence of tissue hypoxia, which is related to insufficient oxygenation of basal membrans.

Keywords: hemoglobin, oxyhemoglobin, glycosylated hemoglobin, hemolysate, erythrocytes, low-protein ration

Одержано редколегією 23.12.2014

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ЗВОРОТНОГО І НЕЗВОРОТНОГО НАКОПИЧЕННЯ ЗАЛІЗА В *PROTEOBACTERIA* ТА *ACTINOBACTERIA*

С. В. ГОРОБЕЦЬ, О. Ю. ГОРОБЕЦЬ, І. В. ДЕМ'ЯНЕНКО, О. В. СЛИВЕЦЬ

Національний технічний університет України «КПІ»,
факультет біотехнології та біотехніки,
03056, Київ, пр. Перемоги 36,
e-mail: pitbm@ukr.net

Методами біоінформаційного аналізу було класифіковано представників типів *Proteobacteria* і *Actinobacteria* на чотири групи по відношенню до наявності білків гомологів Mat-білків магнітоаксисних бактерій, які забезпечують синтез біогенних магнітних наночастинок (БМН), та феритину та/або феритин-подібних білків. Проаналізовано наступні фактори, які визначають той чи інший фенотип у бактерій типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria*: середовище існування, умови існування, рухливість, наявність магнітної фази в середовищі, механізми міжклітинної взаємодії. Показано, що БМН можуть забезпечувати магнітоаксис, виступати в якості специфічної міжклітинної взаємодії та взаємодії з парамагнітними компонентами середовища, забезпечувати захват та накопичення ефективнопарамагнітних та парамагнітних внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних компонент (гранул, везикул, вакуолей, мікро- та нанобульбашок тощо), захист клітин мікроорганізмів від надлишків іонів заліза та для патогенів та умовних патогенів наявність БМН забезпечує захист від імунної відповіді хазяїна. Таким чином наявність БМН у мікроорганізмів є фактором, який підвищує імовірність їх виживання на ряду з іншими мікроорганізмами.

Ключові слова: біогенні магнітні наночастинок, типи *Proteobacteria* і *Actinobacteria*, феритин, біоінформаційний аналіз

Вступ. Біогенні магнітні наночастинок (БМН) є об'єктом інтенсивних досліджень з 1975 року, коли вони вперше були виявлені в магнітоаксисних бактеріях (МТБ) (Frankel et al., 1979). За цей час розшифровано геноми МТБ та виділено гени, які відповідають за біомінералізацію БМН, так званий магнітосомний острівцевець (МО) МТБ та описано процес біомінералізації БМН (M. Winklhofer, 2005; Matsunaga et al., 2007). В МТБ біомінералізація кристалів магнетиту (Fe_3O_4) або грейгіту (Fe_3S_4) відбувається в магнітосомній органелі, що являє собою ліпідну везикулу, і локалізується в пристінній області цитоплазматичної мембрани (M. Winklhofer, 2005; Matsunaga et al., 2007; Grünberg et al., 2004; Richter et al., 2007; Arakaki et al., 2008).

БМН виявлено у представників усіх трьох царств організмів: прокариотах, еукаріотах та археях (Frankel et al., 1979; M. Winklhofer, 2005; Matsunaga et al., 2007; Grünberg et al., 2004; Richter et al., 2007; Arakaki et al., 2008; Hsu et al., 2007; Maher, 1998; Hsu and Chan, 2011; Cranfield et al., 2004; Mann et al., 1988; Lowenstam, 1973), зокрема, в комах (Hsu et al., 2007; Maher, 1998; Hsu and Chan, 2011; Cranfield et al., 2004), птахів (Frankel et al., 1979; Walcott et al., 1979), рибах (Mann et al., 1988) у ссавців (Lowenstam, 1973) та в тканинах людини (Kobayashi et al., 1997; Brem et

al., 2006; Moos, 2004; Bartzokis and Tishler, 2000; Lovell et al., 1998; Burdo and Connor, 2003; Grassi-Schultheiss et al., 1997; Kirschvink, 1981; Beyhum et al., 2005; Collingwood and Dobson, 2006; Kirschvink et al., 1982; Brem et al., 2006). У людини БМН знайдено в надниркових залозах (Kirschvink, 1981), серці, печінці, селезінці (Grassi-Schultheiss et al., 1997) та в головному мозку (Collingwood and Dobson, 2006; Brem et al., 2006). В роботах (Gorobets et al., 2014; Gorobets and Gorobets, 2012; Горобець та ін., 2013) вперше передбачені функції БМН як в бактеріях, так і в багатоклітинних організмах за допомогою методів біоінформатики та модельних експериментів в області магнітохімії. Показано, що БМН слугують не лише для навігації в геомагнітному полі, але й для регуляції метаболічних процесів в клітині шляхом впливу неоднорідного магнітного поля, створеного БМН, на кластерні компоненти в клітині (Gorobets et al., 2014). До недавнього часу існувало дві точки зору, перша – що за процес біосинтезу БМН в клітинах відповідає феритин (Hsu and Chan, 2011) і друга – що феритин не має відношення до цього процесу (Brem et al., 2006). Але дослідження проведені в роботі (Горобець та ін., 2013) показали, що біомінералізація БМН відбувається незалежно від наявності феритину, так як не у всіх МТБ є феритин та/або феритин-подібні білки, хоча фенотиповий прояв

біомінералізації БМН присутній у всіх МТБ. На даний момент з цього питання вивченими є мікроаерофільні та анаеробні бактерії (Горобець та ін., 2013).

Відомо, що феритин здійснює зворотне накопичення іонів заліза, тобто забезпечує його швидке зв'язування-вивільнення в метаболічних процесах (Elizabeth, 2003). Однак, в процесі біомінералізації БМН залізо зв'язується незворотно (Nudelman and Zarivach., 2014) в складі хімічно стійких мінералів (магнетиту, грейгіту тощо (Araçaki et al., 2008). При цьому генетичною основою біомінералізації БМН у багатоклітинних організмів є білки гомологи *mam*-білків МО МТБ (Gorobets et al., 2014). Але незворотне накопичення заліза в процесі біомінералізації БМН впливає не тільки на метаболічні процеси в клітинах (Gorobets et al., 2014; Горобець та ін., 2013), а й на взаємодію клітин та мікроорганізмів між собою та з іншими клітинами, векторними системами для доставки ліків та ін. (Gorobets et al., 2014; Горобець та ін., 2013; Горобець та ін., 2014). Досліджено (Kobayashi et al., 1997; Brem et al., 2006; Moos, 2004; Bartzokis and Tishler, 2000; Lovell et al., 1998; Burdo and Connor, 2003; Beyhum et al., 2005; Collingwood and Dobson, 2006; Kirschvink et al., 1982; Brem et al., 2006), що білки людини (які є гомологами білків МО МТБ) задіяні в патогенезі низки нейродегенеративних та онкологічних захворювань, які характеризуються підвищеною кількістю БМН. Загалом баланс заліза в організмі – важливий фактор метаболізму в нормі і патології, без врахування незворотного накопичення заліза (в процесі біомінералізації БМН) неможливо змоделювати гомеостаз заліза в організмі. Для розуміння процесів, які впливають на рівень біомінералізації БМН у людини в нормі і при патологіях, а відповідно впливають на метаболізм, клітин-клітинну взаємодію, важливо дослідити метаболічні шляхи зворотного та незворотного накопичення заліза для різних типів мікроорганізмів (модельні об'єкти).

Метою даної роботи є встановлення потенційних продуцентів БМН бактерій типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria*, (серед яких більшість належить до аеробів), класифікація представників цих типів за наявністю гомологів білків МО МТБ та наявністю феритину і феритин-подібних білків в їх протеомах, а також аналіз факторів, які можуть визначати той чи інший фенотип.

Біоінформаційний аналіз співіснування гомологів білків МО МТБ та феритину у представників типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria*. Для цього методами

порівняльної геноміки досліджено представників типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria* на наявність в їх геномах генів феритину та/або генів-гомологів *mam*-білків МТБ, без яких неможлива біомінералізація БМН. Для аналізу було обрано лише ті бактерії, які мають повністю розшифрований геном в базі даних GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) для уникнення отримання недостовірних результатів. Повний перелік мікроорганізмів представлено у таблиці 1.

Дослідження проводили в два етапи. На першому етапі було виявлено потенційних продуцентів БМН біоінформаційними методами. Для цього було проведено вирівнювання *mam*-білків бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* з трансльованими повними геномами бактерій родин типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria*, використовуючи програму blastp «BLAST online» за стандартних параметрів, що є вільним програмним ресурсом Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Гомологію досліджували з наступними білками *M. gryphiswaldense*, а саме *mamB*, *mamM*, *mamA*, *mamE*, *mamO*, *mamN* (без яких процес біомінералізації не є можливими) та *mamK*, *mamQ*, *mamZ*, *mamH* (регуляторні білки). Всі ці білки є древніми білками тому, що мають гомологів у представників усіх трьох царств організмів: прокаріот, еукаріот та архей (Горобець та ін., 2013).

На наступному етапі було проведено класифікацію на наявність феритину та/або феритин-подібних білків у протеомі досліджуваних бактерій (Табл. 1).

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що мікроорганізми типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria* можна умовно класифікувати на 4 групи. В першу групу (15 мікроорганізмів) увійшли ті представники, які містять гомологи *mam*-білків *M. gryphiswaldense*, тобто вони є потенційними продуцентами БМН, та містять білок феритину та/або феритин-подібні білки (Таблиця 2). В другу групу (9 мікроорганізмів) увійшли мікроорганізми, які містять тільки гомологи *mam*-білків *M. gryphiswaldense*, тобто феритин та/або феритин-подібні білки відсутні (Таблиця 3). До третьої групи (3 мікроорганізми) віднесено бактерії, які мають власний феритин та/або феритин-подібні білки, але не мають білків гомологів *mam*-білків МО МТБ. В процесі дослідження виявилось, що бактерії *Acidimicrobium ferrooxidans* DSM 10331, *Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941 та *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 відносяться до цієї групи.

Proteobacteria

Bartonella bacilliformis KC583
Brucella abortus bv. 1 str. 9-941
Brucella abortus S19
Brucella melitensis bv. 1 str. 16M
Brucella suis 1330
Caulobacter crescentus CB15
Caulobacter sp. K31
Mesorhizobium ciceri biovar *biserrulae* WSM1271
Phenylobacterium zucineum HLK1
Asticcacaulis excentricus CB 48
Bartonella clarridgeiae 73
Beijerinckia indica subsp. *indica* ATCC 9039
Brevundimonas subvibrioides ATCC 15264
Brucella abortus A13334
Caulobacter crescentus NA1000
Caulobacter segnis ATCC 21756
Hyphomicrobium denitrificans INES1
Hyphomicrobium denitrificans ATCC 51888
Hyphomicrobium nitrativorans NL23
Mesorhizobium australicum WSM2073
Mesorhizobium loti MAFF303099
Ochrobactrum anthropi ATCC 49188
Parvularcula bermudensis HTCC2503
Pelagibacterium halotolerans B2

Actinobacteria

Bifidobacterium bifidum BGN4
Bifidobacterium bifidum PRL2010
Mobiluncus curtisii ATCC 43063
Magnetococcus marinus MC-1
Cryptobacterium curtum DSM 15641
Gardnerella vaginalis ATCC 14019
Gardnerella vaginalis HMP9231
Acidimicrobium ferrooxidans DSM 10331
Arcanobacterium haemolyticum DSM 20595
Atopobium parvulum DSM 20469
Bifidobacterium bifidum S17
Bifidobacterium dentium Bd1
Catenulispora acidiphila DSM 44928
Coriobacterium glomerans PW2
Gardnerella vaginalis 409-05
Streptomyces hygroscopicus subsp. *jinggangensis* 5008

Відповідно остання (четверта) група бактерій (13 мікроорганізмів), які не мають гомологів mat-білків MO МТБ та не містять власного феритину та/або феритин-подібних білків, а саме: *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium bifidum* PRL2010, *Bifidobacterium bifidum* S17, *Brucella abortus* A13334, *Brucella abortus* S19, *Brucella suis* 1330, *Caulobacter crescentus* NA1000, *Caulobacter* sp. K31, *Gardnerella vaginalis* 409-05, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14019, *Gardnerella vaginalis* HMP9231, *Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae* WSM1271, *Mobiluncus curtisii* ATCC 43063.

Відомо, що для забезпечення своєї життєздатності всі мікроорганізми мають різні механізми для взаємодії з іншими мікроорганізмами або клітинами-хазяїнами (симбіоти та паразити) та різні механізми рухомої реакції у відповідь на стимули: світло (фототаксис), температуру (термотаксис), вологу (гідротаксис), зміну концентрації хімічних речовин (хемотаксис), магнітне поле (магнітотаксис) і т.д. З цієї точки зору функціями БМН є:

1) Магнітотаксис як різновид таксису (Frankel, 1981). Наприклад, магнітотаксис МТБ – це рух по лініям геомагнітного поля в мул, де більше поживних речовин (Frankel, 1981).

2) Взаємодія БМН, як з магнітними складовими самого середовища так і з магніточутливими структурами в складі інших клітин та мікроорганізмів як різновид специфічної взаємодії (Горобец и др., 2013). Наприклад, для магніточутливих штамів симбіонтів людини – взаємодія з раковими клітинами, що містять БМН (Горобець та ін., 2014).

3) Магнітний захват та накопичення ефективно парамагнітних внутрішньо та зовнішньо клітинних кластерних компонент (гранул, везикул, вакуолей, мікро- та нанобульбашок тощо) (Gorobets et al., 2014; Cranfield et al., 2004). Наприклад, магнітне концентрування може бути задіяне в складі імунної, транспортної та сенсорної систем.

4) Захист клітин мікроорганізмів від надлишків іонів заліза, так як відомо, що в процесі біомінералізації БМН, організм намагається захиститись від надлишку іонів заліза (незворотне накопичення заліза), так як відомо, що процес біомінералізації БМН пов'язаний з рівнем реактивних форм кисню та залежить від умов існування бактерій та особливостей їх метаболізму, оскільки іони заліза, потрапивши у кристалічну решітку БМН, не беруть участь в реакції Фентона утворення реактивних форм кисню (Nudelmann and Zarivach., 2014).

Табл. 2.
Значимі вирівнювання між білками МО МТБ
бактерії *M. gryphiswaldense* та представниками
тинів *Proteobacteria* та *Actinobacteria* (перша група).

Tab. 2.
Significant alignments among MO MTB proteins of *M.*
***gryphiswaldense* bacteria and *Proteobacteria* and**
***Actinobacteria* species (the first group).**

Штам мікроорганізму	E-value (I, % / P, %)					тип феритину
	Proteins of <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	MamM	MamO	Mam E	
<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB 48	-	9e-17 (24/48)	8e-19 (31/46)	2e-08 (31/49)	4e-31 (42/61)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Bartonella clarridgeiae</i> 73	2e-06 (21/46)	5e-14 (27/51)	5e-12 (24/46)	3e-09 (27/47)	1e-35 (45/64)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039	7e-10 (30/47)	2e-22 (26/53)	2e-18 (27/45)	1e-13 (32/51)	1e-35 (42/59)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Brevundimonas</i> <i>subvibrioides</i> ATCC 15264	-	2e-10 (22/49)	3e-17 (26/44)	4e-09 (27/47)	1e-33 (42/62)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	1e-06 (22/38)	5e-09 (22/42)	2e-16 (30/48)	3e-15 (35/51)	5e-39 937/54	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756	6e-07 (25/45)	3e-10 (25/45)	3e-19 (29/47)	2e-13 (34/50)	2e-27 (37/53)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Hyphomicrobium</i> <i>denitrificans</i> INES1	2e-06 (28/46)	4e-12 (22/48)	5e-15 (22/45)	8e-13 (30/53)	3e-37 (44/59)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Hyphomicrobium</i> <i>denitrificans</i> ATCC 51888	4e-06 (27/46)	2e-16 (23/49)	2e-19 (25/47)	3e-08 (26/43)	1e-37 (45/60)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Hyphomicrobium</i> <i>nitrivorans</i> NL23	4e-08 (29/50)	2e-16 (25/50)	2e-15 (27/45)	1e-07 (30/44)	6e-39 (44/61)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Mesorhizobium</i> <i>australicum</i> WSM2073	2e-11 (27/43)	7e-21 (25/51)	5e-17 (27/46)	2e-09 (30/46)	9e-38 (50/63)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	7e-11 (26/44)	2e-24 (27/51)	5e-18 (26/45)	1e-09 (30/47)	4e-38 (42/55)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	7e-10 (30/49)	4e-17 (27/50)	2e-10 (27/43)	4e-11 (27/44)	5e-38 (39/58)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Pelagibacterium</i> <i>halotolerans</i> B2	9e-09 (27/51)	3e-14 (26/49)	2e-16 (27/49)	3e-12 (31/47)	9e-35 (46/62)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Phenylobacterium</i> <i>zucineum</i> HLK1	-	4e-11 (27/48)	1e-15 (27/45)	1e-10 (31/50)	2e-31 (38/52)	BFR S1 BFR S2 DPS
<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i> subsp. <i>jinggangensis</i> 5008	-	1e-18 (25/49)	8e-17 (28/44)	1e-07 (26/42)	3e-25 (37/53)	BFR S1 BFR S2 DPS

Табл. 3.
Значимі вирівнювання між білками МО МТБ бактерії *M. gryphiswaldense* та представниками роду *Proteobacteria* та *Actinobacteria* (друга група).

Tab. 2.
Significant alignments among MO MTB proteins of *M. gryphiswaldense* bacteria and *Proteobacteria* and *Actinobacteria* species (the second group).

Штам мікроорганізму	E-value (I, % / P, %)				
	Proteins of <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1				
	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> DSM 20595	-	2e-17 (26/48)	2e-12 (25/48)	1e-06 (28/50)	6e-30 (42/59)
<i>Atopobium parvulum</i> DSM 20469	-	4e-20 (24/51)	2e-15 (29/58)	-	5e-27 (42/61)
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583	4e-06 (20/47)	2e-20 (27/52)	1e-16 (26/46)	8e-10 (25/46)	7e-39 (47/65)
<i>Bifidobacterium dentium</i> Bd1	-	4e-07 (28/48)	5e-07 (26/56)	6e-08 (31/53)	2e-24 (43/60)
<i>Brucella melitensis</i> bv. 1 str. 16M	-	2e-16 (26/50)	6e-11 (25/44)	-	-
<i>Coriobacterium glomerans</i> PW2	-	9e-16 (25/50)	8e-16 (23/45)	2e-11 (26/51)	2e-28 (40/66)
<i>Cryptobacterium curtum</i> DSM 15641	-	2e-20 (26/47)	9e-21 (27/46)	6e-08 (24/43)	2e-30 (35/57)
<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1	9e-47 (38/58)	2e-99 (46/73)	2e-95 (48/69)	1e-110 (35/51)	2e-74 (33/46)
<i>Parvularcula bermudensis</i> HTCC2503	2e-07 (27/47)	5e-16 (28/54)	2e-14 (27/45)	4e-09 (28/44)	2e-33 (40/53)

В процесі аналізу умов існування представників першої групи, було встановлено, що типовим середовищем їх існування є ґрунт та водойми, що характеризується широким спектром фізико-хімічних властивостей. Аналіз здатності до самостійного руху представників першої групи показав, що 87% з них рухливі. Тобто представники цієї групи мікроорганізмів мають різноманітні механізми таксису (джгутики, хемотаксис) в залежності від умов існування, одним з яких є магнітотаксис. Відомо (Годовиков, 1983), що практично всі ґрунти містять у своєму складі магніту фазу (ферити, феромагніти), тому при наявності БМН у представників першої групи може виконуватись друга з наведених функцій. Так як середовище існування цієї групи характеризується різним хімічним складом кластерних компонентів, то БМН можуть виконувати функцію магнітного захвату та накопичення ефективно парамагнітних компонентів, тобто виконувати третю функцію. Окрім БМН дані представники характеризуються наявністю широкого спектру механізмів адгезії, що в свою чергу забезпечує їх виживання в різноманітних умовах оточуючого середовища.

Друга група характеризується більш специфічними умовами існування, так як до її складу увійшли внутрішньоклітинні паразити, з яких лише 44 % є рухливими, тобто приблизно половина може володіти першою функцією

БМН. Так як з літературних джерел не є відомим факт наявності магнітоструктурованої фази в середовищі їх існування, то стверджувати про наявність або відсутність другої функції не є доцільним. Відомо (Красінько, 2007), що клітини організму-хазяїна містять кластери парамагнітних та ефективнопарамагнітних компонентів, тобто наявність БМН у внутрішньоклітинних паразитів сприяє накопичення поживних елементів для забезпечення нормальних умов їх життєдіяльності (третя функція).

Окрім функції взаємодії патоген-хазяїн, можна припустити, що наявність ланцюжків БМН у патогена, захищає клітини від реакції імунної системи хазяїна, шляхом незворотного зв'язування заліза (Nudelman and Zarivach., 2014) або шляхом магнітного концентрування ефективно парамагнітних кластерних компонентів клітини (Gorobets et al., 2014). Наприклад, при активації імунної відповіді на антиген, макрофаги викидають у середовище значну кількість активних форм кисню (так званий кисневий вибух) (Takahashi et al., 1991). Відомо, що кисень – парамагнетик, тому ланцюжки БМН можуть притягати до себе нанобульбашки кисню, таким чином нейтралізуючи активні форми кисню (Gorobets et al., 2014).

Представники третьої та четвертої групи характеризуються екстремальними умовами існування, наприклад, у водах гейзерів. Оскільки

середовище їх існування є відносно однорідним, то більша частина представників володіє специфічними механізмами адгезії до субстрату і лише третина з них є рухлива, тобто володіє певним різновидом таксису.

В процесі дослідження було проведено аналіз наступних факторів: середовище існування, умови існування, рухливість, наявність магнітної фази в середовищі, механізми міжклітинної взаємодії (табл. 4). В результаті було показано, що БМН можуть виступати у якості

специфічного механізму міжклітинної взаємодії на ряду з адгезією; наявність БМН у бактеріях забезпечує один з видів таксису – магнітотаксис; накопичення БМН забезпечує акумуляцію парамагнітних та ефективнопарамагнітних кластерних компонентів, що полегшує процес живлення за рахунок магнітних сил. Крім того, для патогенних та умовно-патогенних організмів БМН забезпечують захист від імунної відповіді організму хазяїна.

Табл. 4.
Характеристика факторів існування мікроорганізмів різних груп

	I (БМН+Ф)	II (БМН)	III (Ф)	IV (-)
Середовище існування	вода, ґрунт	внутрішньо-клітинні паразити	екстримальні умови	внутрішньо-клітинні паразити та симбіонти
Таксис	87% рухливі	44% рухливі	33% рухливі	30% рухливі
Взаємодія	взаємодія з магнітною фазою середовища (ґрунту)	магнітної фази в середовищі немає	магнітна фаза не типова для середовища	магнітної фази в середовищі немає
Живлення	БМН полегшує ендоцитоз за рахунок магнітної взаємодії	БМН полегшує ендоцитоз за рахунок магнітної взаємодії	лише 33% існують в середовищі з магнітною фазою	існують в відносно малих об'ємах, магнітна взаємодія не характерна

Tab. 4.
The characteristics of environmental factors for the microorganism of different groups

Висновки. Методами порівняльної геноміки вперше проведено класифікацію мікроорганізмів на чотири групи за такими ознаками як наявність/відсутність гомологів білків МО МТБ та наявність/відсутність феритину та феритин-подібних білків в їх протеомах на прикладі бактерій типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria* з відомими повними геномами. Показано, що перша група мікроорганізмів містить білки гомологи mat-білків та феритин /феритин-подібні білки, що свідчить про зворотне і незворотне накопичення заліза мікроорганізмами; друга група – містить тільки гомологи mat-білків, без яких процес біомінералізації БМН не є можливим, тобто має механізм незворотного накопичення заліза; третя група – містить лише власний феритин та/або феритин-подібні білки, тобто володіє зворотнім механізмом накопичення заліза; четверта група – немає ні гомологів mat-білків, ні феритину та/або феритин-подібних білків, тобто дані механізми накопичення заліза відсутні.

З досліджених мікроорганізмів більшість має білки гомологи mat-білків МТБ (24 мікроорганізми), це свідчить про важливість

процесу біомінералізації БМН для них. Можливо, що в процесі біомінералізації БМН, організм намагається захиститись від надлишку іонів заліза (незворотне накопичення заліза), так як відомо, що процес біомінералізації БМН пов'язаний з рівнем реактивних форм кисню в МТБ (Nudelman and Zarivach., 2014) та залежить від умов існування бактерій та особливостей їх метаболізму, оскільки іони заліза, потрапивши у кристалічну решітку БМН, не беруть участь в реакції Фентона утворення реактивних форм кисню (Nudelman and Zarivach., 2014). Одночасно з утворенням ланцюжків БМН мікроорганізм отримує можливість накопичувати кластери парамагнітних та ефективно парамагнітних речовин в околі ланцюжків БМН, що також впливає на метаболічні процеси (Gorobets et al., 2014; Gorobets and Gorobets, 2012).

Проаналізовано наступні фактори, які визначають той чи інший фенотип у бактерій типів *Proteobacteria* та *Actinobacteria*: середовище існування, умови існування, рухливість, наявність магнітної фази в середовищі, механізми міжклітинної взаємодії. Показано, що БМН можуть забезпечувати

магнітотаксис, виступати в якості специфічної міжклітинної взаємодії та взаємодії з парамагнітними компонентами середовища, забезпечувати захоплення та накопичення ефективнопарамагнітних та парамагнітних внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних компонент (гранул, везикул, вакуолей, мікро- та нанобульбашок тощо), захист клітин мікроорганізмів від надлишків іонів заліза та для патагенів та умовних патагенів наявність БМН забезпечує захист від імунної відповіді хазяїна. Таким чином наявність БМН у мікроорганізмів є фактором, який підвищує імовірність їх виживання на ряду з іншими мікроорганізмами.

Список літератури:

- Frankel R. B., Blakemore R.P., Wolfe R.S. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria // *Science*. –1979. – 203. – P. 1355–1356.
- M. Winklhofer. Biogenic magnetite and magnetic sensitivity in organisms – from magnetic bacteria to pigeons // *Magnetodynamies*. - 2005. - 41. – P. 295–304.
- Tadashi Matsunaga. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nanobiotechnology/ Tadashi Matsunaga, Takeyuki Suzuki, Masayoshi Tanaka, Atsushi Arakaki// *Trends Biotechnol.* – 2007. – 25. – P.182-188.
- K. Grünberg. Biochemical and Proteomic Analysis of the Magnetosome Membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense* /K. Grünberg, E. Müller, A. Otto, etc.// *Appl Env. Mic.* – 2004. – 70. – P. 1040–1050.
- M. Richter. Comparative Genome Analysis of Four Magnetotactic Bacteria Reveals a Complex Set of Group-Specific Genes Implicated in Magnetosome Biomineralization and Function /M. Richter, M. Kube, D. A. Bazylinski, etc.// *J Bacteriol.* – 2007. – 189. – P. 4899–4910.
- Atsushi Arakaki. Formation of magnetite by bacteria and its application / A. Arakaki, H. Nakazawa, M. Nemoto, T. Mori, T. Matsunaga// *J R Soc Interface.* – 2008. – 5. – P. 977–999.
- Chin-Yuan Hsu. Magnetoreception System in Honeybees (*Apis mellifera*) / Chin-Yuan Hsu, Fu-Yao Ko, Chia-Wei Li, Kuni Fann, Juh-Tzeng Lue// *PLoS ONE.* – 2007. – 4. – e395
- B. A. Maher. Magnetite biomineralization in termites// *Proc. R. Soc. Lond.* – 1998. – 265. – P. 733-737
- Chin-Yuan Hsu, Yu-Pei Chan. Identification and Localization of Proteins Associated with Biomineralization in the Iron Deposition Vesicles of Honeybees//*PLoS ONE.* – 2011. – 6. – e19088
- Charles G. Cranfield Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans* / Charles G. Cranfield, Adam Dawe, Vassil Karloukovski, Rafal E. Dunin-Borkowski, David de Pomerai and Jon Dobson// *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* – 2004. – 271. – P.436–439.
- Mann S. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: Implications for magnetoreception /Mann S., Sparks N.H.C., Walker M.M., Kirschvink J.L. // *J. Exp. Biol.* – 1988. – 140. – P. 35–49.
- Lowenstam H.A. Magnetite in denticle capping in recent chitons // *Geol. Soc. 11 Am. Bull.* –1973. – 2. – P. 435–438.
- Walcott C., Gould J.L., Kirschvink J.L. Pigeons have magnets // *Science.* – 1979. – 184. – P. 180–182.
- Kobayashi A., Yamamoto N., Kirschvink J. Studies of Inorganic Crystals in Biological Tissue: Magnetite in Human Tumor// Reprinted from *Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy.* – 1997. – 44. – P. 294.
- Brem F. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumor and hippocampus tissue/ Brem F., Hirt A.M., Winklhofer M., Frei K., Yonekawa Y., Wieser H.-G., Dobson J // *J. R. Soc. Interface.* – 2006. – 3. – P. 833–841.
- Moos T., Morgan E.H. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2004. – P. 1012 – 1014.
- Bartzokis G., Tishler T.A. MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease // *Cell. Molec. Biol.* – 2000. – 46. – P. 821 – 834.
- Lovell M.A, Robertson J.D, Teesdale W.J et al. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques // *J. Neurol. Sci.* – 1998. – 158. – P. 47 – 52.
- Burdo J.R., Connor J.R. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview // *Biomaterials.* – 2003. – 16. – P. 63–75.
- P.P. Grassi-Schultheiss, F. Heller, J. Dobson Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver// *BioMetals* – 1997. – 10. – P. 351–355
- Kirschvink J.L. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue// *J Exp Biol.*–1981. – 92. – P. 333-335.
- W Beyhum. Magnetic biomineralisation in Huntington's disease transgenic mice / W Beyhum, D Hautot, J Dobson, Q A Pankhurst// *Journal of Physics: Conference Series.* – 2005. – 17. – P. 50–53.
- Joanna Collingwood, Jon Dobson. Mapping and characterization of iron compounds in Alzheimer's tissue// *Journal of Alzheimer's Disease.* – 2006. – 10. – P. 215–222
- Kirschvink J.L., Tabrah F, Batkin S. Ferromagnetism in two mouse tumors.// *J Exp Biol.* – 1982. – 101. – P.321-326.
- Franziska Brem. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue / Franziska Brem, Ann M Hirt, Michael Winklhofer, Karl Frei, Yasuhiro Yonekawa, Heinz-Gregor Wieser, and Jon Dobson// *J R Soc Interface.* – 2006. – 3. – P. 833–841.

26. Gorobets O.Yu., Gorobets S.V., Gorobets Yu.I. Biogenic Magnetic Nanoparticles: Biomineralization in Prokaryotes and Eukaryotes, In Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Third Edition. CRC Press: New York, 2014, pp. 300 – 306. // DOI: 10.1081/E-ENN3-1200583 Copywrite © 2014 by Taylor & Francis.
27. Gorobets S.V., Gorobets O.Yu. Functions of biogenic magnetic nanoparticles in organisms // Journal "Functional Materials". – 2012. – 19. – №1. – С.18-26.
28. Горобець О.Ю., Горобець С.В., Горобець Ю.І. Біомінералізація внутрішньоклітинних біогенних магнітних наночастинок і їх можливі функції // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2013. – 3. – С. 28-33.
29. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Дем'яненко І.В. Феритин та біомінералізація біогенних магнітних наночастинок в мікроорганізмах // Наукові вісті НТУУ КПІ. – 2013. – № 3. – С. 34-41.
30. Горобець С.В. Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу наномагнетиту у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмах. /С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, І.В. Дем'яненко // Науковий Вісник Чернівецького університету. Біологічні системи. – 2013. – Т.5, №2. – С.274-280.
31. Elizabeth C. Theil. Ferritin: At the Crossroads of Iron and Oxygen Metabolism // Journal of Nutrition. – 2003. – 133. – P.1549–1553.
32. Hila Nudelman, Raz Zarivach. Structure prediction of magnetosome-associated proteins // Frontiers in Microbiology. – 2014. – 5 (9). – P. 1-17
33. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М., Сивенок Д.В. Магнітодипольне взаємодія ендогенних магнітних наночастинок з магнітоліпосомами при цільовій доставці лікарств // Біофізика, 2013, том 58, вып. 3, с. 488–494.
34. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М., Бутенко К.О. Біомінералізація магнітних наночастинок бактеріальними симбіонтами людини // Медичні перспективи. – 2014. – 2.
35. R.B. Frankel,. Bacterial Magnetotaxis vs Geotaxis // Trans. Am. Geophys. Soc. – 1981. – 62. – P.850.
36. Годовиков А.А., "Минералогия", М.: "Недра", 1983. —227 с.
37. Красінко В.О. Біологія клітин: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 "Промислова біотехнологія" та "Біотехнологія біологічно активних речовин" напряму 0929 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навчання. К.: НУХТ, 2007. –С. 140
38. Ryutaro Takahashi. Luminol Chemiluminescence and Active Oxygen Generation by Activated Neutrophils / Ryutaro Takahashi, Keisuke Edashige, Eisuke F. Sato, Masayasu Inoue, Tsuyoshi Matsuno, Kozo Utsumi// Archives of biochemistry and biophysics. – 1991. – 285(2). – P. 325-330.

