ISSN 2077-1746

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

# Odessa National University Herald

•

Вестник Одесского национального университета

•

# ВІСНИК ОДЕСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

**ТОМ** 15. Випуск 17 *Біологія* 

# ВІСНИК ОДЕСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

Том 15. Випуск 17. 2010 Біологія

Українською та російською мовами

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації: серія КВ № 11455-328Р від 07.07.2006 р.

Вища атестаційна комісія України визнала журнал фаховим виданням. Постанова Президії ВАК України № 1-05/6 від 14 червня 2007 р.

Рекомендовано до друку вченою радою Одеського національного університету імені І. І. Мечникова

**Редакційна колегія журналу:** І. М. Коваль (головний редактор), О. В. Запорожченко (заступник головного редактора), В. О. Іваниця (заступник головного редактора), Є. Л. Стрельцов (заступник головного редактора), С. М. Андрієвський, Ю. Ф. Ваксман, Л. М. Голубенко, В. В. Заморов, В. Г. Кушнір, В. В. Менчук, В. А. Сминтина, В. І. Труба, А. В. Тюрін, Є. А. Черкез, Є. М. Черноіваненко

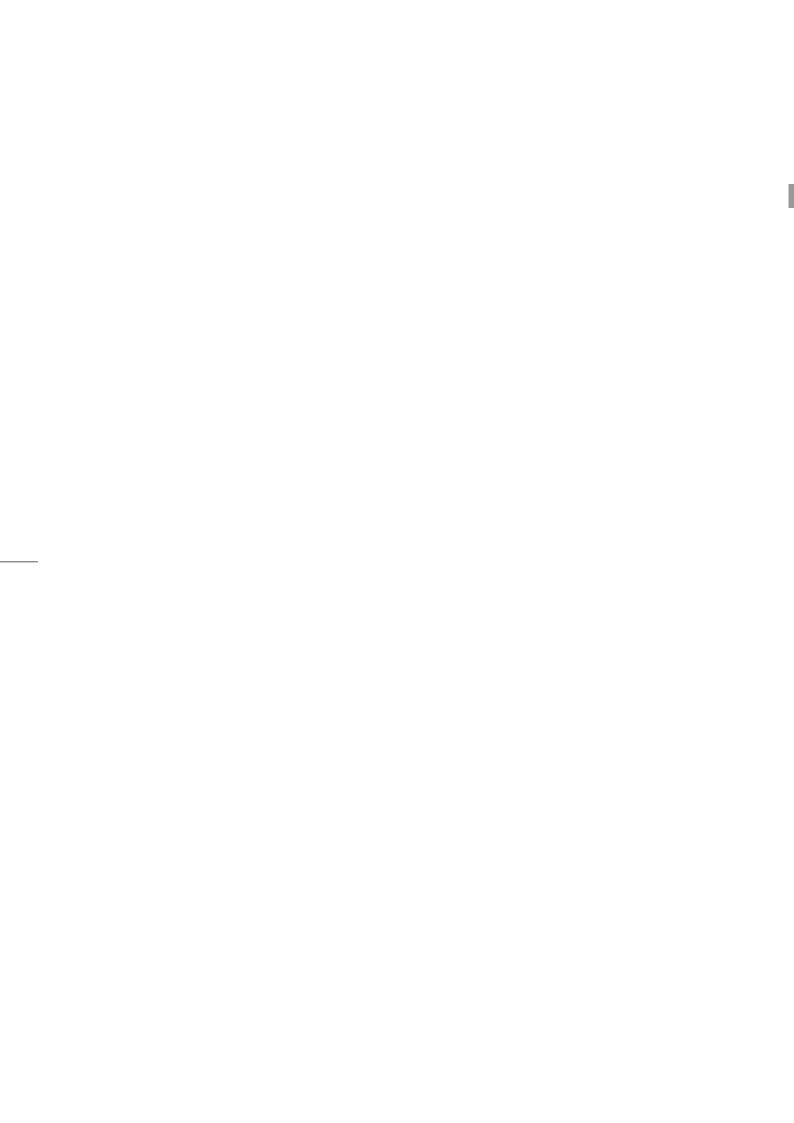
Редакційна колегія випуску: В. О. Іваниця, д-р біол. наук, професор; Б. М. Галкін, д-р біол. наук, професор; Л. М. Карпов, д-р біол. наук, професор; О. М. Слюсаренко, д-р біол. наук, професор; В. П. Стойловський, д-р біол. наук, професор; С. А. Петров, д-р біол. наук, професор; Ф. П. Ткаченко, д-р біол. наук, професор; В. М. Тоцький, д-р біол. наук, професор; Т. О. Філіпова, д-р біол. наук, професор; Б. Г. Александров, д-р біол. наук, професор (науковий редактор), Л. Б. Котлярова, канд. філ. наук, доцент, Т. Г. Алексеєва, канд. біол. наук (відповідальний секретар)

#### Адреса редколегії:

65026, м. Одеса, вул. Дворянська, 2 Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

# БІОХІМІЯ





УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

**А. М. Андриевский**, канд. биол. наук, доцент Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, e-mail: andriev scar@mail.ru

# ОРГАННО-ТКАНЕВАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У DROSOPHILA MELANOGASTER В ОНТОГЕНЕЗЕ

Исследовано органно-тканевое распределение основных типов карбоксиэстераз у личинок, куколок и имаго дрозофилы. На уровне экстрактов изолированных органов и тканей установлены места локализации холинэстераз и арилэстераз. Обнаружены онтогенетические различия в проявлении активности карбоксиэстеразами отдельных органов и тканей. Изучены эффекты ингибирования холинэстераз прозерином и фенилметилсульфонилфторидом. Обсуждается вопрос о наличии полового диморфизма по признаку проявления активности карбоксиэстераз у дрозофилы на стадии имаго.

Ключевые слова: карбоксиэстеразы, гистотопография, онтогенез, дрозофила.

Несмотря на то, что отдельные представители семейства карбоксиэстераз (КФ: 3.1.1.1—10) обнаружены у животных организмов относительно давно, биохимические знания об этой группе гидролитических ферментов до сих пор носят фрагментарный характер и требуют всестороннего уточнения и систематизации [1]. Наиболее глубоко изучена ацетилхолинэстераза нейронов некоторых рыб и млекопитающих — высокоспецифический регулятор уровня ацетилхолина в синапсах [1—3]. Установление аминокислотной последовательности, образующей наиболее важный участок активного центра этой гидролазы, а главное — наличие в ней серина, позволило отнести этот фермент к группе сериновых наряду с трипсином, химотрипсином, эластазой, акрозином и другими протеазами, легко проявляющими и эстеразную активность. Перечисленные ферменты объединяет и то, что все они ингибируются фтор-производными фосфорорганических соединений, вступающих в трудно обратимую реакцию с гидроксильной группой серина. Особый интерес представляет вопрос, связанный с определением субстратной специфичности этих энзимов. Так, химотрипсин крупного рогатого скота (согласно нашим данным [17]) обладает способностью расщеплять сложные эфиры карбоновых кислот и нафтола, более эффективно гидролизующиеся иными специализированными холинэстеразоподобными ферментами различного происхождения.

У насекомых, в частности, у тутового шелкопряда, комнатной мухи, термитов, комаров, а также у дрозофилы, обнаружены различные карбоксиэстеразы, в том числе ацетилхолинэстераза, алилэстераза и арилэстераза [1, 2, 4—11]. Поскольку в большинстве случаев авторы анализировали недифференцированные ткани всего организма, трудно судить, с какими органами связана и какую физиологическую функцию выполняет та или иная карбоксиэстераза. Что касается онтогенетических изменений в системе карбоксиэстераз на органно-тканевом уровне у насекомых, то этот вопрос представляется наименее изученным. В связи с этим данная работа выполнялась с целью исследовать распределение по

органам и тканям основных типов карбоксиэстераз у дрозофилы на отдельных стадиях ее развития.

#### Материалы и методы исследования

В основу исследования положен метод щелочного электрофоретического разделения кислых карбоксиэстераз [12] с последующим выявлением их активности посредством проведения гистохимических реакций азосочетания в полиакриламидном геле [12, 13].

В качестве объекта исследования использована лабораторная линия дикого типа плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Meigen). Исходные родительские формы были отобраны из природной популяции Одесского региона. Экспериментальную линию поддерживали в лабораторных условиях при стабильной температуре +25 °C на полной питательной среде, содержащей суспензию пекарских дрожжей, манную крупу, свекловичный сахар и водорослевый агар [14]. Потомство дрозофилы получали путем нетесного инбридинга и синхронизировали его с точностью до 1,5—2 часов. Для этого популяцию родительских форм выдерживали в течение 3—4 часов на свежей питательной среде с целью получения одноразовой кладки яиц.

В каждом варианте опыта было использовано по 10 личинок предкуколочного периода развития, 10 односуточных куколок и 10 самцов имаго первых 2—3 часов после вылета. В отдельном случае в эксперимент включали молодых виргинных самок из той же имагинальной популяции.

Выделение органов и тканей, приготовление их экстрактов, проведение электрофореза и определение активности карбоксиэстераз осуществляли следующим образом.

Отмытую в дистилляте от питательной среды личинку помещали в каплю (5 мкл) 0,9 % физиологического раствора на предметном стекле и с помощью препаровальных игл отсекали вершину головного отдела. Далее автоматической микропипеткой осуществляли забор всей гемолимфы и переносили ее в эппендорф, смешивая с 30 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера рН 9,0 с добавкой 1 % тритона X-100. После сбора гемолимфы к личиночному препарату добавляли 10 мкл солевого раствора и последовательно удаляли головной мозг (сохраняя комплекс: протоцеребрум — дейтоцеребрум — тритоцеребрум), слюнные железы (попарно), средний кишечник (отсекая заднюю кишку по месту соединения ее с мальпигиевыми сосудами), жировое тело и кутикулу. Органы в порядке их выделения быстро промывали в физиологическом растворе (объем 10—15 мл) и помещали в лизирующий буфер с тритоном, взятый в объеме 30 мкл. Имагинальные диски (первая пара головного отдела) личинки, а также зачаточные гонады выделяли с помощью микропипетки, оснащенной капиллярным наконечником. У куколок, после разрыва пупариума и покровных оболочек, отбирали только гемолимфу с фрагментированными жировыми телами.

Самцов имаго перед препарированием наркотизировали диэтиловым эфиром в течение 5 минут, после чего декапитировали, отсекали вершину брюшка и отбирали гемолимфу, смешанную с 5 мкл физиологического раствора. Далее выделяли половой аппарат, образуемый семенниками, придаточными железами семенников и семяизвергательным каналом, промывали его в солевом растворе и помещали в экстрагирующий буфер. В отдельном варианте опыта придаточные железы с семяизвергательным каналом отделяли от семенников и экстрагировали порознь.

Смешанные гомогенаты выделенных из 10 особей органов и тканей готовили непосредственно в эппендорфах, используя металлический притертый пес-

тик, после чего их центрифугировали при 10 000 g в течение 15 минут на холоде.

Виргинных самок гомогенизировали в системе 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0 с 1% тритоном X-100 в соотношении 1:6. Общие гомогенаты тканей куколок и имаго готовили на том же буфере, используя указанную пропорцию.

Полученные экстракты подвергали электрофоретическому разделению в условиях вертикально-пластинчатого (размеры: 140×120×1 мм) 10 % полиакриламидного геля. Перед внесением в слот гелевого блока 10 мкл пробы смешивали с 5 мкл 0,01 % бромфенолового синего, приготовленного на 60 % растворе сахарозы. В отдельных случаях предварительно к 10 мкл экстракта добавляли 5 мкл 0,05 % водного раствора прозерина («Дарница», Украина) или 5 мкл 10 мМ буферного (рН 9,0) раствора фенилметилсульфонилфторида («Sigma», США), используемых в качестве ингибиторов холинэстераз. После нанесения образцов устанавливали ток силой 10, затем 20 мА, на 10 и 20 минут соответственно, далее поддерживали его на уровне 40 мА в расчете на два гелевых блока до завершения электрофореза.

После окончания электрофоретического разделения опытных образцов, гелевые блоки отмывали от внутреннего щелочного буфера (рН 8,3—8,9) дистиллированной водой до нейтрального значения рН; затем замачивали на 15 минут в 0,1 М фосфат-фосфатном буфере рН 7,4. Нейтрализованные таким образом гелевые блоки помещали в инкубационную среду, содержащую в первом варианте 25 мг α-нафтилацетата, 25 мг β-нафтилацетата и 50 мг соли диазония — прочного синего RR, и во втором варианте — 50 мг  $\alpha$ -нафтилпропионата и 50 мг диазотата. В ряде опытов с целью усиления ингибирующего эффекта прозерина гелевые блоки после разделения в них карбоксиэстераз замачивали в 10 мл 0,005 % раствора данного соединения, после чего добавляли буфер, субстраты (α-нафтилацетат и β-нафтилацетат, вместе и раздельно) и соль диазония. Перед внесением в инкубационный буфер (0,1 М фосфат-фосфатный, рН 7,4) субстраты и диазоний отдельно растворяли в 100 мкл диметилформамида. Инкубацию проводили при температуре +25 °C в течение одного часа, после чего реакционные смеси декантировали, гели промывали дистиллятом и оставляли в водной среде на 10—12 часов для усиления эффекта окрашивания за счет продолжения процесса гидролиза остаточного количества субстрата, находящегося в структуре геля. После достижения оптимального прокрашивания геля в зонах локализации карбоксиэстераз полиакриламидные блоки сканировали, оформляли в виде электрофореграмм и анализировали, используя лицензионную компьютерную программу «АнаИС» (Поджарский М. А., Рыбалка Д. Г., 2004). Представленные в работе иллюстрации выполняли в полном соответствии с оригиналом в чернобелом варианте изображения.

При осуществлении экспериментальной части работы использовали в основном коммерческие препараты фирм «Chemapol» (Чехия) и «Reanal» (Венгрия). Для проведения электрофореза применяли прибор марки «VE-4» производства фирмы «Helicon» (Россия).

#### Результаты исследования и обсуждение

Согласно полученным данным, система карбоксиэстераз у дрозофилы дикого типа представлена четырьмя основными формами энзимов, отличающимися стабильными электрофоретическими свойствами, в частности, подвижностью в полиакриламидном геле при рН 8,9. Первая форма — наименее подвижная (Rf = 0.047) — обладает ярко выраженной  $\alpha$ -фильной нафтилацетазной либо нафтилпропионатазной активностью; вторая — со средней минимальной под-

вижностью (Rf = 0,140) — всегда проявляет невысокую строго  $\alpha$ -фильную активность по любому производному  $\alpha$ -нафтола и отличается четким фокусированием в ходе фореза; третья — со средней максимальной подвижностью (Rf = 0,210), в зависимости от источника выделения обнаруживает различный уровень  $\alpha$ -фильной активности; наконец, четвертая форма — наиболее подвижная (Rf = 0,280) — характеризуется ярко выраженной  $\beta$ -фильной эстеразной активностью, проявляющейся в присутствии  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетата, в то же время она способна расщеплять отдельно взятый  $\alpha$ -нафтилпропионат.

Наряду с основными (мажорными) формами карбоксиэстераз у дрозофилы могут встречаться и их дополнительные, слабо выраженные минорные компоненты (Rf = 0,444,0,560,0,675), разнообразие которых определяется, на наш взгляд, как органно-тканевыми, так и онтогенетическими особенностями.

Согласно нашим данным, распределение определенных форм карбоксиэстераз по органам и тканям у личинок и имаго дрозофилы носит специфический характер (рис. 1 и рис. 2). Так, в гемолимфе личинок обнаруживается высокая активность быстроподвижной карбоксиэстеразы, всегда проявляющей  $\beta$ -фильность по отношению к нафтолпроизводным. В то же время остальные фракции эстераз либо вовсе отсутствуют, либо встречаются в следовых количествах. На стадии имаго в гемолимфе самцов наблюдается усиление  $\alpha$ -фильной активности как медленноподвижной, так и среднеподвижных форм карбоксиэстераз. При этом  $\beta$ -фильный фермент остается высокоактивным.

Общей особенностью головного мозга личинок и головного отдела самцов имаго является то, что они обладают сильно выраженной активностью первых трех форм α-фильных карбоксиэстераз, в то время как β-фильная фракция эстеразы выявляется исключительно в тканях головного отдела взрослой мухи. В слюнных железах личинок активность медленноподвижных α-фильных эстераз оказывается едва выраженной при полном отсутствии других форм. Еще менее выражено проявление тех же фракций ферментов в тканях пищеварительного канала личинок дрозофилы. Что касается жирового тела, то представленное у личинок ассоциированной тканью, оно содержит две четко фокусирующиеся формы карбоксиэстераз: медленноподвижную и среднеподвижную, проявляющие α-фильность в системе с двумя субстратами. Одни и те же формы фермента встречаются и в гемолимфе куколок, и в гемолимфе самцов, что связано с фрагментацией жирового тела во время окукливания личинок и присутствием его фрагментов в кровеносной системе на всех последующих стадиях развития. Поэтому можно предположить, что «чистая» гемолимфа куколок и имаго, так же, как и гемолимфа личинок, практически не содержит α-фильных форм карбоксиэстераз.

Значительное количество медленноподвижных форм эстераз связано с тканями кутикулы. В то же время здесь обнаруживаются следы быстроподвижной фракции, обладающей  $\alpha$ -нафтилацетазной и  $\alpha$ -нафтилпропионатазной активностью. При этом  $\beta$ -фильный фермент отсутствует вовсе.

Исследование карбоксиэстераз смешанных тканей полового аппарата самцов имаго показало наличие в них чрезвычайно высокой активности  $\beta$ -фильной эстеразы (рис. 1 и рис. 2). Из числа  $\alpha$ -фильных форм здесь выделяется медленно-подвижная, активно гидролизующая как  $\alpha$ -нафтилацетат, так и  $\alpha$ -нафтилпропионат. При анализе экстрактов тканей отдельно взятых семенников и придаточных желез с семяизвергательным каналом было установлено, что придаточные железы по содержанию  $\beta$ -фильной эстеразы во много раз превосходят ткань семенников. В то же время лишь ткань этих органов содержит  $\alpha$ -фильные формы: медленноподвижную и среднеподвижную (рис. 1 ( $\beta_1$ — $\beta_2$ ) и рис. 2 ( $\beta_2$ )). В отличие от полового аппарата взрослых самцов, ткань зачатков гонад у личинок практи-

чески лишена трех основных форм карбоксиэстераз. Наряду с перечисленными выше органами и тканями были проанализированы экстракты первой пары имагинальных дисков головного сегмента личинок. Как видно из рисунка 1 ( $\overline{b}_1$  и  $\overline{b}_2$ ), в этих структурах представлены три из четырех форм карбоксиэстераз, которые обнаруживаются у дрозофилы. При этом активность β-фильной формы проявляется крайне слабо. Примечательной особенностью изучаемых форм карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго дрозофилы оказалось то, что основная медленноподвижная, а также средняя быстроподвижная формы, обладающие

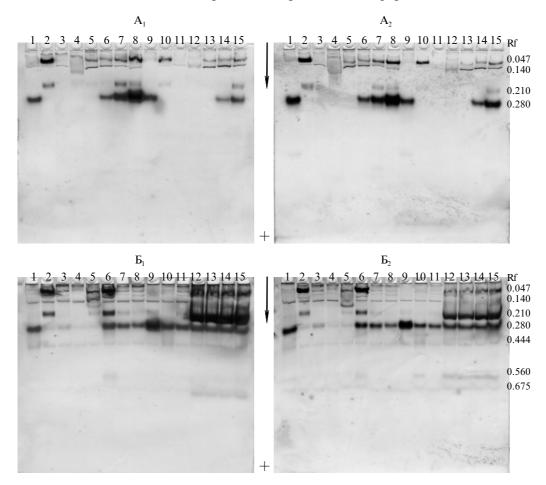


Рис. 1. Электрофоретические спектры карбоксиэстераз изолированных органов и тканей личинок, куколок и имаго Drosophila melanogaster:

Гель  $A_1$ . Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат. Треки: nuчинки: 1 — гемолимфа, 2 – – головной мозг. — слюнная железа, 4 — кишечник, 5 — жировое тело; *куколки:* 6 — гемолимфа; *имаго о* о : 7 — гемолимфа, 8 — половой аппарат; *личинки*: 9 — гемолимфа + прозерин, 10 — головной мозг + прозерин, 11 — слюнная железа + прозерин, 12 — кишечник + прозерин, 13 — жировое тело + прозерин; куколки: 14 — гемолим- $\phi a +$  прозерин; *имаго*  $\sigma \sigma$ : 15 — гемолим $\phi a +$  прозерин.

 Гель А<sub>2</sub>. Субстрат: α-нафтилпропионат. Описание треков то же, что и для геля А<sub>1</sub>.
 Гель Б<sub>1</sub>. Субстраты: α-нафтилацетат + β-нафтилацетат. Треки: *личинки*: 1 — гемолимфа, 2 — головной мозг, 3 — имагинальные диски, 4 — гонада, 5 — кутикула; *имаго* σ'σ': 6 — головной отдел, 7 — гемолимфа, 8 — семенник, 9 — придаточная железа семенника; *личинки*: 10 — гемолимфа + прозерин; *имаго* об: 11 — гемолимфа + прозерин; *имаго виргинные*  $\phi$ : 12—15 — органно-тканевая смесь. Гель  $G_2$ . Субстрат:  $\alpha$ -нафтилиропионат. Описание треков то же, что и для геля  $G_1$ . Вертикальными стрелками

указано направление движения ферментов в ходе электрофореза

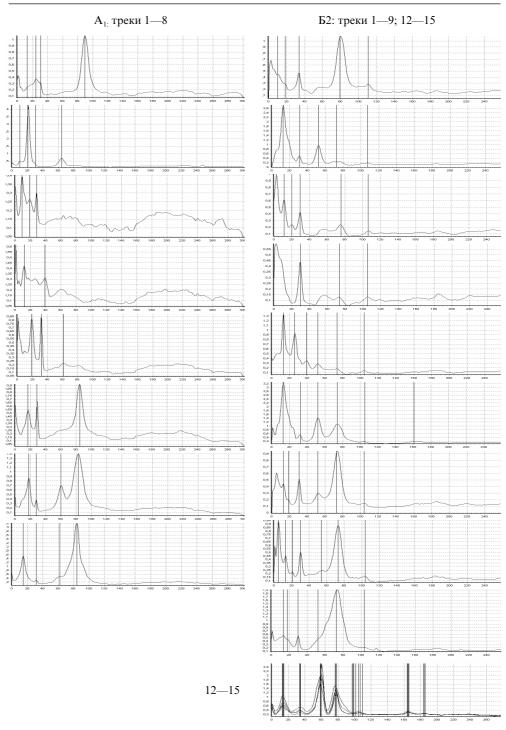


Рис. 2. Денситограммы отдельных треков гелевых блоков, представленных на рисунке 1:

По оси x — длина трека (пиксели); по оси y — оптическая плотность фракций, соответствующих локализации карбоксиэстераз в гелевом блоке ( $\Delta Do$ , относительные единицы). Нумерация треков: сверху — вниз

α-фильной карбоксиэстеразной активностью, сильно подавляются двумя различными по химической природе соединениями, являющимися специфическими ингибиторами сериновых гидролаз и, в частности, холинэстераз, —фенилметилсульфонилфторидом и прозерином. Наиболее эффективно прозерин действует на указанные две формы карбоксиэстераз после их электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (рис. 3  $(A_1 - A_2)$  и рис. 4  $(A_1 - A_2)$ ). Введение же этого соединения в экстракт перед форезом приводит к менее выраженному ингибированию. Это можно объяснить, с одной стороны, тем, что моле-

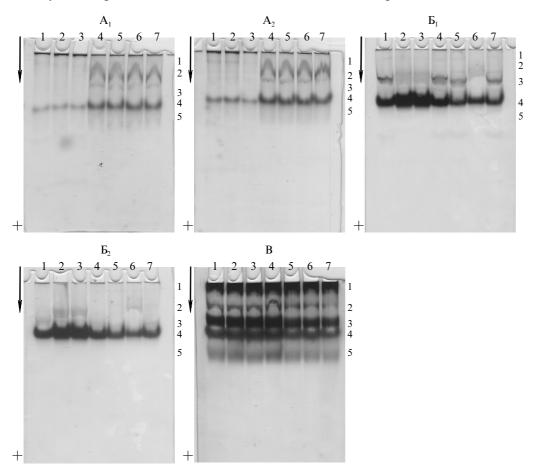


Рис. 3. Влияние прозерина и фенилметилсульфонилфторида на карбоксиэстеразы тканей *Droso*phila melanogaster:

Гель  $A_1$ : прозерин. Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат. Треки: 1-3 — куколки; 4-7 — имаго. Гель  $A_2$ : прозерин. Субстрат:  $\alpha$ -нафтилпропионат. Треки: 1-3 — куколки; 4-7 — имаго.

Гель  $\mathbf{b}_1$ : фенилметилсульфонилфторид. Субстрат:  $\alpha$ -нафтилпропионат. Треки: 1 —  $\sigma \sigma$  контроль; 2—3 –

гот + 10 мМ фенилметилсульфонилфторид; 4 — σ'σ' + 0,025 % прозерин; 5 — οφ контроль; 6 — οφ + 10 мМ фенилметилсульфонилфторид; 7 — οφ + 0,025 % прозерин. Гель ь: фенилметилсульфонилфторид; 7 — οφ + 0,025 % прозерин. Гель ь: фенилметилсульфонилфторид. Субстрат: ρ-нафтилацетат. Треки: описание то же, что и для геля ν Гель ν В: контроль. Субстрат: ν-нафтилацетат. Треки: 1—4 — σ'σ'; 5—7 — νφ. Цифры по вертикали — номера ферментов в порядке возрастания электрофоретической подвижности: 1 — ацетилхолинэстераза (тетрамер,  $\alpha$ -специфичная B-эстераза), 2 — ацетилэстераза ( $\alpha$ -специфичная C-эстераза), 3 — ацетилхолинэстераза (димер,  $\alpha$ -специфичная B-эстераза), 4 —  $\beta$ -специфичная эстераза (A-эстераза), 5 — ацетилхолинэстераза (мономер, α-специфичная В-эстераза). Вертикальными стрелками указано направление движения ферментов в ходе электрофореза

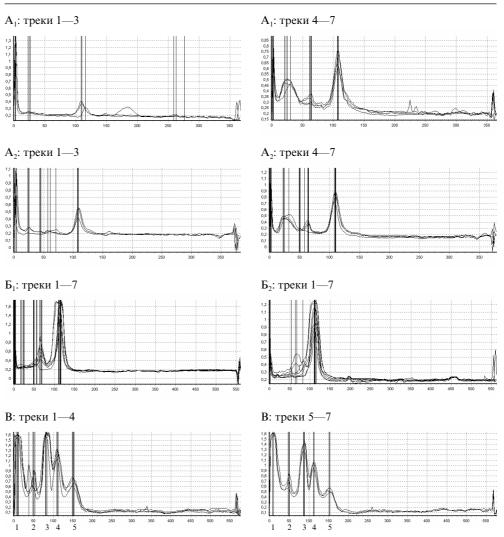


Рис. 4. Денситограммы треков гелевых блоков, представленных на рисунке 3:

По оси x — длина трека (пиксели); по оси y — оптическая плотность фракций, соответствующих локализации карбоксиэстераз в гелевом блоке (относительные единицы). Цифры по горизонтали — номера ферментов в порядке возрастания электрофоретической подвижности: 1 — ацетилхолинэстераза (тетрамер,  $\alpha$ -специфичная B-эстераза), 2 — ацетилхотераза (аспецифичная C-эстераза), 3 — ацетилхолинэстераза (димер,  $\alpha$ -специфичная B-эстераза), 4 —  $\beta$ -специфичная эстераза (A-эстераза), 5 — ацетилхолинэстераза (мономер,  $\alpha$ -специфичная B-эстераза)

кула неостигмина, являясь органическим катионом, связывается с анионным центром холинэстераз путем образования ионной связи, которая может нарушаться при разнонаправленном движении кислых холинэстераз и основного прозерина в условиях щелочного электрофореза. С другой стороны, если после электрофореза сохраняются эквимолярные соотношения между ингибируемыми ферментами и ингибитором, то частичное восстановление эстеразной активности во время инкубации можно рассматривать как результат конкурентного взаимодействия субстратов с прозерином за место в активном центре фермента. Иначе проявляется действие на те же формы карбоксиэстераз фенилметил-

сульфонилфторида. Этот органический ингибитор, связываясь с гидроксильной группой серина в активном центре холинэстеразоподобных ферментов, практически необратимо инактивирует их, независимо от того, на каком этапе выделения фермента подействовал ингибитор.

Наблюдаемые результаты инактивации прозерином и фенилметилсульфонилфторидом первой и третьей  $\alpha$ -фильных форм карбоксиэстераз дают основание полагать, что связанная с тканями головного сегмента (головной мозг личинки, ткани головы имаго, инервирующие органы аксоны нейронов) наименее подвижная и, вероятно, наиболее высокомолекулярная форма представляет собой ацетилхолинэстеразу, тогда как вторая, связанная с теми же тканями более подвижная форма, является холинэстеразой. Оба этих фермента, очевидно, образуют группу алифатических карбоксиэстераз (группу B) у дрозофилы, подобную таковой у млекопитающих [1]. Вторая форма карбоксиэстеразы, имеющая место, по данным электрофоретического анализа, во многих органах и тканях, практически не ингибируется ни неостигмином, ни фтор-производным и, по всей видимости, представляет C-группу карбоксиэстераз. В ходе индивидуального развития дрозофилы эта эстераза характеризуется относительной стабильностью в проявлении активности по используемым в опыте синтетическим субстратам.