BIOINFORMATIONAL ANALYSIS OF REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE IRON ACCUMULATION IN *PROTEOBACTERIA* AND *ACTINOBACTERIA*

S.V. Gorobets, O. Yu. Gorobets, I. V. Demyanenko, O. V. Slyvets

The representatives of Proteobacteria and Actinobacteria were classified into four groups according to the presence of homologues of Mam-protein magnetotacticum bacteria that provide a synthesis of biogenic magnetic nanoparticles (BMN), and ferritin and/or ferrite-like proteins by methods of bioinformatics analysis. In this work were analyzed the following factors that define a particular phenotype in bacteria types Proteobacteria and Actinobacteria: habitat, living conditions, mobility, presence of magnetic phases in the environment, mechanisms of cell-cell interactions. It is shown that BMN may provide magnetotaxis, act as factor of specific cell-cell interactions and interactions with paramagnetic components of the environment, to ensure the capture and storage of efficiently paramagnetic and paramagnetic intracellular and extracellular components (granules, vesicles, vacuoles, and micro nanobulbushok etc.), protection of microorganisms cells from excess of iron ions and for pathens and conditional pathens availability of BMN provides protection against the host immune response. Thus the presence of BMN in microorganisms is a factor that increases the likelihood of their survival along with other organisms.

Key word: biogenic magnetic nanoparticles, Proteobacteria and Actinobacteria, ferritine, bioinformatics analysis

Одержано редколегією 19.10.2014

EFFECT OF SODIUM NITROPRUSSIDE ON ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT AND GLUTATHIONE-RELATED ENZYMES IN LEAVES OF MAIZE SEEDLINGS

Y. V. VASYLYK^{1,*}, N. M. SEMCHUK¹, OK. V. LUSHCHAK²

¹*Department of Biochemistry and Biotechnology,*

²*Botanical Garden, Precarpathian National University named after Vassyl Stefanyk,
57 Shevchenko Str., 76025, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

**e-mail for correspondence: juliavasylyk@ukr.net*

*Sodium nitroprusside was used as nitric oxide ([•]NO) donor to investigate effects of [•]NO on the activity of antioxidant enzymes in leaves of maize seedlings. Seeds of maize hybrid Kharkivskyj 195 MB (*Zea mays* L.) were used for the experiments. Leaves of 10-day old seedlings were cut off and transferred into round-bottomed flasks with distilled water or 0.1, 0.5 and 1.0 mM sodium nitroprusside solution (SNP). They were incubated for 24 h at constant shaking at 150 rpm and illumination with an 18 W fluorescent light, giving 800 lux of light intensity (16/8 h day/night regime and 26°C). The equimolar concentrations of potassium hexacyanoferrate (II) (PCF), were used as an additional control to SNP, since it has a chemical structure similar to SNP but lacks the ability to produce [•]NO. It was shown that treatment of leaves with SNP did not affect catalase activity, but PCF exposure enhanced it by 38-49%. The activity of ascorbate peroxidase was increased by 44-60% in leaves treated with all three concentrations of PCF, while only 0.1 and 0.5 mM of SNP enhanced it by ~60%. Guaiacol peroxidase activity was substantially suppressed by 71-80% and 45-69% in leaves incubated with both effectors, PCF and SNP, respectively. Potassium hexacyanoferrate (II) at all concentrations used did not affect glutathione-S-transferase activity in the leaves of maize seedlings, while 0.5 and 1.0 mM SNP increased it by 18 and 28%, respectively. Glutathione reductase activity was higher in leaves treated with 0.1 and 1.0 mM PCF by 16 and 39%, respectively, whereas 0.5 mM PCF did not change it. At the same time, SNP at all concentrations used increased GR activity by 40-60%. The increase of enzyme activity might result from mild nitrosative/oxidative stress induced by [•]NO donor, and/or to some extent by iron and cyanide ions, which released at SNP decomposition.*

Keywords: Zea mays, maize seedlings, antioxidant enzymes, nitric oxide.

Introduction. Nitric oxide donors are widely used to study [•]NO role in living organisms, particularly in plants. Some of them, such as S-nitrosoglutathione (GSNO), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), and sodium nitroprusside (SNP), release [•]NO during decomposition. The latter is broadly used for investigation of [•]NO effects on different biochemical parameters of plants (Floryszak-Wieczorek et al., 2006; Bethke et al., 2006). It is known that exogenously added [•]NO in low levels acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleuron cells (Beligni et al., 2002). It also decreased oxidative injury induced by drought and UV-B radiation in wheat seedlings (Tian and Lei, 2007). Pre-treatment of roots with [•]NO increased the activity of leaf superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in citrus plants (Tanou et al., 2009).

This work aimed to investigate the effect of [•]NO-donor sodium nitroprusside on the activity of antioxidant and associated enzymes in the leaves of maize seedlings and to compare it with effects of potassium hexacyanoferrate (II), which has a chemical structure similar to SNP, but lacks the ability to produce [•]NO.

Materials and methods. Seeds of maize hybrid Kharkivskyj 195 MB (*Zea mays* L.) were used for the experiments. All chemicals were obtained from "Sigma" (USA), "Fluka" (Germany). Other chemicals were obtained from the local suppliers (Russia, Ukraine) of the highest purity available. Maize seeds were germinated in moist chambers during 5 days. The germinated seeds with the same length of roots were transferred in Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950) and grown for 5 days at 6700 lux of light intensity, 16/8 h day/night regime and 26°C.

Experimental design. Leaves of 10-day old seedlings were cut off and transferred into round-bottomed flasks (Arasimowicz-Jelonek et al., 2011) with distilled water or 0.1, 0.5 and 1.0 mM sodium nitroprusside solution (SNP, Na₂[Fe(CN)₅NO]). They were incubated for 24 h at constant shaking at 150 rpm and illumination with an 18 W fluorescent light, giving 800 lux of light intensity (16/8 h day/night regime and 26°C) (Lyn D. and Williams H., 2003). The equimolar concentrations of potassium hexacyanoferrate (II) (PCF, K₄[Fe(CN)₆], were used as an additional control to SNP, since it has a chemical structure similar to SNP but lacks the ability to produce [•]NO (Bethke et al., 2006).

Determination of enzyme activity and protein content. Leaves of maize seedlings were ground in liquid nitrogen and stored until use. Leaves powder was supplemented 1:10 (w/v) with 50 mM potassium-phosphate (KPi) buffer (pH 7.0) containing 0.5 mM EDTA and 1.0 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride. The extraction buffer for APX contained 1 mM ascorbic acid. The homogenates were centrifuged (Eppendorf 5415R, Germany) at 13200 g during 15 min at 4 °C. The resulted supernatants were used for measurement of enzyme activity and protein concentration.

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was measured spectrophotometrically at 240 nm (Aebi, 1984). The activity of ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) was monitored by following the decrease of absorbance at 290 nm wavelength ($\epsilon = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Chen and Asada, 1989). Guaiacol peroxidase (GuPX; EC 1.11.1.7) activity was assayed spectrophotometrically following the increase in absorbance at 470 nm due to guaiacol oxidation ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ali et al., 2005). Glutathione-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) activity was measured by monitoring the formation of adduct between GSH and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene at 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Lushchak et al., 2005). Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was determined as the decrease in absorbance at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to oxidation of reduced NADPH (Lushchak et al., 2005). One unit of enzymatic activity is defined as the amount of the enzyme consuming 1 μmol of substrate or generating 1 μmol of product per minute; the activities were expressed as international units (or milliunits) per milligram of protein. Protein concentration was determined with Coomassie brilliant blue G-250 according to the method of Bradford (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as a standard.

Statistics. All experiments were carried out in three analytical and three independent biological repeats. Experimental data are expressed as mean \pm SEM, and statistical testing was carried out with ANOVA followed by Dunnett's test.

Results and discussion. *Hydrogen peroxide-detoxifying enzymes.* Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of reactive oxygen species which also is a signaling molecule in plants and other living organisms (Lushchak, 2014). In plants H_2O_2 is eliminated via different mechanisms including enzymes, such as catalase, ascorbate peroxidase (APX), and guaiacol peroxidase (GuPX) (Gill and Tuteja, 2010). In our study the activity of catalase in control leaves of maize seedlings consisted of 19.9 ± 0.4 units/mg protein. It was not changed in leaves treated by SNP, at any concentration used, but PCF exposure enhanced it by 38-49% (Fig. 1A).

It can be suggested, that NO released at SNP decomposition either attenuated, or nullified effects of compounds, released at SNP and PCF decomposition. In our study the activity of APX in control leaves of maize seedlings consisted of 182.7 ± 13.9 units/mg protein. It was increased by 44-60% in leaves treated with all three concentrations of PCF, while only 0.1 and 0.5 mM of SNP enhanced it by $\sim 60\%$ (Fig. 1B). Similar results were observed in detached Arabidopsis leaves, incubated with SNP (Semchuk et al., 2011).

It was supposed that NO -donors could increase the activity of abovementioned enzymes by the stimulation of H_2O_2 producing system(s) (Ederli et al., 2009).

Guaiacol peroxidase (GuPX) also uses H_2O_2 as a co-substrate to oxidize different compounds, particularly phenols, and the enzyme is supposed to be a stress-inducible one (Ghamsari et al., 2007). In our experiments, GuPX activity in control leaves of maize seedlings consisted of 1.16 ± 0.07 units/mg protein. Interestingly, GuPX activity was substantially suppressed by 71-80% and 45-69% in leaves incubated with both effectors, PCF and SNP, respectively (Fig. 1C), i.e. SNP decreased the GuPX activity to smaller extent than PCF. It is known, that NO can inhibit peroxidases by binding to their prosthetic heme group, resulting in heme nitrosylation which, in turn, prevents interaction of H_2O_2 with the iron ions (Ferrer and Barcelo, 1999). However, in our experiments it really protected GuPX against inhibition by PCF.

Glutathione-related enzymes. Glutathione is inevitable component of virtually all living organisms (Lushchak, 2012). It is used for detoxification of reactive species either via direct interaction with them, or as a cofactor of specific detoxifying enzymes, such as glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) (Gill and Tuteja, 2010; Lushchak, 2012). The activity of GST in control leaves of maize seedlings consisted of 89.1 ± 2.2 units/mg protein. Potassium hexacyanoferrate (II) at all concentrations used did not affect GST activity in the leaves of maize seedlings, while 0.5 and 1.0 mM SNP increased it by 18 and 28%, respectively (Fig. 2A). Previous studies demonstrated that NO stimulated the expression of GST gene in soybean (Delledonne et al., 1998) and tobacco (Durner et al., 1998) plants exposed to pathogens and this mechanism could be involved in our case. So it can be that NO enhanced GST activity via synthesis of new enzyme molecules. The activity of GR in control leaves of maize seedlings consisted of 34.0 ± 1.1 units/mg protein. It was higher in leaves treated with 0.1 and 1.0 mM PCF by 16 and 39%, respectively, whereas 0.5 mM PCF did not change it (Fig. 2B).

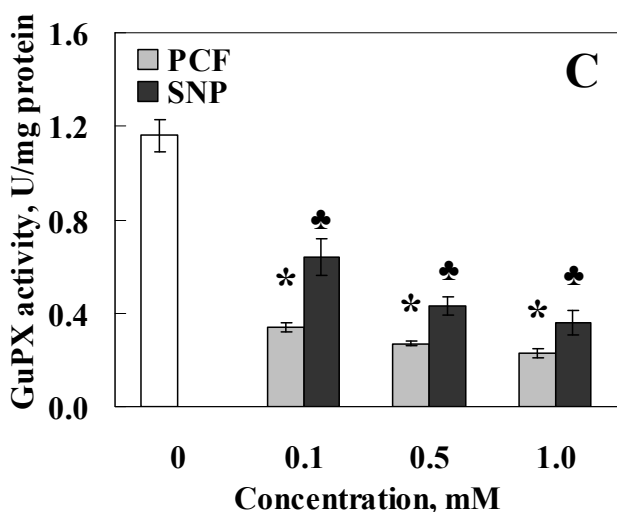
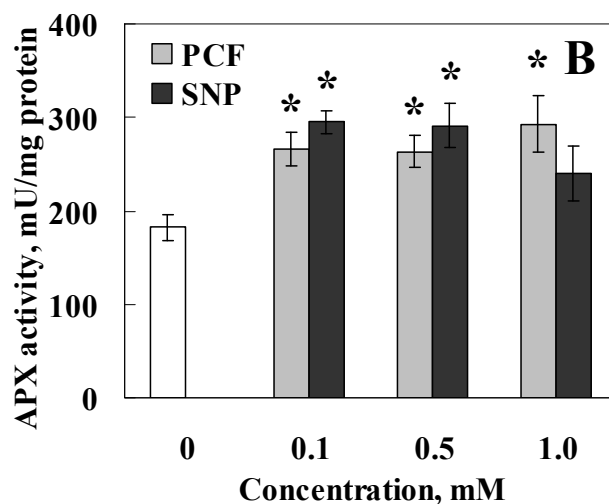
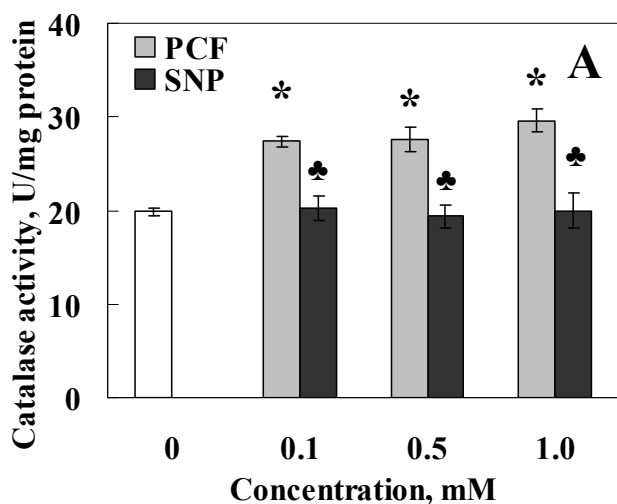


Fig. 1. The activities of catalase (A), ascorbate peroxidase, APX (B), and guaiacol peroxidase, GuPX (C) in detached maize seedling leaves incubated with different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) or potassium hexacyanoferrate (II) (PCF) during 24 h. Data are means \pm S.E.M (n = 9). *Significantly different from water control and *PCF with $P < 0.05$.

At the same time, SNP at all concentrations used increased GR activity by 40-60%. These data well confirm the idea concerning the protective effect of both compounds used, SNP and PCF, against free radicals in the leaves of maize seedlings via increase of the activities of antioxidant and glutathione-

related enzymes. Uchida and colleagues (2002) showed that pre-treatment of rice seedlings with SNP during two days augmented GR activity. SNP treatment also increased GR activity under stress induced by NaCl treatment of the leaves of citrus plants (Tanou et al., 2009).

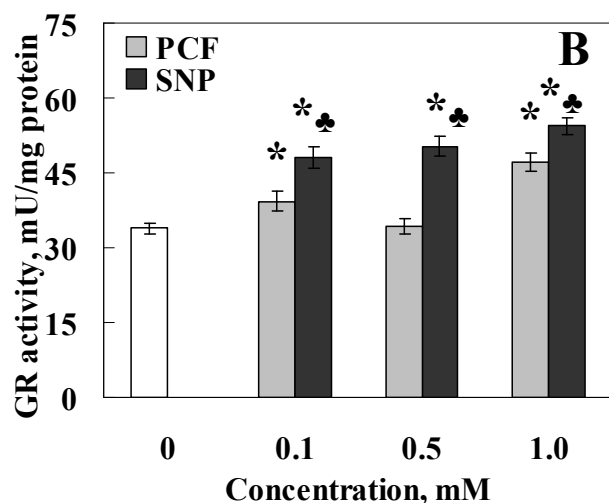
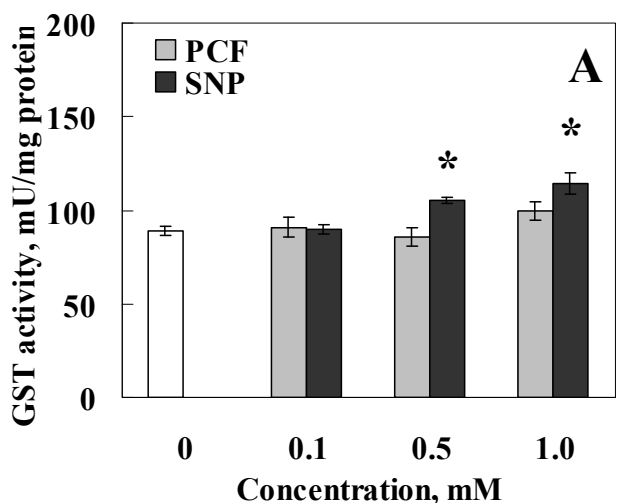


Fig. 2. The activities of glutathione-S-transferase, GST (A) and glutathione reductase, GR (B) in detached maize seedling leaves incubated with different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) or potassium hexacyanoferrate (II) (PCF) during 24 h. Data are means \pm S.E.M (n = 9). *Significantly different from water control and *PCF with $P < 0.05$.

It seems that treatment of different plants with SNP enhances their antioxidant potential via increment of activities of antioxidant and associated enzymes.

Conclusions. It can be concluded that both compounds used, SNP and PCF, similarly affected investigated parameters in detached leaves of maize seedlings, but in the case with SNP these effects were more pronounced. The latter could be attributed to nitric oxide released at SNP decomposition due to several reasons. The first, *NO, as a signal molecule, might enhance the expression of genes encoding antioxidant enzymes measured here. The second, *NO might influence as a direct antioxidant and prevent protein oxidation. Therefore, *NO is supposed to affect leaves either directly as the antioxidant, or via diverse regulatory pathways and these *NO effects can ameliorate plant potential to survive detrimental environmental conditions.

References:

1. Aebi H., Catalases, in: H.U. Bergmeyer (Ed.) // *Meth. Enzym. Anal.* – 1984. – V. 2. – P. 673 – 684.
2. Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. Effect of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis* // *Plant Physiol. Biochem.* – 2005 – V. 43. – P. 213 – 223.
3. Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Kosmala A. Are nitric oxide donors a valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism? // *Plant Biology.* – 2011. – V. 13(5) . – P. 747 – 756.
4. Beligni M., Fath A., Bethke P.C., Lamattina L., Jones R. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleuron cells // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. – P. 1642 – 1650.
5. Bethke P.C., Libourel I.G., Reinöhl V., Jones R.L. Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner // *Planta.* – 2006. – V. 223. – P. 805 – 812.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248 – 254.
7. Chen G.X., Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties // *Plant Cell Physiol.* – 1989 – V. 30. – P. 987 – 998.
8. Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance // *Nature.* – 1998. – V. 394. – P. 585 – 588.
9. Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95. – P. 10328 – 10333.
10. Ederli L., Reale L., Madeo L., Ferranti F., Gehring C., Fornaciari M., Romano B., Pasqualini S. NO Release by nitric oxide donors in vitro and in planta // *Plant Physiol. Biochem.* – 2009. – V. 47. – P. 42 – 48.
11. Ferrer M.A., Barcelo A.R. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans* // *Plant Cell Environ.* – 1999. – V. 22. – P. 891 – 897.
12. Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Arasimowicz M., Ciszewski A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? // *Planta.* – 2006. – V. 224. – P. 1363 – 1372.
13. Ghamsari L., Keyhani E., Golkhoo S., Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corn during rooting // *Iran. Biomed.* – 2007. – J. 11. – P. 137 – 146.
14. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – V. 48. – P. 909 – 930.
15. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil // *California Agricultural Experimental Station Circular.* Berkeley: CA University California. – 1950.
16. Lushchak V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions // *J. Amino Acids.* – 2012. – V. 2012. – P. 1 – 26.
17. Lushchak V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification // *Chem. Biol. Interact.* – 2014. – V. 224. – P. 164 – 175.
18. Lushchak V.I., Bagnyukova T.V., Husak V.V., Luzhna L.I., Lushchak O.V., Storey K.B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – V. 37. – P. 1670 – 1680.
19. Lyn D. and Williams H., A chemist's view of the nitric oxide story. // *Org. Biomol.Chem.* – 2003. – V. 1. – P. 441-449.
20. Semchuk N.M., Vasylyk Yu.V., Kubrak O.I., Lushchak V.I. Effect of sodium nitroprusside and S-nitrosoglutathione on pigment content and antioxidant system of tocopherol-deficient plants of *Arabidopsis thaliana* // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2011. – V. 83. – P. 69 – 79.
21. Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G. Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants // *J. Plant Physiol.* – 2009. – V. 166. – P. 1904 – 1913.
22. Tian X.R., Lei Y.B. Physiological responses of wheat seedlings to drought and UV-B radiation. Effect of exogenous sodium nitroprusside application // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2007. – V. 54. – P. 676 – 682.
23. Uchida A., Jagendorf A.T., Hibino T., Takabe T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163. – P. 515 – 523.

ВПЛИВ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ НА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТИХ ТА ГЛЮТАТІОН-ЗВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЛИСТКАХ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ

Ю. В. Василик^{1,*}, Н. М. Семчук¹, Ок. В. Лушак²

¹Кафедра біохімії та біотехнології,

²Ботанічний сад, Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
вул. Шевченка, 57, 76025, Івано-Франківськ, Україна

*e-mail для листування: juliavasylyk@ukr.net

Нітропрусид натрію використаний як донор оксиду азоту ($^{\bullet}NO$) для дослідження впливу $^{\bullet}NO$ на активність антиоксидантних ферментів у листках проростків кукурудзи. Насіння кукурудзи (*Zea mays* L.) гібриду Харківський 195 МВ було використано для експериментів. Листки (1 г) десятиденних проростків кукурудзи зрізали та перенесли у круглодонні колби, які містили різні концентрації (0,1, 0,5 та 1,0 мМ) нітропрусиду натрію (НПН) у дистильованій воді. Листки інкубувались протягом 24 год при постійному перемішуванні 150 об/хв та цілодобовим освітленням флуоресцентними лампами (18 Вт) при інтенсивності освітлення 15 мкмоль фотонів $m^{-2} s^{-1}$. Фериціанід калію (ФЦК) використовувався як додатковий контроль, оскільки він має хімічну структуру подібну до нітропрусиду натрію, однак не виділяє оксиду азоту. Було показано, що обробка НПН не впливала на активність каталази, проте обробка ФЦК підвищувала її активність на 38-49%. Активність аскорбатпероксидази була вищою на 44-60% в листках, оброблених трьома концентраціями ФЦК, в той час як лише 0,1 та 0,5 мМ НПН підвищувала її активність на ~60%. Активність гваяколпероксидази була значно знижена на 71-80% та 45-69% в листках, інкубованих з обома речовинами, ФЦК та НПН, відповідно. Всі використані концентрації фериціаніду калію не впливали на активність глутатіон-S-трансферази, в той час як обробка 0,5 та 1,0 мМ нітропрусиду натрію підвищувала активність даного ферменту на 18 та 28% відповідно. Експозиція проростків до 0,1 та 1,0 мМ ФЦК підвищувала активність глутатіонредуктази на 16 та 39%, однак обробка 0,5 мМ ФЦК не призводила до її змін. В той же час, всі концентрації нітропрусиду натрію підвищували її активність на 40-60%. Підвищення ферментативної активності могло бути викликане слабким нітрозитивним/оксидативним стресом, спричиненим донором $^{\bullet}NO$, або частково іонами заліза і/або ціаніду, які вивільняються в процесі розкладу нітропрусиду натрію.

Ключові слова: *Zea mays*, антиоксидантні ферменти, оксид азоту.

Одержано редколегією 20.11.2014

БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГЕПАТОСТЕАТОЗУ ПРИ ВІДСУТНОСТІ ЗАПАСІВ ВІТАМІНУ А

І. О. ШМАРАКОВ, В. Л. БОРЩОВЕЦЬКА, О. М. КОБИЛЯНСЬКА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
 Інститут біології, хімії та біоресурсів, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
 e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

Робота присвячена дослідженню особливостей розвитку гепатостеатозу та інсулінорезистентності при відсутності запасів вітаміну А. Для створення вітамін-А дефіцитного стану в експерименті використали трангенних мишей, не здатних етерифікувати ретинол у печінці внаслідок нокауту гена лецитин: ретинолацилтрансферази ($Lrat^{-/-}$), а тому позбавлених печінкових ретиніл ефірів. Гепатостеатоз індукували шляхом утримання експериментальних тварин протягом 16-тижнів на високожировій дієті, збагаченій транс-жирами та з високим вмістом фруктози. Оцінку розвитку гепатостеатозу проводили на основі кількісного визначення рівня триацилгліцеролів та холестеролу в сироватці крові та тканині печінки (із попередньою екстракцією ліпідної фракції за методом Фолча), якісного (з використанням методу електрофорезу) та кількісного аналізу ліпопротеїнів сироватки крові. Біохімічний аналіз інсулінорезистентності проводили на основі визначення показників рівня глюкози натще та сповільненні темпів її кліренсу, визначених у тесті толерантності до глюкози, та рівня глікозильованого гемоглобіну. Результати проведених досліджень показали, що утримання тварин дикого типу на високожировій дієті, призводить до розвитку гепатостеатозу, що виражається у зростанні рівня триацилгліцеролів і холестеролу в печінці та сироватці крові тварин. Проведений якісний та кількісний аналіз ліпопротеїнів сироватки крові виявив зростання ліпопротеїнів низької густини на 50 %. Одночасно виявлене нами зростання рівня загального холестеролу на 30 % свідчило про накопичення його атерогенної форми. Супутнім проявом гепатостеатозу виявляється інсулінорезистентність та розвиток діабету II типу, які проявляються у достовірно вищих показниках рівня глюкози натще, сповільненні темпів її кліренсу, визначених у тесті толерантності до глюкози, та у зростанні рівня глікозильованого гемоглобіну на 30 %. Відсутність ендогенно-депонованих ретиноїдів у мишей $Lrat^{-/-}$, забезпечувала резистентність щодо розвитку неалкогольного ожиріння печінки. Зокрема досліджувані показники: рівень триацилгліцеролів і холестеролу в печінці та сироватці крові тварин не відрізнялись від величин, характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті. Водночас у тварин-нокаутів не спостерігалася поява ознак інсулінорезистентності, а рівень глікозильованого гемоглобіну у толерантності до глюкози не відрізнялись від величин, характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті.

Ключові слова: гепатостеатоз, ретиноїди, інсулінорезистентність, неалкогольна жирова хвороба печінки.

Вступ. На сьогодні зростає частка нутрієнтних патологій, супутнім проявом яких виступає неалкогольна жирова хвороба печінки (англ. *nonalcoholic fatty liver disease, NAFD*) – інтегральне, багатofакторне ураження печінки при ожирінні та метаболічному синдромі (Tomita et al., 2014). Актуальність проблеми неалкогольного ожиріння печінки зумовлена прогресуванням цієї патології від гепастеатозу, що виникає внаслідок порушення транспорту, акумуляції та метаболізму нейтральних жирів, до неалкогольного стеатогепатиту, прогресуючого фіброзу, цирозу та гепатоцелюлярної карциноми (Tetri et al., 2008; Targher et al., 2007).

Патогенез *NAFD* тісно пов'язаний із синдромом інсулінорезистентності, що характеризується низьким рівнем поглинання глюкози периферичними інсулінзалежними

тканинами, і супроводжується розвитком низки клінічних проявів – гіперглікемії, гіперінсулінемії, дисліпідемії, артеріальної гіпертензії та ожиріння (Pooranaperundevi, 2010; Saini, 2010).

Надзвичайно актуальним виявляється розкриття механізмів залучення природних біорегуляторів у розвиток *NAFD* з метою застосування набутих знань в корекції метаболічних порушень. В цьому аспекті значну увагу привертають ретиноїди (вітамін А та його метаболіти), запаси яких прогресивно втрачаються при розвитку патологій печінки (Chen, 2013). На сьогодні цілком доведеною є роль активних метаболітів вітаміну А як генних регуляторів ліпідного обміну та обміну вуглеводів (Brun et al., 2013). Зокрема ретиноїди здатні модулювати експресію генів, залучених у мітохондріальне та

пероксисомальне окислення жирних кислот, (включаючи ацил-КоА лігазу 2, карнітин пальмітоїлтрансферазу 1, ацил КоА дегідрогеназу та ацил КоА оксидазу 1) та глюконеогенез (фосфоенолпіруват карбоксикіназа).

У зв'язку з цим метою роботи було встановити особливості розвитку гепатостеатозу та інсулінорезистентності при відсутності ендогенно депонованих ретиноїдів у формі печінкових ретиніл ефірів.

Матеріали та методи. Досліди проводили на мишах лінії C57BL/6J (дикий тип, WT), віком 8 тижнів, вагою 20-25 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 Першим Українським національним конгресом з біоетики, та з урахуванням положень, викладених у *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Guide..., 2011).

З метою індукування гепатостеатозу тварин утримували на високожировій дієті (*high fat diet, HFD*, калорійність 23,4кДж/г), збагаченій *транс*-жирами та з високим вмістом фруктози, представленої у вигляді сиропу (*high-fructose corn syrup, HFCS*) із масовою часткою фруктози та глюкози 55 % та 45 % відповідно (Tetri et al., 2008; Sorhede and Ahren, 2004). Контрольну групу складали миші, які перебували на стандартній дієті (*chow diet, CD*, калорійність 12,6кДж/г) (Reeves et al., 2009) (Табл. 1, 2, 3).

Для встановлення внеску ендогенно депонованих ретиніл ефірів в дослідженнях використано тварин, не здатних етерифікувати ретинол у печінці внаслідок нокауту гена лецитин: ретинолацилтрансферази EC 2.3.1.135 (*Lrat^{-/-}*), а тому позбавлених печінкових ретиніл ефірів.

Дослідні тварини були поділені на групи:

- група I (WT/CD) – тварини дикого типу, які знаходились на стандартній дієті;
- група II (WT/HFD) – тварини дикого типу, які знаходились на високожировій дієті, збагаченій *транс*-жирами та з високим вмістом фруктози;
- група III (*Lrat^{-/-}/CD*) – тварини, нокаутні за геном лецитин: ретинолацилтрансферази, які знаходились на стандартній дієті;
- група IV (*Lrat^{-/-}/HFD*) – тварини, нокаутні за геном лецитин: ретинол ацилтрансферази, які знаходились на високожировій дієті

збагаченій *транс*-жирами та з високим вмістом фруктози.

Після 16-тижневого утримання тварин на дієті проводили евтаназію під легким ефірним наркозом. Тварин зважували, проводили забір крові та видаляли печінку. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування при 3000 g протягом 10 хв.

Для кількісної оцінки рівня триацилгліцеролів та холестеролу в тканині печінки проводили попередню екстракцію ліпідної фракції за методом Фолча (Folch et al., 1956). Для цього близько 100 мг тканини поміщали у 50 мл пробірки, які містили 5 мл 1,0 M NaCl, та гомогенізували. До отриманого гомогенату печінки додавали 10 мл суміші хлороформ:метанол (2:1). Зразки інтенсивно перемішували протягом 1 хв до їх повної гомогенізації. Після центрифугування при 800g протягом 10 хв нижню хлороформну фазу відбирали у скляну пробірку. З метою повного виходу ліпідів до залишеної нижньої фази додавали 5 мл суміші хлороформ:метанол (2:1), перемішували та центрифугували як попередньо описано. Об'єднані хлороформні фази випаровували під N₂. Після повного випаровування хлороформу у зразки додавали 1 мл 2 % тритону X-100 у хлороформі та інтенсивно перемішували. Хлороформ випаровували під N₂, а осад ліпідів розчиняли, додаючи у скляні пробірки 1 мл деіонізованої води.

Вміст триацилгліцеролів у отриманій ліпідній фракції та сироватці крові визначали з використанням стандартного набору «Філісіт-Діагностика» згідно з інструкцією виробника, та виражали в ммоль/г та ммоль/л відповідно. Вміст холестеролу у отриманій ліпідній фракції та сироватці крові визначали з використанням стандартного набору «Філісіт-Діагностика» згідно з інструкцією виробника та виражали у ммоль/г та ммоль/л відповідно.

Фракційний аналіз ліпопротеїнів сироватки крові проводили методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з градієнтом концентрації від 3 % до 10 %. Аліквоту попередньо зафарбованих суданом чорним ліпопротеїнів сироватки крові розділяли після чого ідентифікували різні фракції ліпопротеїнів (Herbert et al., 1973).

Рівень ліпопротеїнів низької густини та глікозильованого гемоглобіну визначали з використанням стандартного набору «Філісіт-Діагностика» згідно з інструкцією виробника та виражали в ум. од. та мкмоль фруктози / г гемоглобіну відповідно.