Что касается четвертой,  $\beta$ -фильной формы карбоксиэстеразы, имеющей ярко выраженные онтогенетические и органно-тканевые особенности в проявлении активности, то она слабо подавляется прозерином и сильно активируется 10 мМ фенилметилсульфонилфторидом, непосредственно введенным в экстракт тканей имаго перед электрофоретическим разделением ферментов (рис. 3 ( $B_1$ – $B_2$ ) и рис. 4 ( $B_1$ – $B_2$ )). Проводя аналогию с подобными ферментами высших животных [1, 2, 15, 16], можно заключить, что этот энзим представляет собой ароматическую карбоксиэстеразу группы A. На стадии личинки локализация этой аромэстеразы связана исключительно с гемолимфой, тогда как на стадии имаго у самцов этот же фермент присутствует и в тканях головного отдела, и в тканях семенников, и особенно высоко его содержание в придаточных железах полового аппарата.

В отдельном экспериментальном исследовании были обнаружены черты полового диморфизма по уровню проявления активности аромэстеразы у репродуцирующих самок и половозрелых самцов имаго (рис. 3 (В) и рис. 4 (В)). Более высокий уровень активности этого фермента наблюдался у самцов. Вместе с тем в суммарных тканях самок при относительно низком уровне арилэстеразы отмечался очень высокий уровень холинэстеразы. Можно предположить, что активация ароматической эстеразы у самок ассоциирована с началом репродуктивного периода. Об этом свидетельствует крайне низкая активность этого фермента у молодых виргинных самок (рис. 1 ( $E_1 - E_2$ ) и рис. 2 ( $E_3$ )). Наблюдаемая на электрофореграммах степень интенсивности окрашивания зон локализации аромэстеразы тканей самок достигается лишь к 12 часу дополнительной инкубации, тогда как высокий уровень проявления активности их холинэстеразы может быть зарегистрирован уже через 1 час. Высказанное предположение подтвердится, если будет показано, что в процессе геронтогенеза виргинные самки будут сохранять низкий уровень арилэстеразы, в отличие от активно репродуцирующих самок.

# Выводы

1. Система кислых карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* представлена четырьмя основными четко различающимися типами ферментов, два из которых можно отнести к группе алифатических эстераз (группа *B*: ацетилхолинэс-

тераза и холинэстераза), один — к группе C и один — к группе ароматических эстераз (группа A: арилэстераза).

- 2. Карбоксиэстеразы группы *B Drosophila melanogaster* сильно подавляются фенилметилсульфонилфторидом и прозерином; эстераза *C* обладает устойчивостью к действию этих соединений; аромэстераза мало чувствительна к прозерину и сильно активируется фтор-производным.
- 3. У личинок и имаго дрозофилы органно-тканевое распределение карбоксиэстераз носит специфический характер: аромэстераза в основном локализована в гемолимфе личинок и в придаточных железах и гемолимфе самцов имаго; ацетилхолинэстераза и холинэстераза содержатся в тканях нервной системы у личинок, а также в тканях головного отдела самцов имаго; С-эстераза присутствует в небольшом количестве практически во всех органах и тканях.
- 4. По проявлению активности карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* наряду с органно-тканевыми наблюдаются ярко выраженные онтогенетические и половые различия.

#### Литература

- 1. *Диксон М.*, Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Изд. в 3-х т. Т. 1. 389 с.
- 2.  $\Phi$ ридрих  $\Pi$ . Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М.: Мир, 1986. 374 с.
- 3. *Буданцев А. Ю., Ярков А. В., Иванова Ю. В.* Ацетилхолинэстераза в гиппокампальной формации при диссоциированном состоянии, вызванном введением физостигмина и пентобарбитала (количественное биохимическое исследование) // Нейрохимия. — 1998. — Т. 15, № 2. — С. 137—145.
- 4. Ruvolo-Takasusuki Maria Claudia C., Collet Thais. Characterization of Nasutitermes globiceps (Isoptera: Termitidae) esterases // Biochem. Genet. 2000. V. 38, N 11—12. P. 367—375.
- 5. *Хрунин А. В.* Особенности взаимодействия эстераз насекомых и млекопитающих с производными 1,3,2-дигетерафосфоринана и тио- и дитиокислот фосфора, содержащими фрагменты N-ацилированных кислот: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Московский педагогический государственный университет, 2000. 16 с.
- 6. *Иванова Е., Стойкова Т., Вълчев И., Колева С., Мурлева П.* Електрофоретично проучване на неспецифичните естерази при вида *Reticulitermes lucifugus*, разпространен в Българиа // Науч. тр. биол. / Пловдив. унив. 1999. Т. 35, № 6. С. 99—103.
- 7. Shiotsuki Takahiro, Bonning Bryony, Hirai Makoto, Kikuchi Kyoko, Hammock Bruce D. Charakterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from Bombyx mori // Biosci, Biotechnol. and Biochem. 2000. V. 64, N 8. P. 1681—1687.
- 8. *Qiao Chuan Ling, Sun Zi Qing, Liu Jun E.* New esterase enzymes involved in organophosphate resistance in *Culex pipiens (Diptera: Culicidae)* from Guang Zhou, China // J. Med. Entomol. 1999. V. 36, N 6. P. 666—670.
- 9. Tavares Mara Garcia, de Azeredo-Oliveira Maria Tercilia Vilela, Ceron Carlos Roberto. Tissue-specific expression of esterases in Triatoma infestans (Triatominae, Heteroptera) // Genet. and Mol. Biol. 1998. V. 21, N 4. P. 461—464.
- 10. Stojan Jure, Marcelo Véronique, Estrada-Mondaca Sandino, Klaebe Alain, Masson Patrick, Fournier Didier. A putative kinetic model for substrate metabolisation by Drosophila acetylcholinesterase // FEBS Lett. 1998. V. 440, N 1—2. P. 85—88.
- 11. *Shi Mingan, Yuan Jianzhong, Wu Jun, Zhuang Peijun, Tang Zhenhua.* Studies on the kinetics of acetylcholinesterase in the resistant and susceptible strains of housefly // Entomol. Sin. 2001. V. 8, N 1. P. 30—38.
- 12. *Андриевский А. М., Кучеров В. А.* Выделение и идентификация карбоксиэстераз из *Drosophila melanogaster //* Вісник ОНУ. 2004. Т. 9. Вип. 2. С. 11—22.
  - 13. *Берстон М.* Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1965. 464 с.
  - 14. *Медведев Н. Н.* Практическая генетика. М.: Наука, 1966. 240 с.
  - 15. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.

- 16. *Лизосомы. Методы исследования /* Под ред. Д. Дингла. М.: Мир, 1980. 342 с.
- 17. Андриевский А. М., Кучеров В. А., Тоцкий В. Н. Система карбоксиэстераз Drosophila melanogaster в онтогенезе // Вісник ОНУ. 2007. Т. 12. Вип. 5. С. 7—18.

#### О. М. Андрієвський

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики і молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, e-mail: andriev\_scar@mail.ru

#### ОРГАНО-ТКАНИННА ЛОКАЛІЗАЦІЯ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ОНТОГЕНЕЗІ

#### Резюме

Досліджено органо-тканинний розподіл основних типів карбоксиестераз у личинок, лялечок та імаго дрозофіли. На рівні екстрактів ізольованих органів і тканин встановлено місця локалізації холінестераз та арилестераз. Знайдено онтогенетичні відмінності в прояві активності карбоксиестераз окремих органів і тканин. Вивчено ефекти інгібування холінестераз прозерином та фенілметилсульфонілфторидом. Обговорюється питання про наявність статевого диморфізму за ознакою прояву активності карбоксиестераз у дрозофіли на стадії імаго.

Ключові слова: карбоксиестерази, гістотопографія, онтогенез, дрозофіла.

#### A. M. Andrievsky

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65026, Ukraine, e-mail: andriev\_scar@mail.ru

# ORGAN-TISSUE LOCALIZATION OF CARBOXYLESTERASES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN ONTOGENESIS

#### **Summary**

Organ-tissue distribution of the main types of carboxylesterases in larva, pupae and adult *Drosophila* have studied. Localization of cholinesterase and arilesterases in the organs and tissues has been established. Ontogenetic futures in the manifestation of carboxylesterases activity in the individual organs and tissues have been detected. Study of the inhibition effects of neostigmine and fenilmetilsulfonylfluorid on cholinesterases have been studied. The question of the presence of sexual dimorphism in carboxylesterases activity on the stage imago of *Drosophila* has been discussed.

Key words: carboxylesterase, histotopography, ontogenesis, Drosophila.

УДК 577.127.3:616.036.12

О. М. Єршова, канд. біол. наук, ст. наук. співр. Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра фізіології людини і тварин, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

# АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ БІОМАСИ ШТАМІВ СПІРУЛІНИ НА ФОНІ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ У ЩУРІВ

Досліджено вплив біомаси штамів Spirulina platensis (дикий тип, штам 27G та 198В) на вміст продуктів перекисного окислення ліпідів та активність глутатіонредуктази печінки та нирок щурів на фоні хронічного стресу. Встановлено, що процедура внутрішньошлункового введення шурам фізіологічного розчину щодобово протягом двох тижнів викликає посилення перекисного окислення ліпідів і пригнічує активність глутатіонредуктази. Внутрішньошлункове введення за такою ж схемою щурам біомаси різних штамів спіруліни знижує інтенсивність перекисного окислення ліпідів, посилює активність глутатіонредуктази, що свідчить про адаптивну та антиоксидантну дію спіруліни для організму щурів.

**Ключові слова:** хронічний стрес, спіруліна, перекисне окислення ліпідів, глутатіонредуктаза, щури.

Сильні впливи оточуючого середовища, як правило, викликають стрес в організмі людини і тварин. При нетривалому впливі стресу помірної інтенсивності відбувається посилення функціонування органів і мобілізація організму. Однак, при інтенсивному та тривалому стресі в клітинах відбувається активація вільно-радикального окислення, зниження синтезу білка та його денатурація. Це призводить до патологічних змін у всіх органах і тканинах і, таким чином, стрес-реакція з ланцюга адаптації перетворюється в ланцюг патогенезу [1]. Одним з можливих механізмів швидкої реакції на стрес  $\varepsilon$  активація перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), внаслідок чого порушується рівновага між прооксидантною та антиоксидантною системами, що, в свою чергу, потребує нормалізації цього процесу. У зв'язку з цим стає актуальною проблема пошуку нових джерел антиоксидантів. Саме серед природних біологічно активних речовин такої дії великої уваги дослідників заслуговує біомаса синьо-зеленої водорості Spirulina platensis, яка має виражені антиоксидантні властивості. На фоні прийому біомаси спіруліни за деяких патологій та впливу несприятливих патогенних та екстремальних факторів відмічено зниження перекисного окислення ліпідів в органах і тканинах та посилення системи антиоксидантного захисту. Відомо, що клітинні компоненти Spirulina platensis пригнічуюче діють на РНК- і ДНК-вміщуючі віруси, у тому числі на вірус імунодефіциту людини [2], володіють протимікробною, антикоагулянтною, осморегулюючою активністю [3], а сульфатовані полісахариди поряд з глікопротеїдами є основою протипухлинних препаратів, одержуваних з цієї водорості [4]. Встановлено, що антиоксидантна дія спіруліни обумовлена фікобіліпротеїнами, β-каротином, фенольними кислотами, токоферолами, сульфатованими полісахаридами [5]. В ряді робіт показано, що основним антиоксидантом  $\epsilon$  фікобіліпротеїн — c-фікоціанін [6].

Крім процесів вільно-радикального окислювання, в клітинах в умовах дії різних агентів звичайно вивчають і активність ферментів антиоксидантного за-

хисту, тому що їх показники перебувають у постійній взаємозалежності один від одного. Збалансованість між рівнем перекисного окислення ліпідів і антиоксидантним захистом є необхідною умовою для підтримки нормальної життєдіяльності клітини. Зміщення цієї рівноваги є однією з перших неспецифічних ланок у розвитку патології і може служити тією біологічно важливою зміною внутрішнього середовища клітини, що запускає інші механізми захисту [1].

Мета даної роботи — порівняти дію біомаси штаму дикого типу (ДТ)  $Spirulina\ platensis$  та його мутантних штамів 198В та 27G на швидкість перекисного окислювання ліпідів, а також на активність антиоксидантного ферменту глутатіонредуктази (ГР) на фоні хронічного стресу у щурів для пошуку можливостей зменшення його наслідків.

## Матеріали і методи дослідження

Експеримент проводили на 40 білих безпородних самцях шурів вагою 180—200 г, поділених на 5 груп по 8 тварин у кожній: 1-а група — інтактні тварини; 2-а група — тварини, яким внутрішньошлунково протягом двох тижнів щодобово вводили фізіологічний розчин (ФР) в об'ємі 2 мл за допомогою зонду; 3, 4, 5-а групи — тварини, що отримували біомасу штамів спіруліни ДТ, 198В і 27G відповідно. Біомасу спіруліни розчиняли у ФР (по 250 мг сухої речовини на кг маси щурів) і також щодобово вводили внутрішньошлунково за допомогою зонду в об'ємі 2 мл. Тварин після наркотизації хлороформом забивали через два тижні від початку досліду за загальноприйнятою методикою. Гомогенати печінки та нирок готували, як описано в [7].

Вміст малонового діальдегіду визначали за допомогою тіобарбітурової кислоти, як описано в [8]. Глутатіонредуктазну активність в гомогенатах досліджуваних органів вимірювали по швидкості окислення відновленого НАДФ $H_2$  у реакційному середовищі (100 мМ Na-K-фосфатний буфер, рН 6,6; 0,075 мМ глутатіон окислений, 0,063 мМ НАДФ $H_2$ , ферментний препарат). Реакцію ініціювали окисленим глутатіоном. Динаміку зменшення концентрації НАДФ $H_2$  реєстрували на протязі 5 хв. при  $\lambda$  340 нм [7].

## Результати дослідження та їх обговорення

При проведенні дослідження було встановлено, що процедура введення щурам внутрішньошлунково ФР викликає в них стан, подібний до хронічного стресу. В результаті цього кількість кінцевого продукту ПОЛ — малонового діальдегіду в печінці щурів збільшувалася в 1,7 рази порівняно з інтактними тваринами, що свідчить про значну інтенсифікацію вільно-радикального процесу. Всі три штами спіруліни достовірно зменшували дію хронічного стресу: дикий тип і штам спіруліни 198В — в 1,3 і в 1,65 рази відповідно, штам 27G — в 1,5 рази (рис. 1). Найбільш уповільнює процес вільно-радикального окислювання біомаса штаму спіруліни 198В та і, таким чином, має найбільшу антиоксидантну дію.

Спіруліна містить речовини антиоксидантного ряду (бета-каротин, фікобіліпротеїни, глутатіон, глутамінову кислоту, селен, супероксиддисмутазу) і завдяки оптимальному співвідношенню ненасичених і насичених жирних кислот забезпечує високу антиоксидантну й мембранопротекторну активність [9]. Біомаса мутантних штамів 198В и 27G має більш сильну антиоксидантну дію, ніж традиційно використовувана біомаса штаму ДТ. Імовірно, це пов'язано з тим, що обидва штами відрізняються підвищеним вмістом компонентів, які мають антиоксидантну дію: сірковміщуючих амінокислот, фенілаланіну, а також піг-

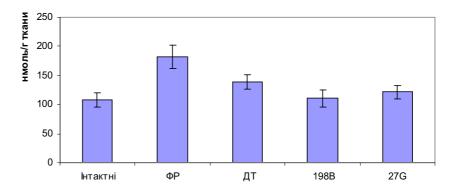


Рис. 1. Вміст малонового діальдегіду в печінці щурів на фоні хронічного стресу та прийому біомаси штамів спіруліни

ментів — c-фікоціаніну, алофікоціаніну і хлорофілу a, а штам 198В — ще й підвищеним вмістом каротиноїдів [10].

Дослідження активності глутатіонредуктази печінки тварин, які перебували в стані хронічного стресу після процедури введення ФР показало (рис. 2), що активність цього ферменту знижувалась в 1,35 рази порівняно з інтактною групою тварин. Після додавання в раціон щурів біомаси різних штамів спіруліни активність цього антиоксидантного ферменту підвищувалась. Так, ГР активність зростала у групах, які одержували біомасу штамів спіруліни ДТ, 198В та 27G в 1,12, в 1,24, та в 1,34 рази відповідно. В тих групах, де найбільш зростала активність глутатіонредуктази — знижувався рівень вільних радикалів.

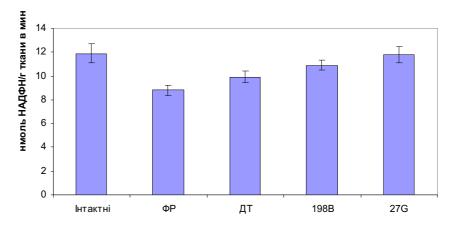


Рис. 2. Активність глутатіонредуктази в печінці щурів на фоні хронічного стресу та прийому біомаси штамів спіруліни

При дослідженні впливу хронічного стресу та дії біомаси вказаних штамів спіруліни на вміст малонового діальдегіду в нирках шурів встановлено (рис. 3), що швидкість вільно-радикального окислювання зростає у другій групі тварин в 1,44 рази. В той же час біомаса спіруліни пригнічує зростання показника кількості вільних радикалів: так, біомаса штамів ДТ та 27G зменшує вміст одного з кінцевих продуктів вільно-радикального окислювання — малонового діальдегі-

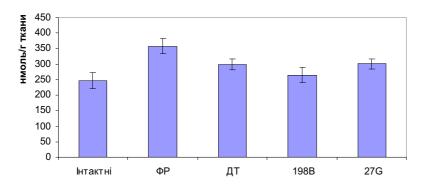


Рис. 3. Вміст малонового діальдегіду в нирках щурів на фоні хронічного стресу та прийому біомаси штамів спіруліни

ду — в 1,2 рази, тоді як біомаса штаму 198В — в 1,35 рази. Відомо, що штам спіруліни 198В містить в своєму складі β-каротини, що, ймовірно, впливає на результати дослідження.

При вивченні рівня активності глутатіонредуктази в нирках щурів на фоні хронічного стресу та під впливом біомаси штамів спіруліни встановлено (рис. 4), що у другій групі тварин хронічний стрес викликає зменшення активності цього антиоксидантного ферменту в 1,4 рази, тоді як всі три штами спіруліни достовірно підвищують активність ГР. Найбільш ефективна активація антиоксидантного ферменту спостерігається під впливом біомаси штаму 27G, при цьому рівень глутатіонредуктази підвищується практично до контрольного показника.

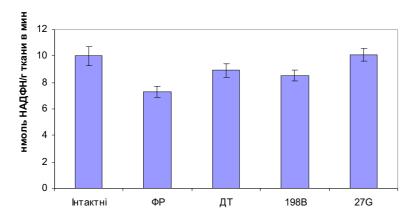


Рис. 4. Активність глутатіонредуктази в нирках щурів на фоні хронічного стресу та прийому біомаси штамів спіруліни

Можна припустити, що активність глутатіонредуктази зростає за рахунок того, що до складу синьо-зеленої водорості входить потужний антиоксидант глутатіон, і, можливо, за рахунок додаткового синтезу даної речовини з цистеїну, вміст якого в використаних штамах значно підвищений. Це, у свою чергу, ймовірно, впливало і на активність глутатіонредуктази, оскільки глутатіон є субстратом цього антиоксидантного ферменту.

#### Висновки

- 1. Процедура внутришлункового введення щурам ФР за допомогою зонду викликає у них:
  - а) посилення процесу утворення вільних радикалів;
  - б) пригнічує активність глутатіонредуктази.
- 2. Додавання до раціону щурів біомаси всіх штамів спіруліни виявляє їх антиоксидантні властивості:
  - а) пригнічення процесу вільно-радикального окислювання;
  - б) активацію глутатіонредуктази.
- 3. Найбільш виражену антиоксидантну дію виявлено у мутантних штамів 198В та 27G.

## Література

- 1. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи соврем. биол. — 1991. — Т. 111. — Вып. 6. — С. 923—932.
- 2. Лоенко Ю. Н. и соавт. Биологически активные полисахариды морских цветковых растений // Раст. рес. — 1991. — 27, № 3. — С. 150—157.
- 3. Сиренко Л. А., Козицкая В. Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. — К.: Наукова думка, 1988. — 253 с.
- 4. Апрышко Г. Н., Нехорошев М. В. Противоопухолевые препараты из морских
- организмов // Медицина и здравоохранение. 1986. № 2. С. 17—23. 5. Овсянникова Т. Н., Миронова Н. Г., Заболотный В. Н., Губанова А. Г., Полищук Л. Я., Виноградова Г. Ю., Забелина И. А., Карпенко Н. А. Состав и антиоксидантная активность комплекса биополимеров из Spirulina platensis (Nordst.) Geitl // Альгология. — 1998. — Т. 8, № 1. — С. 75—81.
- 6. Pinero Estrado J. E., Bermejo Bescos P., Villar del Frasno A. M. Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protein extract // Farmaco. — 2001. — Vol. 56 -7). — P. 497—500.
- 7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Учеб. пособие под ред. М. И. Прохоровой. — Ленинград: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. — C. 181—183.
- 8. Стальная Д. И., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // В кн.: Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — C. 68.
- 9. Majit K., Dua S., Ahluwalia A. S. Biochemical studies on spirulina proteins // Spirulina ETTA Nat. symp. MCRC. — Madras, India, 1992. — P. 78—84.
- 10. Каракас С. Г., Карпов Л. М., Драгоева Е. Г., Лавренюк Т. И., Сагариц В. А., Марченко В. С. Биохимический состав биомассы штаммов Arthrospira (Spirulina) platensis // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № (2). — С. 58—63.

#### О. Н. Ершова

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра физиологии человека и животных, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

#### АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОМАССЫ ШТАММОВ СПИРУЛИНЫ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА У КРЫС

#### Резюме

Исследовано влияние биомассы штаммов Spirulina platensis (дикий тип, штаммы 198В и 27G) на фоне хронического стресса на содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность одного из ферментов антиоксидантной защиты — глутатионредуктазы в печени и почках крыс. Установлено, что процедура внутрижелудочного введения крысам физиологического раствора вызывает усиление перекисного окисления липидов и подавляет активность глутатионредуктазы. Внутрижелудочное введение крысам по такой же схеме штаммов спирулины снижает интенсивность перекисного окисления липидов, усиливает активность глутатионредуктазы, что свидетельствует об адаптационных и антиоксидантных возможностях спирулины для организма.

**Ключевые слова:** хронический стресс, спирулина, перекисное окисление липидов, глутатионредуктаза, крысы.

#### O. N. Yershova

Odesa National Mechnykov University, Department of man's and animal's physiology, Dvoryanska St., 2, Odesa, 65026, Ukraine

# ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF BIOMASS SPIRULINA STRAINS ON THE BACKGROUND OF CHRONICAL STRESS IN RATS

#### Summary

There's analyzed the influence of biomass of *Spirulina platensis* cultures (wild type, strains 198B and 27G) on the background of chronical stress on the content of lipid peroxidation products and on the activity of antioxidative protection enzyme — gluthationreductase in liver and kidneys of rats. It is fixed that the procedure of in-stomachal injection of physiological solution leads to the lipid peroxidation-strengthening and suppresses the activity of gluthationreductase. In-stomachal injection of different spirulina strains decreases lipid peroxidation-activity, increases gluthationreductase activity, that testifies to adaptive and antioxidative abilities of spirulina for an organism.

**Key words**: chronical stress, spirulina, lipid peroxidation, gluthationreductase, rats.

УДК 557.12.577.112:24

А. Б. Ель Та'алу, аспірант,

М. В. Гоенага, мол. науковий співробітник,

**Є. Е. Перський,** д-р біол. наук, проф., зав. кафедрою біохімії Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра біохімії,

пл. Свободи, 4, м. Харків, 61077, Україна тел.: +38 (057) 707-55-02, e-mail: epersky@list.ru

# ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗВ'ЯЗКУ МІЖ ОКИСЛЮВАЛЬНИМ ДЕЗАМІНУВАННЯМ І ТЕРМОСТАБІЛЬНІСТЮ КОЛАГЕНУ ШКІРИ

Вивчено зв'язок між віковими змінами окислювального дезамінування  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп лізилу та гідроксилізилу в колагені шкіри і термостабільністю його надмолекулярних структур у шурів лінії Wistar. Показано, що, підвищуючись до 3-місячного віку, вміст вільних  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп в колагені залишається далі постійним, в той час як вміст вільних СОН-груп, починаючи з одного місяця, неухильно знижується з віком. У відповідності з цим внутрішньомолекулярне поперечне зв'язування колагенових надмолекулярних структур знижується від 1 до 3 місяців, після чого постійно підвищується до 24 місяців. Міжмолекулярне зв'язування не змінюється до 3-місячного віку, після чого теж починає збільшуватися. Це призводить до зниження їх термостабільності у період від 1 до 3 місяців з подальшим її ростом до 24 місяців.

**Ключові слова:** вік, колаген, окислювальне дезамінування, поперечне зв'язування, термостабільність.

Однією з вікових змін сполучнотканинного матриксу є підвищення його структурної стабільності, що супроводжується порушенням функціональних властивостей сполучної тканини в старому віці [1-3].

Суттєва причина цього явища — віковий розвиток сітки поперечних міжмолекулярних ковалентних зв'язків у надмолекулярних колагенових структурах, які виконують у матриксі арміруючу роль [1, 4, 5].

Начальним етапом цього процесу є посттрансляційне ферментативне окислювальне дезамінування  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп лізилу та гідроксилізилу в поліпептидних ланцюгах колагену із наступним перетворенням цих залишків у аллізил та гідроксиаллізил, які містять, замість  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-, альдегідні СОН-групи. В подальшому поперечні ковалентні зв'язки утворюються при взаємодії або двох СОН-груп (внутрішньомолекулярні зшивки — альдолі), або  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп з СОН-групами (міжмолекулярні зшивки — шифові основи) [6—8].

Показано, що залежності інтенсивності як синтезу, так і внутрішньоклітинного процесингу колагену від віку являють собою криві з максимумами [9]. Природно, що це може приводити до особливостей вікових змін структурної стабільності колагенових надмолекулярних утворень. На цей час, однак, це питання ще не вивчено.

Метою цієї роботи було дослідження вікових особливостей зміни структурної стабільності надмолекулярних колагенових структур та їх зв'язок із ступенем окислювального дезамінування  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп лізилу і гідроксилізилу в сумарному колагені шкіри щурів на різних етапах онтогенезу.

## Матеріали і методи дослідження

Досліди проведені на шкірі 1-, 3-, 12- и 24-місячних щурів — самців лінії Вістар.

При проведенні дослідів дотримувались правил виконання медико-біологічних досліджень у відповідності з міжнародними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) і норм біомедичної етики, у відповідності з Законом України «Про захист від жорстокого поводження».

Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом.

Для вимірювання ступеня окислювального дезамінування колагену зразки шкіри спини (20×5) мм з довгою стороною вздовж хребта очищували від підшкірно-жирового шару й волосяного покрову і розтирали в рідкому азоті до порошкоподібного стану. Колаген екстрагували з порошку 1M NaCl та вилучали з екстракту діалізом [10]. Концентрацію колагену розраховували за гідроксипроліном [11].

Один зразок колагену отримували з шкіри чотирьох 1-місячних, двох 3-місячних та одної 12- і 24-місячної тварини. В дослідах було використано 8—9 зразків колагену щурів кожного віку.

Ступінь окислювального дезамінування лізилу та гідроксилізилу оцінювали за вмістом вільних е-аміно- та альдегідних груп, які вимірювали методами [12] і [13] відповідно.

Структурну стабільність колагенових структур визначали за термостабільністю, для чого вимірювали кінетику їх руйнування в шкірі, яку прогрівали в дистильованій воді при 60 °С (з розрахунку 20 мг тканини на 1 мл H<sub>2</sub>O). Руйнування надмолекулярних колагенових структур оцінювали за їх розчинністю, вимірюючи кількість часток молекул колагену та їх агрегатів, що вийшли у розчин. Для цього вимірювали в ньому кількість гідроксипроліну після 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 і 120 хвилин прогрівання шкіри. Ступінь розчинності розраховували, як кількість гідроксипроліну, що вийшов у розчин, до його початкової кількості в зразку і виражали в %. За отриманими даними будували залежності ступеня розчинності від часу. Швидкість розчинності розраховували за тангенсом кута нахилу дотичної до відповідних ділянок кінетичних кривих на їх напіввисотах.

Рівень ковалентного поперечного зв'язування колагенових надмолекулярних структур визначали електрофоретично за питомим вмістом часток молекул колагену і їх агрегатів різного ступеня полімеризації, що вийшли у розчин після прогрівання шкіри, і виражали у відсотках від загального вмісту колагену в ній.