Таблиця 2.
Суміш вітамінів, використана в стандартній (CD) та високожировій (HFD) дієтах

Table 2.
Vitamin mix used in chow (CD) and high fat (HFD) diets

Компонент	Масова частка, г/кг		Компонент	Масова частка, г/кг	
	HFD	CD		HFD	CD
Крохмаль	200	365	Целюлоза	50	50
Декстринізований крохмаль	100	154	Суміш вітамінів	10	10
Казеїн	223,5	195	Суміш мінералів	35	35
Сахароза	80	100	L-цистеїн	1,8	1,8
Соева олія	180	40	Холін хлорид	2,5	2,5
Маргарин	180	-	Терт-бутилгідрокінон	0,008	0,008

Таблиця 1.
Компонентний склад стандартної (CD) та високожировій (HFD) дієт

Table 1.
Component composition of chow (CD) and high fat (HFD) diets

Компонент	Масова частка, г/кг	Компонент	Масова частка, г/кг
Нікотинова кислота	3	Вітамін Е	15
Піридоксин	0,7	Вітамін А	0,8
Тіамін	0,6	Вітамін D	0,25
Рибофлавін	0,6	Вітамін К	0,075
Фолієва кислота	0,2	Пантотенова кислота	1,6
Біотин	0,02	Сахароза	974,655
Вітамін В ₁₂	2,5	Вітамін Е	15

Таблиця 3.
Суміш мінералів, використана в стандартній (CD) та високожировій (HFD) дієтах

Table 3.
Mineral mix used in chow (CD) and high fat (HFD) diets

Компонент	Масова частка, г/кг	Компонент	Масова частка, г/кг
Кальцій карбонат	357	Калій йодит	0,01
Калій фосфат	250	Натрій селенат	0,01025
Натрій хлорид	74	Амоній парамолібдат	0,00795
Калій сульфат	46,6	Натрій метаселікат	1,45
Калій цитрат	28	Борна кислота	0,0815
Оксид магнію	24	Натрій флуорид	0,0635
Ферум цитрат (Fe III)	6,06	Нікель карбонат	0,0318
Цинк карбонат	1,65	Літій хлорид	0,0174
Манган карбонат	0,63	Ванадат амонію	0,0066
Купрум карбонат	0,3	Хром натрій сульфат	0,275

Для встановлення рівня захоплення позапечінковими інсулінзалежними тканинами глюкози проводили тест толерантності до глюкози (Sorhede and Ahren, 2004). Для цього у тварин після 12 годинного обмеження доступу до їжі визначали рівень глюкози в крові, величина якого слугувала в подальшому референтною. Тваринам вводили інтраперитонеально розчин глюкози (0,5 г/мл) з розрахунку 3 мкл/г ваги та проводили визначення рівня глюкози через 15, 30, 60, 90 та 120 хвилин, використовуючи глюкометр ІМЕ-DC.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різниці вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Утримання мишей дикого типу (група WT/HFD) на високожировій дієті призводило до появи класичних ознак розвитку неалкогольного ожиріння печінки. У тварин даної групи спостерігалось зростання рівня триацилгліцеролів печінки на 35 % та холестеролу на 25 % (Рис.1.), що свідчило про акумуляцію нейтральних ліпідів в гепатоцитах.

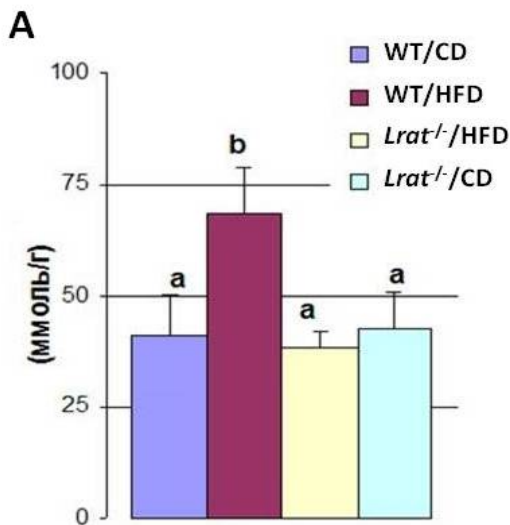


Рис. 1. Вміст триацилгліцеролів (А), та холестеролу (Б) в тканині печінки тварин

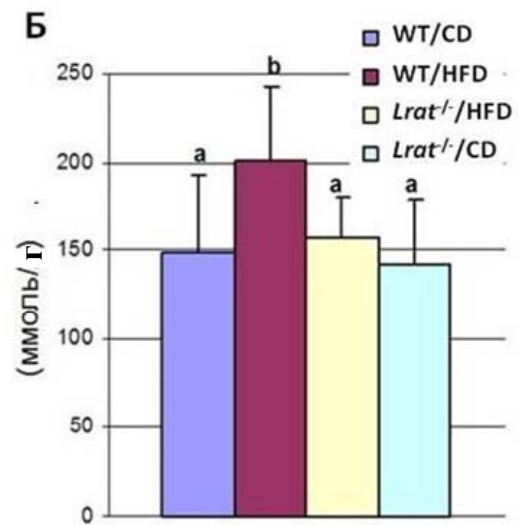


Fig. 1. The content of triacylglycerols (A) and cholesterol (B) in the liver tissue of animals

Примітка: величини позначені різними буквеними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

Note: values are indicated by different letter index statistically significant difference, $P \leq 0,05$

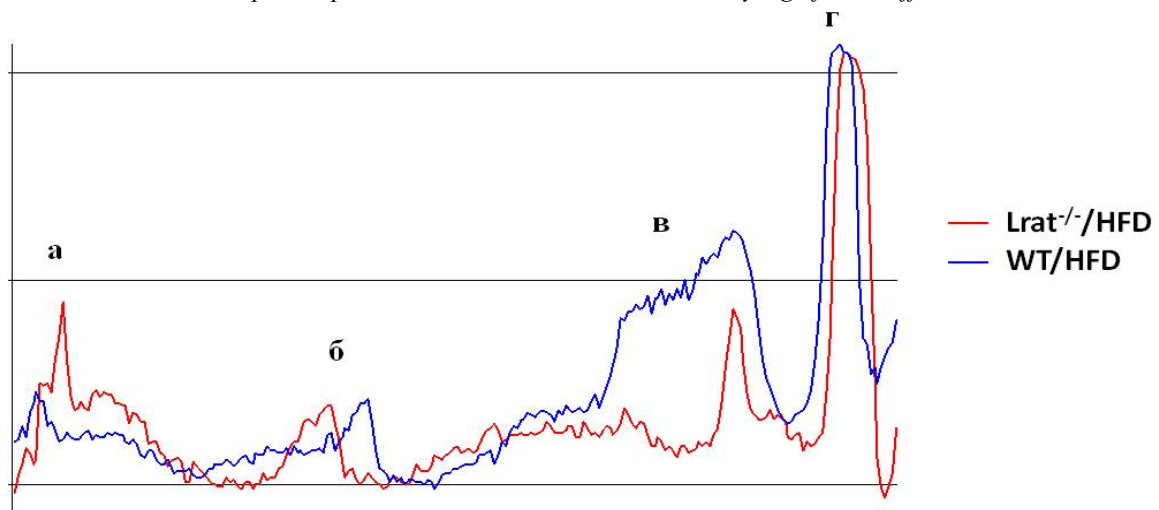


Рис. 2. Фракційний розподіл ліпопротеїнів сироватки крові

Fig. 2. Fractional distribution of serum lipoproteins

Примітка: хиломікрони - chylo (а), ліпопротеїни дуже низької густини - VLDL (б), ліпопротеїни низької густини - LDL (в) та ліпопротеїни високої густини - HDL (г)

Note: chylomicrons - chylo (a), very low density lipoproteins - VLDL (b), low density lipoproteins - LDL (c) and high density lipoproteins - HDL (g)

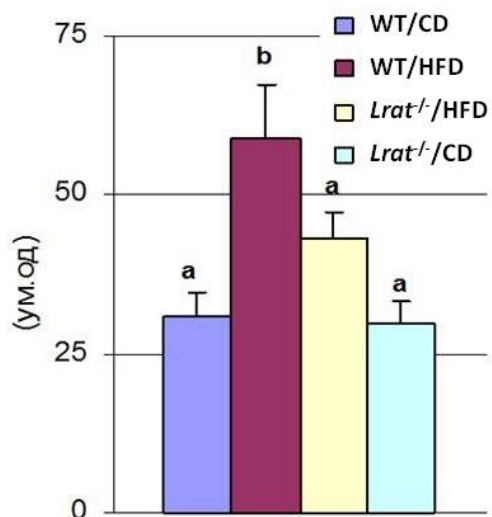


Рис. 3. Вміст ліпопротеїнів низької густини в сироватці крові тварин

Примітка: величини позначені різними буквеними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

Fig. 3. The content of low density lipoproteins in the blood serum of animals

Note: values are indicated by different letter index statistically significant difference, $P \leq 0,05$

Відомо, що при надмірному надходженні в організм харчових ліпідів зростає рівень вільних жирних кислот, які внаслідок β -окислення в мітохондріях стають джерелом ацетил-КоА. Проте утворені кількості перевищують можливості окислення в циклі Кребса, а тому спрямовуються на ліпогенез *de novo*. Водночас накопичення нейтральних жирів в тканинах печінки супроводжується порушенням співвідношення транспортних форм ліпідів та надмірної секреції триацилгліцеролів у складі ліпопротеїнів дуже низької густини. Проведений нами фракційний аналіз ліпопротеїнів сироватки крові показав, що у тварин з гепатостеатозом (група WT/HFD) на денситограмі спостерігалось розширення зони, що відповідає ліпопротеїнам низької густини (Рис. 2.).

При проведеній кількісній оцінці стану дисліпідемії нами було зафіксовано зростання рівня ліпопротеїнів низької густини в сироватці крові на 50 % (Рис.3.). З цими результатами узгоджується зростання рівня триацилгліцеролів у сироватці крові на 50 % (Рис.4.А). Проведене визначення рівня загального холестеролу показало зростання його вмісту на 30% (Рис.4 Б).

Оскільки нами не було зафіксовано зростання рівня ліпопротеїнів високої густини, як основного транспортера холестеролу до печінки (Uehara and Saku, 2014), та виявлено збільшення рівня ліпопротеїнів низької густини, як транспортера до позапечінкових тканин (Harisa and Alanazi, 2013), зростання рівня загального холестеролу найімовірніше свідчить про накопичення його атерогенної форми.

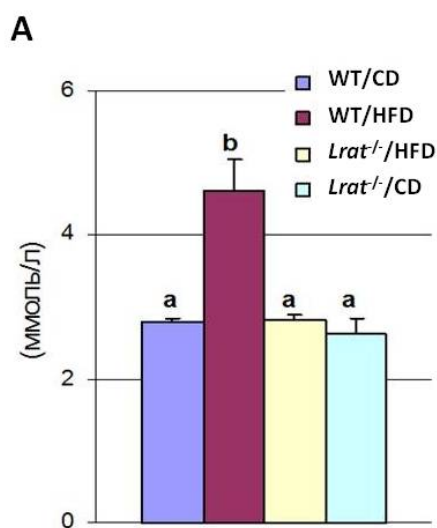


Рис. 4. Вміст триацилгліцеролів (А) та холестеролу (Б) в сироватці крові тварин

Примітка: величини позначені різними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

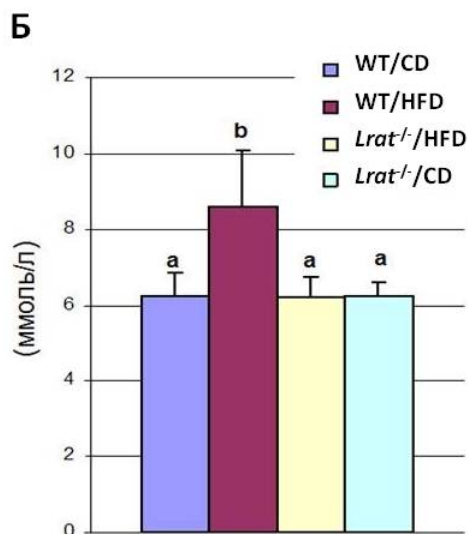


Fig. 4. The content of triacylglycerols (A) and cholesterol (B) in the blood serum of animals

Note: values indicated by different letter index are statistically significant difference, $P \leq 0,05$

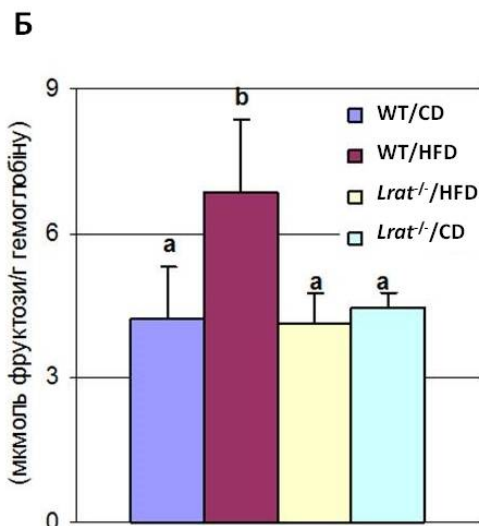
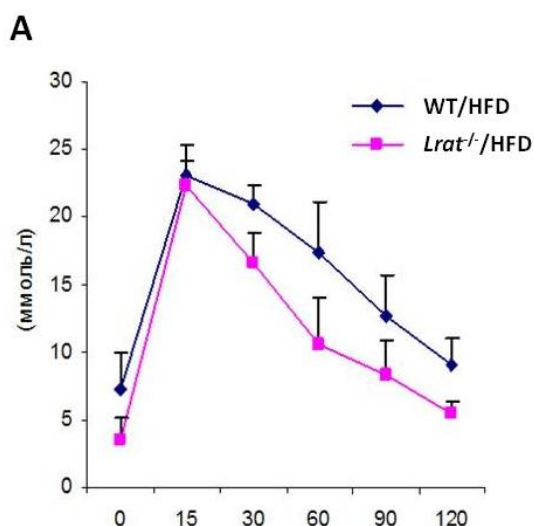


Рис. 5. Тест толерантності до глюкози (А) та вміст глікозильованого гемоглобіну (Б) в крові тварин

Fig. 5. Glucose tolerance test (A) and glycosylated hemoglobin content (B) in the blood of animals

Примітка: величини позначені різними буквеними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

Note: values indicated by different letter index are statistically significant different, $P \leq 0,05$

Водночас у тварин, позбавлених ендогенно депонованих ретиніл ефірів ($Lrat^{-/-}$) не спостерігалось накопичення триацилгліцеролів в печінці, а досліджувані показники не відрізнялись від величин, характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті (Рис. 1, 2, 3, 4).

характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті (Рис. 5).

Оскільки відомо, що гепатостеатоз супроводжується розвитком цукрового діабету 2 типу, нами проведено біохімічний аналіз інсулінорезистентності. У тварин (група WT/HF) інсулінорезистентність проявлялась у достовірно вищих показниках рівня глюкози натще та сповільненні темпів її кліренсу, визначених у тесті толерантності до глюкози (Рис. 5 А).

Отже, ендогенно-депоновані ретиноїди залучені в патогенез неалкогольного ожирівння печінки, та можуть виступати модуляторами даної патології.

Список літератури:

Для підтвердження поступового зростання рівня глюкози в крові нами було проведено визначення рівня глікозильованого гемоглобіну, що відображає відсоток гемоглобіну крові, необоротно сполученого з молекулами глюкози. Підвищений рівень глікозильованого гемоглобіну на 30 % (Рис. 5 Б) свідчив про персистентність процесів, які характеризують діабет 2 типу.

1. Brun P. J. Potent regulators of metabolism / P. J. Brun, J. Z. Yang, S. A. Lee [et al.] // Biofactors. – 2013. – Vol. 39, № 2. – P. 151–163.
2. Chen G. Roles of Vitamin A Metabolism in the Development of Hepatic Insulin Resistance / G. Chen // ISRN Hepatology. – 2013. – Vol. 2013. № 4 – P. 1-21.
3. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509.
4. Guide for the care and use of laboratory animals. - Washington D. C.: National Academies Press, 2011. - p. 246.
5. Harisa G. I. Low density lipoprotein bionanoparticles: from cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs / G. I. Harisa and F. K. Alanazi // Saudi Pharm. J. – 2014. – Vol. 22, № 6. – P. 504-515.
6. Herbert K. Polyacrylamide-Gel Disc-Electrophoresis as a Screening Procedure for Serum Lipoprotein Abnormalities / K. Herbert, N. M. Wada, L. A. Ehrhart [et al.] // Clin. Chem. – 1973. – Vol. 19. № 2, – P. 228-234.
7. Pooranaperundevi M. Insulin resistance induced by a high-fructose diet potentiates thioacetamide

Водночас у тварин, позбавлених ендогенно депонованих ретиніл ефірів ($Lrat^{-/-}$), (група $Lrat^{-/-}$ /HFD) не спостерігалось ознак інсулінорезистентності, а рівень глікозильованого гемоглобіну і толерантність до глюкози не відрізнялись від величин,

- hepatotoxicity / M. Pooranaperundevi, M. S. Sumiyabany, P. Viswanathan // Singapore Med. J. – 2010. – Vol. 51, № 5. – P. 390-397.
8. Reeves P. G. AIN-93 Purified Diets For Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet / P. G. Reeves, F. H. Nielsen, G. C. Fahey // J. Nutrition. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 12-24.
 9. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus / V. Saini // World J. Diabetes. – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 68-75.
 10. Sorhede Winzell M. The High-Fat Diet – Fed Mouse. A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes / M. Sorhede Winzell, B. Ahren // Hepatology. – 2004. – Vol. 53, № 3. – P. 215-219.
 11. Targher G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients/ G. Targher, L. Bertolini, R. Padovani [et al.] // Diabetes Care. – 2007. – Vol. 30, № 12 – P. 1212-1218.
 12. Tetri L. H. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent / L. H. Tetri, M. Basaranoglu, E. M. Brunt [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 295, № 3. – P. 234-242.
 13. Tomita K. Free Cholesterol Accumulation in Hepatic Stellate Cells: Mechanism of Liver Fibrosis Aggravation Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice / K. Tomita, T. Teratani, T. Suzuki [et al.] // Hepatology. – 2014. – Vol. 59, № 4. – P. 155-169.
 14. Uehara Y. High-density lipoprotein and atherosclerosis: Roles of lipid transporters / Y. Uehara and K. Saku // World J. Cardiol. – 2014. – Vol. 6, № 10. – P. 1049-1059.

BIOCHEMICAL FEATURES OF HEPATIC STEATOSIS UNDER THE ABSENCE OF VITAMIN A STORES

I. O. SHMARAKOV, V. L. BORSCHOVETSKA, O. M. KOBYLYANSKA

*Y. Fedkovich Chernivtsi National University
Institute of Biology, Chemistry and Natural Resources, Kotsyubynskyi str, 2, . Chernivtsi, 58012
e-mail: igor.shmarakov@gmail.com*

The work is devoted to the research of the characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis and insulin resistance under the absence of vitamin A stores. To develop a vitamin A-deficient state transgenic mice were employed in the studies, which are unable to esterify retinol in the liver (as a result of lecithin: retinol acyltransferase gene knockout ($Lrat^{-/-}$)), and therefore deprived of liver retinyl esters. Hepatic steatosis was induced by keeping the experimental animals on a high-fat diet enriched with trans fats and high fructose for 16 weeks. Assessment of hepatic steatosis was based on the quantitative determination of triacylglycerol and cholesterol in serum and liver tissue (with prior lipid fraction extraction by Folch method), qualitative (PAGE) and quantitative analysis of serum lipoproteins. Biochemical analysis of insulin resistance was based on the determination of fasting glucose levels, its clearance determined in a glucose tolerance test, and glycated hemoglobin levels. Our studies showed that keeping wild-type animals on a the high fat diet enriched with trans-fats and high fructose leads to the hepatic steatosis development, resulting in the increase of triacylglycerol and cholesterol levels in the liver and serum. The performed analysis confirmed increase of low-density lipoprotein level by 50%. At the same time an increase in total cholesterol level by 30 % was found, indicating the accumulation of its atherogenic form. The absence of endogenous retinoids stores in $Lrat^{-/-}$ mice, as a result of lecithin: retinylacyltransferase gene knockout, provides resistance for the development of nonalcoholic fatty liver. In particular the studied parameters: the level of hepatic and serum triacylglycerol and cholesterol did not differ from the values characteristic for animals kept on a standard diet. Simultaneously, in knockout animals the appearance of signs of insulin resistance, the level of glycosylated hemoglobin and glucose tolerance did not differ from values characteristic for animals kept on a standard diet.

Keywords: hepatic steatosis, retinoid, insulin resistance, nonalcoholic fatty liver disease.

Одержано редколлегією 15. 12. 2014 р.



УДК 577.1(262.5)

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЕ МИГРАЦИИ ЧЕРНОМОРСКИХ КРЕВЕТОК У ПОБЕРЕЖЬЯ ОДЕССКОГО ЗАЛИВА В ПЕРИОД ДО И ПОСЛЕ РАССВЕТА

А. Ю. ВАРИГИН

Институт морской биологии НАН Украины, Одесса, 65011, ул. Пушкинская, 37,;
e-mail: sealife_1@mail.ru

Протягом 2011-2014 рр. вивчений характер горизонтальних міграцій чорноморських креветок в прибережній зоні Одеської затоки в період до і після світанку. У 2011 р міграції здійснювали три види ракоподібних: *Crangon crangon*, *Palaemon elegans* і *Palaemon adspersus*. У наступні роки в прибережній зоні був виявлений лише *P. adspersus*. Характер його горизонтальних міграцій полягав у наступному: максимальні кількісні показники були відзначені в прибережній зоні за 1 годину до світанку. Потім ближче до світанку і після нього чисельність і біомаса ракоподібних поступово знижувалася. У нерестовий період максимальні кількісні показники креветок також були відзначені за годину до світанку. При цьому кількість яйценосних самок *P. adspersus* становило до 92% від загальної чисельності ракоподібних. Потім, під час світанку і після нього, відбувається поступове зниження чисельності та біомаси ракоподібних. У цей період кількість яйценосних самок коливається на рівні приблизно рівному числу самців, але вже через 2 години після світанку різко знижується до 3,7% від загального числа креветок. У літній період 2014 було зафіксовано різке збільшення кількісних показників креветок. Максимальні чисельність (10071 екз./100 м²) і біомаса (8056,8 г/100 м²) *P. adspersus* були відзначені за годину до світанку. Потім ці показники поступово знижувалися, і вже через 2 години після світанку чисельність креветок становила 1019 екз./100 м², а біомаса – 550,3 г/100 м². Довжина *P. adspersus* коливалася в межах від 17,1 до 65,6 мм. Динаміка розмірної структури креветок у всі вивчені роки носила подібний характер. Так, за годину до світанку в прибережній зоні моря були присутні в основному дорослі тварини. Потім ближче до сходу сонця з'являлася молодь, а кількість дорослих особин поступово зменшувалася. Через 2 години після світанку в прибережній зоні залишалася лише молодь.

Ключові слова: чорноморські креветки, горизонтальні міграції, період до і після світанку, прибережна зона, Одеська затока..

Введение. Известно, что многие виды креветок в течение жизненного цикла совершают различные миграции. Наиболее изученными являются регулярные вертикальные перемещения этих ракообразных в толще воды. Так, массовый вид креветок Берингова моря *Pandalus goniurus* днем обитает на дне, а ночью поднимается к поверхности. Причем обратное движение в сторону дна происходит у этого вида в предрассветные часы (Барсуков, Иванов, 1979). Хорошо изученный вид *Crangon crangon*, обитающий во многих морях, в том числе и Черном, днем закапывается в песок, а ночью выходит из грунта и поднимается в толщу воды (Закутский, 1965; Baan, 1975; Janssen, Kuipers, 1980). Этот вид во многих странах мира имеет промысловое значение (Viegas et al, 2007). Так, в юго-восточной части Северного моря его ежегодный вылов составляет около 20 тыс. т (Temming, Damm, 2002).

Сезонные миграции креветок происходят также и в горизонтальном направлении. Их массовые циклические перемещения в направлении берег – море – берег являются одной из важнейших адаптаций к жизни в прибрежной зоне моря, где действие многих факторов среды проявляется в наибольшей степени. Такие виды черноморских креветок, как *Palaemon adspersus* и *Palaemon elegans* в холодное время года перемещаются на большую глубину, а в весенне-летний период подходят к берегу, где на мелководье вынашиваются и созревают их яйца, а так же выклеваются личинки (Макаров, Пилявская, 1951; Макаров, 2004). При этом *P. adspersus* может плавать со скоростью от 10 до 30 см·с⁻¹ (Игнатъев, 1982). Известно, что и в других морях этот вид креветок совершает сезонные миграции (Hagerman, Ostrup, 1980).

Третий вид черноморских десятиногих

Crangon crangon также совершает подобные миграции, которые впрочем, не связаны с процессом размножения, а вызваны лишь сезонной изменчивостью температурного режима прибрежных вод (Макаров, 2004). Все эти три вида креветок часто обитают совместно и в других морях, например, в Балтийском, хотя при этом они занимают разные экологические ниши (Lapinska, Szaniawska, 2005).

Прибрежные горизонтальные миграции десятиногих ракообразных в предрассветный период значительно менее исследованы. Цель настоящей работы состоит в выяснении характера горизонтальных миграций черноморских креветок в прибрежной зоне Одесского залива в период до и после рассвета.

Материалы и методы. Материалом для работы послужили пробы, собранные в летний период (август) 2011–2014 гг. в прибрежной зоне Одесского залива. Для изучения характера горизонтальных миграций яйценосных самок креветок дополнительно были взяты пробы во время их массового нереста весной (апрель) 2014 г. Пробы собирали на песчаном грунте на глубине 1,3 м с помощью десятиметровой волокуши с размером ячеи 4 мм. Для отбора каждой пробы волокушу протягивали параллельно береговой линии на расстояние 50 м. Таким образом, облавливаемая площадь в каждом случае составляла 500 м².

Основным ориентиром при отборе проб был восход Солнца. Материал отбирали по следующей схеме: проба № 1 взята час до восхода Солнца, проба № 2 – за полчаса, проба № 3 во время восхода, проба № 4 – через полчаса после восхода, проба № 5 – через 2 часа после восхода Солнца. Содержимое каждой пробы фиксировали 4 % формалином. В лаборатории определяли вид отобранных животных, подсчитывали их количество, измеряли длину и массу. В качестве количественных характеристик ракообразных использовали их численность N , экз. · 100 м⁻² и биомассу B , г · 100 м⁻².

Результаты и их обсуждение. В результате обработки материала 2011 г. в пробах были обнаружены 3 вида представителей отряда Decapoda: *Crangon crangon* (Linne, 1758), *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 и *Palaemon elegans* Rathke, 1837. Первые два вида, а именно: песчаная и травяная креветки преобладали в количественном отношении, так как биотоп прибрежного песка, где были собраны пробы, является привычным местом их обитания. Третий вид, каменная креветка была найдена в значительно меньшем количестве, в виду того, что для нее предпочтителен каменистый грунт (Макаров, 2004).

Как видно из данных, представленных на рис. 1, численность двух видов ракообразных *C. crangon* и *P. adspersus*, изменяется за изученных период в прямо противоположном направлении. Так, за один час до рассвета максимальной численности в прибрежной зоне изученного района достигает *C. crangon* ($N = 2,4$ экз. · 100 м⁻²). Количественные показатели другого вида *P. adspersus* в это время в три раза ниже ($N = 0,8$ экз. · 100 м⁻²). Затем ближе к рассвету численность *C. crangon* постепенно снижается. И уже через полчаса после восхода Солнца этот вид больше не обнаруживается в прибрежной зоне моря (рис. 1). Численность *P. adspersus* за это время наоборот возрастает, достигая своего максимума через полчаса после рассвета ($N = 5,4$ экз. · 100 м⁻²).

Динамика биомассы этих двух видов за изученный период соответствовала изменению их численности. Так, максимальная биомасса *C. crangon* отмечена за час до рассвета ($B = 1,46$ г · 100 м⁻²), а *P. adspersus* – через полчаса после него ($B = 3,15$ г · 100 м⁻²). Третий вид креветок *P. elegans* был обнаружен в единичных экземплярах только за полчаса до рассвета и через полчаса после него. Через два часа после рассвета ракообразные в прибрежной зоне обнаружены не были (рис. 1).

Изучение динамики размерной структуры ракообразных показало, что длина обнаруженных особей *P. adspersus* колебалась в пределах от 26,0 до 54,1 мм. В пробе, отобранной за час до рассвета, в прибрежной зоне присутствовали только взрослые экземпляры этих креветок длиной от 40,3 до 50,1 мм. Затем, за полчаса до рассвета появляются более мелкие экземпляры, длиной 30,1 – 35,3 мм, хотя количественно преобладают особи, длиной 40,2 – 45,4 мм. В следующей пробе, взятой во время рассвета, появляется молодь, длиной до 30 мм. Через полчаса после рассвета взрослые особи покидают прибрежную зону. В это время здесь остается лишь молодь.

Длина обнаруженных в пробах *C. crangon* колебалась в пределах от 31,1 мм до 50,3 мм. Изменение размерной структуры этого вида за изученный период по сравнению с *P. adspersus* происходило в противоположном направлении. Так, за 1 час до рассвета в прибрежной зоне присутствуют как взрослые особи длиной до 46 мм, так и молодь – длиной до 30 мм. Затем, за полчаса до рассвета молоди становится значительно меньше. И, наконец, во время рассвета в прибрежной зоне были отмечены лишь взрослые экземпляры *C. crangon*, длиной от 38,6 до 50,3 мм.

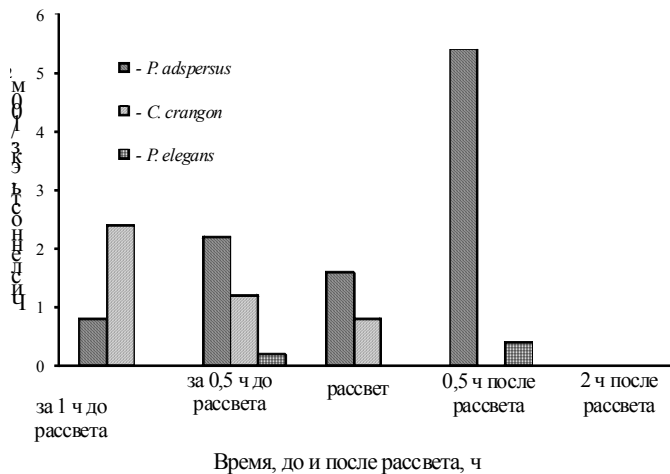


Рис. 1. Динамика численности *P. adspersus*, *C. crangon*, *P. elegans* в прибрежной зоне Одесского залива Черного моря в период до и после рассвета летом 2011 г.

Fig. 1. The dynamics of *P. adspersus*, *C. crangon* and *P. elegans* population in the coastal zone of Odessa Bay of the Black Sea in the period before and after sunrise in summer, 2011

В пробах, собранных в последующие годы (2012–2014 гг.) были обнаружены креветки только одного вида, а именно: *P. adspersus*. Как показали проведенные исследования, в отсутствие конкурентов миграционное поведение этого ракообразного несколько изменилось. Так, по материалам 2012 г. максимальная численность *P. adspersus* ($N = 56$ экз.·100 м⁻²) была зафиксирована за час до рассвета. Через полчаса этот показатель снижался до 15 экз.·100 м⁻². Затем происходило постепенное уменьшение численности ракообразных ($N = 7$ экз.·100 м⁻², через 2 ч после рассвета). В 2013 г. наблюдалась аналогичная картина – численность *P. adspersus* снизилась с 66 экз.·100 м⁻² (за час до рассвета) до 0,6 экз.·100 м⁻² (через 2 ч после него).

Динамика биомассы *P. adspersus* за изученный период, показанная на рис. 2, соответствовала характеру изменения их численности. Так, по материалам 2012 г. максимальная биомасса креветок была зафиксирована за час до рассвета ($B = 43,06$ г·100 м⁻²). Через полчаса этот показатель снизился до 11,98 г·100 м⁻². Затем происходило постепенное уменьшение биомассы ракообразных ($B = 3,04$ г·100 м⁻², через 2 ч после рассвета). Динамика биомассы *P. adspersus* в 2013 г была аналогичной – показатели за изученный период снизились с 49,5 г·100 м⁻², (за час до рассвета) до 0,36 г·100 м⁻² (через 2 ч после него).

Сопоставление данных за период 2011–2013 гг. показало, что максимальная численность *P. adspersus* в 2012 г. возросла по сравнению с 2011 г. более чем в 11 раз, а биомасса – в 13 раз. Другими словами, количественные показатели этого вида креветок в отсутствие конкурентов за период с 2011 по 2012 гг. увеличились на порядок. В 2013 г. эти показатели по сравнению с 2012 г. изменились незначительно (рис. 2).

Длина *P. adspersus*, обнаруженных в сборах 2012–2013 гг. колебалась в пределах от 26,5 до 68,5 мм. Динамика размерной структуры креветок в эти годы носила сходный характер. Так, за час до рассвета в прибрежной зоне моря присутствовали в основном взрослые животные длиной от 45,1 до 68,5 мм. Затем через полчаса количество крупных экземпляров заметно уменьшилось. Во время рассвета и через полчаса после него появилась молодь длиной 26,5–32,2 мм. И уже через 2 ч после рассвета в прибрежной зоне остались лишь молодые особи ракообразных.

По материалам, собранным весной 2014 г. в период массового размножения *P. adspersus* была изучена динамика как количественных показателей, так и полового состава креветок, совершающих горизонтальные миграции в прибрежной зоне моря. В этих пробах были обнаружены только взрослые особи ракообразных длиной от 36,5 до 68,3 мм. При этом практически все самки несли яйца на своих плеоподах.

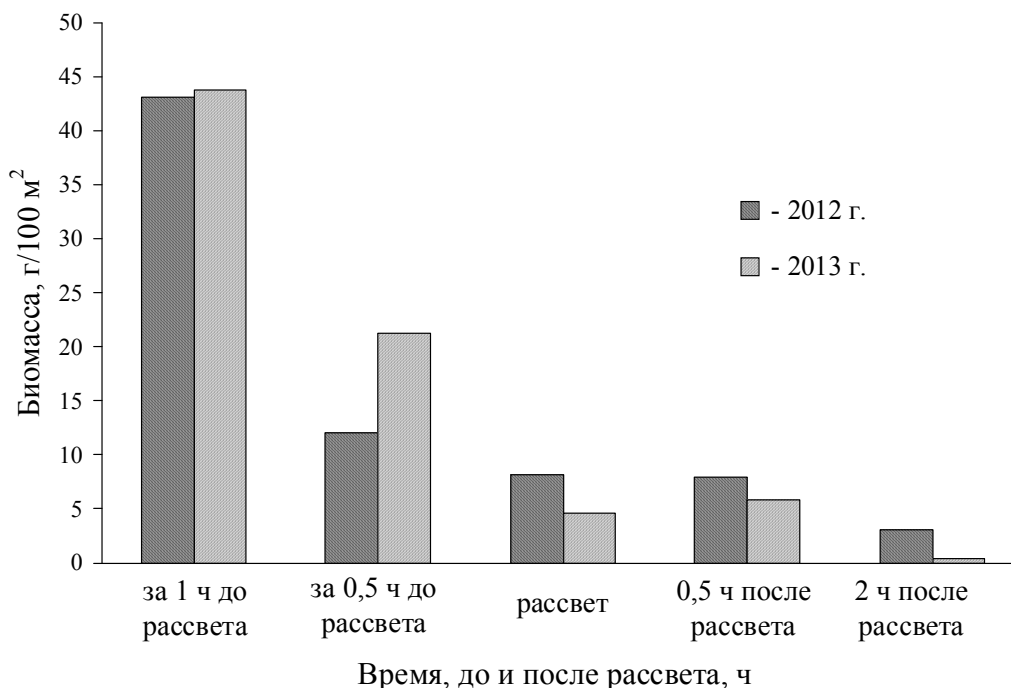


Рис. 2. Динамика биомассы *P. adspersus* в прибрежной зоне Одесского залива Черного моря в период до и после рассвета летом 2012 и 2013 гг

Fig. 2. The dynamics of *P. adspersus* biomass in the coastal zone of Odessa Bay of the Black Sea in the period before and after sunrise in summer, 2012 and 2013.