Електрофорез  $\alpha$ -ланцюгів і їх агрегатів проводили в поліакриламідному гелі за методом [14], в апараті ПЕФА-1 у скляних трубках діаметром 3 мм і довжиною 70 мм в додецилсульфатному буфері. Концентрації верхнього (концентруючого) і нижнього (розділяючого) гелів становили 4,1 % і 6,1 % відповідно. В кожну трубку вносили 0,1 мл зразка, який містив 100—150 мкг білка. Сила струму становила 4 мА на трубку. В цих умовах послідовність виходу часток зруйнованих надмолекулярних структур така: індивідуальні поліпептидні  $\alpha$ -ланцюги молекул колагену,  $\beta$ -частки — попарно зв'язані поперечними зшивками  $\alpha$ -ланцюги, частки, які складаються з більшої кількості  $\alpha$ -ланцюгів, пов'язаних як внутрішньо-, так і міжмолекулярними поперечними зшивками [14].

Після закінчення електрофорезу, забарвлювання білка і відмивки гелів, їх денситометрували на мікрофотометрі ИФО-451. На отриманих денситограмах вимірювали площини піків, що відповідали  $\alpha$ -ланцюгам та їх агрегатам різного ступеня полімеризації і розраховували вміст цих частин в зразку в %.

Криві, що представлені на рисунках, є типовими для серії повторних вимірювань (не менш, як 8—9 зразків в кожній серії).

При статистичній обробці результатів використовували критерії вірогідності Стьюдента і Манна—Уітні. Вірогідними вважали результати з p < 0.05.

## Результати досліджень та їх обговорення

На рис. 1 представлені криві кінетики виходу в розчин колагену, при нагріванні шкіри щурів різного віку, а в табл. 1 наведено розраховані за цими кривими показники процесу руйнування надмолекулярних колагенових структур.

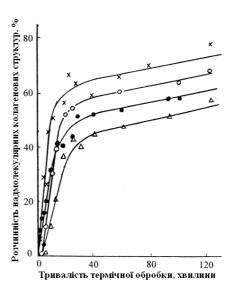


Рис. 1. Часові залежності виходу в розчин зруйнованого колагену після прогрівання шкіри щурів різного віку:

o — 1, × — 3, • — 12, 
$$\Delta$$
 — 24 mic.

Як видно, в усіх вікових групах кінетичні криві складаються з двох областей, що характеризуються різною крутизною.

Таким чином, весь досліджений процес складається з двох стадій. На першій як швидкість, так і ступінь руйнування колагенових структур в усіх досліджених вікових групах суттєво більші, ніж на другій. При цьому тривалість першої стадії з віком збільшується, а другої — зменшується (табл. 1).

Це пояснюється тим, що в колагенових надмолекулярних структурах in vivo молекули знаходяться на різних стадіях як полімеризації поперечними зв'язками, так і фізіологічної деструкції. Тому такі структури займають проміжне положення між незшитим і повністю зшитим полімером. У суті, вони являють собою просторову сітку міцно пов'язаних молекул колагену, з'єднану з слабко пов'язаними з нею молекулами, які були синтезовані недавно.

Очевидно, перша область на кінетичних кривих і, відповідно, перша стадія руйнування відповідають виходу в розчин молекул, слабко пов'язаних в надмолекулярних структурах, а друга — руйнуванню сильно, практично повністю зшитого полімеру. Оскільки, незалежно від віку, структура такого полімеру одна

й та ж, швидкість його руйнування на другій стадії не змінюється в онтогенезі (табл. 1).

Таблиця 1

Вікові зміни кінетичних параметрів процесу руйнування колагенових структур в шкірі щурів

	1-а стадія			2-а стадія				
Параметри руйнування	Вік, міс.							
рунцування	1	3	12	24	1	3	12	24
Час, хв.	18,0±	20,0±	23,0±	27,0±	102,0±	100,0±	97,0±	93,0±
	0,5	0,5*	0,5*,**	0,5*.**	0,75	0,75*	0,75***	0,75***
Ступінь, %	47,3±	59,0±	50,7±	39,5±	61,2±	73,5±	68,0±	56,0±
	2,1	4,0*	3,2*	1,9*,**	3,2	3,9*	3,8*	2,8*,**
Швидкість, % / хв.	3,5±	5,3±	3,9±	2,0±	0,119±	0,112±	0,115±	0,123±
	0,6	1,1*	0,9*,**	0,4*.**	0,014	0,008	0,012	0,016

 $\Pi$  р и м і т к а: В цій і наступній таблицях: \*— вірогідно (p < 0.05) відносно контролю (1 міс.); \*\*— вірогідно (p < 0.05) відносно попереднього значення показника.

Найбільш цікавим, однак,  $\epsilon$  те, що як швидкість, так і ступінь руйнування колагенових структур на обох стадіях підвищуються в період від 1 до 3 місяців, після чого починають знижатися. Таким чином, структурна стабільність колагенових надмолекулярних утворень в шкірі тварин знижується в період від 1 до 3 місяців і лише після цього почина $\epsilon$  безперервно збільшуватися до 24-місячного віку.

Це явище, очевидно, повинно бути пов'язане з віковою специфікою поперечного ковалентного зв'язування надмолекулярних колагенових структур.

На рис. 2 приведені електрофоретичні профілі колагену, що вийшов у розчин при нагріванні шкіри щурів різного віку, а в табл. 2 — розраховані за цими профілями кількості його поліпептидних ланцюгів з різним ступенем полімеризації.

У відповідності з даними табл. 2, в період між 1 і 3 місяцями питомий вміст індивідуальних  $\alpha$ -ланцюгів в зруйнованому колагені, які вийшли в розчин, має явну тенденцію до підвищення, а  $\beta$ -частинок, які являють собою попарно зв'язані внутрішньомолекулярними зв'язками  $\alpha$ -ланцюги, — знижується. В той же

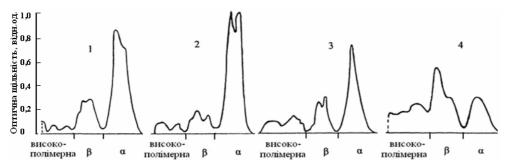


Рис. 2. Електрофоретичні профілі зруйнованого колагену, який вийшов у розчин після прогрівання шкіри щурів різного віку:

*1* — 1, 2 — 3, 3 — 12, 4 — 24 міс.

час вміст молекул колагену і окремих  $\alpha$ -ланцюгів, пов'язаних у більш високополімерні комплекси міжмолекулярними зв'язками, не змінюється. Лише після 3-місячного віку вміст індивідуальних  $\alpha$ -ланцюгів починає безперервно знижатися, а високополімерних колагенових комплексів — підвищуватися. Підвищується на цьому етапі й питомий вміст  $\beta$ -частинок.

Таблиця 2

Вікові зміни вмісту частинок різного ступеня полімеризації, які вийшли в розчин після теплового руйнування колагенових структур в шкірі щурів, %

Тип частинок	Вік, міс.					
	1	3	12	24		
α-ланцюги β-частинки Високополімерні	65,4±5,9 26,7±3,4 7,8±1,7	75,4±7,2 13,9±2,5* 10,8±2,6	49,1±5,0*,** 28,7±3,9*,** 21,9±3,3*,**	23,0±2,2*,** 40,5±5,0*,** 36,5±4,8*,**		

Виявлене явище може визначати, що у період з 1 до 3 місяців при незмінності кількості міжмолекулярних зшивок, кількість внутримолекулярних зшивок в колагенових структурах знижується. Тільки після 3-місячного віку йде паралельне утворення обох типів зв'язків. При цьому у період з 3 до 24 місяців кількість  $\beta$ -частинок підвищується в 2,9, а високополімерних — у 3,4 рази. Це може свідчити про більш інтенсивне міжмолекулярне, ніж внутрішньомолекулярне зв'язування на цьому етапі онтогенезу.

Такий механізм підтверджується результатами вимірювання вільних  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>- і СОН-груп в колагені тварин різного віку. Як видно з табл. 3, в період від 1 до 3 місяців вміст  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп в колагені підвищується, залишаючись в подальшому практично незмінним. В той же час вміст СОН-груп починає вірогідно знижуватися лише після 3-місячного віку.

Таблиця 3

Вікові зміни вмісту вільних  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-груп лізилу і гідроксилізилу і альдегідних СОН-груп аллізилу і гідроксиаллізилу в колагені шкіри щурів, мг/г колагену

Вільні групи	Вік, міс.				
	1	3	12	24	
ε-NH <sub>2</sub> - COH-	11,66±0,7 50,98±6,8	24,69±2,2* 41,39±6,3	28, 13±2,8* 33,93±2,1*	30,80±3,5* 28,67±3,9*,**	

Таким чином, виявлене збільшення ступеня руйнування колагенових надмолекулярних структур шкіри в період від 1 до 3 місяців може пояснюватися зниженням в цей час внутрішньомолекулярного поперечного зшивання в молекулах колагену при незмінності кількості в ньому міжмолекулярних зв'язків. Подальше зростання термостабільності до 24 місяців є результатом зростання кількості обох типів зшивок, з переважним утворенням останніх.

#### Висновки

1. Структурна стабільність надмолекулярних колагенових утворень шкіри щурів знижується в період від 1 до 3 місяців, після чого безперервно підвищується до 24-місячного віку.

2. В основі цього явища лежить зниження в колагені в період від 1 до 3 місяців внутрішньомолекулярних зв'язків, а після 3-місячного віку — паралельне утворення як внутрішньомолекулярних, так і міжмолекулярних зв'язків.

#### Література

- 1. *Никитин В. Н.*, *Перский Е.* Э., *Утевская Л. А.* Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. К.: Наукова думка, 1977. 242 с.
- 2. Bailey A. Y., Paul R. G. The mechanisms and consequences of the maturation and ageing of collagen // Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.). 1999. V. 111, № 1. P. 57—69.
- 3. *Vogel M. G.* Influence of maturation and ageing on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats // Mech. Ageing and Dev. 1980. V. 14, № 3—4. P. 283—292.
- 4. Yoshinori N. Stabilization mechanism of triple helical structure of collagen molecules // Intern. J. of Peptide Res. and Therapeutics. 2003. V. 10, № 5—6. P. 533—537.
- 5. Waller J. M., Maibach H. I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water and lipid content and structure // Skin Res. Technolog. 2006. Aug. 12 (3). P. 145—154.
- 6. Eyre D. R., Wu J. J. Collagen Cross Links // Topics in Current Chemistry. 2005. V. 247. P. 207—229.
- 7. Robins S. P., Bailey A. J. The chemistry of the collagen cross-links. The mechanism of stabilization of the reducible intermediate cross-links // Biochem. J. 1975. № 149 (2). P. 381—385.
- 8. Yamauchi M., Masashi M. Post-translational Modifications of Proteins: Lysine Hydroxylation and Cross-linking of collagen // Tools for Functional Proteomics. Series: Methods in Molecular Biology. 2008. V. 445. P. 95—108.
- 9. *Перский Е. Э., Йикитина Н. А., Наглов А. В., Кот Ю. Г.* Возрастные особенности индукции синтеза и интенсивности некоторых стадий процессинга коллагена в соединительной ткани под действием механической нагрузки // Биологический вестник. 2006. Т. 10, № 2. С. 126—129.
- 10. Miller E. J., Rhodes R. K. Preparation characterization of the different types of collagen // Methods in Enzymol. Structural and Contractile Proteins. Part A, Extracellular Matrix. 1982. V. 82. P. 33—64.
- 11. Утевская Л. А., Перский Е. Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. 1982. № 226. С. 18—20.
  - 12. *Бейли Дэк*. Методы химии белков. М.: Мир, 1965. 284 с.
- 13. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // Вопр. мед. химии. 2000. № 4. С. 36—47. 14. *Kubj K., Takagi T.* The б 1(I) and б 2(I) chains of collagen separate in sodium dodecil
- 14. *Kubj K., Takagi T.* The 6 1(1) and 6 2(1) chains of collagen separate in sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel electrophoresis due to differences in sodium dodecil sulfate binding capacities // Collagen and Relat. Res. 1984. V. 4, № 3. P. 201—208.

#### А. Б. Эль Та'алу, М. В. Гоэнага, Е. Э. Перский

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077,Украина, e-mail: epersky@list.ru

#### ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СВЯЗИ МЕЖДУ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ ДЕЗАМИНИРОВАНИЕМ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬЮ КОЛЛАГЕНА КОЖИ

#### Резюме

Изучена связь между возрастными изменениями окислительного дезаминирования ε-NH<sub>2</sub>-групп лизила и гидроксилизила в коллагене кожи и термостабильностью его надмолекулярных структур у крыс линии Вистар. Показано, что, повышаясь к 3-месячному возрасту, содержание свободных ε-NH<sub>2</sub>-групп в коллагене остается в дальнейшем постоянным, в то время как содержание свободных СОН-групп, начиная с первого месяца, неуклонно снижается с возрастом. В соответствии с этим внутримолекулярное поперечное связывание коллагеновых надмолекулярных структур снижается от 1 до 3 месяцев, после чего постоянно повышается до 24 месяцев. Межмолекулярное связывание не изменяется до 3-месячного возраста, после чего также начинает увеличиваться. Это приводит к снижению их термостабильности в период от 1 до 3 месяцев с дальнейшим ее ростом до 24 месяцев.

**Ключевые слова**: возраст, коллаген, окислительное дезаминирование, поперечные сшивки, термостабильность.

# A. B. El-ta'alu, M. V. Goenaga, E. E. Persky

Kharkiv National Karazin University, Svoboda sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine, e-mail: epersky@list.ru

# AGE-RELATED PECULIARITIES OF OXIDATIVE DESAMINATION AND THERMOSTABILITY OF SKIN COLLAGEN

#### Summary

The relationship between age-related changes in oxidative desamination of e-NH<sub>2</sub>-group of lysyl and hydroxylysyl in collagen and thermostability of sub-molecular structures in the skin of Wistar rats were studied. It was shown that after an increasing towards the age of 3-months, the content of free e-NH<sub>2</sub>- groups in collagen further remains constant, while at the same time, the content of free COH-groups, beginning from the age of 1-month, continuously decreased. Because of this inter-molecular cross-linking of collagenous sub-molecular structures decreased from the age of 1 to 3 months, after that, continuously increased up to the age of 24 months. This leads to decrease in their thermostability, from the age of 1 to 3 months, with further increase up to the age of 24 months.

**Key words**: age, collagen, oxidative, desamination, intermolecular cross-linking, thermostability.

УДК 577.1+678.048-056.13

О. А. Макаренко, канд. биол. наук, зав. лаб. биохимии,

А. П. Левицкий, проф., д-р биол. наук, зам. директора по науч. работе,

И. В. Ходаков, науч. сотрудник лаб. биохимии

ГУ «Институт стоматологии АМН Украины», лаборатория биохимии,

ул. Ришельевская, 11, Одесса, 65026, Украина,

тел.: +38 (048) 728-24-63, e-mail: flavan@mail.ru

# АНТИПРОТЕИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЛАВАНОИДОВ

В опытах *in vitro* изучали ингибирующее действие 9 синтетических и 3 растительных флаваноидов на протеолитические ферменты эластазу, трипсин и химотрипсин из поджелудочной железы свиньи, а также коллагеназу из *Clostridium histolyticum*. Для каждого использованного флаваноида и протеиназы установлены значения  $IC_{50}$ , по уровню которых судили о степени ингибирующей активности. Обсуждается перспективность применения флаваноидов, тормозящих активацию протеолиза, имеющую место при развитии ряда заболеваний.