Параметры их максимальной численности ($N = 24 \text{ экз.} \cdot 100 \text{ м}^{-2}$) и биомассы ($B = 68,78 \text{ г} \cdot 100 \text{ м}^{-2}$) были зафиксированы за час до рассвета. В этот период количество яйценосных самок составляло 91,8 %, а самцов – 8,2 % от общего числа креветок (рис. 3). Через полчаса численность креветок снизилась до 6 экз. $\cdot 100 \text{ м}^{-2}$, а биомасса – до 9,02 г $\cdot 100 \text{ м}^{-2}$. В это время количество самцов немного превышало число яйценосных самок (рис. 3).

Затем, во время рассвета и после него, происходило постепенное снижение численности ($N = 2 \text{ экз.} \cdot 100 \text{ м}^{-2}$, через 2 ч после рассвета) и биомассы ($B = 1,76 \text{ г} \cdot 100 \text{ м}^{-2}$, через 2 ч после рассвета) ракообразных. В этот период количество яйценосных самок колебалось на уровне примерно равном числу самцов, но уже через 2 часа после рассвета снизилось до 3,7 % от общего числа креветок (рис. 3).

В пробах, собранных летом 2014 г. было зафиксировано резкое увеличение количественных показателей креветок. Максимальные численность ($N = 10071 \text{ экз.} \cdot 100 \text{ м}^{-2}$) и биомасса ($B = 8056,8 \text{ г} \cdot 100 \text{ м}^{-2}$) *P. adspersus* были отмечены за час до рассвета. Затем эти показатели постепенно снижались, и уже через 2 ч после рассвета численность креветок составляла 1019 экз. $\cdot 100 \text{ м}^{-2}$, а биомасса – 550,3 г $\cdot 100 \text{ м}^{-2}$. Длина *P. adspersus*, обнаруженных в этих сборах колебалась в пределах от 17,1 до

65,6 мм. Динамика размерной структуры креветок за период до и после рассвета в 2014 г. была аналогичной таковой за предыдущие изученные годы.

При сравнении последних полученных данных с материалами за предыдущие годы можно сделать вывод о том, что летом 2014 г. произошла вспышка численности *P. adspersus* в исследуемом районе моря. Так, в этом году по сравнению с прошлым количественные показатели креветок увеличились на два порядка. Дело в том, что травяная креветка может резко увеличивать свою численность за счет значительной индивидуальной плодовитости. Так, взрослая самка *P. adspersus* может вынашивать на своих плеоподах в среднем около 1300 яиц, а максимально – до 3600 (Замятина, 2012; Макаров, 2004). При благоприятных условиях, и особенно, в отсутствии конкурентов, это может привести к подобным вспышкам численности ракообразных.

Как видно из представленных данных, динамика численности креветок в прибрежной зоне моря в период до и после рассвета во все изученные годы имела сходный характер. Так, если выразить эту изменчивость численности ракообразных в процентах от их общего числа, то выясняется, что наиболее резкое снижение их относительной численности происходит в период между 1 ч до рассвета и 0,5 ч до рассвета.

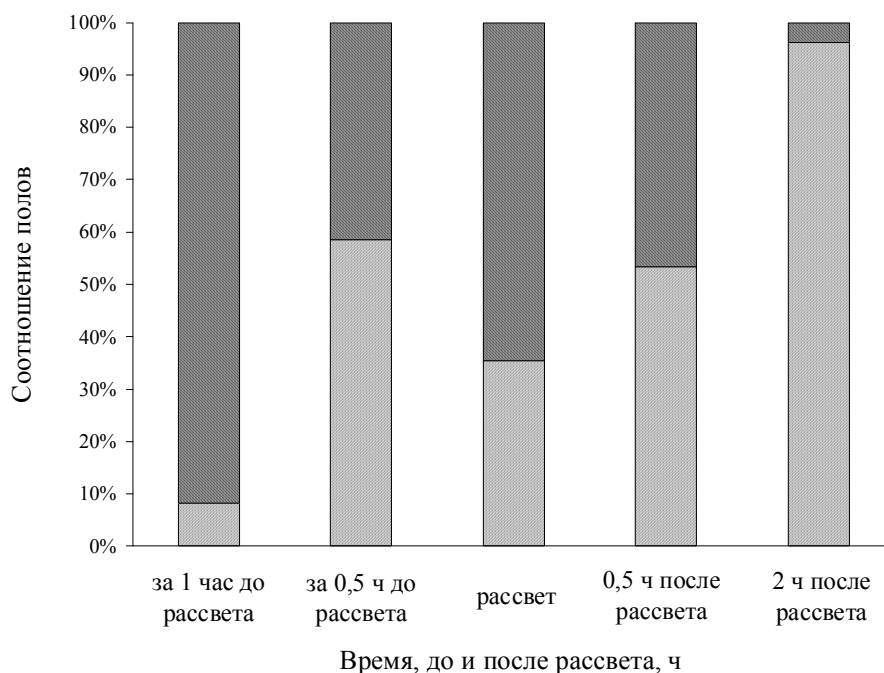


Рис. 3. Соотношение самок с икрой (темная штриховка) и самцов (светлая штриховка) *P. adspersus* в прибрежной зоне Одесского залива Черного моря в период до и после рассвета весной 2014 г.

Fig. 3. The ratio of females with eggs (dark shading) and males (light shade) of *P. adspersus* in the coastal zone of Odessa Bay of the Black Sea in the period before and after sunrise in spring, 2014

Это хорошо видно по усредненным данным за 2012–2014 гг. (Рис. 4). Затем во время рассвета и после него происходит постепенное уменьшение относительной численности креветок.

Выводы. В результате проведенных исследований был выяснено, что в случае совместного обитания трех видов креветок, как это было отмечено в 2011 г., один из них, а

именно: *P. adspersus* массово появлялся в прибрежной зоне, лишь после того, как ее покидал другой вид *C. crangon*. Третий вид ракообразных *P. elegans* появлялся в прибрежной зоне лишь эпизодически.

В последующие годы в прибрежной зоне моря в предрассветные часы был обнаружен лишь один вид – *P. adspersus*.

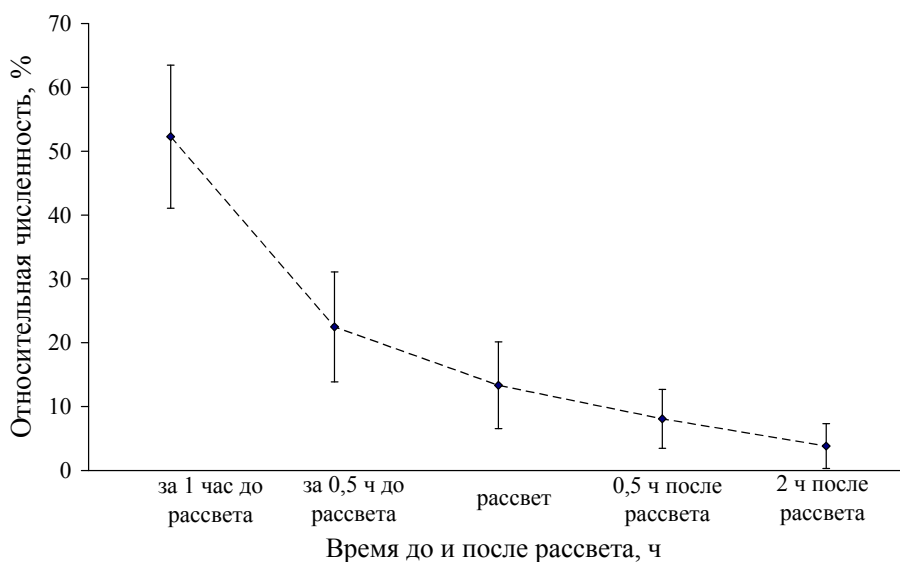


Рис. 4. Динамика относительной численности *P. adspersus* в период до и после рассвета в прибрежной зоне Одесского залива Черного моря. Усредненные данные за 2012-2014 гг.

Примечание: Вертикальными линиями отмечены 95 % доверительные интервалы.

Fig. 4. The dynamics of *P. adspersus* relative abundance in the period before and after dawn in the coastal zone of Odessa Bay of the Black Sea. Averaged data for 2012-2014.

Note: Vertical lines indicate 95% confidence intervals

Характер его горизонтальных миграций в отсутствие конкурентов состоял в следующем: максимальные количественные показатели были отмечены в прибрежной зоне за 1 час до рассвета. Затем ближе к рассвету и после него показатели численности и биомассы ракообразных постепенно снижались.

В нерестовый период (апрель 2014 г.) максимальные количественные показатели креветок также были отмечены за час до рассвета. При этом количество яйценосных самок *P. adspersus* составляло до 92 % от общей численности ракообразных. Затем, во время рассвета и после него, происходит постепенное снижение численности и биомассы ракообразных. В этот период количество яйценосных самок колеблется на уровне примерно равном числу самцов, но уже через 2 часа после рассвета резко снижается до 3,7 % от общего числа креветок.

Динамика размерной структуры креветок во все изученные годы носила сходный характер. Так, за час до рассвета в прибрежной зоне моря присутствуют в основном взрослые животные. Затем ближе к восходу солнца появляется молодь, а количество взрослых особей постепенно уменьшается. Через 2 ч после рассвета в прибрежной зоне остается лишь молодь.

Благодарности. Автор выражает благодарность старшему научному сотруднику ИМБ НАНУ, к.б.н. Ю.В. Квачу за помощь в сборе материала.

Список литературы:

1. Барсуков В.Н., Иванов Б.Г. Вертикальные суточные миграции креветок в западной части Берингова моря // Биол. моря. – 1979. – № 3. – С. 18–23.
2. Закутский В. П. О концентрации некоторых донных и придонных организмов в приповерхностном слое

Черного и Азовского морей // Океанология. – 1965. – Т. 5, № 3. – С. 495–497.

3. Замятина Е.А. Индивидуальная плодовитость травяной креветки (*Palaemon adspersus* Rathke, 1837) в разных районах Черноморского бассейна // Труды ЮгНИРО. – 2012. – Т. 50. – С. 123–128.

4. Игнатъев С.М. Гидродинамические особенности черноморской креветки *Palaemon adspersus* Rathke (Decapoda, Palaemonidae) // Экол. Моря. – 1982. – вып. 11. – С. 83–86.

5. Макаров А.К., Пилявская А.Е. Материалы по биологии черноморской креветки *Leander adspersus* Rathke // Тр. Карадаг. биол. станции. – 1951. – вып. 11. – С. 38–46.

6. Макаров Ю.Н. Десятиногие ракообразные. – Киев: Наук. думка, Фауна Украины. – 2004. – Т. 26, вып. 1–2. – 429 с.

7. Baan S. M. Migration of *Crangon crangon* in surface waters near the «Texel» lightship // Neth. J. Sea Res. – 1975. – Vol. 9, N 3–4. – P. 287–296.

8. Hagerman L., Ostrup J. Seasonal and diel activity variations in the shrimp *Palaemon adspersus* from a brackish, non-tidal Area // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1980. – 2. – P. 329–335.

9. Janssen G.M., Kuipers B.R. On tidal migration in the shrimp *Crangon crangon* // Neth. J. Sea Res. – 1980. – 14. – P. 339–346

10. Lapinska E., Szaniawska A. Seasonal variations in the occurrence of the prawns *Crangon crangon* (L., 1758), *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837) and *Palaemon elegans* (Rathke, 1837) in the littoral zone of the Gulf of Gdansk // Oceanol. and Hydrobiol. Studies. – 2005. – vol. 34, N 2. – P. 95–110.

11. Temming A., Damm U. Life cycle of *Crangon crangon* in the North Sea: a simulation of the timing of recruitment as a function of the seasonal temperature signal // Fish. Oceanogr. – 2002. – vol. 11, N 1. – P. 45–58.

12. Viegas I., Martinho F., Neto J., Pardal M. Population dynamics, distribution and secondary production of the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) in a southern European estuary. Latitudinal variations // Sci. Mar. – 2007. – vol. 73, N 3. – P. 451–460.

HORIZONTAL MIGRATION OF THE BLACK SEA SHRIMPS IN THE ODESSA BAY BEFORE AND AFTER SUNRISE

A. Yu. Varigin

During the years 2011-2014 the character of the horizontal migration of the Black Sea shrimps in the Odessa Bay in the period before and after sunrise was studied. In 2011 three species of crustaceans: Crangon crangon, Palaemon elegans and Palaemon adspersus were observed. In subsequent years in the coastal zone only P. adspersus was detected. The nature of its horizontal migration was as follows: the maximum quantity indicators were observed in the coastal zone for 1 hour before sunrise. Then, around sunrise and after, the abundance and biomass of crustaceans were gradually decreased. In the spawning period the maximum quantity indicators of shrimps were also noted an hour before sunrise. In this time the number of oviparous females of P. adspersus was up to 92 % of the total number of crustaceans. Then, during sunrise and after, the number of oviparous females ranged at about an equal number of males, but 2 hours after sunrise was sharply reduced to 3,7 % of the total number of shrimps. In summer 2014 a sharp increase in quantitative parameters of shrimps was recorded. The maximum abundance (10071 ind.·100 m⁻²) and biomass (8056,8 g·100 m⁻²) of P. adspersus were marked by an hour before sunrise. Then, these figures were gradually declining, and within 2 hours after sunrise the abundance of shrimps was 1019 ind.·100 m⁻², and biomass – 550,3 g·100 m⁻². The length of P. adspersus was ranged from 17,1 to 65,6 mm. The dynamics of the size structure of shrimps in all years studied was of a similar character. So, an hour before sunrise in the coastal area was mainly attended by adult animals. Then, closer to sunrise the young individuals were appeared, and the number of adults gradually decreased. Two hours after sunrise in the coastal zone only juveniles were remained.

Keywords: Black Sea shrimps, horizontal migration, period before and after sunrise, the coastal zone, Odessa Bay.

Одержано редакцією 8.12.2014

ВПЛИВ СУБСТРАТІВ ВІДВАЛУ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ НА ВМІСТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ У *SORGHUM HALEPENSE* (L.) PERS

З. БЕШЛЕЙ¹, С. БЕШЛЕЙ², В. БАРАНОВ¹, О. ТЕРЕК¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського 4, м. Львів, 79005, Україна.
e-mail: zirka_blb2@ukr.net

²Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаника 11, м. Львів, 79005, Україна.

У роботі досліджено зміни вмісту пероксиду водню і активності пероксидази в 30- та 120-добових рослин *Sorghum halepense* (L.) Pers (довгокореневищного злаку родини тонконогових (Poaceae), який розмножується як насінням, так і кореневищами) за умов росту на субстратах відвалу Центральної збагачувальної фабрики «Червоноградська», із додаванням у них нетрадиційних органічних та мінеральних добрив – глауконіту і відходів дріжджового виробництва. У результаті проведених експериментів встановлено обернену залежність між активністю пероксидази та вмістом пероксиду водню у тканинах 30- та 120-добових рослин сорго алевського, які росли на різних субстратах. Ця закономірність є природною адже в умовах стресу збільшується активність пероксидази, яка активує розщеплення пероксиду водню до кисню та води, запобігаючи тим самим його токсичному ефекту. Показано, що у 120-добових рослин *S. halepense* вміст пероксиду водню та активність пероксидази у більшості варіантів були практично на рівні контролю, що пов'язано із формуванням адаптаційних перетворень у рослин протягом тривалого існування в умовах стресу. При внесенні нетрадиційних добрив у субстрати відвалу відбувалися зміни їх фізико-хімічних властивостей, що вплинуло на вміст пероксиду водню та активність пероксидази у рослин. Отримані експериментальні дані можуть бути основою для аналізу стійкості рослин та створення системи заходів із коригування продуктивності цих рослин в умовах техноекосистем, покращення їх фіторемераційних властивостей за допомогою використання не лише традиційних добрив а й як показують наші дослідження нетрадиційних добрив, які зменшать собівартість рекультиваційних робіт.

Ключові слова: пероксид водню, пероксидаза, субстрати відвалів вугільних шахт, глауконіт, відходи виробництва дріжджів, *Sorghum halepense*.

Вступ. Проблема рекультивації техногенних ландшафтів особливо актуальна у районах видобутку природних ресурсів, зокрема вугілля. Відвали шахтних порід створюють серйозні екологічні проблеми, оскільки їх субстрати мають кислу реакцію середовища, містять важкі метали та інші ксенобіотики і полютанти в концентраціях, що перевищують гранично допустимі концентрації у кілька порядків (Книш, Харкевич, 2003; Баранов, 2008). Одним із дієвих екологічних способів відновлення техногенних ландшафтів є фіторекультивация (Геник, 2008). При фіторекультивации породних відвалів збагачувальних фабрик і шахтних териконів рослини піддаються комплексному впливу ряду стресових факторів: підвищеній кислотності середовища, дії ксенобіотиків, промислових полютантів, незбалансованості макро-, мезо- та мікроелементного складу середовища, недостатнього і нерівномірного зволоження, перепаду температур (Рыктор и др., 2011).

Світовий досвід фіторекультивации порушених земель вказує на те, що можна використовувати різні культури, в тому числі і злакові. У США і

Канаді (провінції Онтаріо, Альберта, Британська Колумбія) злакові травосуміші висівають для закріплення поверхні відвалів, запобігання водній і вітрової ерозії. Посадка та ріст на відвалах злакових культур пришвидшує розвиток ґрунтоутворювального процесу, інтенсифікує нагромадження гумусу, забезпечує диференціацію «ґрунтового» профілю (Лукина и др, 2008). Для покращення умов едафотопу техногенного ландшафту і стимуляції ростових процесів рослин – фітомеліорантів ряд авторів пропонує використовувати як традиційні, так і нетрадиційні добрива (Баранов та ін., 2010).

Наші попередні роботи були присвячені дослідженню участі злакових у фітомеліорації субстратів відвалів вугільних шахт Червоноградського гірничопромислового району (Баранов та ін., 2012). Результати цих досліджень показали високий адаптаційний потенціал злакових в умовах шахтних відвалів. Рослини не лише виживали за токсичного впливу субстратів відвалів, а й зберігали досить високі ростові показники. Враховуючи літературні дані, було вирішено дослідити морфометричні та біохімічні

показники рослин сорго *Sorghum halepense* (L.) Pers за умов росту на субстратах породного відвалу Центральної збагачувальної фабрики «Червоноградська», із додаванням у них нетрадиційних органічних та мінеральних добрив – глауконіту і відходів дріжджового виробництва.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом дослідження були рослини сорго алепського *Sorghum halepense* (L.) Pers, довгокореневищного злаку родини тонконогових (Poaceae), який розмножується як насінням, так і кореневищами (Warwick, Black, 1983).

Для моделювання техногенного едафотопу використовували субстрати породних відвалів Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ). Колір субстратів, з яких сформований відвал, є червоний (перегоріла порода зі зміненими структурно-текстурними особливостями, різноманітних відтінків, що свідчить про складні літологічні та петрографічні перетворення, які відбувалися у процесі термального “метаморфізму”) і чорний (не перегоріла порода, для якої характерний природний чорно-сірий колір) (Баранов та ін., 2012) (Рис.1).

До цих техногенно забруднених субстратів додавали нетрадиційні добрива – глауконіт і відходи виробництва дріжджів Львівського дріжджового заводу (у співвідношенні 50 г на 1000 г субстрату відвалу). Субстрат змішували з добривами, вносили у дерев'яні ящики і висівали насіння *S. halepense*. Аналізували 30- та 120-

добові рослини. Контролем слугували рослини, що росли на торфі.

Активність пероксидази визначали за швидкістю реакції окиснення бензидину. Її активність виражали в умовних одиницях на грам маси сирової речовини (ум. од./г маси сирової речовини) (Гавриленко и др., 1975). Вміст пероксиду водню визначали спектрофотометрично у рослинному екстракті після реакції із сульфатом титану (Di Torri et al., 1999). Виразали вміст H_2O_2 у мг на грам маси сирової речовини (Li-Men Chen, Ching-Huei Kao, 1999). Отримані дані опрацьовували методами статистичного аналізу (Лакин, 1990).

Результати та обговорення. В умовах дії стресора збереження життєздатності організму відбувається шляхом підвищення неспецифічної опірності в результаті прояву адаптаційного синдрому як захисної реакції організму в стані стресу. Отримані експериментальні дані можуть бути основою для аналізу стійкості рослин та створення системи заходів із коригування продуктивності цих рослин в умовах техноекосистем (Рыктор и др., 2011).

Пероксид водню є сигналом для активації захисних систем, активатором експресії генів і процесів, що призводять до формування стійкості у рослин (Polidoros, Scandalos, 1999). Результати дослідження вмісту пероксиду водню в тканинах надземних органів 30- та 120-добових рослин *S. halepense* за умов росту на субстратах відвалів з додаванням у них глауконіту та відходів дріжджового виробництва наведені на рисунку 2.



Рис.1. Зовнішній вигляд чорної (А) та червоної (Б) порід

Fig. 1. The appearance of black (A) and red (B) rocks

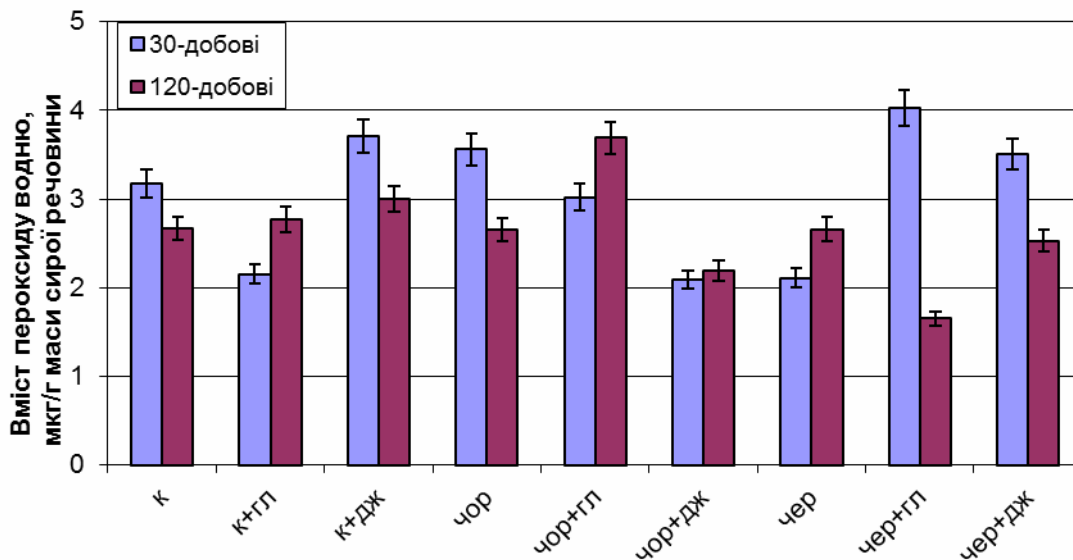


Рис. 2. Вміст перексиду водню у 30- та 120-добових рослин *Sorghum halepense* за умов росту на субстратах відвалу з додаванням глауконіту та відходів дріжджової промисловості.

Примітка (тут і надалі): к – контроль, к+гл – контроль + глауконіт, к+дж – контроль + відходи дріжджової промисловості, чор – чорна порода, чор+гл – чорна порода + глауконіт, чор+дж – чорна порода + відходи дріжджової промисловості, чер – червона порода, чер+гл – червона порода + глауконіт, чер+дж – червона порода + відходи дріжджової промисловості.

У результаті проведених досліджень встановлено, що у деяких варіантах дослідів відбувалося зменшення вмісту сигнальної молекули H_2O_2 у 120-добових рослин сорго алепського, порівняно з 30-добовими. Це, можливо, пов'язано як із збільшенням активності ферментів антиоксидантного захисту (зокрема пероксидази), так і з формуванням адаптаційних перетворень протягом тривалого часу росту рослин в умовах стресу. За умов росту *S. halepense* на чорній та червоній породі спостерігалась протилежна тенденція до збільшення вмісту H_2O_2 у тканинах рослин: його вміст зростав на чорній породі та знижувався на червоній, що, можливо пов'язано із фізико-хімічними властивостями цих субстратів. При додаванні глауконіту та відходів дріжджового виробництва у різні субстрати в більшості варіантів у 30-добових рослин *S. halepense* спостерігалось зменшення вмісту H_2O_2 , порівняно із 120-добовими рослинами, що, вочевидь, пов'язано із сорбційними властивостями та значним вмістом органічних речовин, макро- та мікроелементів, у складі нетрадиційних добрив. Протилежна закономірність спостерігалась при додаванні

Fig. 2. The content of hydrogen peroxide in the 30- and 120-day plants of *Sorghum halepense* under the conditions of growth on dump substrates with a trace of glauconite and waste yeast industry.

Note (hereinafter): к – control, к+гл – control + glauconite +, к+дж – control + waste yeast industry, чор – black rock, чор+гл – black rock + glauconite, чор+дж – black rock + waste yeast industry, чер – red rock, чер+гл – red rock + glauconite, чер+дж – red rock + waste yeast industry.

глауконіту та відходів дріжджового виробництва до субстрату червоного кольору (спостерігалось збільшення вмісту H_2O_2 у 30-добових і зменшення у 120-добових рослин). При додаванні глауконіту та відходів дріжджового виробництва до субстратів відвалів у тканинах 120-добових рослин *S. halepense*, які росли на цих субстратах спостерігалась протилежна тенденція за вмістом перексиду водню.

Дослідження основних механізмів дії техногенних субстратів на рослини та ролі антиоксидантної системи останніх у процесах адаптації дасть змогу розробити нові підходи для підвищення стійкості рослин і розробки нових методів фітореMediaції (Пацула, 2008). Пероксидаза є ферментом антиоксидантної системи, гетерогенною за складом, що зазнає значної мінливості під дією несприятливих умов середовища, в тому числі техногенного забруднення (Стаценко и др., 2008). Відомо, що такі ферменти, як пероксидаза та каталаза можуть моделювати гомеостаз перексиду водню, і, відповідно, його сигнальну здатність. Пероксидаза активує розщеплення перексиду водню до кисню та води, запобігаючи тим самим його токсичному ефекту.

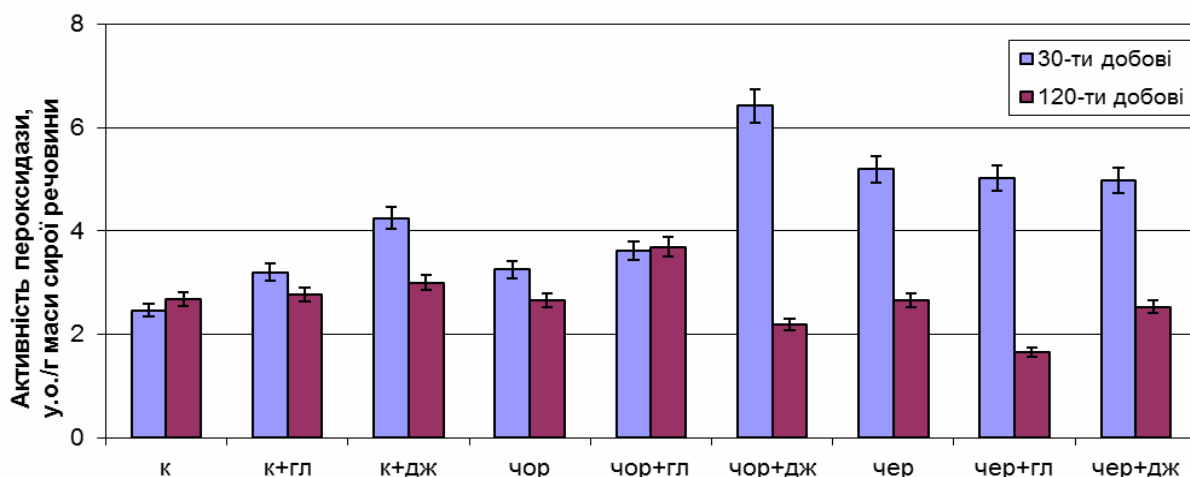


Рис. 3. Активність пероксидази у 30- та 120-добових рослин *Sorghum halepense* за умов росту на субстратах відвалу з домішкою глауконіту та відходів дріжджової промисловості.

Fig. 3. Peroxidase activity in the 30- and 120-day plants of *Sorghum halepense* under the conditions of growth on dump substrates with a trace of glauconite and waste yeast industry.

Отримані результати, представлені на рис. 3, засвідчують, що активність пероксидази зростала у 30-добових рослин сорго алепського за умов росту на різних субстратах, порівняно із 120-добовими рослинами, що пов'язано із активацією ферментів антиоксидантного захисту на початкових етапах дії стресових факторів. За росту *S. halepense* на чорній та червоній породі спостерігали збільшення активності пероксидази у його тканинах порівняно із контролем.

Найбільша активність пероксидази зафіксована у 30-добових рослин сорго алепського за росту на чорному субстраті із додаванням дріжджів ($6,42 \pm 0,39$ у.о./г маси сирової речовини). У 120-добових рослин спостерігали зменшення активності пероксидази при додаванні у субстрати відвалу ЦЗФ нетрадиційних добрив, що, можливо, пов'язано із змінами фізико-хімічних властивостей техносубстратів.

Висновок. У ході досліджень встановлено обернену кореляцію між вмістом пероксиду водню та активністю пероксидази у тканинах досліджуваного об'єкта за умов росту на різних субстратах. Показано, що у 120-добових рослин *S. halepense* вміст пероксиду водню та активність пероксидази у більшості варіантів були меншими ніж у 30-добових, що пов'язано із формуванням адаптаційних перетворень у рослин протягом тривалого існування в умовах стресу. При додаванні нетрадиційних добрив у субстрати відвалу протягом 120 днів відбувалися зміни фізико-хімічних властивостей техноедафотопу, що вплинуло на вміст пероксиду та активність пероксидази у *S. halepense*.

Список літератури:

1. Баранов В. І. Екологічний опис породного відвалу вугільних шахт ЦЗФ ЗАТ "Львівсистеменерго" як об'єкта для озеленення // Вісн. Львів. ун-ту, Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 172-178.
2. Баранов В., Бешлей С., Телегус Я. Деякі біохімічні показники адаптації куничника наземного (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth) до умов едафотопу відвалів вугільних шахт // Вісник ЛНУ. 2012. Вип. 58. С. 292-299.
3. Баранов В. І., Гавриляк М. Я., Телегус Я. В. Зміни вмісту сірки, вільних амінокислот і білка в рослинах ріпаку, підживлених капсульованими добривами на субстратах породного відвалу вугільних шахт // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2010. Т. 4(№ 1). С. 53-62.
4. Баранов В. І., Книш І. М., Блайда І. А та ін. Очерет звичайний – фіторемедіант важких металів у дренажних канавах породних відвалів вугільних шахт // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2012. Т6(№1). С. 93-100.
5. Гавриленко В. Ф. Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. М.: Высш.школа, 1975. 392 с.
6. Генік Я. В. Порушені території Львівщини та шляхи їх фітомеліорації та рекультивациі. // Науковий вісник НЛТУ України. 2008. Вип. 18.10. С. 22-26.
7. Книш І. Б., Харкевич В. В. Розподіл вмісту хімічних елементів у породах териконів Червоноградського гірничо-промислового району // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геол. 2003. Вип. 17. С. 148-158.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов, 4-е изд. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
9. Лукина Н. В., Чибрик Т.С., Глазырина М.А., Филимонова Е.И. Биологическая рекультивация

10. Пацула О., Кобилецька М., Терек О. та ін. Оксидативні реакції рослин приуслової ділянки ріки Тиса // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 48. С. 201–204.
11. Рыктор И. А., Зубкова Ю. Н., Бутюгин А. В. Влияние буроугольных гуминовых удобрений на снижение стрессовой реакции у растений *Festuca pratensis* Huds // Вісник Донецького національного університету, Сер. А: Природничі науки, 2011. № 1. С. 115-122.
12. Стаценко А. П., Тужилова Л. И., Вьюговский А. А. Растительные пероксидазы – маркеры химического загрязнения природных сред // Вестник ОГУ. 2008. №10(92). С. 188-191.
13. Di Toppi L., Lambardi M., Pazzagli L. et al. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures // *Plant Science*. 1999. Vol.137. P.119-129.
14. Li-Men Chen, Ching-Huei Kao. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation // *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1999. Vol. 40. P. 283–287
15. Polidoros A. N., Scandalos J. S. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidant in the regulation of catalase and glutathione-S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.) // *Physiologia Plantarum*. 1999. Vol. 106. P. 112–120.
16. Warwick, S.I., Black L.D. The biology of Canadian weeds. 61. *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Canadian Journal of Plant Science*. 1983. 63(4):997-1014.