Ключевые слова: ингибирование протеолиза, флаваноиды, протеиназы.

В разрушении внеклеточного матрикса при различных патологических процессах участвуют различные протеолитические ферменты, образуя мультиферментную систему, способную разрушать компоненты белкового матрикса соединительной ткани [1, 2]. Активация протеолиза имеет место при развитии ревматоидного артрита, эмфиземы легких, пародонтита, перитонита, панкреатита, туберкулеза и др. При этом ингибиторы протеиназ часто не справляются со своей задачей по поддержанию баланса в системе «фермент — субстрат — ингибитор» [3]. Поэтому поиск способов торможения гидролиза структурных компонентов внеклеточного матрикса при помощи эффективных ингибиторов протеиназ может быть важным шагом к созданию новых препаратов для лечения заболеваний, связанных с активацией протеолиза.

В этой связи особое значение имеют соединения растительного происхождения — флаваноиды. Широкий спектр их фармакологического действия осуществляется за счет способности оказывать неспецифическое действие, тормозящее развитие целого ряда патологических состояний. Такие универсальные свойства можно объяснить антиоксидантной и антифосфолипазной активностью, выраженной у флаваноидов в разной степени [4, 5, 6]. С нашей точки зрения, представляет интерес и антипротеиназное действие этих соединений. Тем более что имеются лишь единичные работы по этому вопросу [7, 8, 9].

Цель работы — оценить способность ряда синтетических и природных флаваноидов ингибировать некоторые протеолитические ферменты.

#### Материалы и методы исследования

В работе использовали коммерческие протеолитические ферменты: коллагеназу типа I A из *Clostridium histolyticum* («Sigma»), трипсин («Fluka»), эластазу и химотрипсин («Sigma») из поджелудочной железы свиньи, а также коммерческие стандарты флаваноидов: апигенин, лютеолин, кверцетин, гесперетин, нарингенин, катехин, генистеин, дайдзеин, флоретин («Sigma»). Кроме того, изучали

биофлаваноиды, выделенные из растительного сырья. Байкалин получен из корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) [10, 11], софорикозид — из плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) [12], флаволигнаны — из плодов расторопши пятнистой (*Sylibum marianum* L. Gaerth) [13, 14]. Препаратом сравнения для биофлаваноидов служил синтетический рутин («Sigma»).

Степень антипротеиназной активности (АПА) флаваноидов изучали в нескольких молярных концентрациях, позволяющих рассчитать показатель  $IC_{50}$ , равный концентрации препарата, оказывающей 50 % ингибирование. Флаваноиды растворяли в половинном объеме диметилсульфоксида и доводили до конечного объема дистиллированной водой. Для определения антипротеиназной активности раствор фермента предварительно смешивали с растворами соответствующей концентрации флаваноида в равных соотношениях и выдерживали 10 минут при комнатной температуре. После этого к смеси прибавляли раствор субстрата соответствующей протеиназы для инкубации.

Для определения антихимотрипсиновой активности (AXA) и антиколлагеназной активности (AKA) после взаимодействия с флаваноидами в качестве субстрата использовали 2 %-ный раствор казеина на 0,1 М фосфатном буфере рН 7,6 [15]. Раствор химотрипсина (0,2 мг/мл) готовили на 0,01 М ацетатном буфере рН 4,5, с 0,001 М  $CaCl_2$ , раствор коллагеназы (0,2 мг/мл) — на воде с 0,004 М  $CaCl_2$ . Инкубацию с химотрипсином проводили в течение 30, а с коллагеназой — 60 минут при +37 °C, реакцию останавливали 10 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования определяли продукты гидролиза казеина с помощью реактива Фолина [15].

Антиэластазную активность (АЭА) флаваноидов определяли по методу, в основе которого лежит гидролиз субстрата *N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester* («Sigma») [16] в нашей модификации. Суспензию эластазы («Sigma») разводили водой в 50 раз. К смеси «флаваноид + эластаза» прибавляли 1,4 мл 0,05 М фосфатного буфера рН 6,5, оставляли на водяной бане при +25 °C. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мл 0,01 М раствора *N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester* в ацетонитриле. Экстинкцию измеряли на нулевой и пятой минутах.

Антитрипсиновую активность (ATA) флаваноидов определяли по остаточной активности трипсина в реакции с субстратом *Benzoyl-DL-arginine-4-nitro-anilide hydrochloride* («Sigma») с образованием 4-нитроанилина [17].

Измерение оптической плотности осуществляли на спектрофотометре «UV mini-1240 Shimadzu» (Япония). Определения проводили в трех повторностях для каждой концентрации флаваноида. Антипротеиназную активность рассчитывали по формуле:

$$A\Pi A = \frac{\Delta E_{\phi} - \Delta E_{on}}{\Delta E_{\phi}} \cdot 100 \%,$$

где  $\Delta E_{\phi}$  — разница экстинкций в соответствующем временном интервале фермента;  $\Delta E_{\rm on}$  — разница экстинкций в соответствующем временном интервале смеси фермента и флаваноида.

Значения  $IC_{50}$  определяли с помощью регрессионного анализа с использованием программы «MS Excel» и выражали в молярной концентрации (M) [18]. Приемлемыми считали регрессии с коэффициентом детерминации  $R^2$  не ниже 0,95.

# Результаты исследования и их обсуждение

В качестве примера определения  $IC_{50}$  на рис. 1—3 приведены кривые ингибирования трипсина, эластазы и химотрипсина кверцетином — самым активным флаваноидом, по результатам представленной работы.

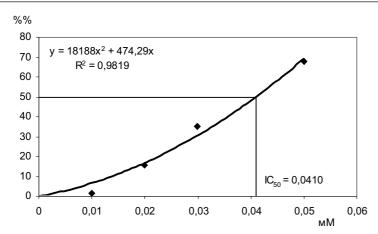


Рис. 1. Зависимость степени ингибирования трипсина от концентрации кверцетина

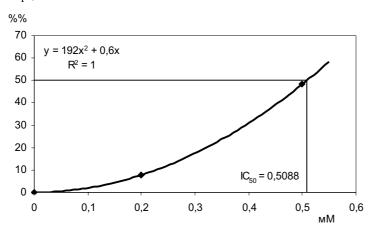


Рис. 2. Зависимость степени ингибирования эластазы от концентрации кверцетина

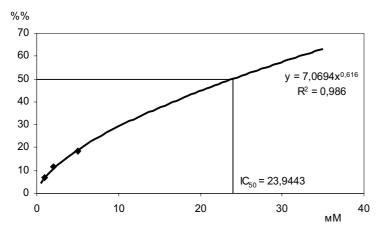


Рис. 3. Зависимость степени ингибирования химотрипсина от концентрации кверцетина

Результаты определения  $IC_{50}$  коммерческих стандартов флаваноидов по отношению к трипсину, эластазе, химотрипсину и коллагеназе обобщены в табл. 1. Все изучаемые флаваноиды, за исключением гесперетина и нарингенина, проявляли высокую способность ингибировать трипсин. Самым активным ингибитором трипсина оказался кверцетин,  $IC_{50}$  которого в 655 раз ниже, чем у самого слабого нарингенина. Достаточно активными ингибиторами трипсина можно считать апигенин и лютеолин с  $IC_{50}$  в среднем около  $1 \cdot 10^{-3}$  М. АТА дайдзеина в 2—3 раза ниже, чем у апигенина и лютеолина. Катехин и генистеин имели более высокие и примерно одинаковые значения  $IC_{50}$ . В общем, по способности ингибировать трипсин флаваноиды располагаются следующим образом: кверцетин > апигенин = лютеолин > дайдзеин > катехин = генистеин > флоретин > гесперетин > нарингенин.

Таблица 1 Антипротеиназная активность коммерческих стандартов флаваноидов

Стандарты флаваноидов	ATA	АЭА	AXA	АКА
Кверцетин Апигенин Лютеолин Гесперетин Нарингенин Катехин Генистеин Дайдзеин	$\begin{array}{c} 0,041\cdot 10^{-3} \\ 1,167\cdot 10^{-3} \\ 0,937\cdot 10^{-3} \\ 22,759\cdot 10^{-3} \\ 26,859\cdot 10^{-3} \\ 4,297\cdot 10^{-3} \\ 4,086\cdot 10^{-3} \\ 2,845\cdot 10^{-3} \end{array}$	$0,509 \cdot 10^{-3}$ $1,552 \cdot 10^{-3}$ $1,974 \cdot 10^{-3}$ Не обнаружена Не обнаружена $35,873 \cdot 10^{-3}$ $4,248 \cdot 10^{-3}$ $3,052 \cdot 10^{-3}$	23,944 · 10 <sup>-3</sup> Не обнаружена Не обнаружена 12,943 · 10 <sup>-3</sup> 6,868 · 10 <sup>-3</sup> 14,169 · 10 <sup>-3</sup> 27,581 · 10 <sup>-3</sup> 92,664 · 10 <sup>-3</sup>	Не обнаружена 24,232 · 10 <sup>-3</sup> 20,318 · 10 <sup>-3</sup> 13,710 · 10 <sup>-3</sup> 0,905 · 10 <sup>-3</sup> Не обнаружена 5,510 · 10 <sup>-3</sup> 5,028 · 10 <sup>-3</sup>
даидзеин Флоретин	$9,511 \cdot 10^{-3}$	$13,476 \cdot 10^{-3}$	Не обнаружена	$5,669 \cdot 10^{-3}$

 $\Pi$  р и м е ч а н и е. Активность: антитрипсиновая — ATA, антиэластазная — AЭA, антихимотрипсиновая — AXA и антиколлагеназная — AKA; данные отражают молярную концентрацию флаваноидов по  $IC_{50}$ 

Кверцетин оказался и самым активным ингибитором эластазы. Более низкой АЭА обладали апигенин и лютеолин,  $IC_{50}$  которых в 3—3,9 раза была выше, чем у кверцетина. Далее по степени снижения ингибиторной способности следуют дайдзеин и генистеин с примерно одинаковыми значениями  $IC_{50}$ . Самая высокая  $IC_{50}$  была установлена для катехина (35,873 ·  $10^{-3}$  M), что более чем в 70 раз выше, чем для кверцетина. Исследования не обнаружили АЭА у гесперетина и нарингенина. По степени снижения АЭА изучаемые препараты представлены таким рядом: кверцетин > апигенин > лютеолин > дайдзеин = генистеин > флоретин > катехин.

В ряду изучаемых флаваноидов самым активным ингибитором химотрипсина оказался нарингенин со значением  $IC_{50}$  6,868 ·  $10^{-3}$  М. Далее по степени снижения AXA следовали катехин и гесперетин ( $IC_{50}$  14,169 ·  $10^{-3}$  и 12,943 ·  $10^{-3}$  М, соответственно), а также кверцетин и генистеин с  $IC_{50}$  23,944 ·  $10^{-3}$  и 27,581 ·  $10^{-3}$  М соответственно. Дайдзеин оказался очень слабым ингибитором этой протеиназы с  $IC_{50}$  92,664 ·  $10^{-3}$  М. Тогда как апигенин, лютеолин и флоретин вовсе не ингибировали химотрипсин. Изучаемые флаваноиды оказались весьма слабыми ингибиторами химотрипсина, и по степени уменьшения AXA они располагаются так: нарингенин > гесперетин > катехин > кверцетин > генистеин > дайдзеин.

Наиболее выраженной способностью ингибировать коллагеназу обладал нарингенин, имеющий  $IC_{50} = 0.905 \cdot 10^{-3} \,\mathrm{M}$ . Далее в порядке снижения антиколлагеназной активности следовали генистеин, дайдзеин и флоретин с примерно одинаковыми значениями  $IC_{50}$ . Еще более низкая АКА была зарегистриро-

вана для гесперетина ( $IC_{50} = 13,710 \cdot 10^{-3} \, M$ ), апигенина и лютеолина ( $IC_{50} = 24,232 \cdot 10^{-3}, 20,318 \cdot 10^{-3} \, M$  соответственно). При этом нам не удалось установить  $IC_{50}$ для катехина и кверцетина. АКА коммерческих стандартов флаваноидов можно представить в таком порядке по степени снижения активности: нарингенин > генистеин = дайдзеин = флоретин > гесперетин > лютеолин = апигенин

Исследование коммерческих флаваноидов показало, что характер проявления степени ATA и AЭA большинства изучаемых флаваноидов схож. Самым активным ингибитором этих протеиназ оказался кверцетин. Менее активными, но с достаточно низкими значениями  $IC_{50}$  в реакции с эластазой и трипсином, были апигенин и лютеолин. Наряду с этим кверцетин, апигенин и лютеолин обладали очень низкой способностью ингибировать коллагеназу и химотрипсин. Проявление антипротеиназной активности гесперетина и нарингенина имело обратную зависимость. Так, гесперетин и нарингенин весьма слабо ингибировали трипсин, были не активны по отношению к эластазе, и в то же время нарингенин оказался самым активным ингибитором коллагеназы и химотрипсина. Флоретин, генистеин и дайдзеин можно отнести к флаваноидам со средней ингибиторной эффективностью в отношении представленных протеаз, за исключением химотрипсина. Катехин в то же время в достаточно высокой степени ингибировал только трипсин. Все изученные флаваноиды за исключением флаванонов гесперетина и нарингенина, оказались наиболее активными ингибиторами трипсина.

Результаты исследования биофлаваноидов (БФ) обобщены в табл. 2, из которой видно, что все изучаемые препараты способны ингибировать коллагеназу с явным преимуществом байкалина,  $IC_{50}$  которого в 41,8 раза ниже, чем у рутина. Вообще, АКА синтетического рутина оказалась более низкой по сравнению с природными флаваноидами. Так,  $IC_{50}$  флаволигнанов расторопши в 1,7 раза ниже, чем у рутина, а  $IC_{50}$  у софорикозида — в 7,1 раз меньше соответствующего показателя выбранного стандарта.

Таблица 2 Антипротеиназная активность природных флаваноидов

Природные флаваноиды	АКА	ATA	АЭА	AXA
Рутин Байкалин Софорикозид Флаволигнаны	$ \begin{array}{c} 16,116\cdot 10^{-3} \\ 0,385\cdot 10^{-3} \\ 2,258\cdot 10^{-3} \\ 9,311\cdot 10^{-3} \end{array}$	$\begin{array}{c} 2,233\cdot 10^{-3} \\ 11,680\cdot 10^{-3} \\ 1,355\cdot 10^{-3} \\ 0,770\cdot 10^{-3} \end{array}$	Не обнаружена Не обнаружена 4,951 · 10 <sup>-3</sup> 3,776 · 10 <sup>-3</sup>	$29,670 \cdot 10^{-3}$ Не обнаружена $16,025 \cdot 10^{-3}$ $14,254 \cdot 10^{-3}$

Примечание. Активность: антитрипсиновая — ATA, антиэластазная — AЭA, антихимотрипсиновая — AXA и антиколлагеназная — AKA; данные отражают молярную концентрацию флаваноидов по  $IC_{50}$ .

При исследовании ингибиторных свойств БФ по отношению к панкреатическим ферментам установлена самая низкая активность байкалина:  $IC_{50}$  для эластазы и химотрипсина не обнаружена, а  $IC_{50}$  для трипсина составила  $11,680 \cdot 10^{-3}$  М. Софорикозид и флаволигнаны расторопши примерно в одинаковых концентрациях оказывали 50 %-ный эффект ингибирования эластазы. А по способности ингибировать трипсин наиболее активными оказались флаволигнаны,  $IC_{50}$  которых в 2,9 раза ниже, чем у рутина, и в 1,8 раза ниже, чем у софорикозида. Софорикозид и флаволигнаны ингибировали химотрипсин с  $IC_{50}$   $16,025 \cdot 10^{-3}$ 

и  $14,254 \cdot 10^{-3}$  M соответственно, что в среднем в два раза ниже того же показателя у рутина.

Антипротеиназную активность БФ можно представить следующими рядами в порядке снижения активности. АКА: байкалин > софорикозид > флаволигнаны расторопши > рутин; АТА: флаволигнаны расторопши > софорикозид > рутин > байкалин; АЭА: флаволигнаны расторопши > софорикозид > рутин и байкалин не активны; АХА: флаволигнаны расторопши > софорикозид > рутин. Обобщая результаты исследования, важно отметить, что все изучаемые природные флаваноиды в подавляющем большинстве случаев являются более активными ингибиторами протеиназ по сравнению с рутином. Исключение составляет довольно низкая АТА байкалина и отсутствие АХА у этого биофлаваноида. Но при этом байкалин оказывается весьма активным ингибитором коллагеназы.

Таким образом, проведенное исследование показало способность коммерческих стандартов и природных флаваноидов в различной степени ингибировать некоторые протеиназы. Так, кверцетин, апигенин и лютеолин оказались активными ингибиторами эластазы и трипсина, при этом мало или вообще не активными по отношению к коллагеназе и химотрипсину. Флаваноиды гесперетин и нарингенин, наоборот, являются активными ингибиторами коллагеназы и химотрипсина при очень низкой активности по отношению к трипсину и отсутствии таковой по отношению к эластазе. Соединения генистеин и дайдзеин оказывают примерно одинаковое среднеингибирующее действие на эластазу, трипсин и коллагеназу на фоне слабого угнетения активности химотрипсина. Ингибирующая активность растительных флаваноидов также неодинакова по отношению к изученным протеиназам. Вероятно, различная степень ингибирования флаваноидами протеиназ зависит от особенностей структуры участка связывания флаваноида в молекуле фермента, что требует проведения специальных исследований.

В целом, представленные результаты свидетельствуют о широком спектре ингибирующего действия флаваноидов в отношении протеиназ, что позволяет их отнести к малоспецифическим ингибиторам этих ферментов. Полученные результаты показывают перспективность разработки лекарственных препаратов, содержащих флаваноиды, которые за счет торможения избыточного протеолиза наряду со способностью подавлять продукцию радикалов кислорода и активность фосфолипазы  $A_2$  могут оказаться высокоэффективными средствами при лечении ряда заболеваний.

#### Выводы

- 1. Установлена антипротеиназная активность 9 коммерческих стандартов флаваноидов при взаимодействии с трипсином, эластазой, химотрипсином и коллагеназой. Кверцетин, апигенин и лютеолин являются активными ингибиторами эластазы и трипсина, мало активными по отношению к коллагеназе и химотрипсину. Гесперетин и нарингенин, наоборот, активно ингибируют коллагеназу и химотрипсин на фоне низкого проявления активности по отношению к трипсину и эластазе.
- 2. Определены значения концентраций трех препаратов флаваноидов, выделенных из растительного сырья (байкалина, софорикозида и флаволигнанов), оказывающих 50 %-ное ингибирование. Показана высокая ингибирующая активность биофлаваноидов по отношению к трипсину, эластазе коллагеназе, и более низкая к химотрипсину. Рутин в большинстве случаев по сравнению с биофлаваноидами является менее активным ингибитором протеиназ.

## Литература

- 1. Хасигов П. 3., Подобед О. В., Кцоева С. А., Гатагонова Т. М., Грачев С. В., Шишкин С. С., Березов Т. Т. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека // Биохимия. 2001. Т. 66. Вып. 2. С. 167—179.
- 2. *Щепеткин И. А.* Остеокластическая резорбция кости // Успехи соврем. биол. 1996. Т. 116, № 4. С. 474—492.
- 3. Ларионова Н. И., Балабушевич Н. Г., Жатиков П. А. Взаимодействие эластазы лейкоцитов человека с фибронектином плазмы и его ингибирование соевым ингибитором протеиназ типа Баумана-Бирк // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 9. С. 1263—1268.
- 4. *Макаренко О. А.* Антиоксидантна активність біофлаваноїдів цитрусових // Медична хімія. 2009. Т. 11, № 2. С. 106—110.
- 5. *Макаренко О. А.* Антиоксидантная эффективность проростков злаковых // Фитотерапия. Часопис—2009. № 2. С. 37—42.
- 6. Левицький А. П., Розсаханова Л. Н. Вплив біофлаваноїдів на активність фосфоліпаз  $A_2$  з підшлункової залози й бджолиної отрути // Досягнення біології та медицини. 2007. № 1(9). С. 8—11.
- 7. Dell'Aica I., Caniato R., Biggin S., Garbisa S. New phytoweapons to curb leukocyte elastase // Drugs of the Future. 2006. Vol. 31 (9). P. 827—835.
- 8. *Калиман П. А., Самохин А. А., Самохина Л. М.* Влияние кверцетина на некоторые показатели системы протеиназа ингибитор протеиназ у крыс при введении им хлорида кобальта // Укр. біохім. журн. 2001. Т. 73, № 6. С. 127—130. 9. *Middleton E., Kandaswani C., Theoharides T.* The effect of plant flavonoides on
- 9. *Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.* The effect of plant flavonoides on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer // Pharmacological Review. 2000. Vol. 52, № 4. P. 673—701.
- 10. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. И. Литвиненко, Т. П. Попова, Н. И. Суслов. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1994. 223 с.
- 11. *Фитохимия* и фармакологические свойства препаратов шлемника байкальского / В. И. Литвиненко, Т. П. Попова, В. Г. Воловик, Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, Н. И. Суслов. Харьков, 2007. 763 с.
- 12. *Саилова Д. Д., Попова Т. П., Литвиненко В. И.* Флавоноиды надземной части софоры японской флоры Азербайджана // Фармаком. 1996. № 1/2. С. 36—38.
- 13. Сокольская Т. А. Создание лекарственных средств из плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества): Автореф. дис. ... д-ра фармац. наук: 15.00.02 / Московская мед. академия им. И. Н. Сеченова. М., 2000. 79 с.
- 14. *Зубченко Т. Н.* Розробка і стандартизація виробництва препаратів на основі комплексної переробки розторопші плямистої: Дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.03 / Государственный научный центр лекарственных средств. Харьков, 2008. 157 с.
- 15. *Левицкий А. П.* Методы определения ингибиторов трипсина. Казеиновый метод // Биохимические методы исследования селекционного материала: Сб. научн. трудов. 1979. Вып. XV. С. 68—71.
- 16. Visser L., Blout E. R. The use of p-nitrophenyl-N-test-butyl-oxycarbonyl-l-alaninate as subsrate for elastase // Biochem. of Biophys. Acta. 1972. Vol. 268. № 1. P. 275—280.
- 17. Адамовская В. Г., Левицкий А. П., Вовчук С. В. Взаимосвязь между уровнем протеиназ, их ингибированием и хозяйственно-полезными признаками зерна пшеницы // Научно-техн. бюлл. ВСГИ. 1980. № 3 (37). С. 25—30.
- 18. *Сернов Л. Н., Гацура В. В.* Элементы экспериментальной фармакологии. М.: Медицина, 2000. С. 117—119.

#### О. А. Макаренко, А. П. Левицький, І. В. Ходаков

ДУ «Інститут стоматології АМН України», лабораторія біохімії, вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна, тел.: +38 (048) 728-24-63, e-mail: flavan@mail.ru

#### АНТИПРОТЕЇНАЗНА АКТИВНІСТЬ ФЛАВАНОЇДІВ

#### Резюме

В дослідах *in vitro* вивчали інгібуючу дію 9 синтетичних і 3 рослинних флаваноїдів на протеолітичні ферменти еластазу, трипсин і хімотрипсин з підшлункової залози свині, а також колагеназу з *Clostridium histolyticum*. Для кожного з флаваноїдів і протеїназ встановлені значення  $IC_{50}$ , за рівнем яких оцінювали ступінь інгібуючої активності. Обговорюється перспективність застосування флаваноїдів, гальмуючих активацію протеолізу, що має місце при розвитку ряду захворювань.

Ключові слова: інгібування протеолізу, флаваноїди, протеїнази.

# O. A. Makarenko, A. P. Levitsky, I. V. Khodakov

SE «The Institute of Dentistry of the AMS of Ukraine», the laboratory of Biochemistry, Rishelievska str., 11, Odesa, 65026, phone: +38 (048) 728-24-63, e-mail: flavan@mail.ru

#### THE ANTIPROTEASE ACTIVITY OF FLAVANOIDS

#### Summary

The inhibiting effect of 9 synthetic and 3 plant flavonoids upon proteolytic enzymes — elastase, trypsin and chymotrypsin from pancreas of a pig and collagenase from *Clostridium histolyticum* were studied *in vitro*. The values of  $IC_{50}$  were determined for each flavonoid and proteinase. According to the level of them the degree of inhibiting activity was estimated. The conclusion of the availability of the application of flavonoids, braking the outburst of proteolysis, present at the development of the number of diseases was disscussed.

Key words: inhibition of proteolysis, flavanoids, proteinases.

УДК 577.15:591.466(043.5)

Л. Д. Орлова <sup>1</sup>, консультант-терапевт,

**О. В. Устянська** <sup>2</sup>, асп.,

**Н. В. Мотрук <sup>2</sup>**, ст. лаб.,

**С. С. Чернадчук** <sup>2</sup>, канд. біол. наук, доцент,

 $\mathbf{C. A. Петров}^2$ , д-р біол. наук, професор

<sup>1</sup> Науково-дослідницький інститут здоров'я родини Фонтанська дорога, 2, Одеса, 65074, Україна

<sup>2</sup> Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра біохімії, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

### АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ У РІЗНИХ ВИДІВ ЗМІЙ

Вперше виявлено наявність катепсиноподібних ферментів в препаратах, виготовлених з різних видів змій. Встановлено, що всі досліджувані препарати характеризуються наявністю активності катепсин-D-подібних протеїназ. Найбільш активними  $\epsilon$  катепсиноподібні протеїнази в препаратах з *Vipera ursini Bonap* (Гадюка степова) і з *Natrix natrix* (Вуж звичайний).

Ключові слова: катепсиноподібні протеїнази, змії.

Використання природної сировини для одержування біологічно активних сполук  $\epsilon$  важливим напрямком наукових досліджень в біології та медицині. Для лікування хвороб, особливо невиліковних, у всьому світі ведеться постійний пошук лікарських засобів з рослин, тварин і мікроорганізмів [1, 2].

Слід відзначити, що в теперішній час великий інтерес викликають препарати, виготовлені із змій. В першій половині XX ст. вчені різних країн, зокрема А. С. Мелік-Карамян з співробітниками, одержали кобротоксин — поліпептид з багатим амінокислотним складом, який використовується для лікування різних захворювань, в тому числі онкологічних [3, 4]. В сучасній медицині застосовуються ліки на основі зміїних отрут, які знімають біль, зупиняють кровотечу, лікують нервову і кісткову системи, бронхіальну астму і епілепсію [5].

Новітні винаходи пов'язані з пошуком біологічно активних сполук в організмі змії, які можуть впливати на різноманітні процеси життєдіяльності організму, метаболічну активність клітин, мають інгібуючу або розщеплюючу дію. В організмі змії знайдені нові поліпептидні сполуки, нові білки [6], ферменти [7], на культурі клітин змії вивчаються механізми проліферації [8].

Одним з головних напрямків сучасних біохімічних досліджень є вивчення протеолізу як особливої форми біологічної регуляції і протеолітичних ферментів на різних рівнях біологічної організації. Протеолітичні ферменти приймають участь в обміні білків та деградації їх аномальних молекул, в поповненні клітин амінокислотами, а також мають велике значення для розшифровки регуляторних механізмів клітин [9].

Пошук протеолітичних ферментів проводиться у різних видів змій. Існує досить численна інформація про знайдені у змій протеолітичні ферменти. Зокрема, з організму змій виділені фібринолітична протеїназа неувідаза [10], плазміноген-активуюча протеїназа [11] тощо. Але слід зауважити, що ці винаходи стосуються тільки зміїних отрут. В літературі майже не існує досліджень активності протеїназ в тканинах і органах змій.

В зв'язку з вищезазначеним мета нашої роботи полягала в дослідженні активності протеолітичних ферментів, а саме — катепсиноподібних протеїназ в препаратах, виготовлених із змій [Патент РФ № 2034550 «Спосіб П. М. Орлова одержування засобу для лікування гнійних ран»].

В процесі виконання роботи вирішували наступні завдання:

- 1. Дослідити активність катепсиноподібних протеїназ В, L, D в препаратах, одержаних з різних видів змій.
- 2. Порівняти активність катепсиноподібних протеїназ В, L, D в досліджуваних препаратах.

### Матеріали і методи дослідження

Щоб визначити активність ферментів протеолітичної системи в досліджуваних препаратах, зокрема, катепсин- В, -L, і D-подібних протеїназ, в експеримент були взяті чотири препарати, одержаних з різних видів змій. Препарати виготовлені із всього організму змії і являють собою рідину, яка легко розчиняється в воді. В ході експерименту використовувались дослідні проби препаратів, розведених дистильованою водою в різних співвідношеннях залежно від якості препаратів і методики постановки дослідів.

Для визначення активності катепсин-D-подібних протеїназ ми застосовували метод М. L. Anson в модифікації А. П. Левицького [12], заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу 1% гемоглобіну при рН 3,5, які не осаджуються 10% розчином трихлороцтової кислоти.