THE EFFECT OF COAL MINES ROCK DUMP ON THE HYDROGEN PEROXIDE CONTENT AND PEROXIDASE ACTIVITY IN SORGHUM HALEPENSE (L.) PERS

Z. Beshley, S. Beshley, V. Baranov, O. Terek

*The research is devoted to changes of hydrogen peroxide content and peroxydase activity in 30- and 120-days-old *Sorghum halepense* (L.) Pers plants (long-rhizomed cereal from Poaceae family, which reproduces both by seeds and rhizomes) under growth on substrates from Central enrichment plant "Chervonogradska" dump, with the addition of non-traditional organic and mineral fertilizers - glauconite and wastes of yeast production. As a result of experiments it was established inverse relationship between the peroxidase activity and hydrogen peroxide content in the tissues of 30- and 120-days-old Johnson grass plants that were grown on different substrates. This pattern is natural because under stress conditions is peroxidase activity increased, which activates cleavage of hydrogen peroxide to oxygen and water, thus preventing its toxic effects. It is shown that the 120-days-old *S. halepense* plant content of hydrogen peroxide and peroxidase activity in most variants were almost at the level of control that is associated with the formation of adaptive changes in the plant for a long existence under stress. After addition non-traditional fertilizers into dump substrates, there were changes in their physical and chemical properties that influenced the content of hydrogen peroxide and peroxidase activity in plants. The experimental data can be the basis for the analysis of plant resistance and creation of performance measures for the adjustment of these plants under technoecosystems, improve their fitoremediation properties by using not only traditional fertilizers but, as shown by our study of non-traditional fertilizers, which will reduce the cost of remediation.*

*Keywords: hydrogen peroxide, peroxidase, substrates of coal mines dumps, glauconite, residues of yeast, *Sorghum halepense*.*

Одержано редколегією 16.06.2014

ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ ЛЕБЕДІВ (РІД *CYGNUS*) НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

О. О. ЧОВАН, В. О. ЯНЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
 ННЦ «Інститут біології» Київ, Україна
 e-mail: alexchov@mail.ru, baggir@gmail.com

Рід Лебідь (Cygnus) у фауні України представлений трьома видами – це лебідь-шипун (Cygnus olor), лебідь-кликун (Cygnus cygnus) і лебідь малий (Cygnus bewickii). Всі три представники роду мають не однаковий статус перебування на території країни. Актуальність оглядової роботи, яка характеризує стан вивченості лебедів в Україні полягає у тому, що чисельність лебедів в останні десятиріччя не є стабільною й постійно змінюється. За останні 50 років відбувається ріст чисельності лебедя-шипуна і лебедя-кликуну. В даній публікації ми узагальнили відомі джерела по поширенню, біології та екології лебедів в Україні, отримавши повну історію дослідження цих птахів. Всього було виявлено та опрацьовано 301 літературне джерело, де хоча б згадується про якийсь із 3 видів лебедів на території України в період 1850-2012 рр. Визначали ступінь вивченості кожного виду досліджуваних птахів, всі джерела ретельно вивчали та систематизували в каталог по кожному виду. Об'ємних робіт по вивченню лебедів чи одного представника цього роду по всій території України не проводилося. Існують лише фрагментарні й загальні дані по поширенню цих видів у різних регіонах країни, також лебедів вивчали паралельно з іншими гусеподібними під час обліків водоплавних птахів, більшість даних наведено у загальних фауністичних роботах, замітках про зустрічі того чи іншого виду в різних регіонах України. Весь період досліджень лебедів можна поділити на два етапи: перший – з середини XIX ст. до 70-х рр. XX століття й другий – від 70-х рр. XX століття до сьогодні. Найбільш регулярні і повні дослідження лебедів проводилися на півдні України, де вони були і є поки що найбільш чисельними в порівнянні з іншими регіонами України. На материковій частині України найбільш регулярні дослідження проводилися на заході та в центрі України, що пов'язано з особливостями розселення лебедя-шипуна. В останнє десятиріччя матеріали по чисельності та поширенню лебедів можемо знайти у значній кількості облікових та фауністичних публікаціях. Найменш дослідженими регіонами України залишаються Чернігівська, Сумська області та Схід країни. Насамперед, це пояснюється ще досить незначною чисельністю лебедів в даних регіонах.

Ключові слова: рід Лебідь (*Cygnus*), історія вивчення, Україна, етапи дослідження.

Вступ. Рід Лебідь (*Cygnus*) у фауні України представлений трьома видами – це лебідь-шипун (*Cygnus olor*), лебідь-кликун (*Cygnus cygnus*) і лебідь малий (*Cygnus bewickii*). Лебідь-шипун є гніздовим, перелітним і зимуючим птахом на території країни, лебідь-кликун зустрічається під час міграцій та на зимівлі, а лебідь малий є рідкісним залітним та зимуючим видом (Фесенко та Бокотей, 2002). Всі три представники роду мають не однаковий статус перебування на території країни. Найбільш чисельним є лебідь-шипун, що відображається і у його вивченості. Лебідь-кликун зустрічається лише під час перельотів і на зимівлі, хоча вважається, що у XIX ст. міг гніздитися в дельтах Дністра і Дунаю (Лысенко и Гусеобразные, 1991). Але цей вид також розширює ареал, зокрема, в Білорусії він просувається на південь, дійшовши до півночі України (Гащак, 2005). Можливо, у найближчому майбутньому лебідь-кликун матиме статус гніздового виду фауни України. Лебідь малий занесений до Червоної книги

України й зустрічається набагато рідше за попередні види. Можна спостерігати в Україні й чорного лебедя (*Cygnus atratus*) – декоративний вид, представники якого утримуються в парках у напіввільному стані по всій території України, проте його акліматизації не відбувається, хоча у 1994 р. в околицях с. Дмитрівка Кіровоградської області реєструвався випадок гніздування самця цього виду з самкою лебедя-шипуна, коли птахи успішно вивели 5 пташенят (Шевцов та ін., 2004). Узагальнюючи існуючі матеріали по кожному виду ми знаходимо недосліджені аспекти в біології та екології цих представників. Екологічна значимість таких досліджень полягає у виявленні та систематизації змін у популяціях об'єктів дослідження на протязі усього задокументованого періоду їх вивчення. Щодо лебедів такий підхід є ще більш актуальним у зв'язку з їхніми різкими змінами в популяціях і розширенні ареалів.

Метою нашої роботи стало визначення і систематизація основних етапів дослідження

лебедів у регіонах України, встановлення їх найбільш вивчених аспектів біології та екології для подальшої організації досліджень та моніторингу цих видів.

Об'єкт і методи. Публікація створена на основі даних, зібраних під час обробки літературних джерел з тематики поширення лебедів на території України. Ми опрацювали джерела, починаючи з кінця XIX ст. до сьогодення. З кожної праці були відібрані дані, які стосуються лебедів. Визначали ступінь вивченості кожного виду досліджуваних птахів, всі джерела ретельно вивчали та систематизували в каталог по кожному виду. Всього було знайдено та опрацьовано 301 літературне джерело, де хоча б згадується про любий із 3 видів лебедів на території України в період 1850-2012 рр. Інтенсивність появи публікацій з реєстраціями лебедів показана на графіку (Рис. 1). Було взято всі опрацьовані публікації з 1850 р. по 2010 р. та прораховано кількість праць на кожні 10 років.

Результати та обговорення. Регулярні дослідження біології, екології та поширення лебедів почалися з кінця 80-х рр. XX ст. Це пов'язано із незначною чисельністю птахів до середини XX ст., зокрема лебеда-шипун та лебеда-кликун. В Україні лебідь-шипун в останні десятиріччя значно збільшив свою чисельність. У XIII-XX ст. відбулася зміна чисельності і скорочення гніздового ареалу виду. В другій половині XIX ст. він був звичайним в низинах Дністра, Дунаю та Дніпра, а в першій половині XX ст. – лише Дністра та Дунаю (Лысенко и Гусеобразные, 1991). Далі його чисельність почала різко падати. Починаючи з другої половини XX ст. за сукупності сприятливих чинників (зміна клімату, заборона полювання на лебедів, евтрофікація водойм, адаптація до людини) чисельність шипуна почала зростати (Гринченко, 2012; Лысенко и Гусеобразные, 1991; Щёголев и Щёголев, 2011).

Об'ємних робіт по вивченню лебедів чи одного представника цього роду по всій території України не проводилося. Існують лише фрагментарні й загальні дані по поширенню цих видів у різних регіонах країни, також лебедів вивчали паралельно з іншими гусеподібними під час обліків водоплавних птахів, більшість даних наведено у загальних фауністичних роботах, замітках про зустрічі того чи іншого виду в різних регіонах України. Весь період досліджень лебедів можна поділити на два етапи: перший – з середини XIX ст. до 70-х рр. XX століття й другий – від 70-х рр. XX століття до сьогодення. Загалом це стосується лебеда-шипун,

чисельність якого почала зростати саме у другій половині XX ст.

Перші письмові згадки про лебедів датуються кінцем XVIII ст., а саме у відомості 1782 року «Історико-статистичного опису Харківської єпархії» вказується про присутність лебедів в околицях Чугуєва (Сомов, 1897). Також, в історичній довідці кінця XVIII ст. збереглося пояснення походження назви міста Лебедин Харківської області – «тут є озеро, на якому раніше було багато лебедів» (Панченко, 1996). У наукових працях тих часів перші достовірні дані по біології та кількості зустрічей лебедів з'являються в середині XIX ст. у загальних фауністичних працях Центральної України К.Ф. Кесслера (Кесслер, 1850), Харківської губернії А. Черная (Чернай, 1853), М.М. Сомова (Сомов, 1897), Херсонської губернії А.А. Браунера (Браунер, 1894), Полтавської губернії М.І. Гавриленка (Гавриленко, 1929). У цих працях наводяться відомості по поширенню та біології лебеда-кликун та лебеда-шипун. А. Чернай пише, що лебідь-шипун на території Харківської губернії частково мігрує, частково гніздиться на озерах в долині р. Донець і р. Мжа (Чернай, 1853). На відміну від А. Черная, М.М. Сомов у праці «Орнитологическая фауна Харьковской губернии» вказує цей вид як дуже рідкісний залітний та неправильно пролітний. А лебеда-кликун відносить до звичайного пролітного виду під час осінньої та весняної міграцій. М.І. Гавриленко в праці «Птицы Полтавщины» вказує на зустрічі лебеда-шипун під час міграцій та затримку деяких пролітних особин до травня місяця, на гніздуванні не відмічався. Лебідь-кликун зазначається як двічі пролітний та зрідка зимуючий вид.

Перші достовірні знахідки малого лебеда в Україні датуються 1952 роком, коли 13 листопада М.І. Гавриленко (Гавриленко, 1960) на «Великому Болоті», що на Полтавщині, спостерігав 16 лебедів, із яких один був добутий і виявився малим лебедем. У 1938 р. виходить перша фауністична праця, присвячена птахам всієї території України М.В. Шарлеманя «Птахи УРСР» (Шарлемань, 1938), де дуже стисло вказується на поширення і статус лебедів в країні. Лебідь-шипун зазначається як залітний вид в різних частинах України, У 1952 р. виходить 4-й том «Птицы Советского Союза», в якому Є.С. Птушенко (Птушенко, 1952) описує поширення й біологію лебедів. Для території України зазначаються загальні відомості про зимівлю лебеда-кликун в різних регіонах країни та деякі фенологічні дані.



Рис. 1. Інтенсивність досліджень лебедів на території України

Fig. 1. The intensity of swan studies at the territory of Ukraine

За малого лебедя вказується лише те, що добутий на весняному прольоті в Полтавській області. Лебідь-шипун наводиться як залітний та пролітний птах деяких областей України, в основному на півдні. До середини ХХ ст. публікацій, які стосуються лебедів не виявлено, лише окремі замітки в загальних роботах. В 1958 р. у «Праці Чорноморського заповідника» з'являється публікація Б.В. Сабіневського «О нижнеднепровской популяции лебедя-шипуна» (Сабіневский, 1958). Після заповнення дніпровських водосховищ у 1960-х – 1970-х рр. В.Л. Булахов займається вивченням орнітофауни новоутворених водосховищ, в результаті виходить ряд публікацій, де вказується й статус лебедів на цих територіях (Булахов, 1968; Булахов, 1972). У цей же час з'являються публікації по зимівлі водоплавних птахів на півдні України, в тому числі і лебедів (Андоне і др., 1965; Лысенко, 1972; Ардамацкая, 1975). Із 1970-х рр. розпочинаються активні дослідження лебедя-шипуна на півдні країни, де чисельність виду почала зростати (Ардамацкая и Лысенко, 1980; Костин, 1976; Костин, 1979; Назаренко и Николаевский, 1975). У 1979 р. виходить том «Миграции птиц Восточной Европы и Северной Азии (аистообразные-пластинчатоклювые)» (Миграции птиц..., 1979), де по даним спостережень та кільцювання детально описуються міграції та зимівлі лебедя-шипуна й лебедя-кликуну у Азово-Чорноморському регіоні України. До цього моменту найактивніше вивчається популяція лебедів на півдні України. Зі створенням дніпровських водосховищ і як наслідок зростання чисельності лебедів на материковій частині України, вивчення птахів

проводиться і в Центральній та Північній Україні. Вагомий внесок у дослідження водоплавних птахів Середнього Дніпра зробив М.Л. Клестов (Клестов, 1983; Клестов, 1983; Клестов, 1984; Клестов, 1985). Також, проводиться робота по збору інформації за допомогою анкетного методу, фенологічні дані по міграції лебедів в Україні публікуються В.В. Серебряковим (Серебряков, 1984). У 1987 р. виходить збірник матеріалів конференції «Экология и миграции лебедей в СССР», у який входить ряд публікацій по чисельності та поширенню лебедів у Азово-Чорноморському регіоні Т.Б. Ардамацької, Ю.В. Костіна, А.І. Корзюкова, Г.А. Кривоносова, В.І. Лисенка. В цей час вивченням водоплавних птахів на півдні країни займається Т.Б. Ардамацька, ряд праць якої присвячений лебедям (Ардамацкая, 1990; Ардамацкая, 1990; Ардамацкая и Лысенко, 1980). У зв'язку з розширенням ареалу лебедя-шипуна, в 1980-х – 1990-х рр. його чисельність невинно зростає майже по всій території України, спостерігається розселення на заході України та в центрі по дніпровських водосховищах та лівобережних притоках Дніпра у північно-східному напрямку. З'являються публікації про знахідки та чисельність птахів у регіонах (Горбань, 1990; Грищенко и Сорокун, 1990; Губкин, 1990; Гулай, 1990; Кошелев и др., 1990; Серебряков и Полуда, 1990; Талпош, 1994; Татаринов, 1990; Штиркало та Васильчук, 1990). У 1988 р. у м. Одеса проводиться «Всесоюзна конференція, присвячена лебедям». Це перші значні результати у вивченні лебедів в Україні. Більшість матеріалів стосується Центральної, Західної та Південної України. У 1991 р.

публікуються перші узагальнені дані по лебедям на території України в журналі «Wildfowl» (Kozjukov et al., 1991; Serebryakov et al., 1991). Також, у 1991 р. виходить з друку 5-й том «Фауна України. Гусеобразные» В.І. Лисенка (Лысенко и Гусеобразные, 1991). В цій праці узагальнено максимум відомих на той час даних по лебедям України, включаючи й усні повідомлення різних мисливців та вчених. У 1990-х рр. активно проводяться дослідження популяції лебедя-шипуну на Правобережній Україні, зокрема у Тернопільській, Вінницькій, Хмельницькій, Львівській, Кіровоградській та Чернівецькій областях (Годованець та Скільський, 1994; Гулай, 1994; Матейчик, 1994; Пограничний та Паук, 1994; Талпош, 1994; Шевцов, 1996; Шкаран, 1998). Саме в цей час проходить пік розселення й росту чисельності лебедя-шипуну на заході України та появу цього птаха на нових територіях. На Лівобережжі України розселення лебедя-шипуну проходить у північно-східному напрямку по долинам Лівобережних приток Дніпра, реєструється у Полтавській області на р. Кагамлик (Роговий, 1996). Окремих публікацій по лебедях в лівобережних регіонах на той час немає, але є ряд відомостей у фауністичних публікаціях та заміток про реєстрації птахів як в гніздовий період, так і під час міграцій та на зимівлі (Дядичева и др., 1999; Лебедь и Мерзликин, 1996; Писарев и др., 1994; Яненко та ін., 2012). У 1996 р. з'являється публікація про першу зустріч малого лебедя А.М. Полудою у Київській області (Полуда, 1996). У 2000-х рр. продовжується вивчення лебедів у Азово-Чорноморському регіоні (Гринченко, 2012; Дядичева и Кошелев, 2006; Жмуд, 2003; Щёголев и Щёголев, 2011). Значна кількість даних по лебедях материкової частини України публікується у різноманітних облікових та фауністичних роботах, у вигляді заміток по Азово-Чорноморському регіону, Житомирській, Полтавській, Волинській, Сумській, Київській, Черкаській та інших областях. У 2002 р. в журналі «Казарка» опублікований загальний огляд чисельності і розподілу лебедя-шипуну на території колишнього СРСР (Кузнецов и Анзигитова, 2002). З розширенням ареалу лебідь-шипун з'являється в зовсім нових для себе місцях – на Закарпатті, Українському Розточчі та гірському Передкарпатті, що відображено в ряді публікацій (Дзизюк та Дзизюк, 2005; Луговой и Поттиш, 2012; Чередарик та ін., 2003). У 2005 р. вперше реєструється гніздування лебедя-кликуну на території України, а саме в Чорнобильській зоні С.П. Гащак (Гащак, 2005). У 2007 р. з'являється замітка про зустріч малого лебедя в

Харківській області (Банник, 2007). Вивченням гідрофільних птахів Криму, в тому числі і лебедів, займається М.М. Безкаравайний, матеріали досліджень якого висвітлені у ряді робіт (Бескаравайный, 1999; Бескаравайный, 1999; Бескаравайный, 2007; Бескаравайный, 2008; Бескаравайный, 2010; Бескаравайный, 2012).

Висновки. З аналізу літературних джерел випливає, що найбільш регулярні і повні дослідження лебедів проводилися на півдні України, де вони були і є поки що найбільш чисельними в порівнянні з іншими регіонами України. До 1970-х рр. ХХ ст. спостерігаємо дослідження лебедів в контексті загальних фауністичних робіт як по регіонах, так і в Україні в цілому. У другій половині ХХ ст. із значним ростом чисельності лебедя-шипуну та розширення ним ареалу відбувається активне вивчення цього птаха на більшій території України, що відображається у публікаціях того часу та проведенні конференції на території України, присвяченій саме лебедям. В подальшому велика кількість вчених займається вивченням цих птахів на материковій частині країни. Найбільш регулярні дослідження проводяться на Заході та в центрі України, що пов'язано з особливостями розселення лебедя-шипуну. В останнє десятиріччя матеріали по чисельності та поширенню лебедів можемо знайти у значній кількості облікових та фауністичних публікаціях. Зі збільшенням чисельності лебедів на зимівлях у внутрішніх областях України, що не в останню чергу пов'язано з пом'якшенням клімату, публікується велика кількість робіт по зимовим облікам водоплавних птахів. Найменш дослідженими регіонами України залишаються Чернігівська, Сумська області та Схід країни. Насамперед, це пояснюється ще досить незначною чисельністю лебедів в даних регіонах.

Список літератури:

1. Андоне Г., Пашковский С., Алмэшан Х. и др. Материалы по зимовке водоплавающих и болотных птиц в дельте Дуная в 1959–1961 гг. // Миграции птиц и млекопитающих. – 1965. – С. 133-145.
2. Ардамацкая Т.Б., Лысенко В.И. Лебеди на озими // Охота и охот. хоз-во. – 1980. – № 11. – С. 19-20.
3. Ардамацкая Т.Б. Миграции и зимовки лебедя-шипуну в Северном Причерноморье // Всесоюз. конф. по миграциям птиц. – М.: Наука, 1975. – Ч. 1. – С. 102-107.
4. Ардамацкая Т.Б. Лебеди Черноморского заповедника // Охота и охот. хоз-во. – 1990. – № 12. – С. 14-15.
5. Ардамацкая Т.Б. Состояние зимовок лебедя-шипуну в районе Черноморского заповедника //

- Экология и охрана лебедей в СССР. – Мелитополь, 1990. – Ч. 1. – С. 14-19.
6. Ардамацкая Т.Б. Сроки и место линьки лебедя-шипун в Черноморском заповеднике // Экология и охрана лебедей в СССР. – Мелитополь, 1990. – Ч. 1. – С. 20-22.
 7. Ардамацкая Т.Б. Условия зимовки водно-болотных птиц в районе Джарылгачского залива в 3-й декаде января 1999 г. // Зимние учеты птиц на Азово-Черноморском побережье Украины. – Мелитополь; Одесса; Киев, 1999. – Вып. 2. – С. 3-7.
 8. Ардамацкая Т.Б., Лысенко В.И. Лебеди на озими // Охота и охот. хоз-во. – 1980. – № 11. – С. 19-20.
 9. Баник М.В. Залет малого лебедя в Харьковскую область // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 10: Матер. 13-14 совещаний «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца» – Харьков, 2007. – С. 139-141.
 10. Бескаравайный М.М. Фауна и орнитокомплексы гнездящихся гидрофильных птиц пресноводных биотопов Юго-Восточного Крыма // Проблемы изучения фауны юга Украины. – Мелитополь: Бранта-Одесса: АстроПринт, 1999. – С. 10-18.
 11. Бескаравайный М.М. Зимовка птиц в юго-восточном Крыму // Зимние учеты птиц на Азово-Черноморском побережье Украины. – Мелитополь; Одесса; Киев, 1999. – Вып. 2. – С. 10-20.
 12. Бескаравайный М.М. О южных границах распространения некоторых элементов гнездовой орнитофауны равнинного и предгорного Крыма // Бранта: Сборник научных трудов Азово-Черноморской орнитологической станции. – 2007. – Вып. 10. – С. 7-26.
 13. Бескаравайный М.М. Птицы морских берегов южного Крыма. – Симферополь: «Н. Орианда», 2008. – 160 с.
 14. Бескаравайный М.М. Экстремальные похолодания как фактор формирования зимовок гидрофильных видов птиц на юге Крыма // Бранта: Сборник научных трудов Азово-Черноморской орнитологической станции. – 2010. – Вып. 13. – С. 21-32.
 15. Бескаравайный М.М. Птицы Крымского полуострова. – Симферополь: Бизнес-Информ, 2012. – 336 с.
 16. Браунер А.А. Заметки о птицах Херсонской губернии // Зап. Новороссийск. о-ва естествоиспытателей. – Одесса, 1894. – Т. 19, вып. 1. – С. 39-93.
 17. Булахов В.Л. Формирование орнитофауны Днепродзержинского водохранилища // Орнитология. – М.: МГУ, 1968. – Вып. 9. – С. 178-187.
 18. Булахов В.Л. Формирование населения гусеобразных птиц на Днепровских водохранилищах // Ресурсы водоплавающих птиц СССР, их воспроизводство и использование. – М.: Моск. ун-т, 1972. – Вып. 1. – С. 76-78.
 19. Гавриленко Н.И. Птицы Полтавщины. – Полтава, 1929. – 133 с.
 20. Гавриленко Н.И. Находки арктических и бореальных птиц на Полтавщине // Орнитология. – Вып. 3. – М.: изд-во МГУ, 1960. – С.436-439.
 21. Гашак С.П. О гнездовании лебедя-кликуна в Чернобыльской зоне Украины // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 2005. – Т. 14, Вип.2. – С. 269-270.
 22. Годованець Б.Й., Скільський І.В. Гніздування лебедя-шипун в Чернівецькій області // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 1994. – Т. 3, Вип. 2. – С. 151-152.
 23. Гончаров С.А. О необычном выводке лебедя-шипун // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 4-5: Матер. 4-й и 5-й конф. «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца». – Харьков, 1998. – С. 68-69.
 24. Горбань И.М. Гнездование лебедя-шипун западе Украины // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по лебедям СССР. 21-24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 38-40.
 25. Гринченко А.Б. Гнездование, летовки и зимовки лебедя-шипун *Cygnus olor* в Крыму // Русский орнитологический журнал. – 2012. – Экспресс-выпуск 772, Т. 21. – С. 1556-1557.
 26. Грищенко В.Н., Сорокун Г.Н. Зимовки лебедей в антропогенном ландшафте Киевской области // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по лебедям СССР. 21-24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 22-24.
 27. Губкин А.А. Лебедь-шипун на Днепропетровщине // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по лебедям СССР. 21-24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 40.
 28. Гулай В.И. Многолетняя динамика численности лебедей на Подолии // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по лебедям СССР. 21-24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 41.
 29. Гулай В.И. Формування гніздової популяції лебедя-шипун на Поділлі // Мат. 1-ї конференції молодих орнітологів України (Луцьк, 4-6 березня, 1994 р.). – Чернівці, 1994. – С. 26-27.
 30. Дзизюк О.І., Дзизюк О.В. Лебідь-шипун на Українському Розточчі // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 9: Матер. 11-й и 12-й конф. «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца». – Донецк, 2005. – С. 77-81.
 31. Дядичева Е.А., Черничко И.И., Горлов П.И., Черничко Р.Н., Кошелев А.И. Структура зимних орнитокомплексов поймы р. Молочная по данным январских учетов 1997-1999 гг. // Зимние учеты птиц на Азово-Черноморском побережье Украины. – Мелитополь; Одесса; Киев, 1999. – Вып. 2. – С. 21-32.
 32. Дядичева Е.А., Кошелев А.И. Молочный лиман как место миграционных остановок гусеобразных птиц // Бранта: Сборник научных трудов Азово-Черноморской орнитологической станции. – 2006. – Вып. 9. – С. 97-113.

33. Жмуд М.Е. О зимней экологии лебедя-шипуна *Cygnus olor* в северно-западном Причерноморье // Русский орнитологический журнал. – 2003. – Экспресс-выпуск 228, Т. 12. – С. 752-755.
34. Кесслер К.Ф. Животные губерний Киевского учебного округа. – К., 1850. – 101 с.
35. Клестов Н.Л. О влиянии гидростроительства на орнитофауну Среднего Днепра // Вестник зоологии. – 1983. – Вып. 3. – С. 25-28.
36. Клестов Н.Л. Орнитофауна Среднего Днепра и её изменения под влиянием гидростроительства. – Автореф... канд. биол. наук. – К., 1983. – 26 с.
37. Клестов Н.Л. Ресурсы водоплавающих птиц среднеднепровских водохранилищ и перспективы их увеличения // Современное состояние ресурсов водоплавающих птиц. – М.: Наука, 1984. – С. 51 – 52.
38. Клестов Н.Л., Лепешков А.В. Особенности формирования и современное состояние населения птиц Днепродзержинского водохранилища // Орнитология. – 1985. – Вып. 20. – С. 113-119.
39. Костин Ю.В. Сезонное размещение азово-черноморской популяции лебедя-шипуна по данным кольцевания // Материалы ко 2-му Всесоюз. совещ. «Вид и его продуктивность в ареале». – Вильнюс, 1976. – С. 69-71.
40. Костин Ю.В. Результаты кольцевания лебедя-шипуна в северном Причерноморье // Миграции птиц Восточной Европы и Северной Азии (аистообразные – пластинчатоклювые). – М.: Наука, 1979. – С. 56-62.
41. Кошелев А.И., Корзюков А.И., Лысенко В.И., Серебряков В.В., Гринченко А.Б., Жмуд М.Е. Современное размещение и численность лебедя-шипуна на Украине // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по лебедям СССР. 21-24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 28-33.
42. Кривицкий И.А., Кальченко Ю.А., Кальченко А.Ю. Птицы прудов Печенежского рыбхоза // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 3: Матер. 3-й конф. «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца» (13-15 сентября 1995 г.) – Харьков, 1996. – С. 16-21.
43. Кузнецов Е.А., Анзигитова Н.В. Гнездовая численность и летнее распределение лебедя-шипуна в СССР. Обзор // Казарка. – 2002. – Вып. 8. – С. 199-232.
44. Лебедь Е.А., Мерзликин И.Р. Редкие и залетные гидрофильные птицы р. Ворскла // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 3: Матер. 3-й конф. «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца» (13-15 сентября 1995 г.) – Харьков, 1996. – С. 30-31.
45. Лебедь Е.А., Мерзликин И.Р. Новые данные о некоторых гидрофильных птицах верхней Ворсклы // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 4-5: Матер. 4-й и 5-й конф. «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца». – Харьков, 1998. – С. 21-23.
46. Лысенко В. И. Зимовки уток и лебедей на нижнем Днепре и в Северном Приазовье // Ресурсы водоплавающих птиц в СССР, их воспроизводство и использование. – М., 1972. – Вып. 2. – С. 92-95.
47. Лысенко В.И. Гусеобразные. Фауна Украины: в 40 т. Т. 5. Птицы. Вып. 3. – К.: Наукова думка, 1991. – 208 с.
48. Луговой А.Е., Потиш Л.А. Начало внедрения лебедя-шипуна *Cygnus olor* в фауну Закарпатья // Русский орнитологический журнал. – 2012. – Экспресс-выпуск 718, Т. 21. – С. 73-74.
49. Матейчик В.І. Лебідь-шипун Шацького поозер'я (Динаміка чисельності та стан популяції) // Мат. 1-ї конференції молодих орнітологів України (Луцьк, 4-6 березня, 1994 р.). – Чернівці, 1994. – С. 25-26.
50. Миграции птиц Восточной Европы и Северной Азии (аистообразные – пластинчатоклювые). – М.: Наука, 1979. – 248 с.
51. Назаренко Л.Ф., Николаевский О.В. Сезонное размещение лебедя-шипуна на Украине и охрана его гнездовой и зимовок // Материалы Всесоюзной конференции по миграции птиц. – М.: Изд-во МГУ, 1975. – Ч. 2. – С. 244-245.
52. Панченко В.О. Птахи в геральдиці міст України // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 1996. – Т. 5, Вип. 1. – С. 88-90.
53. Писарев С.Н., Тимошенко А.А., Сикорский И.А. Зимующие птицы незамерзающих водоемов Донецкого Придонцовья // Мат. 1-ї конференції молодих орнітологів України (Луцьк, 4-6 березня, 1994 р.). – Чернівці, 1994. – С. 110-113.
54. Пограничний В.С., Паук А.А. Гніздування лебедя-шовкуна на правобережжі Дністра у Львівській області // Мат. 1-ї конференції молодих орнітологів України (Луцьк, 4-6 березня, 1994 р.). – Чернівці, 1994. – С. 27-29.
55. Полуда А.М. Встреча малого лебедя (*Cygnus bewickii*) в Киевской области // Праці Українського орнітологічного товариства. Т.1. – Київ, 1996. – С. 221.
56. Птушенко Е.С. Род лебеди // Птицы Советского Союза. В 6 томах. – М.: Сов. Наука, 1952. – Т. 4. – С. 255-275.
57. Роговий Ю.Ф. Гніздування лебедя-шипуна на р. Кагамлик у Полтавській області // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 1996. – Т. 5, Вип. 2. – С. 203-204.
58. Сабиневский Б.В. О нижнеднепровской популяции лебедя-шипуна // Тр. Черноморск. заповедника. – 1958. – Вып. 2. – С. 87-90.
59. Серебряков В.В. Миграции лебедей на территории Украинской ССР. – К.: Киевск. ун-т. – 1984. – 26 с. (Деп. в УкрНИИТИ 28.06.1984 г. №1132).
60. Серебряков В.В., Полуда А.М. Зимовки лебедей во внутренних областях Украины // Экол. и охрана лебедей в СССР. – Мелитополь, 1990. – Ч. 1. – С. 33-37.
61. Сомов Н.Н. Орнитологическая фауна Харьковской губернии. – Харьков: Типография Адольфа Дарре, 1897. – 680 с.
62. Талпош В.С. Лебедь-шипун в Тернопольской области // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по

- лебедам ССРСР. 21 – 24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 46-47.
63. Галпош В.С. Гусеподібні Тернопільської області // Мат. 1-ї конференції молодих орнітологів України (Луцьк, 4-6 березня, 1994 р.). – Чернівці, 1994. – С. 23-25.
 64. Татаринів К.А. Гнездование и зимовка шипуна во Львовской области // Экология и охрана лебедей в СССР (Материалы второго Всесоюзного совещания по лебедам ССРСР. 21-24 сентября 1988 г., Одесса). Часть I. – Мелитополь, 1990. – С. 47-50.
 65. Фесенко Г.В., Бокотей А.А. Птахи фауни України: польовий визначник. – К.: Українське товариство охорони птахів, 2002. – 416 с.
 66. Чередарик М.І., Панчук О.І., Скільський І.В. Зимівля та гніздування лебедів у заказнику “Чорторійський” (Буковинське Передкарпаття) // Роль Природно-заповідних територій у підтриманні біорізноманіття: матеріали наукової конференції, присвяченої 80-річчю Канівського природного заповідника (Канів, 9-11 вересня 2003 р.). – Канів, 2003. – С. 305-307.
 67. Чернай А. Фауна Харьковской губернии и прилежащих к ней мест. Вып. 2. Фауна млекопитающих и птиц. – Харьков, 1853. – 44 с.
 68. Шарлемань М.В. Птахи УРСР. (Матеріали до фауни). – К., 1938. – 265 с.
 69. Шевцов А.А. Новые данные о лебеде-шипуне в Кировоградской области // Мат. конф. (7-9 квітня 1996 р., м. Ніжин) – Київ, 1996. – С. 47-49.
 70. Шевцов А.О., Санжаровський Ю.О., Соріш Р.В., Єфремов В.Л. Нові, рідкісні та малочисельні птахи Кіровоградської області // Беркут. Український орнітологічний журнал. – 2004. – Т. 13, Вип. 1. – С. 13-17.
 71. Шкаран В.И. Зимовка лебедей-шипунів на реке Турия (Вольнская область) // Орнитология. – 1998. – Вып. 28. – С. 235.
 72. Штиркало Я.С., Васильчук Г.М. Гніздування лебедя-шипуна на Прикарпатті // Орнітофауна західних областей України та проблеми її охорони (матеріали доповідей п'ятої наради орнітологів та аматорів орнітологічного руху Західної України). – Луцьк, 1990. – С. 84.
 73. Щёголев И.В., Щёголев С.И. Лебедь-шипун *Cygnus olor* в северном Причерноморье // Русский орнитологический журнал. – 2011. – Экспресс-выпуск 623, Т. 20. – С. 35-43.
 74. Яненко В.О. Результати зимових обліків водоплавних та коловодних птахів у районі очисних споруд м. Київ 2009-2010 рр. / В.О. Яненко, С.В. Пшеничний, А.В. Турчик, В.В. Казанник.// Екологія боліт і торфовищ (збірник наукових статей). – Київ: ДІА, 2012. – С. 126-132.
 75. Korzjukov A.I., Koshelev A.I., Serebryakov V.V. The present status of the Mute Swan (*Cygnus olor*) in the Ukraine, USSR // Wildfowl. – 1991. – Supplement No.1. – P.49-52.
 76. Serebryakov V.V., Grishchenko V.N., Poluda A.M. The migration of swans (*Cygnus* spp.) in the Ukraine, USSR // Wildfowl. – 1991. – Supplement No.1. – P.218-223.

THE HISTORY OF SWANS (*CYGNUS*) RESEARCHES IN UKRAINE

A. Chovan, V. Yanenko

The Genus Swan (Cygnus) includes three species - Mute Swan (Cygnus olor), Whooper Swan (Cygnus cygnus) and Bewick's Swan (Cygnus columbianus bewickii). All three members of the genus are not have the same status in the country. Actuality of this publication that has devoted to the studying of swans in Ukraine has consisted is that the number of swans in the recent decades is not stable and often changes. Over the 50 years the number of Mute Swan (Cygnus olor) and Whooper Swan (Cygnus cygnus) has increased. In the present article we have summarized well-known literary data about distribution, biology and ecology of swans in Ukraine and have received a complete history of studies of these birds. There were found and analysed 301 references about swans for 1850-2012. We have determined the degree of the studying of each species. All sources have studied and noted in the catalog for each of them. There were not carried out of systematic fieldworks of studying of swans overall in Ukraine. We have only fragmentary and general data about the distribution of these species in different regions of Ukraine. We have also data about swans during studying other Ansiriformes. We have divided a whole period of studying of swans into two stages: the first - from the mid XIX century to the 1970s and the second - from the 1970s to the present time. The most regular and full studies of swans were conducted in the south of Ukraine, where they were the most numerous in comparison with other regions of Ukraine. Inland in Ukraine the most regular studies were conducted in the Western and Central Ukraine. In recent decades the literature data we can to find in a large number of counting and faunistic publications. The most less studied regions of Ukraine are Chernigiv, Sumy regions and the East of our country. It is primarily explained by the lower number of swans in these regions.

Keywords: gender Swan (Cygnus), history of research, Ukraine, stages of the study.

Одержано редколлегією 23.10.2014

СЕЗОННА ДИНАМІКА ВМІСТУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ВОДІ КОЛОДЯЗІВ НА ТЕРИТОРІЇ ПРИКАРПАТТЯ

І. В. БРИНДЗЯ¹, В. В. ГРУБІНКО²

¹Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка, біологічний факультет, кафедра екології та географії, вул. Шевченка, 23, м. Дрогобич, 82100, Україна,

²Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, хіміко-біологічний факультет, кафедра загальної біології та методики навчання природничих дисциплін, вул. М. Кривоноса, 2, м. Тернопіль, 46027, Україна, e-mail: ¹ira_3107@ukr.net, ²v.grubinko2@yahoo.com

Метою нашого дослідження був аналіз річної динаміки вмісту важких металів у питній воді Прикарпаття та порівнянні їх з нормативними показниками вмісту у природних водах. Об'єктом виступала вода з криниць даного регіону, територію якого ми умовно поділили за характером антропогенного навантаження на чотири частини – техногенна, рекреаційна, агронавантажена та урбановантажена території, що відрізняються за рівнем і характером забруднення політантами. Для визначення валового вмісту Zn, Mn, Fe, Cu, Pb, Co, Ni та Cd проби води відбирали на глибині 1-2 м, концентрували у 10 разів випаровуванням і визначали вміст ВМ методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі С-115 при довжинах хвиль, що відповідали максимуму поглинання кожного з досліджуваних металів. Проведені дослідження показали, що для біогенних металів характерно зростання їхнього вмісту у воді криниць рекреаційної території ранньою весною, в кінці літа та ранньої осені. Щодо небіогенних металів, то їхній вміст у воді криниць характеризується ранньовесняним, середньолітнім та ранньоосіннім піками. Техногенна територія характеризується зростанням вмісту біогенних металів у воді криниць від липня та до кінця дослідженого періоду. Щодо небіогенних металів, то їх вміст у воді криниць зростає найбільше у липні, однак характеризується меншими піками у жовтні та післязимовий період. Водночас техногенна діяльність не спричиняла появи у воді криниць металів на рівні, що перевищували ГДК. Вищий вміст у воді криниць техногенної території відносно рекреаційної встановлено для феруму і нікелю. Натомість цинку тут виявлено менше. У воді криниць урбановантаженої території вміст металів, особливо феруму і нікелю, є високим лише навесні і восени, водночас їх вміст був на рівні, що не перевищували ГДК. Концентрація металів у воді криниць агронавантаженої території така ж, як і для техногенної та урбанізованої, з переважанням вмісту металів у осінньо-зимовий період та з незначним піком у липні. Основну масу серед всіх металів становлять ферум, нікель і кобальт. Українські свинець і кадмій виявлені слідових кількостях. Внаслідок проведених досліджень встановлено, що вміст металів у воді криниць визначається як надходженням з ґрунтовими водами, так і є наслідком тривалої акумуляції у абіотичних та біотичних компонентах гідроекосистеми. Простежується спільна для більшості металів тенденція до зниження їх вмісту в абіотичних компонентах водойми протягом вегетаційного періоду водоростей і водяних рослин та зростання після його закінчення. Негативним явищем є перевищення фонових показників вмісту у воді криниць іонів купруму, феруму, кобальту, нікелю.

Ключові слова: важкі метали, вода, ГДК, фонові показники, Прикарпаття.

Вступ. Важкі метали (ВМ) – одні з найбільш небезпечних компонентів забруднення поверхневих вод України. Не піддаючись, на відміну від органічних речовин, деструкції, вони постійно містяться в тій чи тій формі у водних екосистемах і тому суттєво впливають на якість води та функціонування біоти. Акумуляція ВМ у водоймах залежить не тільки від геологічної структури порід, але й типу водойми, її гідрологічного режиму, сезонних коливань фізико-хімічних показників води. Найбільш біодоступними і небезпечними є розчинені у воді сполуки металів (Линник и Набиванец, 1986; Мур и Рамамурти, 1987; Холопов, 2003).

Нині досить добре досліджено вміст ВМ у поверхневих водах річок, озер, ставків, мілких водотоків і водогонів (Линник и Набиванец, 1986; Мур и Рамамурти, 1987; Романенко 2001). Проте близько третини населення України користується водою з підземних джерел, здебільшого колодязів (Романенко, 2001; Федоренко та ін., 2006).

Інтенсивне технологічне, агротехнічне та рекреаційне навантаження територій і недостатній контроль за якістю води в криницях і джерелах становлять загрозу для здоров'я населення. Наприклад, нітрит-нітратне забруднення води криниць є причиною

виникнення метгемоглобінемії в її споживачів (Давыдова и Тагасов, 2002; Куценко, 2002).

Важкі метали, особливо зі змінною валентністю, виявляють пряму токсичну дію у організмів та можуть брати участь у процесах хімічного та біохімічного утворення і перетворення сполук нітрогену. Тому проблема набуває більшої актуальності при сумісному забрудненні такої води сполуками важких металів, які можуть разом з сполуками нітрогену виявляти щодо організмів синергетичні токсичні ефекти (Куценко, 2002).

З огляду на зазначене мета нашого дослідження – визначити вміст важких металів у воді криниць та зіставити отримані дані з фоновими показниками і значеннями ГДК, а також окреслити основні чинники, що впливають на вміст металів у криничній воді Прикарпатського регіону.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження була вода з криниць Прикарпаття, територію якого ми умовно поділили за характером антропогенного навантаження на чотири частини – техногенна, рекреаційна, агронавантажена та урбанавантажена території, що відрізняються за

рівнем і характером забруднення поллютантами (Бриндзя, 2010; Державні санітарні правила та норми, 1999). Усі досліджені криниці мають облицювання з бетонних кілець, а їхня глибина до водного дзеркала коливається від 5 до 12 м.

Дослідження здійснені в з березня до жовтня 2011 р. Для визначення у воді криниць валового вмісту Zn, Mn, Fe, Cu, Pb, Co, Ni та Cd проби води відбирали на глибині 1-2 м, концентрували у 10 разів випаровуванням і визначали вміст ВМ методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі С-115 при довжинах хвиль, що відповідали максимуму поглинання кожного з досліджуваних металів (Мур и Рамамурти, 1987). Уміст металів виражали в мг на 1 дм³ досліджуваних зразків. Статистичне опрацювання одержаних результатів здійснювали за методом (Лакин, 1990).

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановили загальний вміст важких металів у воді досліджених колодязів (Рис. 1-8) та порівняли їх з нормативними показниками вмісту у природних водах (табл. 1.).

Таблиця 1
Фонові показники вмісту важких металів та значення їх ГДК у воді

Table 1
Background quantity of heavy metals and their MPC in water

Метал	Фонові показники, мг/дм ³ [2]	ГДК, мг/дм ³	
		Господарсько-питтєве та культурно-побутове [12]	Рибогосподарське[12]
Zn	0,015	1,0-50	0,01
Mn	0,1	-	-
Fe	0,1	-	-
Cu	0,002	0,1-0,5	0,001-0,01
Pb	0,003	0,03-0,1	0,03-0,1
Co	0,008	1,0	0,01
Ni	0,003	0,1	0,0002
Cd	0,0001	0,01	0,005

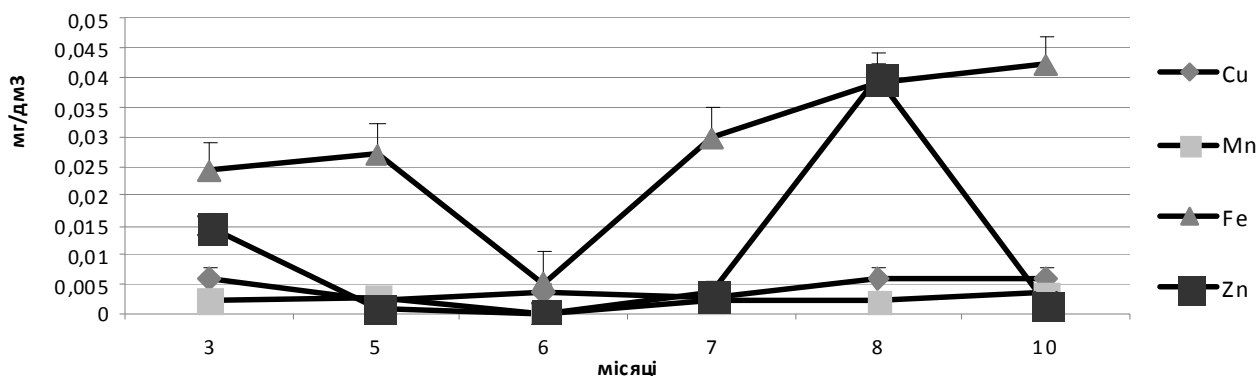


Рис. 1. Уміст біогенних важких металів у воді криниць рекреаційної території Прикарпаття.

Fig. 1. Content of biogenic heavy metals in well water of the recreational area in Precarpathian region

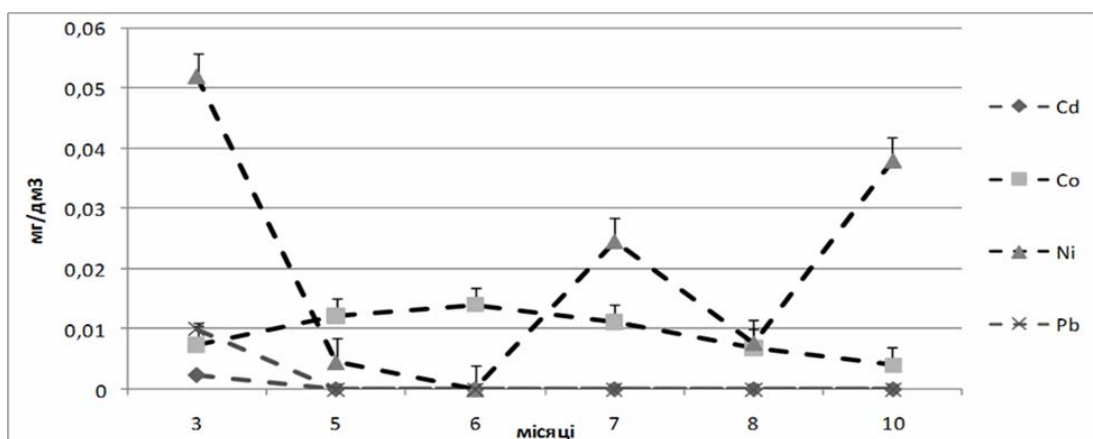


Рис. 2. Уміст небіогенних важких металів у воді криниць рекреаційної території Прикарпаття

Fig. 2. Content of non-biogenic heavy metals in well water of the recreational area in Precarpathian region

Уміст купруму від початку спостереження (березень) до липня знижувався до мінімального значення протягом терміну досліджень, потім вміст металу підвищився, а в серпні-жовтні цей показник був максимальним (рис. 1). Зниження вмісту купруму у воді криниць навесні і влітку можлива за рахунок зв'язування металу біотичними компонентами, що активно розвиваються в цей період, та утворенням і осадженням нерозчинних комплексів з завислими частками органічної та мінеральної природи (Романенко, 2001; Сборник санитарно-гигиенических нормативов ..., 1991). Унаслідок відмирання восени водяних рослин концентрація міді у воді знову збільшується.

Уміст мангану у воді протягом березня – травня був стабільним, у червні він зменшився до мінімального значення, в липні знову підвищився та був стабільним протягом решти досліджуваного періоду. Уміст мангану у воді не перевищував фонових значень та показників ГДК (рис. 1).

Уміст феруму протягом березня-травня був сталим, різко зменшився у кінці травня і знову підвищився, починаючи з червня, до максимальних показників у жовтні. Уміст феруму у воді не перевищував фонових значень і ГДК (рис. 1). Разом з тим, іони феруму відіграють надзвичайно важливу роль у життєдіяльності водних організмів та значною мірою засвоюється ними, чим пояснюємо зниження його концентрації у воді протягом періоду вегетації та зростання восени (Гуменюк, 2003; Коновець та ін., 2009).

Уміст цинку з березня знизився і досяг мінімальних значень у червні. З липня концентрація цього металу почала зростати і у серпні досягла максимальних значень, що в декілька разів перевищувала фонові значення (рис. 1). Протягом наступного місяця цей показник так стрімко почав знижуватися, що було виявлено лише сліди цинку.

Концентрація кадмію у березні була незначною. У наступні місяці дослідження їх вміст був на рівні слідових кількостей. Перевищень фонових значень та ГДК не спостерігали (рис. 2).

Протягом усього досліджуваного періоду вміст плюмбуму був найвищим у березні і перевищував фонові значення у декілька разів. У наступні місяці його концентрація знизилася до мінімальних показників (рис. 2).

Уміст кобальту у воді рекреаційної території з березня до червня дещо збільшився і досяг максимальних значень у червні, що значно перевищили фонові значення вмісту цього металу. Протягом наступних місяців дослідження концентрація кобальту знижувалася і досягла мінімальних значень у жовтні (рис. 2).

Концентрація нікелю від початку дослідження в березні була найбільшою і значно перевищувала фонові значення, але була дещо менша ГДК. Протягом наступного місяця спостерігається різке зниження цього показника до мінімальних значень у червні. Надалі спостерігається флуктуаційне збільшення (липень) і зниження (серпень) цього показника, а в жовтні – знову стрімке зростання (рис. 2).

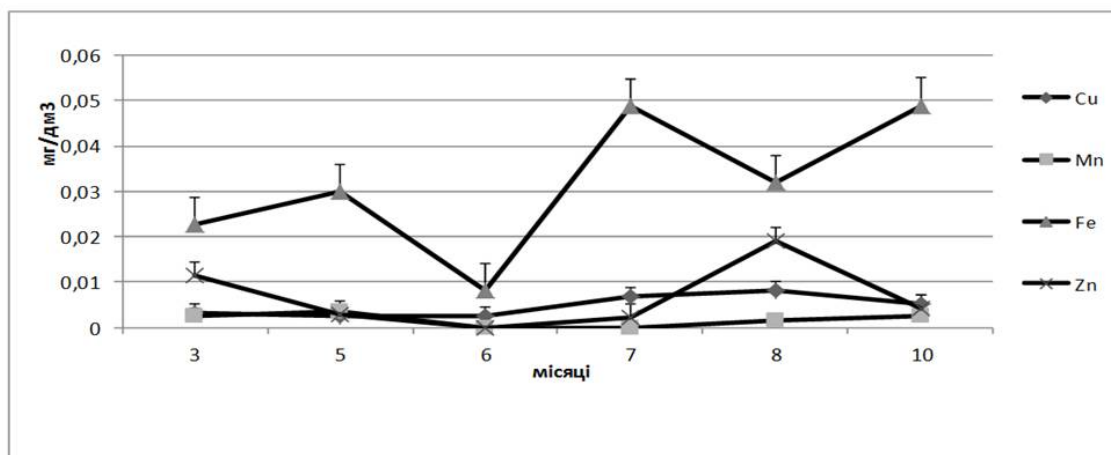


Рис. 3. Уміст біогенних важких металів у воді криниць технонавантаженої території Прикарпаття

Fig. 3. Content of biogenic heavy metals in well water of the industrial area in Precarpathian region

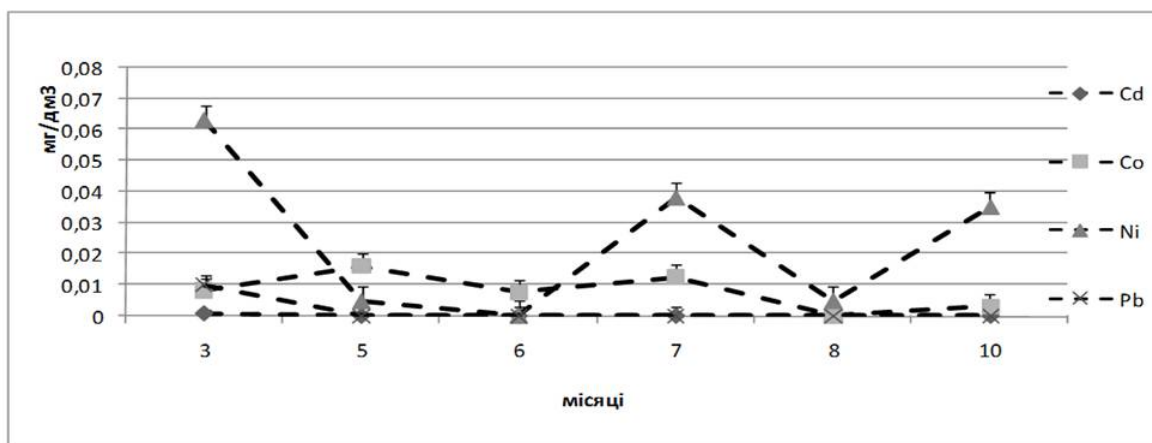


Рис.4. Уміст небіогенних важких металів у воді криниць технонавантаженої території Прикарпаття

Fig. 4. Content of non-biogenic heavy metals in well water of the industrial area in Precarpathian region

Загалом, для біогенних металів характерно зростання їхнього вмісту у воді криниць ранньою весною, можливо у зв'язку з паводковим явищем, та в кінці літа – ранньої осені, коли розпочинається активне відмирання рослин, що можуть стати джерелом надходження металів у водні горизонти. Щодо небіогенних металів, то їхній вміст у воді криниць характеризується ранньовесняним, середньолітнім та ранньоосіннім піками, що може бути пов'язано з дощовими та талими змивами з ґрунтової поверхні. Уміст купруму протягом березня-червня практично не змінювалася (рис. 3). У подальшому вміст металу підвищилася до максимального показника у серпні, а протягом наступного місяця спостерігалось незначне його зниження. В усі місяці уміст купруму перевищував фонові значення, а у серпні він був

на рівні значень ГДК. Відсутність чітко визначеної динаміки вмісту міді у першій половині дослідження свідчить про велику кількість чинників, вплив яких не завжди можливо оцінити, але основними серед них є рН, наявність розчинених органічних речовин та завислих органічних часток (Линник и Набиванец, 1986; Романенко, 2001).

Уміст мангану у воді протягом досліджуваного періоду змінювався мало, спостерігалось незначне його збільшення у травні та вересні (рис. 3). Протягом наступних місяців, у воді було виявлено лише сліди металу. Уміст мангану у воді не перевищував фонових значень та показників ГДК. Манган має невисокий показник комплексоутворення (Линник и Набиванец, 1986), а його зв'язування залежить від рН води, наявності органічних та

інших комплексоутворювальних речовин, концентрації завислих компонентів та окисно-відновної здатності вод (Романенко, 2001). Зниження рН сприяє вивільненню мангану з донних відкладів (Линник и Набиванец, 1986), наслідком чого могло бути підвищення вмісту металу у вересні, коли виявлено зменшення рН дослідженої води приблизно на одиницю (до 6,5-6,7) порівняно з попередніми місяцями.

Уміст феруму у травні підвищив показники березня, а протягом наступного місяця поступово зменшувався до найнижчого значення, однак уже в липні зріс до максимального значення, протягом наступного місяця спостерігалось його незначне зниження; у жовтні він знову зріс до максимального показника (рис. 3). Уміст феруму у воді не перевищував фонових значень і ГДК.

Уміст цинку від початку дослідження (березень) до червня поступово знижувався, а з наступного місяця спостерігалось стрімке збільшення його концентрації у воді. У серпні цей показник досяг максимального значення, після чого стрімко знижувався. Уміст Zn у воді не перевищував фонових показників, крім серпня, і значень ГДК (рис. 3). Оскільки цинк є біогенним металом, то можна передбачити його активне засвоєння рослинами, у яких іони цинку беруть участь у ключових реакціях фотосинтезу (Романенко, 2001), з чим пов'язуємо зменшення вмісту цього металу у воді з настанням вегетаційного періоду.

Протягом усього періоду дослідження кадмій і плумбум у воді криниць були у слідових кількостях.

Щодо вмісту кобальту, то протягом усього досліджуваного періоду, крім серпня та жовтня, він перевищував фонові значення (рис. 4). Максимальні значення показника виявлено у травні, наступного місяця його концентрація знизилася у два рази, а вже у липні знову зросла. Протягом серпня вміст кобальту знизився до мінімального показника, а протягом наступного місяця зафіксовано незначне його збільшення. Зростання вмісту кобальту у воді в липні могло бути зумовлене великою кількістю опадів, унаслідок чого метал потрапляє з дощовими водами. Зменшення концентрації кобальту у вегетаційний період пояснюється його зв'язуванням гідробіонтами (Романенко, 2001).

Концентрація нікелю у березні була найбільшою, перевищувала фонові значення, але була нижчою від значень ГДК (рис. 4). Протягом наступного місяця спостерігається різке зниження його вмісту до мінімальних значень у червні. Надалі спостерігається збільшення цього показника у липня та різке зниження у серпні.

Протягом жовтня цей показник знову стрімко зростає. Флюктуаційна динаміка вмісту нікелю у воді може бути пов'язана з невисоким ступенем його комплексування, оскільки в умовах досліджених природних вод існує конкурентне зв'язування фульвокислот іншими металами, із яких найбільший вклад в утворення комплексних сполук вносять ферум та купрум (Линник и Набиванец, 1986).

У цілому для біогенних металів характерно зростання їхнього вмісту у воді криниць від липня, коли розпочинається активне розкладання рослин, що можуть бути джерелом надходження металів у водні горизонти. Щодо небіогенних металів, то їхній вміст у воді криниць зростає найбільше у липні, але характеризується меншими піками у жовтні та післязимовий період, що може бути пов'язано з дощовими та талими змивами з ґрунтової поверхні. Разом з тим техногенна діяльність не спричиняла появи у воді криниць металів на рівні, що перевищували ГДК. Вищий вміст у воді криниць техногенної території відносно рекреаційної встановлено для феруму і нікелю, що може бути пов'язане з характером виробничої діяльності – металообробкою (Бриндзя, 2010; Коновець та ін., 2009). Натомість цинку тут виявлено менше. Уміст купруму з початку дослідження до травня дещо зменшувався, а з червня виявлено зростання показника до максимального значення у серпні. Надалі він знову знижувався. Концентрація купруму впродовж усього досліджуваного періоду перевищувала фонові значення, але не показники ГДК (рис. 5).

З березня концентрація мангану у воді досліджуваної території знижувалася та досягла мінімальних значень у червні. Протягом липня-серпня вміст марганцю зростає, а в жовтні цей показник знову знижувався. Уміст мангану у воді не перевищував фонових значень та показників ГДК (рис. 5).

Уміст цинку з березня до травня дещо підвищився, а у наступний місяць відбувалося його різке зниження до мінімального значення у червні. У липні – серпні концентрація цинку різко зросла до максимальних значень (рис. 5). У наступному місяці спостерігається різке зменшення цього показника. Протягом усього досліджуваного періоду вміст цинку у воді не перевищував фонових значень та показників ГДК.

Уміст кадмію протягом усього досліджуваного періоду був мінімальним (рис. 6). Плумбум у незначній кількості був присутній у березні, а протягом наступних місяців дослідження знизився та перебував у мінімальних кількостях (рис. 6).

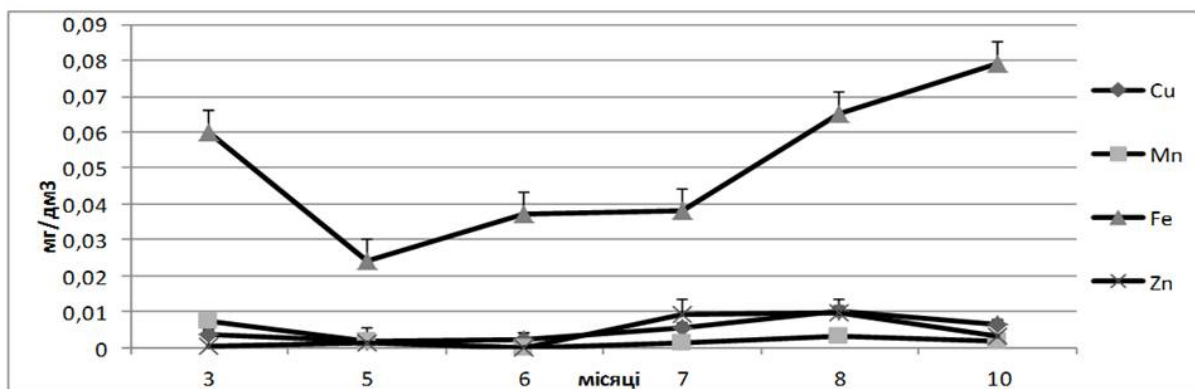


Рис. 5. Уміст біогенних важких металів у воді криниць урбановантаженої території Прикарпаття

Fig. 5. Content of biogenic heavy metals in well water of the urban area in Precarpathian region

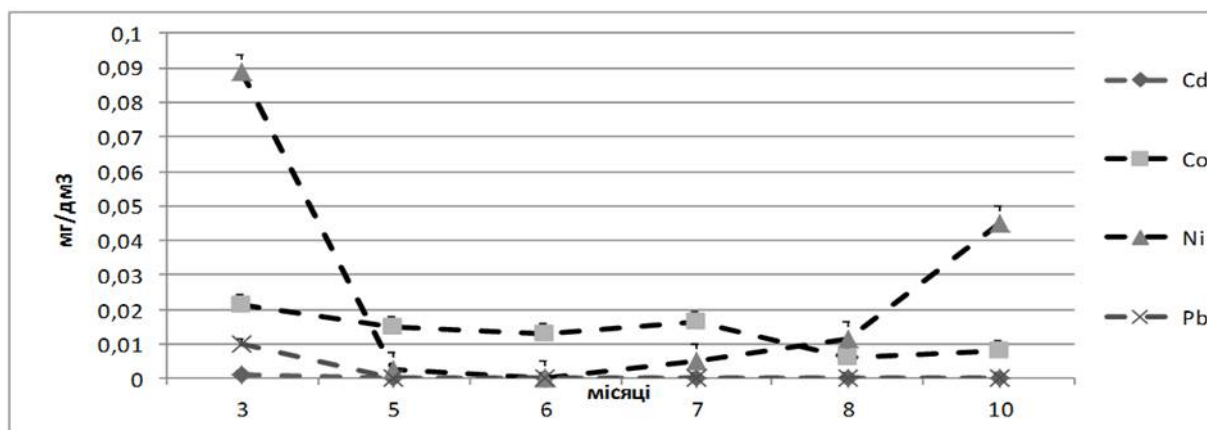


Рис. 6. Уміст небіогенних важких металів у воді криниць урбановантаженої території Прикарпаття

Fig. 6. Content of non-biogenic heavy metals in well water of the urban area in Precarpathian region

Концентрація кобальту у воді в березні була найвищою та значно перевищувала фонові значення. Протягом травня цей показник зменшився і до липня він був сталим (рис. 6). У наступні місяці дослідження спостерігалось зменшення вмісту кобальту до мінімальних значень.

Уміст нікелю у березні був максимальним, що значно перевищувало фонові значення, а до травня цей показник різко знизився до мінімального значення і в таких кількостях перебував протягом наступного місяця. З липня до жовтня цей показник знову зростав (рис. 6).

Загалом уміст металів, особливо феруму і нікелю, у воді криниць урбановантаженої території є високим лише навесні і восени, коли має місце активне розкладання рослин, що можуть бути джерелом надходження металів у водні горизонти. Разом з тим, у досліджених

криницях урбоєкосистеми вміст металів був на рівні, що не перевищували ГДК. Концентрація купруму з початку дослідження (березень) зменшувалася та досягла мінімальних значень у червні. З липня спостерігали підвищення цього показника до максимальних значень у жовтні, що значно перевищували фонові значення (рис. 7).

Уміст феруму у воді з березня до червня зменшувався, а протягом наступних місяців спостерігали різке збільшення цього показника з максимумом у жовтні, що перевищували фонові значення (рис. 7).

Концентрація мангану у березні була максимальною, а у наступні місяці дослідження спостерігалось значне зниження цього показника до мінімальних значень у червні та липні. У серпні відбувалося підвищення вмісту мангану у воді, хоча ці показники не перевищували ні фонових значень, ні ГДК (рис. 7).

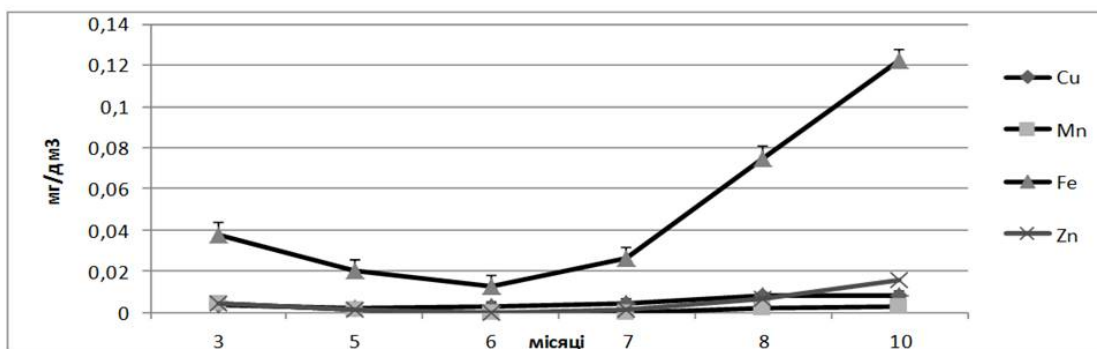


Рис. 7. Уміст біогенних важких металів у воді криниць агроавантаженої території Прикарпаття

Fig. 7. Content of biogenic heavy metals in well water of the agricultural area in Precarpathian region

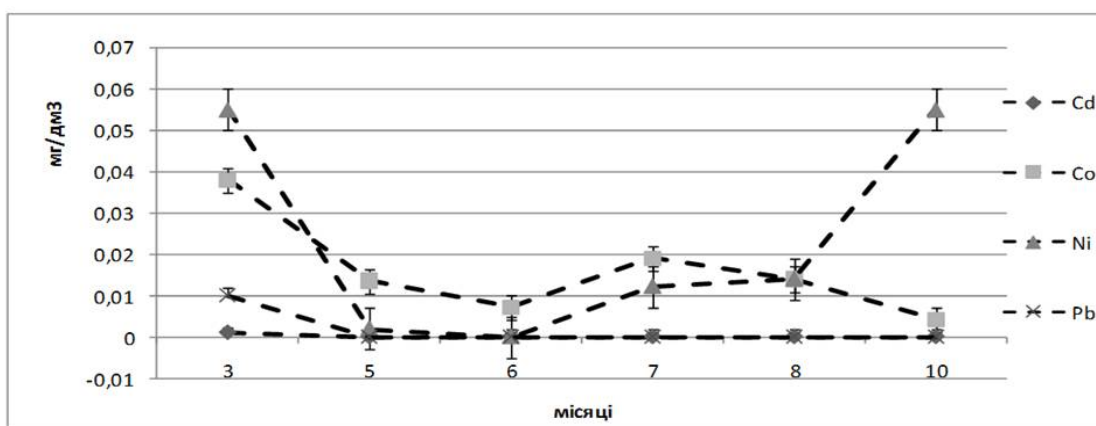


Рис. 8. Уміст небіогенних важких металів у воді криниць агроавантаженої території Прикарпаття

Fig. 8. Content of non-biogenic heavy metals in well water of the agricultural area in Precarpathian region

Кадмію та свинцю протягом усього досліджуваного періоду виявлено у слідових кількостях (рис. 8).

Максимальний вміст кобальту зафіксовано в березні з перевищенням фонових значень (рис. 8). Протягом травня-червня його вміст у воді дещо знизився, а у липні знову збільшився.

Уміст нікелю в березні досяг максимальних значень, а протягом наступного періоду дослідження його концентрація різко знизилася до мінімальних значень у червні. Протягом липня-жовтня його вміст знову зростає до максимальних значень у жовтні, хоча вони були дещо нижчими від фонових значень та ГДК (рис. 8).

Загалом динаміка вмісту металів у воді криниць агроавантаженої території така сама, як і для техногенної та урбанізованої, з переважанням умісту металів у осінньо-зимовий період та з незначним піком у липні. Основну масу серед всіх металів становлять ферум, нікель і кобальт. Українські токсичні свинець і кадмій виявлені в слідових кількостях.

Висновки. Аналіз результатів дослідження засвідчує, що зниження або підвищення умісту металу в воді криниць можна пов'язати з сезонними чинниками, насамперед, весняним водопіллям, що спричиняє надходження металів, змитих з ґрунтових поверхонь, та вегетацією водяних рослин у криницях. Простежується спільна для більшості металів тенденція до зниження їх вмісту в абіотичних компонентах водойми протягом вегетаційного періоду та зростання після його закінчення. Негативним явищем є перевищення фонових показників вмісту у воді криниць купруму, феруму, кобальту і нікелю. Небезпеку становить уміст купруму на рівні ГДК у воді криниць агроавантаженої території, та нікелю у криницях урбанізованої території. Окрім цього, перевищення фонових значень нікелю та кобальту спостерігалось у криницях усіх досліджених територій.

За вмістом важких металів стан колодязної води гірший навесні та восени, а покращується він улітку.

Список літератури:

1. Бриндзя І.В. Динаміка вмісту нітратів, нітритів та амонію у питній воді Прикарпатського регіону // Наукові записки ТНПУ ім. В.Гнатюка. Серія: Біологія. Спец. випуск: Гідроекологія. – 2010. – № 2 (43). – С. 41–46.
2. Гуменюк Г.Б. Порівняльна характеристика розподілу важких металів у гідроеко системах різного типу // Наукові записки ТНПУ ім. В.Гнатюка. Серія: Біологія. Спец. вип.: Гідроекологія. – 2010. – № 2 (43). – С.139–148.
3. Гуменюк Г.Б. Розподіл важких металів у гідроеко системі прісної водойми (на прикладі Тернопільського ставу): автореф. дис. на здобуття наук. степеня канд. біол. наук.: спеціальність «екологія». – Тернопіль, 2003. – 21 с.
4. Давыдова С. Л. Тагасов В. И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века - М.: Учебн. пос. – 2002. – 140 с.
5. Державні санітарні правила та норми. 2. Комунальна гігієна. 2.7. Грунт, очистка населених місць, побутові та промислові відходи, санітарна охорона ґрунту. Правила № 29 від 01.07.1999, додаток 3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://uapravo.net>
6. Коновець І.М., Кіпніс Л.С., Гончарова М.Т., Крот Ю.Г. Токсикологічна оцінка стану донних відкладів ділянки р. Дніпро нижче греблі Київської ГЕС // Наукові записки ТНПУ ім. В. Гнатюка. Серія: Біологія. – 2009. – № 1-2 (39). – С.97–102.
7. Куценко С.А. Основы токсикологии. – С.Пб., 2002. – 818 с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
9. Линник П. Н., Набиванец Б. И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. – Л.: Гидрометеоздат, 1986. – 268 с.
10. Мур Дж., В. С. Рамаурти Тяжёлые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. – М.: Мир, 1987. – 285 с.
11. Романенко В. Д. Основы гидроэкологии. – К.: Обереги, 2001. – 728 с.
12. Сборник санитарно-гигиенических нормативов и методов контроля вредных веществ в объектах окружающей среды. – М., 1991. – 284 с.
13. Тяжелые металлы как фактор экологической опасности: / Метод. указ. Сост. Ю. А. Холопов. – Самара: СамГАПС, 2003. – 16 с.
14. Федоренко О.І., Бондар О.І., Кудін А.В. Основы екології. – К.: Знання, 2006. – 543 с.

SEASONAL DYNAMICS OF HEAVY METALS CONTENT IN THE WELL WATER OF PRECARPATHIAN REGION

I. V. Bryndzya, V. V. Grubinko

The purpose of our study was to analyze the annual dynamics of heavy metals content in drinking water of Precarpathian region and to compare it with the standards of heavy metals content in water. The object of our study was well water in the region, where four areas depending on the specifics of the anthropogenic loading: industrial, recreational, agricultural and urban were defined for convenience. Each area differs by its level and type of pollution. To estimate the gross content of Zn, Mn, Fe, Cu, Pb, Co, Ni and Cd, the water samples were taken from 1-2 m depth, 10-fold concentrated using evaporation, and the content of heavy metals was determined with the method of atomic absorption spectrometry on the spectrometer C-115 at the wavelength corresponding the maximum absorption for each analyzed metal. The conducted researches showed that it is typical for the content of biogenic metals in the well water of recreational areas to increase in early spring, in the end of summer and in early autumn. The content of non-biogenic metals in the well water has peaks in early spring, in the midsummer and in the early autumn. On the industrial area, the concentration of biogenic metals in the well water increases from July till the end of studied period. The concentration of biogenic elements increases mostly in July but has the small peaks in October and in the end of winter period. The industrial activity do not result in exceeding the MPC of heavy metals. The well water of industrial area contains more iron and nickel comparing recreational area. On the other hand, the water of industrial area contains less zinc. The concentration of metals in well water of urban area, especially iron and nickel, is high in spring and in the autumn, but their concentrations does not exceed MPC level. The concentration of heavy metals in the well water of agricultural area is the same as for the industrial and urban areas with the increasing of metals content in autumn and winter and with the small peak in July. Iron, nickel and cobalt are mainly found in the water. Lead and cadmium, which are extremely toxic, were found in trace quantity. The conducted study permitted to find that the concentration of heavy metals in well water is determined by both the groundwater intake and by long-term accumulation in the biotic and abiotic components of water ecosystems. The general tendency is the decreasing the heavy metals concentration in abiotic components of water ecosystems during vegetation period of algae and hydrophytes and the rising of the concentration of metals in the end of the vegetation period. The exceeding of the background content for copper, iron, cobalt and nickel ions in the well water is the negative phenomenon.

Keywords: heavy metals, water, MPC, background quantity, Precarpathian region.

Одержано редколегією 20.10.2014

ЕКОЛОГО-БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *HEMEROCALLIS* L. ПРИ ІНТРОДУКЦІЇ В КРИВОРІЗЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇНИ

Т. Ф. ЧИПИЛЯК

Криворізький ботанічний сад НАН України, м. Кривий Ріг
e-mail: chipiljak@rambler.ru

Досліджено еколого-біологічні особливості розвитку та рівень адаптаційної пластичності 9 видів та 110 сортів роду *Нemerocallis* L. в екологічних умовах м. Кривий Ріг. Початок вегетації лілійників припадав на першу декаду квітня коли сума ефективних температур вище 0°C досягала 125,05 – 166,07. Встановлено, що терміни початку вегетації найбільш залежні від суми температур вище 0°C , хоча невисокий показник кореляції вказує на багатофакторну залежність початку даної фенофази. Визначено, що початок бутонізації досить чітко пов'язаний з сумою температур вище 5°C . Цей зв'язок виражений коефіцієнтами кореляції від +0,898 до +0,980. Але, якщо інтродуценти раннього квітіння починали бутонізацію при сумі температур 778,7 – 899,1 $^{\circ}\text{C}$, то для середньопізніх цей показник був вдвічі більший – 1570,6 $^{\circ}\text{C}$. В умовах Кривого Рогу першими починали квітіння рослини видів *H. middendorffii* (кінець травня – початок червня) та *H. dumortieri* (I-II декада червня), тоді як найпізніше зацвітали *H. citrina* і *H. thunbergii* (III декада липня). Масове квітіння інтродуцентів лілійнику припадало на липень. Квітіння дуже ранніх лілійників починалося, коли сума ефективних температур вище 0°C становила 967,2 $^{\circ}\text{C}$, тоді як для видів і сортів середніх та середньопізніх термінів ці показники досягали 1685,2 та 1811,3 $^{\circ}\text{C}$ відповідно. Аналіз залежності фази квітіння від суми ефективних температур показав, що квітіння ранніх лілійників було найбільш залежним від весняного переходу температури повітря через 0°C (коефіцієнти кореляції + 0,945 – +0,981), тоді як у лілійників середнього і середньопізнього термінів, початок квітіння тісно пов'язаний з сумою ефективних температур вище за 10°C , що підтверджується високими ($r = +0,863$ – +0,907) показниками коефіцієнту кореляції. В умовах Кривого Рогу рослини видів середньораннього квітіння відтворювали ритми розвитку притаманні їм в природних ареалах. Тоді як раньоквітучий *H. dumortieri* та середнього терміну квітіння *H. citrina* і *H. thunbergii* починали квітіння на 12-15 днів раніше. Тривалість квітіння лілійників в наших умовах коливалася в межах 15-55 днів. Стійкість лілійнику до несприятливих чинників в наших умовах забезпечується за рахунок переходу до стану спокою (завершення вегетації на 30-40 днів раніше, ніж в умовах природних ареалів), або зміни феноритмотипу, що характерно для вічнозеленого виду *H. aurantiaca* (зміна феноритмотипу на напівсплячий). Переважна більшість видів та сортів лілійнику в екологічних умовах Кривого Рогу мають високий та середній рівень адаптації. Притаманна лілійникам екологічна пластичність в поєднанні з невибагливістю до умов вирощування та широким спектром різноманітних декоративними якостей дозволяє використовувати їх для оптимізації території промислових регіонів.

Ключові слова: рід *Нemerocallis* L., феноритміка, ефективні температури, еколого-біологічні особливості, рівень адаптації.

Вступ. В якості оцінки адаптаційних можливостей та стійкості організмів в нових умовах зростання використовують показники еколого-біологічних особливостей росту та розвитку рослин. Процеси розвитку мають явно визначений ритмічний характер, залежать від багатьох внутрішніх та зовнішніх чинників і є результатом пристосування рослин до умов існування. Найбільш чітко адаптаційний потенціал рослин виявляється при аналізі багаторічних спостережень, коли рослини в своєму розвитку пройшли ряд екстремальних періодів (Булах, 2005). Результати таких досліджень можуть бути використані як діагностичні ознаки щодо реакції інтродуцентів

на зміни умов вирощування та для прогнозування успішності інтродукційного випробування видів і сортів, які залучаються для поповнення ботанічних колекцій, збагачення біорізноманіття культурфітоценозів (Базилевская, Мауринь, 1984). Значною мірою це стосується культури лілійника, яка ще не набула досить широкого застосування в оформленні міських та промислових територій України. Так, у сучасному світовому садівництві використовується щонайменше 6 видів лілійників і близько 30 тисяч сортів, тоді як в антропогенних ландшафтах Криворіжжя зустрічається тільки *Нemerocallis fulva* L. і за рідким виключенням *H. lilioasphodelus* L.

(Чипиляк та ін., 2014). Виходячи з вищезначеного, дослідження еколого-біологічних особливостей розвитку представників родового комплексу *Heimerocallis* в умовах Степу України є актуальним і визначило мету нашої роботи – оцінка рівня адаптаційної пластичності видів та сортів роду *Heimerocallis* L. в умовах м. Кривий Ріг.

Матеріали та методи. Об'єкт досліджень – еколого-біологічні особливості розвитку *H. aurantiaca* Baker, *H. citrina* Baroni, *H. dumortieri* Morr, *H. esculenta* Koidzumi, *H. fulva*, *H. lilioasphodelus*, *H. middendorffii* Trautv. Et Meyer, *H. minor* Miller, *H. thunbergii* Baker та 110 сортів роду *Heimerocallis*.

Колекція представників родового комплексу *Heimerocallis* Криворізького ботанічного саду НАН України (далі КБС) була сформована за рахунок рослин, які були отримані з природних ареалів та географічних районів відмінних від м. Кривий Ріг за ґрунтово-кліматичними умовами. Так, види були вирощені з насіння отриманого з їх природних ареалів – Японії (м. Канадзава), Китаю (м. Пекін), Росії (м. Сиктивкар) та закордонних центрів інтродукції – Польща (м. Лодзь) і Ісландія (м. Рейк'явік). Поповнення живими рослинами лілійнику відбувалося з інтродукційних центрів: національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, м. Київ; Донецький ботанічний сад НАН України, м. Донецьк; ботанічний сад Чернівецького національного університету ім. Юрія Федьковича, м. Чернівці; Нікітський ботанічний сад УААН – Національний науковий центр, м. Ялта; ботанічний сад Ботанічного інституту РАН, м. Новосибірськ; центральний ботанічний сад АН Білорусі, м. Мінськ.

Місто Кривий Ріг знаходиться на південному заході Дніпропетровської області в степовій природній зоні. Криворіжжя відноситься до посушливих районів України (до 400 – 430 мм опадів на рік), характеризується досить складними кліматичними умовами зими, для якої

звичайним явищем є ожеледь, застій води на поверхні ґрунту, відлиги, після яких, зазвичай, бувають короточасні, але великі від'ємні температури (Казаков та ін., 2005).

Фенологічні дослідження проводилося за загальноприйнятою методикою спостережень (Методика..., 1975). Стійкість лілійників до посушливих умов визначали методом візуального обліку і оцінювали за п'ятибальною шкалою (Шестаченко, Фалькова, 1974). Зимостійкість лілійників визначали згідно рекомендацій (Рекомендации..., 1990). Рівень адаптації визначали з використанням шкали М.О. Смолінської (Смолинская, 2002), яка складається з 7 критеріїв (інтенсивність росту монокарпичного пагону, періодичність квітування, періодичність плодоношення, інтенсивність вегетативного розмноження, стійкість до хвороб та шкідників, життєздатність і самовідновлення) оцінених від 1 до 5 балів. Оцінка декоративних якостей проводилася за 100-бальною шкалою (Былов, 1971). Інтродуценти колекції згідно міжнародної класифікації (Catalog ..., 2002) були поділені за термінами квітування: дуже ранні (квітування починається в I декаді червня); ранні (II декада червня); середньоранні (III декада червня – I липня); середні (кінець липня – початок серпня) і середньопізні (II декада серпня).

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів феноспостережень дозволив визначити тип інтродуценту залежно від терміну початку вегетації (Пельтихіна, 2005): раньовегетуючі – *H. citrina*, *H. lilioasphodelus* та 46 сортів (III декада березня); середньовегетуючі – *H. fulva*, *H. aurantiaca*, *H. dumortier*, 19 сортів (I декада квітня); пізньовегетуючі – *H. middendorffii*, *H. minor*, *H. esculenta*, *H. thunbergii*, 45 сортів (II – III декада квітня). За середніми показниками, початок вегетації припадав на першу декаду квітня коли сума ефективних температур вище 0°C досягала 125,05 – 166,07 (табл. 1).

Табл. 1.
Залежність від температурного чиннику початку вегетації окремих груп лілійників

Доба, M ± m	Σ температур > 0°C		Σ температур > 5°C		Σ температур > 10°C	
	M ± m	r	M ± m	r	M ± m	r
Дуже ранні						
8.IV ± 2,0	151,11 ± 16,98	0,336	115,89 ± 15,83	0,303	38,67 ± 11,22	0,160
Ранні						
9.IV ± 2,0	166,07 ± 16,79	0,655	130,81 ± 15,80	0,652	52,95 ± 12,51	0,617
Середньоранні						
5.IV ± 2,0	125,54 ± 13,60	0,549	91,16 ± 12,60	0,534	25,18 ± 7,03	0,411
Середні						
6.IV ± 2,0	137,28 ± 13,24	0,539	103,04 ± 12,57	0,524	39,06 ± 9,71	0,414
Середньопізні						
7.IV ± 1,0	138,58 ± 14,16	0,609	104,41 ± 13,31	0,590	40,22 ± 8,54	0,422

Табл. 1
The dependence of growing season beginning on temperature factor for certain groups of daylilies

Табл. 2.
Залежність від температурного чиннику початку бутонізації окремих груп лілійників

Tab. 2
The dependence of flower budding beginning on temperature factor for certain groups of daylilies

Доба, M ± m	Σ температур > 0°C		Σ температур > 5°C		Σ температур > 10°C	
	M ± m	r	M ± m	r	M ± m	r
Дуже ранні						
4.VI ± 5,0	967,15 ± 92,43	0,981	941,37 ± 96,63	0,979	762,21 ± 91,66	0,958
Ранні						
13.VI ± 3,0	1139,13 ± 45,75	0,945	1115,18 ± 45,53	0,942	933,42 ± 43,78	0,912
Середньоранні						
30.VI ± 2,0	1478,25 ± 34,47	0,844	1441,81 ± 33,51	0,847	1272,05 ± 31,45	0,857
Середні						
10.VII ± 2,0	1685,18 ± 34,68	0,748	1650,50 ± 34,21	0,762	1500,00 ± 38,74	0,863
Середньопізні						
16.VII ± 2,0	1811,29 ± 35,92	0,748	1776,03 ± 34,86	0,810	1619,11 ± 35,77	0,907

Примітка: «r» – коефіцієнт кореляції

Дослідження впливу температурного чиннику на термін початку вегетації виявило найбільш сильну залежність даної фази від суми температур вище 0°C. Проте показник коефіцієнту кореляції +0,336 – +0,655 вказує на багатофакторну залежність термінів початку вегетації. Бутонізацію першими починали лілійники дуже раннього та раннього терміну квітування – це III декада травня, бутонізація середньоранніх відбувалася в II декаду червня, середньопізніх – III декаду червня – I декаду липня. Встановлено, що початок бутонізації досить чітко пов'язаний з сумою температур вище 5°C. Цей зв'язок виражений коефіцієнтами кореляції від +0,898 до +0,980 (табл. 2). Але, якщо інтродуценти раннього квітування починали бутонізацію при сумі температур 778,7 – 899,1°C, то для середньопізніх цей показник був вдвічі більший – 1570,6°C.

В умовах КБС першими починали квітування рослини видів *H. middendorffii* (кінець травня-початок червня) та *H. dumortieri* (I-II декада червня), тоді як найпізніше зацвітали *H. citrina* і *H. thunbergii* (III декада липня). Масове квітування інтродуцентів лілійнику припадало на липень, так як 72,5% зразків колекції відносяться

до групи середньораннього терміну квітування (в тому числі види *H. esculenta*, *H. fulva*, *H. aurantiaca*). Дослідження показали, що квітування дуже ранніх лілійників починалося, коли сума ефективних температур вище 0°C становила 967,2°C, тоді як для видів і сортів середніх та середньопізніх термінів ці показники досягали 1685,2 та 1811,3°C відповідно. Необхідно зауважити, що в умовах помірно-посушливого степу Алтайського краю (Бжицьких, 2009) для квітування ранніх видів лілійників потрібна сума температур 538,7°C, що майже вдвічі менше ніж в умовах КБС, тоді як квітування зразків середніх та середньопізніх термінів відбувалося за однакового температурного режиму.

Аналіз залежності фази квітування від суми ефективних температур показав, що квітування ранніх лілійників було найбільш залежним від весняного переходу температури повітря через 0°C (коефіцієнти кореляції + 0,945 – +0,981), тоді як у лілійників середнього і середньопізнього термінів, початок квітування тісно пов'язаний з сумою ефективних температур вище за 10°C, що підтверджується високими (r = +0,863 – +0,907) показниками коефіцієнту кореляції (табл. 3).

Табл. 3.
Залежність від температурного чиннику початку квітування окремих груп лілійників

Tab. 3
The dependence of flowering beginning on temperature factor for certain groups of daylilies

Доба, M ± m	Σ температур > 0°C		Σ температур > 5°C		Σ температур > 10°C	
	M ± m	r	M ± m	r	M ± m	r
Дуже ранні						
4.VI ± 5,0	967,15 ± 92,43	0,981	941,37 ± 96,63	0,979	762,21 ± 91,66	0,958
Ранні						
13.VI ± 3,0	1139,13 ± 45,75	0,945	1115,18 ± 45,53	0,942	933,42 ± 43,78	0,912
Середньоранні						
30.VI ± 2,0	1478,25 ± 34,47	0,844	1441,81 ± 33,51	0,847	1272,05 ± 31,45	0,857
Середні						
10.VII ± 2,0	1685,18 ± 34,68	0,748	1650,50 ± 34,21	0,762	1500,00 ± 38,74	0,863
Середньопізні						
16.VII ± 2,0	1811,29 ± 35,92	0,748	1776,03 ± 34,86	0,810	1619,11 ± 35,77	0,907

За даними фенологічних спостережень були визначені особливості розвитку лілійників в природно-кліматичних умовах м. Кривий Ріг. Так, порівняння отриманих нами даних з феноритмами розвитку видів лілійників в природних умовах (Тахтаджян, 1987; Вяткин, 2000; Седельникова, 2014) дає можливість констатувати, що раньоквітучий *H. dumortieri* та середнього терміну квітучий *H. citrina* і *H. thunbergii* в умовах Кривого Рогу починали квітнути на 12-15 днів раніше. Тоді як види середньораннього квітучого відтворювали ритми розвитку притаманні їм в природних ареалах. У окремих сортів середнього та середньопізннього квітучого (*Hemerocallis* х *hybrida hort. cv. Luxury Lace, Stagecoach, Varsity* та ін.), в порівнянні з характеристиками визначеними оригінаторами (Catalog ..., 2002), зафіксоване квітання у більш ранні терміни (перехід з серпня на I-II декади липня). Тривалість квітання лілійників в наших умовах коливалася в межах 15-55 днів, що характерно для них і в умовах Алтайського степу та Уфи, тоді як на Далекому Сході квітання досягає 70 днів (Зайнетдинова, 2009; Крестова, 2010; Седельникова, 2014).

В умовах КБС спостерігали регулярне плодоношення у *H. lilioasphodelus*, *H. dumortieri* та *H. middendorffii*, тоді як два останні в природних ареалах не плодоносять (Тахтаджян, 1987; Вяткин, 2000). *H. thunbergii*, *H. esculenta*, *H. citrina* та *H. minor* відзначалися не регулярним плодоношенням і утворенням не виповненого

насіння. Не плодоносили *H. aurantiaca* та *H. fulva*, що характерно для них і в первинних місцезростаннях.

Визначення рівня зимостійкості лілійників доводить, що переважна більшість зразків (*H. lilioasphodelus*, *H. middendorffii*, *H. thunbergii*, *H. esculenta*, *H. citrina*, *H. fulva* та 81% культиварів) є зимостійкими. Необхідно відзначити, що *H. aurantiaca*, який в умовах природних ареалів по феноритму є вічнозеленим, в КБС розвивається по напівсплячому типу (Chung, 1997; Вяткин, 2000). За результатами дослідження стійкості лілійників до посушливих умов визначено, що *H. lilioasphodelus*, *H. fulva*, *H. citrina*, *H. esculenta*, *H. minor*, *H. dumortieri* та 78 сортів в наших умовах витримують нетривалі посухи, при високих літніх температурах пошкодження рослин не носять масового характеру і значно не впливають на ріст і генеративний розвиток. Таким видам, як *H. aurantiaca*, *H. thunbergii*, *H. middendorffii* присвоєно середній рівень посухостійкості, так як рослини на 30-40 днів раніше, в порівнянні з середніми показниками по колекції, завершують ростові процеси.

При визначенні рівня адаптації та декоративності лілійнику зразкам колекції КБС присвоєно високі бали (табл. 4). Аналіз природних ареалів видів показав, що високий рівень адаптації обумовлюється широкою екологічною амплітудою, яка дозволяє їм успішно зростати в умовах мінливого навколишнього середовища і підтверджує їх високу пластичність (Чипиляк, 2013).

Табл. 4
Оцінка рівня адаптації і декоративних якостей видів та сортів лілійнику в умовах м. Кривий Ріг

Рівень адаптації та декоративність	Оцінка декоративних якостей (бал)	Оцінка рівня адаптації (бал)	Кількість зразків
Найвищий рівень адаптації (вид / сорт перспективний, високодекоративний, стійкий)	80-100	28-35	<i>H. citrina</i> , <i>H. esculenta</i> , <i>H. fulva</i> , <i>H. middendorffii</i> , <i>H. thunbergii</i> , <i>H. lilioasphodelus</i> , 59 сортів
Середній рівень адаптації (вид / сорт перспективний, високодекоративний, не досить стійкий)	60-80	21-27	<i>H. aurantiaca</i> , <i>H. dumortieri</i> , <i>H. minor</i> , 42 сорти
Низький рівень адаптації (вид / сорт мало перспективний, не декоративний, не досить стійкий)	40-60	14-20	9 сортів
Не адаптувався (вид / сорт не перспективний, не декоративний, не стійкий)	1-40	7-13	—

Tab. 4.
Estimation of adaptation level and decorative qualities species and varieties of daylilies in the conditions of Kriviy Rig

Висновки. Узагальнюючи отримані результати, можна констатувати наступне. Терміни початку квітування представників родового комплексу *Hemerocallis* в екологічних умовах Кривого Рогу визначаються сумою ефективних температур – початок квітування ранніх лілійників найбільш залежний від суми температур вище 0⁰С, тоді як лілійників середнього і середньопізннього термінів вище 10⁰С. До особливостей розвитку відноситься прискорення фази квітування (на 12-15 діб) у видів раннього і середнього термінів квітування та окремих сортів середнього та середньопізннього термінів. Стійкість лілійнику до посушливих умов забезпечується за рахунок переходу до стану спокою – завершення вегетації на 20-30 діб раніше, ніж в умовах природних ареалів. Адаптація вічнозеленого виду *H. aurantiaca* до умов зими проявляється в зміні феноритмотипу на напівсплячий.

Аналіз рівня адаптації та декоративних якостей видів і сортів лілійнику в умовах м. Кривий Ріг доводить, що притаманна їм екологічна пластичність в поєднанні з невибагливістю до умов вирощування та широким спектром різноманітних декоративними якостей роблять їх незамінними в озелененні ландшафтів міських та промислових територій нашого регіону.

Список літератури:

1. Базилевская Н.А., Мауринь А.М. Интродукция растений. Теории и практические приемы: Учебное пособие. – Рига: ЛГУ им. П. Стучки, 1984. – 91 с.
2. Бжицких Н. В. Сравнительная оценка сортов и гибридов лилейника и эффективные способы их размножения в условиях умеренно-засушливой и колочной степи Алтайского края: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. сельхоз. наук. – Барнаул, 2009. – 16 с.
3. Булах П.Е. Фенологические критерии устойчивости в интродукции растений // Интродукция растений. – 2005. – № 4. – С. 9 – 19.
4. Былов В.Н. Основы сортоизучения и сортооценки декоративных растений при интродукции // Бюллетень ГБС. – 1971. – Вып. 81. – С. 69 – 75.
5. Вяткин А.И. Род Красоднев (*Hemerocallis* L.) в Сибири: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук. – Новосибирск, Центр. сиб. ботан. сад СО РАН, 2000. – 14 с.
6. Зайнетдинова Г.С., Миронова Л.Н. Биологические особенности представителей рода *Hemerocallis* L. при интродукции // Вестник Оренбургского гос. университета. – 2009. – № 6. – С. 133 – 136.
7. Крестова И. Н. Род *Hemerocallis* L. (семейство Hemerocallidaceae) в условиях культуры в Приморском крае: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук. – Владивосток, ТИБОХ ДВО РАН, 2010. – 14 с.
8. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР. – М.: ГБС АН СССР, 1975. – 27 с.
9. Пельтихина Р.И., Крохмаль И.И. Интродукция видов и сортов рода *Hemerocallis* L. (*Hemerocallidaceae* R.Br.) в Донбасс и перспективы их использования в декоративном садоводстве – Донецк: Норд-Пресс, 2005. – 236с.
10. Природнича географія Кривбасу: Монографія / за редакцією В.Л. Казакова. – Кривий Ріг: КДПУ, 2005. – 156 с.
11. Рекомендации Совета бот садов СССР. – К., 1990. – 184 с.
12. Седельникова Л.Л. Особенности развития *Hemerocallis hybrida* в Западной Сибири // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. – 2014. – Вып. 11. – С. 16-20.
13. Смолинская М.А. Оценка успешности интродукции травянистых растений // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія: Збірник наук. праць. – 2002. – Вип. 145 – С. 164 – 168.
14. Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. – Л.: Наука, 1987. – 439 с.
15. Чипиляк Т.Ф. Географічне поширення і умови зростання видів роду *Hemerocallis* L. та перспективність їх інтродукції на Україні // Интродукция растений. – 2013. – №1 – С. 46 – 54.
16. Чипиляк Т.Ф., Мазура М.Ю., Береславська О.О., Лещенюк О.М. Квітничково-декоративне оформлення парків та скверів міста Кривий Ріг. Рекомендації щодо його поліпшення / Науковий вісник НЛТ України: збірник науково-технічних праць. – 2014. – Вип. 24.4. – С. 164 – 169.
17. Шестаченко Г.Н., Фалькова Т.В. Методические рекомендации по оценке засухоустойчивости растений, применяемых для скальных садов в субаридных условиях. – Ялта, 1974. – 27 с.
18. Catalog Bells – Reinke: Bill s Joyce, 2002. – 24 p.
19. Chung M.G., Kang S.S. Morphometric analysis of the genus *Hemerocallis* L. (Liliaceae) in Korea // J. Plant Res. – 1997. – Vol. 107. – P. 165 – 175. genus *Hemerocallis* L. (Liliaceae) in Korea // J. Plant Res. – 1997. – Vol. 107. – P. 165 – 175.

ECOLOGO-BIOLOGICAL FEATURES OF THE SPECIES OF *HEMEROCALLIS* L. GENUS UNDER THEIR INTRODUCTION INTO BOTANICAL GARDEN OF KRIVYI RIG NAS OF UKRAINE

T. F. Chipilyak

The ecological and biological characteristics and adaptive plasticity level of 9 species and 110 varieties of the genus *Hemerocallis* L. were studied. It is investigated in ecological conditions of Krivyi Rig. The beginning of vegetative season daylily falls on first decade of April when the sum of effective temperatures above the 0°C reaches 125,05 – 166,07. It is established that the terms of vegetative season beginning are most dependent on the sum of temperatures above 0°C, although low correlation index indicates multifaceted dependence of this phenophase beginning. It was established that the beginning of flower budding quite clearly related with the sum of temperatures above 5°C. This relationship is expressed by the correlation coefficients from 0,898 to 0,980. But if the introduced species and varieties very early flowering started flower budding at the sum of temperatures 778,7 - 899,1°C, then for midseason this index was twice as much - 1570,6°C. In the conditions of Krivyi Rig first started flowering plants of species *H. middendorffii* (the end of May - early June) and *H. dumortieri* (I-II decade of June), while the latest blossomed *H. citrina* and *H. thunbergii* (third decade of July). The massive flowering of daylily introduced plants there were for July. Flowering of very early daylilies began, when sum of effective temperatures above the 0°C was 967,2°C, while for species and varieties midseason and late midseason these indicators reached 1685,2 and 1811,3°C respectively. Analysis of the relationship phase of flowering and sum of effective temperatures showed that early flowering daylilies was most dependent on spring transition temperature over 0°C (correlation coefficients 0.945 + - 0.981), while the daylilies midseason and late midseason terms of flowering beginning closely related to the sum of effective temperatures above 10°C, as evidenced by high ($r = +0,863 - +0,907$) correlation coefficients meanings. In the conditions of Krivyi Rig plants of early-midseason species reproduced rhythms inherent of their natural areas. While plants of very early species *H. dumortieri* and midseason terms of flowering *H. citrina* and *H. thunberdii* began to flowering for 12-15 days earlier. Duration of daylilies flowering in our conditions fluctuated within 15-55 days. Daylilies resistance to unfavorable factors in our conditions is provided by the transition to dormant state (ending growing season for 30-40 days earlier than in a natural areas) or by change of phenorhythm type, which is typical for evergreen specie *H. aurantiaca* (change of phenorhythm type on semi evergreen). The vast majority of daylily species and varieties in Krivyi Rig ecological conditions are had a high and medium adaptation level. Daylilies inherent ecological plasticity combined with the unpretentious to growing conditions and wide range of different decorative qualities allows to use them to optimize of industrial regions.

Keywords: genus *Hemerocallis* L., biorhythms of the development, effective temperatures, ecologo-biological features, level of adaptation.

Одержано редколегією 22.12.2014

УПРАВЛІННЯ СОЦІАЛЬНОЮ СКЛАДОВОЮ ЕКОЛОГІЧНОЮ БЕЗПЕКИ КАЛУСЬКОГО ПРОМИСЛОВОГО РАЙОНУ

Л. Я. САВЧУК

*Івано-Франківський національний технічний університет нафти і газу
вул. Карпатська, 15, м. Івано-Франківськ, 76019
e-mail: bzhd@nung.edu.ua*

Багаторічна техногенна діяльність гірничо-хімічних підприємств у Калуському промисловому регіоні призвела до суттєвих змін природного стану довкілля та деградації його складових об'єктів, що проявляється у високому рівні техногенного забруднення атмосферного повітря, водних об'єктів й ґрунту. Це призводить до пониження рівня екологічної безпеки та значного зростання захворюваності населення. Для гігієнічної оцінки впливу чинників на соціальну складову екологічної безпеки були вибрані методи вивчення здоров'я населення, які можуть здійснюватися у формі так званих поперечних та поздовжніх досліджень. Поперечні дослідження полягають у спостереженні за впливом чинників навколишнього середовища на здоров'я населення у даний момент, без врахування динаміки захворюваності. Дані дослідження поділяють на перспективні та ретроспективні. При проведенні перспективних досліджень проводять порівняння двох груп людей: перша – люди, що зазнають впливу екологічного чинника, друга – люди, що не зазнають такого впливу. При ретроспективному дослідженні порівнюють дві інші групи людей, а саме: хворих і здорових. Суть поздовжнього методу дослідження полягає у проведенні тривалого динамічного спостереження за певним контингентом людей і також може мати два види: паралельні і непаралельні. Під час проведення паралельного дослідження тривалість проведення самого дослідження та період, протягом якого збирається необхідна інформація, співпадають, а при непаралельному дослідженні використовують архівні матеріали. Кінцевою метою алгоритму медично-конструктивно-екологічного оцінювання впливу екологічних чинників на захворюваність населення є встановлення між ними зв'язку, розроблення та впровадження профілактичних заходів і засобів зменшення впливу на соціальну складову екологічної безпеки. В роботі встановлений перелік аспектів, які необхідно враховувати при управлінні соціальною складовою екологічної безпеки. Показані основні шляхи транспортування хімічних речовин у навколишнє середовище та надходження їх в організм людини. Розроблений алгоритм для управління соціальною складовою екологічної безпеки. Для кореляції медично-демографічних та екологічних чинників розроблена спеціальна програма. Проведено оцінювання впливу екологічних чинників на захворюваність населення є встановлення між ними зв'язку, розроблення та впровадження профілактичних заходів і засобів зменшення цього впливу на соціальну складову.

Ключові слова: екологічні чинники, соціальна складову, кореляція, алгоритм управління, методи дослідження, статистичні характеристики.

Екологічні проблеми Калуської промислово-міської агломерації терміново вимагають розроблення управлінських методів мінімізації впливу екологічних чинників на довкілля, насамперед на соціальну складову, що є першочерговим, актуальним завданням. Питанням управління соціальною складовою екологічної безпеки присвячені роботи (Бердник, 2001, Абрамов, 2004, Нейка, 2001, Голубець, 1997, Шевченко, 1994, Міщенко, 2003).

Для зменшення техногенного тиску на соціальне середовище необхідно визначити перелік основних діючих в регіоні екологічних факторів (Фелленберг, 1997). На даний час розроблено декілька підходів до їх класифікації. Зокрема за часом (періодичністю) дії, за

характером впливу, за об'єктом, що є джерелом впливу, станом навколишнього середовища, за ступенем впливу на довкілля, за спектром впливу. Розроблена схем чинників навколишнього середовища (Пашенко, 1994), які детермінують здоров'я людини. У своїй сукупності усі чинники визначають соціальні умови життя і мають безпосередній вплив на формування індивідуального і суспільного здоров'я. Екологічні чинники, що впливають на захворюваність, розглядають як сукупність станів об'єктів у рамках певної території (ландшафт, річковий басейн, адміністративний район, природний регіон чи адміністративна область) у певний проміжок часу без аналізу

екологічних показників чи характеристик джерел забруднення довкілля.

Згідно з проведеними дослідженнями під час управління соціальною складовою екологічної безпеки необхідно врахувати такі аспекти захворюваності населення:

- 1) причиною порушення нормальної життєдіяльності організму і виникнення патологічного процесу можуть бути абіотичні чинники. Існує зв'язок географічного розподілу захворюваності, що пов'язаний з кліматично-географічними зонами, з висотою місцевості, з інтенсивністю інсоляції, з атмосферним тиском;
- 2) відхилення від нормального стану організму можуть бути викликані біотичними компонентами навколишнього середовища у вигляді продуктів метаболізму рослин і мікроорганізмів, патогенними мікроорганізмами, отруйними рослинами, комахами небезпечними для людини тваринами;
- 3) патологічні стани пов'язані з антропогенними чинниками забруднення навколишнього середовища: повітря, ґрунту, води; в першу чергу з біологічним забрудненням від тваринництва, виробництвом біологічно активних речовин фармацевтичними підприємствами;
- 4) виникнення патологічних станів зумовлено впливом середовища і неправильним харчуванням, проявляється у порушеннях обміну речовин в організмі;
- 5) наявність широкого спектру група хвороб зумовлених поганим пристосуванням організму до умов зовнішнього середовища через генетичні дефекти або особливості імунітету.

Встановивши взаємозв'язок між екологічним станом довкілля і здоров'ям населення, можна здійснювати первинну профілактику, яка повинна бути масовою і відображає наступальну стратегію системи охорони здоров'я. Вторинна профілактика більш складна, тому що проводиться на індивідуальному рівні і ґрунтується на тестуванні кожного пацієнта. Система охорони здоров'я являє собою заходи спрямовані для забезпечення необхідного рівня гігієнічних, санітарно-гігієнічних і психологічних потреб, для розробки комплексу заходів, які реалізують функцію оптимальної життєдіяльності за критеріями здоров'я індивіду, колективів, популяцій.

Під час визначення стану здоров'я населення необхідно враховувати, що абсолютного здоров'я не існує – це загальнопатологічне (філософське) здоров'я населення. Загальнопатологічне здоров'я – інтервал, у межах якого кількісні коливання психофізичних процесів здатні утримувати живу систему на рівні функціонального оптимуму (оптимальна зона, у

межах якої організм не виходить на патологічний рівень саморегуляції). Другим положенням є те, що індивідуальне та популяційне (здоров'я групи людей популяцій населення) здоров'я неподільні. Популяційне здоров'я це умовне статистичне поняття, яке досить повно характеризується комплексом демографічних показників, рівнем фізичного розвитку, рівнем захворюваності певної групи населення. Крім того, визначення здоров'я населення неможливе без оцінки взаємодії індивіда та навколишнього середовища.

Вплив стану навколишнього середовища на здоров'я людини можна прогнозувати визначивши перевищення граничнодопустимої концентрації (ГДК) забруднювача. Якщо перевищення ГДК забруднюючих речовин не виявлено, то зміни здоров'я, зумовлені їх дією, відсутні; при перевищенні у 2÷3 рази відбуваються зміни у стані здоров'я за деякими функціональними показниками; у 4÷7 разів фіксуються виражені фізіологічні зміни; у 8÷10 разів відбувається збільшення специфічної та неспецифічної захворюваності; у 100 разів реєструються гострі отруєння, а у 500 разів і більше – летальні отруєння. Даний метод простий і наочний. Його недоліком є те, що він не дає можливості визначити пріоритетні забруднювачі.

З метою управління соціальною складовою екологічної безпеки Калуського автором статті розроблено алгоритм для оцінки впливу екологічних чинників на здоров'я населення. Згідно з алгоритмом медично-екологічне вивчення території проводиться шляхом експедиційних, стаціонарних, аерокосмічних, дистанційних, лабораторних досліджень. Окремо розглядаються джерела забруднення. Калуський промисловий регіон відноситься до проблемних районів, територія якого відзначається найбільшим рівнем природно-техногенної небезпеки. Розташування у межах міста потужних підприємств гірничо-видобувної та хімічної промисловості та їх сировинної бази (родовища калійних солей), розташування контурів залягання газових родовищ не тільки впливає на природне середовище, але і пригнічує життєдіяльність населення. Для гігієнічної оцінки впливу чинників на соціальну складову екологічної безпеки були вибрані методи вивчення здоров'я населення, які можуть здійснюватися у формі так званих поперечних та поздовжніх досліджень.

Поперечні дослідження полягають у спостереженні за впливом чинників навколишнього середовища на здоров'я населення у даний момент, без врахування

динаміки захворюваності. Дані дослідження поділяють на перспективні та ретроспективні. При проведенні перспективних досліджень проводять порівняння двох груп людей: перша – люди, що зазнають впливу екологічного чинника, друга – люди, що не зазнають такого впливу. При ретроспективному дослідженні порівнюють дві інші групи людей, а саме: хворих і здорових.

Суть поздовжнього методу дослідження полягає у проведенні тривалого динамічного спостереження за певним контингентом людей і також може мати два види: паралельні і непаралельні. Під час проведення паралельного дослідження тривалість проведення самого дослідження та період, протягом якого збирається необхідна інформація, співпадають, а при непаралельному дослідженні використовують архівні матеріали.

Кінцевою метою алгоритму медично-конструктивно-екологічного оцінювання впливу

Список літератури:

1. Абрамов И. Б. Оценка воздействия на окружающую среду планируемой хозяйственной деятельности. Нормативное обеспечение. Основные положения оценки воздействия на геологическую и водную среду / И. Б. Абрамов // Экология довкілля та безпека життєдіяльності. – 2004. – № 5. – с. 80 – 85.
2. Бердник О. В. Навколишнє середовище і здоров'я населення / О. В. Бердник, Л. В. Серих, В. Ю. Зайковська, Е. І. Парасадян // Гігієна населених міст. - К.: 2001. – Вип. 38. – Т. 2. – С. 408 – 418.
3. Голубець М. А. Плівка життя / М. А. Голубець. – Л.: Поля, 1997. – 185 с.
4. Міщенко Л. В. Геоєкологічний аудит техногенного впливу на довкілля та здоров'я населення (на прикладі регіону Покуття) : автореф.

MANAGEMENT OF THE SOCIAL COMPONENT OF THE ENVIRONMENTAL SAFETY IN KALUS INDUSTRIAL REGION

Savchuk L. Ya.

Significant changes in the natural environment leading to its degradation are reported in Kalus industrial region as a result of prolonged functioning of various local mining and chemical factories. These changes result in high air pollution emission, contamination of water bodies and soils, causing worsening in the local environmental safety and increase in the general population sickness rate. So-called lateral and longitudinal investigation models were selected to provide the hygienic estimation of influence of some factors on the social component of environment safety. The lateral investigation assumes research of the environmental parameters influence on the population sickness rates but with no consideration of the sickness rates dynamics. Such a research can be subdivided into the two classes: prospective and retrospective. Two indicative groups should be compared within the prospective research: the group one is under influence of some negative environmental factors while the control group is free of this influence. Another two groups are compared in the retrospective research: the "sick" and the "healthy" individuals. The longitudinal method assumes the long-lasting dynamic observations of some group of individuals. This method can also be subdivided into two categories: parallel and non-parallel observations. The parallel observations consider actual current information while the non-parallel methods work with the archival data. The medical-constructive-ecological assessment is targeted on finding dependencies between the population sickness rate and the environmental parameters as well as development and implementation of some prophylactic and mitigation actions to decrease the negative effect on the social component of environmental safety. The list of influential parameters that should be accounted at management of the social component of environmental safety is found. The main ways of the chemical pollutants emission and their ingress into human organism are discussed. A management procedure has been developed for social component of environmental safety. Correlation between the medical-demography and environmental parameters can be controlled by the specially developed software.

Key words: environmental factors, social component, correlation, management algorithm, research method, statistical characteristics.

Одержано редколегією 25.12.2014

екологічних чинників на захворюваність населення є встановлення між ними зв'язку, розроблення та впровадження профілактичних заходів і засобів зменшення впливу на соціальну складову екологічної безпеки.

Висновки. Для управління соціальною складовою екологічної безпеки Калуського району, враховуючи задачі та етапи досліджень, розроблено алгоритм для оцінювання впливу екологічних чинників на здоров'я населення. Кінцевою метою алгоритму медично-конструктивно-екологічного оцінювання впливу екологічних чинників на захворюваність населення є встановлення між ними зв'язку, розроблення та впровадження профілактичних заходів і засобів зменшення цього впливу на соціальну складову.

дис. на здобуття наук. ступеня канд. географ. наук / Л. В. Міщенко. – Чернівці, 2003. – 20 с.

5. Нейко Є. М. Медико-геоекологічний аналіз стану довкілля як інструмент оцінки та контролю здоров'я населення / Є. М. Нейко Г. І. Рудько, Н. І. Смоляр – Івано-Франківськ. – Львів : ЕКОР, 2001. – 350 с.

6. Пашенко В. М. Основні поняття і проблеми еколого-географічних досліджень / В. М. Пашенко // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. – 1994. – № 4. – С. 8 – 16.

7. Фелленберг Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию [переклад з німецької] / Г. Фелленберг. – М. : Мир, 1997. – с. 58.

8. Шевченко В. А. Медико-географическое картографирование территории Украины / В. А. Шевченко. – Киев : Наук. думка, 1994. – 159 с.

ЗМІСТ

CONTENTS

БІОХІМІЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

- T. V. BAKALETS, D. O. MINCHENKO, O. O. RATUSHNA, O. O. RIABOVOL, O. H. MINCHENKO** GLUCOSE AND GLUTAMINE DEPRIVATIONS AFFECT THE EXPRESSION OF *MAP3K5*, *MAP4K3*, *C1B1*, *RIPK1*, AND *RIPK2* GENES IN U87 GLIOMA CELLS WITH BLOCKADE OF ERN1 SIGNALING ENZYME FUNCTION **99**
- T. V. БАКАЛЕЦЬ, Д. О. МІНЧЕНКО, О. О. РАТУШНА, О. О. РЯБОВОЛІ, О. Г. МІНЧЕНКО** ДЕФІЦИТ ГЛЮКОЗИ ТА ГЛУТАМІНУ ЗМІНЮЄ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ *MAP3K5*, *MAP4K3*, *C1B1*, *RIPK1*, AND *RIPK2* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 З ВИКЛЮЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1
- A. Є. ШЕЛИФІСТ, М. Д. ДЗВІНЧУК** ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦІОНУВАННЯ ДЕЯКИХ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН В ТКАНИНАХ *LIGULARIA GLAUCA* (L.) HOFFM. I *L. SIBIRICA* (CASS.) ЗА РІЗНИХ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ **108**
- A. E. SHELYFIST, M. D. DZVINCHUK** THE CHARACTERISTIC OF THE FUNCTIONING OF THE SELECTED COMPONENTS OF PLANT ANTIOXIDANT SYSTEM IN *LIGULARIA GLAUCA* (L.) HOFFM. AND *L. SIBIRICA* (CASS.) TISSUES UNDER THE DIFFERENT GROWING CONDITIONS
- Я. І. ІВАНОВИЧ, Н. В. ТРЯПЩИНА** ПРОФІЛЮВАННЯ ГЕНОМУ СОРТІВ ЧЕРЕШНІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ IRAP-ПЛР ТА REMAP-ПЛР МАРКЕРІВ **113**
- Y. I. IVANOVYCH, N. V. TRIAPITSYNA** FINGERPRINTING GENOMES OF UKRAINIAN-BREED CULTIVARS OF SWEET CHERRY BY USING IRAP AND REMAP MARKERS
- О. В. ТЯЖКА, Д. О. МІНЧЕНКО, В. В. ДАВИДОВ, А. БУРДЕЙКО, О. С. МОЛЯВКО, Д. К. КУЛІШОВА, О. Г. МІНЧЕНКО** РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ДО ІНСУЛІНУ ЗМІНЮЄ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ РІСТ ТА ВИЖИВАННЯ КЛІТИН, У КЛІТИНАХ КРОВІ ДІТЕЙ ЧОЛОВІЧОЇ СТАТІ ЗА УМОВ ОЖИРІННЯ **118**
- O. V. TIAZHKA, D. O. MINCHENKO, V. V. DAVYDOV, O. A. BUDREIKO, O. S. MOLIAVKO, D. K. KULIESHOVA, O. H. MINCHENKO** INSULIN RESISTANCE AFFECTS THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO THE CONTROL OF CELL GROWTH AND SURVIVING IN BLOOD CELLS OF OBESE BOYS
- U. I. BURDEYKO, O. S. MOLYAVKO, D. K. KULESHOVA, O. G. MINCHENKO** RESISTENTNESS TO INSULIN CHANGES THE EXPRESSION OF GENES THAT CONTROL GROWTH AND SURVIVAL OF CELLS IN THE BLOOD CELLS OF MALE CHILDREN UNDER THE CONDITIONS OF OBESITY
- Т. О. РУСНАК, І. І. ПАНЧУК** ОТРИМАННЯ РОСЛИН-ТРАНСФОРМАНТІВ, ЩО НЕСУТЬ РЕПОРТЕРНИЙ ГЕН ПІД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА APX2 **125**
- T. O. RUSNAK, I. I. PANCHUK** OBTAINING TRANSGENIC PLANTS BEARING REPORTER GENE UNDER CONTROL OF APX2 PROMOTER
- О. Ю. ГАЛКІН, О. Б. БЕСАРАБ, А. С. ГРИШИНА, О. М. ДУГАН, Ю. М. ГУРЖЕНКО** БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКУ (HSP-60) *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ТА ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВ ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ У СЕРОЛОГІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ **130**
- O. YU. GALKIN, O. B. BESARAB, A. S. GRYSHYNA, O. M. DUGAN, YU. M. GURZHENKO** BIOTECHNOLOGY FOR OBTAINING THE RECOMBINANT HEAT SHOCK PROTEIN (HSP-60) OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* AND EVALUATION OF THE PERSPECTIVES OF ITS USE IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS
- Т. П. КАРПОВЕЦЬ, Н. В. ШАБАНОВА, В. В. КОНОПЕЛЬНИЮК, О. М. САВЧУК, Л. І. ОСТАПЧЕНКО** ВИСОКОКАЛОРИЙНОЇ ДІЄТИ У ЩУРІВ ВНАСЛІДОК СПОЖИВАННЯ ВИСОКОКАЛОРИЙНОЇ ДІЄТИ **139**
- T. P. KARPOVETS, N. V. SHABANOVA, V. V. KONOPELNYUK, O. M. SAVCHUK, L. I. OSTARCHENKO** HIGH-CALORIE DIET AS A FACTOR OF OBESITY DEVELOPMENT IN RATS
- Л. М. ЧЕБАН, І. В. МАЛІЩУК, В. Р. ЛИСАК, М. М. МАРЧЕНКО** ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИРОЩУВАННЯ *ANABAENA HASSALII* (KUTZ.) WITTR. ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ **143**
- L. M. CHEBAN, I. V. MALISCHUK, V. R. LYSAK, M. M. MARCHENKO** THE EFFICIENCY OF GROWING *ANABAENA HASSALII* (KUTZ.) WITTR. UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS
- К. О. ДВОРЩЕНКО** ВМІСТ ЕСЕНЦІАЛЬНИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРИДРІЇ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА **148**
- K. O. DVORSCHENKO** THE CONTENT OF ESSENTIAL TRACE ELEMENTS IN THE RAT PANCREAS UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA AND WITH ADMINISTRATION OF THE MULTIPROBIOTIC
- Г. П. КОПІЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА, М. Г. СКРИПНИК** ВМІСТ РІЗНИХ ФОРМ ГЕМОГЛОБІНУ В ЕРИТРОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ **153**
- G. P. KOPYLCHUK, I. M. BUCHKOVSKA, M. G. SKRYPNYK** THE LEVEL OF DIFFERENT FORMS OF HEMOGLOBIN IN THE HEMOLISAT OF THE ERYTHROCYTES OF RATS BLOOD ON CONDITION OF THE LACK OF PROTEIN
- С. В. ГОРОБЕЦЬ, О. Ю. ГОРОБЕЦЬ, І. В. ДЕМ'ЯНЕНКО, О. В. СЛИВЕЦЬ** БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ЗВОРОТНОГО І НЕЗВОРОТНОГО НАКОПИЧЕННЯ ЗАЛІЗА В *PROTEOBACTERIA* ТА *ACTINOBACTERIA* **159**
- S. V. GOROBETS, O. YU. GOROBETS, I. V. DEMYANENKO, O. V. SLYVETS** BIOINFORMATIONAL ANALYSIS OF REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE IRON ACCUMULATION IN *PROTEOBACTERIA* AND *ACTINOBACTERIA*
- Ю. В. ВАСИЛИК, Н. М. СЕМЧУК, ОК. В. ЛУЩАК** ВПЛИВ НІТРОПРУСИДУ НА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТИХ ТА ГЛУТАТІОН-ЗВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЛИСТКАХ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ **167**
- Y. V. VASYLYK, N. M. SEMCHUK, OK. V. LUSHCHAK** EFFECT OF SODIUM NITROPRUSSIDE ON ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT AND GLUTATHIONE-RELATED ENZYMES IN LEAVES OF MAIZE SEEDLINGS
- І. О. ШМАРАКОВ, В. Л. БОРЦОВЕЦЬКА, О. М. КОБИЛЯНСЬКА** БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГЕПАТОСТАТОЗУ ПРИ ВІДСУТНОСТІ ЗАПАСІВ ВІТАМІНУ А **172**
- I. O. SHMARAKOV, V. L. BORSCHOVETSKA, O. M. KOBYLYANSKA** BIOCHEMICAL FEATURES OF HEPATIC STEATOSIS UNDER THE ABSENCE OF VITAMIN A STORES
- ЕКОЛОГІЯ**
- А. Ю. ВАРИГІН** ГОРИЗОНТАЛЬНІ МІГРАЦІЇ ЧЕРНОМОРСЬКИХ КРЕВЕТОК БЛЯ УЗБЕРЕЖЖЯ ОДЕСЬКОГО ЗАЛИВУ В ПЕРІОД ДО І ПІСЛЯ СВІТАНКУ **179**
- A. YU. VARIGIN** HORIZONTAL MIGRATION OF THE BLACK SEA SHRIMPS IN THE ODESSA BAY BEFORE AND AFTER SUNRISE
- З. БЕШЛЕЙ, С. БЕШЛЕЙ, В. БАРАНОВ, О. ТЕРЕК** ВПЛИВ СУБСТРАТІВ ВІДВАЛУ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ НА ВМІСТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ У *SORGHUM HALEPENSE* (L.) PERS **185**
- Z. BESHLEY, S. BESHLEY, V. BARANOV, O. TEREK** THE EFFECT OF COAL MINES ROCK DUMP ON THE HYDROGEN PEROXIDE CONTENT AND PEROXIDASE ACTIVITY IN *SORGHUM HALEPENSE* (L.) PERS
- О. О. ЧОВАН, В. О. ЯНЕНКО** ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ ЛЕБЕДІВ (РІД *CYGNUS*) НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ **190**
- A. CHOVAN, V. YANENKO** THE HISTORY OF SWANS (*CYGNUS*) RESEARCHES IN UKRAINE
- І. В. БРИНДЗЯ, В. В. ГРУБІНКО** СЕЗОННА ДИНАМІКА ВМІСТУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ВОДІ КОЛОДІАЗІВ НА ТЕРИТОРІЇ ПРИКАРПАТТЯ **197**
- I. V. BRYNDZYA, V. V. GRUBINKO** SEASONAL DYNAMICS OF HEAVY METALS CONTENT IN THE WELL WATER OF PRECARPATHIAN REGION

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

У журналі «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)» публікуються результати досліджень з актуальних проблем біохімії, біотехнології, молекулярної генетики, екології, ботаніки, ґрунтознавства, збереження біоти і біоресурсів.

Друкуються оригінальні експериментальні роботи, оформлені у вигляді статей, які раніше не друкувалися, а також наукові огляди, короткі повідомлення, матеріали конференцій та рецензії.

Повний обсяг (разом з таблицями, переліком літератури, рисунками та підписами до них, резюме двома мовами і ключовими словами) експериментальної статті не повинен перевищувати 6 повних сторінок, оглядової статті – 12 сторінок, короткого повідомлення – двох сторінок. Рукописи більшого обсягу приймаються до журналу тільки після попереднього узгодження з редколегією.

Повідомлення друкуються українською, англійською та російською мовами (в окремих випадках можливе опублікування німецькою, польською, румунською та словацькою мовами).

У певному конкретному випуску один автор має право надрукувати тільки одну самостійну статтю.

Матеріали для друку (текст, література, підписи до рисунків та ін.) подаються у паперовому (2 копії) та електронному (ідентично паперовому) вигляді, надруковані:

- у форматі, який підтримується Microsoft Word;
- через 1 інтервал, без використання переносів;
- сторінки формату А4;
- шрифт – Times New Roman Cyr 14 пунктів (список літератури,

текст у таблицях і резюме – 10 пунктів);

- поля з кожного краю по 2 см.

Кожен рукопис повинен містити:

1. **Титульний лист** (на окремому від інших частин аркуші), де подається українською та англійською мовами:

- назва статті, яка повинна коротко інформувати про її зміст;
- індекс УДК;
- прізвища та ініціали авторів;
- назва організації, у якій виконувалося дослідження (у тому числі кафедри, факультету, відділу);
- повна поштова адреса, телефон та електронна адреса (e-mail)

для оперативної співпраці з авторами із зазначенням автора, з яким слід вести листування;

➤ резюме обсягом не менше 300 слів, яке повинно коротко описувати проведені дослідження, включаючи мету, методи, результати і головні висновки;

- ключові слова (до 10 слів).

2. **Експериментальну частину** (для експериментальних робіт), структуровану на розділи:

- вступ, де зазначається актуальність та новизна обраної теми дослідження;
- матеріали та методи, де подається опис використаних методик, достатній для їх відтворення;
- результати та їх обговорення;
- висновки.

3. **Таблиці**, які мають бути пронумерованими відповідно до змісту тексту, кожна – на окремому аркуші; короткий опис кожної

таблиці подається зверху (українською та англійською мовами), а статистична або інша деталізація подається внизу у виносках; шрифт тексту в таблицях Times New Roman Cyr 10 пунктів.

4. **Ілюстрації**, пронумеровані у порядку їх обговорення у тексті та надруковані на окремому аркуші з підписами українською та англійською мовами; всі ілюстрації повинні бути якісними та читабельними після їх масштабування на 50 %, без використання великих кеглів шрифтів і стилів оформлення, які дають дуже тонкі елементи букв; вгорі на зворотному боці ілюстрації зазначається прізвище автора та назва статті.

Не припустиме повторення змісту таблиць ілюстраціями; за рівних умов надавайте перевагу ілюстраціям (графікам).

Ілюстрації повинні мати дві електронні копії у форматах Tiff- 4.0 or 5.0 (*.tif) або Paint (*.bmp); формули і рівняння необхідно подавати розробленими у спеціальних редакторах рівнянь і збереженими як окремі файли (Windows metafile, *.wmf); фінальна якість растрових ілюстрацій після масштабування повинна бути не менше 200-300 пікселів на дюйм.

5. **Список літератури**, який подається у двох варіантах: мовою оригіналу і транслітерованій або перекладений на англійську мову. Надзвичайно важливо після бібліографічних даних джерела надати цифровий ідентифікатор публікації (англ. *digital object identifier*, скорочено doi).

Список літератури слід подавати через 1 інтервал шрифтом Times New Roman Cyr 10; у переліку джерел літератури повинні переважати посилання на роботи останніх років; посилання у переліку літератури нумеруються в алфавітному порядку, а в тексті у круглих дужках подається прізвище автора і рік (якщо авторів один або двох, наводимо всіх, а якщо більше ніж 2 автори слід наводити лише перше прізвище з наступним “та ін.”, “и др.”, “et al.”).

Приклади оформлення переліку літератури:

1. Лакін Г.В. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер с англ./ Под ред. Херрингтона С., Макги Дж. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
3. Ландшафти міста Чернівці: Монографія / за редакцією В.М. Гуцуляка. – Чернівці: Рута, 2006. – 188 с.
4. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Волощук О. М. Функціональний стан мітохондріальних мембран печінки попередньо опромінених щурів з трансплантованою карциномою Герена // Доповіді НАН України. – 2007. – № 2. – С. 174 – 177.

Всі позначення і найменування фізичних та хімічних одиниць вимірювання слід наводити в системі СІ.

Публікація повинна супроводжуватися рекомендацією до друку кафедри або наукової установи, де виконувалося дослідження, та повинна бути підписаною всіма авторами на останній сторінці. Одноосібні публікації аспірантів повинні супроводжуватися дозволом керівника.

Статті рецензуються незалежними експертами, яких призначає редколегія, після чого автору надсилається примірник рукопису статті із зауваженнями рецензентів. У випадку, коли матеріали повернені на доопрацювання, автор надає аргументовану відповідь, передруковує і надсилає матеріали на адресу редакційної колегії журналу не пізніше двох тижнів.

У разі відхилення статті рецензентами автору надсилається письмове повідомлення.

Редколегія має право редагувати текст статей, рисунків та підписів до них, погоджуючи відредагований варіант з автором, а також відхиляти рукописи, якщо вони не відповідають вимогам журналу «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)».

Відповідальність за зміст матеріалів несуть автори.

Матеріали не повертаються.

Адреса редколегії: Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Інститут біології, хімії та біоресурсів, вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012, Україна.

e-mail: vb@chnu.edu.ua

Телефон для довідок: 0372-584838

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Journal «**Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems)**» publishes the results of the studies on actual problems of biochemistry, biotechnology, molecular genetics, ecology, botany, soil science, biota and bioresources preservation.

Unpublished previously and completed experimental works drawn up as articles, reviews, short communications, materials from congresses and conferences are published.

The total volume for the entire paper (including tables, references, figures and their legends, abstracts in three languages, and key words) of an experimental article should not exceed 6 pages, review – 12 pages, short communication – two pages. The papers of a larger size are submitted to the journal after previous agreement with the editorial board.

The papers are published in Ukrainian, English and Russian (in some cases it is possible to be published in German, Polish, Romanian and Slovakian).

One author is allowed to have only one single-author publication in a particular issue.

Materials for publishing (text, references, figure legends etc.) are submitted in paper (2 copies) and identical electronic version, typed:

- in Microsoft Word format;
- single line spacing, without hyphenation;
- page format A4;
- font – Times New Roman 14 (references, text in tables and abstracts – 10);

➤ all margins 2 cm.

Each manuscript must have:

1. **Title page**, where to provide in Ukrainian and English:

- title;
- UDC (Universal Decimal Classification) code;
- authors' surnames and initials;
- institution, where the study was performed (including department or faculty);
- full postal address, telephone and e-mail, indicating corresponding author;

➤ abstract (no less than 300 words), which has to describe briefly performed studies, including aim, methods, results and main conclusions;

➤ key words (no more than 10).

2. **Experimental part** (for experimental studies), structured into chapters:

- introduction, where the urgency and novelty of the performed studies are indicated;
- materials and methods, where the reproducible description of used methods is provided;
- results and discussion;
- conclusions.

3. **Tables**, which have to be numbered according to their citation in the text, each one – on a separate sheet; brief description of each table is provided on the top (in Ukrainian and English), statistical or other details are provided at the bottom in the notices; text font in the tables is Times New Roman 10.

4. **Illustrations**, numbered according to their discussion in the text and typed on a separate sheet (legends in Ukrainian and English); all illustrations have to be qualitative and readable after their scaling in 50 %; on the top of illustration underside the author and article title are provided.

The repeat of table content with illustrations is inadmissible; illustrations (figures) are primary under equal circumstances.

Illustrations must have two electronic copies in Tiff- 4.0/5.0 (*.tif) or Paint (*.bmp) formats; formulas and equations have to be provided by made in special equation editors and saved as separate files (Windows metafile, *.wmf); final quality of the illustrations after their scaling has to be no less than 200-300 pixels per inch.

5. **References**, which is provided with single line spacing, Times New Roman 10; works of the recent years should prevail in references with digital object identifier (doi) provided; references in the list are numbered in an alphabetical order, and in the text author and year are provided in round brackets (if the number of authors is one or two, all of them are indicated in references, if there are three or more authors, only one name is given with following et al.).

Examples of references:

1. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 – Vol. I. - 682 p.

2. Taub R. Liver Regeneration: from Myth to Mechanism // Nature Reviews. – 2004. – Vol. 5. – P. 836 – 847.

3. Kopylchuk H.P., Shmarakov I.O., Marchenko M.M. A possible mechanism of antitumor activity of 5-(5',6'- benzocoumaroyl-3')-methylaminouracil in vivo // Exp.Oncol. – 2007. – Vol. 29, No. 4. – P. 123 – 125.

All the designations and denominations of physical and chemical units of measurement should be given in SI system.

Official assignment from the institution where the studies were performed is required. The manuscript has to be signed by all authors on the last page. Single-author papers of post-graduate students (aspirants) must be accompanied with the scientific advisor sanction.

The articles are reviewed by the independent experts, who are selected by the editorial board, and then a copy of the manuscript with reviewer's remarks is sent to an author. If the paper is returned for the completion, the author gives a reasonable answer, reprint and send all the required materials to the editorial board of the journal no longer than in 2 weeks.

If the manuscript is rejected by the reviewers, a written notice is sent to the author.

Editorial board is allowed to edit the text of the articles, figures and their legends, coordinating the edited version with the author, and also reject manuscripts, if they don't meet the requirements of the journal «**Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems)**».

The authors are responsible for the contents of their articles.

Materials are not returnable.

Editorial board address: Chernivtsy National University named after Yuriy Fed'kovich, Institute of Biology, Chemistry and Natural Resources, Kotsyubynskyyi Str. 2, Chernivtsy, 58012, Ukraine.

e-mail: vb@chnu.edu.ua

telephone: 0372-584838

Підписано до друку 22.04.2014. Формат 60 x 84/8. Папір офсетний. Друк різнографічний.

Ум.-друк. арк. 13,1. Обл.-вид. арк. 14,1. Зам. 3-002.

Видавництво та друкарня Чернівецького національного університету

58012, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №891 від 08.04.2002 р.