Визначення катепсин-L-подібних протеїназ проводили методом В. І. Чорної в модифікації І. Л. Вовчук і С. С. Чернадчук [13]. Метод, заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу білкового субстрату азоказеїна, які не осаджуються  $10\,\%$  розчином трихлороцтової кислоти.

Визначення активності катепсин-В-подібних протеїназ проводили за методом В. F. Erlanger [14]. Метод, заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу синтетичного субстрату БАПНА (N-бензоїларгінін-п-нітроанілід).

В ході експерименту проводили також визначення вмісту білка в досліджуваних зразках препаратів за методом О. Н. Lowry [15].

Статистичну значимість відмінностей між дослідними препаратами визначали за допомогою t-критерія Стьюдента [16].

### Результати дослідження та їх обговорення

Для вивчення ферментативної активності препаратів, виготовлених з різних видів змій, ми визначали наявність в них катепсиноподібних лізосомних протеїназ В ( $K\Phi$ : 3.4.22.1), L ( $K\Phi$ : 3.4.22.15), D ( $K\Phi$ : 3.4.23.5).

Всі проби препаратів, виготовлених з чотирьох видів змій, показали наявність в них катепсиноподібних В-, L- і D-протеїназ. Результати визначення активності катепсиноподібних протеїназ в препаратах, отриманих з різних видів змій, наведені на рис. 1—3.

При порівняльному аналізі активності протеолітичних ферментів в препаратах реєстрували найбільшу активність катепсин-D-подібних протеїназ, значно меншу активність проявляли катепсин-L-подібні протеїнази і зовсім незначною активністю характеризувалися катепсин-B-подібні протеїнази.

Катепсин-D-подібні протеїнази найбільшу активність виявили в препаратах, одержаних з *Vipera ursini Bonap* і *Natrix natrix*. Меншою активністю катепсин-D-подібних протеїназ характеризувалися препарати, виготовлені з *Coluber jugularis* і *Vipera berus*. Значний розбіг активності цих препаратів,

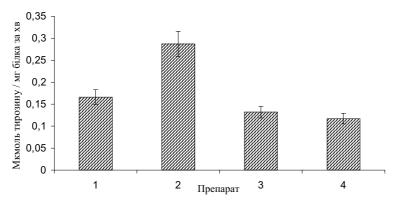


Рис. 1. Активність катепсин-D-подібної протеїнази в препаратах, отриманих з різних видів змій:

1- Natrix natrix (Вуж звичайний); 2- Vipera ursini Bonap (Гадюка степова); 3- Coluber jugularis (Жовтобрюхий полоз); 4- Vipera berus (Гадюка звичайна), n=5

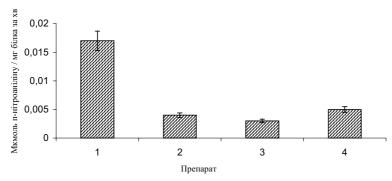


Рис. 2. Активність катепсин-В-подібної протеїнази в препаратах, отриманих з різних видів змій:

1 — Natrix natrix; 2 — Vipera ursini Bonap; 3 — Coluber jugularis; 4 — Vipera berus, n = 7

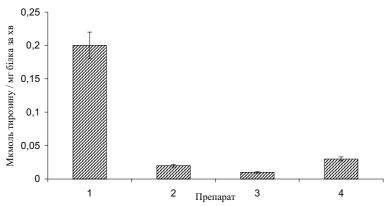


Рис. 3. Активність катепсин-L-подібної протеїнази в препаратах, отриманих з різних видів змій:

1 — Natrix natrix; 2 — Vipera ursini Bonap; 3 — Coluber jugularis; 4 — Vipera berus, n=8

очевидно, можна пояснити не тільки видом змій, але і умовами їх життя і харчування.

Вивчення лізосомних протеолітичних ферментів, зокрема, катепсинів, знаходиться в центрі наукових досліджень останніх десятиліть, що пояснюється високою ефективністю цих ферментів, участю в процесах загального і обмеженого протеолізу, в рості та метастазуванні пухлин [17].

Таким чином, виявлена присутність в досліджених препаратах катепсиноподібних ферментів свідчить про їх протеолітичну дію, особливості якої потребують подальшого дослідження.

#### Висновки

- 1. Досліджувані препарати, виготовлені із змій, характеризуються максимальною активністю катепсин-D-подібних протеїназ.
- 2. Катепсиноподібні протеїнази В та L знаходяться в препаратах в слідових кількостях.
- 3. Рівень активності катепсин-D-подібних протеїназ в досліджуваних препаратах з різних видів змій залежить від джерела їх отримання.

### Література

- 1. Пат. 2255747 Россия МКЦ А61К 35/56. Способ производства адаптогена / Одинец А. Г. № 2003123738/15; заявл. 31.07.03; опубл. 10.07.05. Бюл. № 19.
- 2. *Toxines de venin*: Des annes biologiques redoutables au servise de la santé humaine / F. Tiaho, F. Bera, N. Hussy // Medical Science Monitor. 2001. Vol. 17, № 8/9. P. 947—951.
- 3. *Мелик-Карамян А. С.* Влияние ядов среднеазиатских змей на некоторые физиологические и патологические процессы в организме / А. С. Мелик-Карамян. Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1947. 234 с.
- 4. *Баркаган 3.* Ядовитые змеи и их яды / 3. Баркаган, П. Перфильев. Барнаул: Алтайское кн. изд-во, 1967. 76 с.
  - 5. *Костнок С. С.* Нескінченний пошук / С. Є. Костюк. К.: Знання, 1971. 108 с.
- 6. MALDI-масс-спектрометрия для идентификации новых белков в яде змей / В. В. Кухтина, К. Вайзе, А. В. Рсипов [и др. ] // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26, № 11. С. 803—807.
- 7. *Isolation* and characterization of pepsinogen from *Trimeresurus flavoviridis* / Y. Hiroo, N. Tsuyoshi, U. Tetsuya [et. al.] // Journal of Biochemistry. 2000. Vol. 127, № 5. P. 755—760.
- 8. *Голубков В. С.* Перспективы получения культуры клеток, секретирующих токсичные ферменты, на примере культуры клеток эпителия околоушной железы гадюки обыкновенной *Vipera berus I* В. С. Голубков, Э. И. Лежнев // Биология клетки в культуре: Тез. докл. на Всероссийском симп., 20—22 окт. 1998 г., Санкт-Петербург // Цитология. 1999. Т. 41, № 3/4. С. 256—257.
- 9. *Локшина Л. А.* Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов / Л. А. Локшина // Биоорганическая химия. 1994. Т. 206, № 2. С. 142—143.
- 10. *Purification*, characterization and biological properties of phosphodiesterase from *Russell's viper (Vipera ruseili)* venom / Tin-Win, Aue-Kyaw, Sandia [et al.] // Snake. 1998. Vol. 28, № 1/2. P. 83—89.
- 11. *Isolation* of a proteinase with plasminogen-activating activity form *Lachesis muta muta (Bushmaster)* snake wenon / E. F. Sancher, C. L. Santos, A. Magalhaes [et al.] // Archives of Biochemistry and Biophysies. 2000. Vol. 378, No. 1. P. 131—147.
- 12. *Чернадчук С. С.* Активність катепсин В-подібних ферментів в онкопатологічних репродуктивних органах жінок / С. С. Чернадчук, І. Л. Вовчук // Вчені записки Таврійського національного університету. Сер. «Біологія». 2003. Т. 16 (55), № 22. С. 202—207.

- 13. Вовчук И. Л. Активность тканевих катепсин L-подобных протеиназ у женщин с онкопатологией тела матки / И. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук // Украинский биохимический журнал. — 2004. — № 22. — С. 56—60.
- 14. Erlanger B. F., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new ctromogenic substrates of trypsin / B. Erlanger // Archives Biochemistry and Biophysies. — 1961. — Vol. 95, № 2. — P. 271—278.
- 15. Lowry O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // The Journal of biological chemistry. — 1951. -Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
- 16. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.
- 17. Пупышев А. Б. Лизосомы человека: библиометрическая оценка актуальных направлений исследований / А. Б. Пупышев // Бюллетень СО РАМН. — 2006. — № 1 (199). — C. 106—115.

### Л. Д. Орлова $^1$ , О. В. Устянская $^2$ , Н. В. Мотрук $^2$ , С. С. Чернадчук $^2$ , С. А. Петров $^2$

- 1 Научно-исследовательский институт здоровья семьи Фонтанская дорога, 2, Одесса, 65074, Украина
- <sup>2</sup> Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра биохимии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

### АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ У РАЗНЫХ ВИДОВ ЗМЕЙ

#### Резюме

Впервые обнаружено наличие катепсиноподобных ферментов в препаратах из различных видов змей. Установлено, что все исследованные препараты характеризуются максимальной активностью катепсин-D-подобных протеиназ. Наиболее активны катепсиноподобные протеиназы в препаратах Vipera ursini Bonap и Natrix natrix.

Ключевые слова: катепсиноподобные протеиназы, змеи.

### L. D. Orlova <sup>1</sup>, O. V. Ustjanska <sup>2</sup>, N. V. Motruk <sup>2</sup>,

S. S. Chernadchuk <sup>2</sup>, S. A. Petrov <sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Family Health research Phontan Road, 2, Odesa, 65074, Ukraine
- <sup>2</sup> Odesa National Mechnykov University, Department of Biochemistry, Dvoryanska Str., 2, Odesa, 65026, Ukraine

### ACTIVITY OF CATHEPSIN-LIKE PROTEINASES OF VARIOUS SNAKES **KINDS**

### **Summary**

For the first time presence of cathepsin-like proteinases in preparations from various species of snakes is found out. It is established that all imesligated preparations are characterized by the maximal activity cathepsin-D-like proteinases. Cathepsin-like proteinases are the most active in a preparation from Vipera ursini Bonap and Natrix natrix.

**Key words**: cathepsin-like proteinases, snakes.

УДК: 577.12.577.112:577.2

### О. М. Пономаренко, аспірант

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра біохімії, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна, e-mail: Apon08@mail. ru

### ВПЛИВ ДЕФОРМАЦІЇ НА ВМІСТ ТА ЯКІСНИЙ СКЛАД ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ В ПРОТЕОГЛІКАНАХ ШКІРИ ЩУРІВ

Вивчено вплив деформації шкіри при її механічному напруженні у дослідах *in vitro* на концентрацію і питомий вміст глікозаміногліканів, а також пов'язаних з ними нефібрилярних білків в шкірі 3-місячних щурів. Методом іонообмінної хроматографії показано, що механічне навантаження в діапазоні 0—0,24 МН/м² призводить спочатку до підвищення загальної інтенсивності синтезу глікозаміногліканів та до їх сумарного накопичення в шкірі з подальшим зменшенням обох показників. Так само змінюється і вміст нефібрилярних білків, пов'язаних з глікозаміногліканами. Під дією напруження фракційний склад глікозаміногліканів змінюється. При підвищенні напруги питома доля гіалуронової кислоти спочатку росте, після чого постійно зменшується. В той же час питомі долі сульфатованих глікозаміногліканів не змінюються вірогідно з ростом напруження. Це свідчить про те, що при деформації шкіри *in vitro* частина свіжосинтезованих сульфатованих глікозаміногліканів не входить до складу протеогліканових комплексів, що, ймовірно, може привести до структурних, а тим самим і до функціональних змін її властивостей.

**Ключові слова**: сполучна тканина, протеоглікани, глікозаміноглікани, синтез, корові білки.

В останні роки з'явились численні свідоцтва того, що у фізіологічних умовах зміни механічного напруження в сполучній тканині є одним з факторів регуляції її будови і функціональних властивостей на протязі всього онтогенезу. В цьому зв'язку частково досліджені особливості синтезу, структури та властивостей головних конструкційних білкових компонентів — колагену і еластину — в різновидах сполучної тканини при дії механічного напруження [6].

Натомість, особливості механічного впливу на інтенсивність синтезу конструкційних полісахаридів сполучної тканини — глікозаміногліканів (далі ГАГ) та утворення протеогліканів в ній досі ще не вивчались і  $\varepsilon$  не розкритими.

Тому, метою роботи стало вивчення змін інтенсивності синтезу, вмісту і якісного складу ГАГ в протеогліканах сполучної тканини шкіри *in vitro*, що виникають під впливом деформації за дією механічного напруження.

### Матеріал і методи дослідження

Дослідження були проведені *in vitro* на шкірі 3-місячних щурів-самців лінії Wistar. У дослідженнях виконували правила поводження з тваринами у відповідності з міжнародними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» [2] і норми біомедичної етики у відповідності з Законом України «Про захист від жорстокого поводження».

Щурів присипляли введенням тіопенталу натрію [9], після чого декапітували. Зразки шкіри (20×5) мм з довгою стороною вздовж спини очищали від підшкірно-жирового шару і волосяного покрову. Зразки інкубували у розчині Рінгера—Кребса протягом 6 годин при t = 36 °C, розтягуючи їх у повздовжньому напрямку при статичних напруженнях (0—0,24) МН/м².

Для вивчення інтенсивності синтезу ГАГ в інкубаційний розчин добавляли <sup>14</sup>С-глюкозу (Amersham) до кінцевої радіоактивності 0,5 МБк/г зразка. Проінкубовані зразки обезжирювали спочатку ацетоном (24 години), а потім дієтиловим ефіром (24 години). Знежирені і висушені зразки шкіри зважували та розтирали в рідкому азоті до порошкоподібного стану.

Визначення радіоактивності  $^{14}$ С-глюкози, що увійшла до складу ГАГ, проводили у флаконах Бекмана в 10 мл толуольного сцинтилятора ЖС-8 і рахували на лічильнику Beckman LC-7800.

Для виділення глікозаміногліканів шкіри отримані з <sup>14</sup>С-глюкозою (Amersham) порошки піддавали ферментативному гідролізу в натрій-фосфатному буфері (pH 7,4), який містив 1мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,33 мМ MgCl<sub>2</sub> і колагеназу (з Clostridium histolyticum, тип I, Sigma-Aldrich, 200 од. /мл) на протязі 24 годин при 37 °С при постійному перемішуванні [13]. За цих умов колаген, присутній в шкірі, видалявся із зразків. Після закінчення ферментативної обробки, низькомолекулярні пептиди осаджували охолодженою до 4 °C 6 % трихлороцтовою кислотою (далі ТХО). Осад відділяли центрифугуванням (4500 g, 15 хв.) й відкидали, а супернатант використовували для подальшого виділення глікозаміногліканів. ГАГ осаджували додаванням до супернатанта 2 % хлористого цетилпіридінію (1:10) (Merck). Осадок глікозаміногліканів відділяли центрифугуванням (4500 g, 15 xв.) та тричі промивали охолодженим до 4 °C 95 % етанолом, насиченим NaCl. Промитий осад суспендували в 3 мл 10 % розчину ацетату натрію, добре перемішували та суміш фракціонували методом іонообмінної хроматографії на колонці розміром 0,9×50 см, яка була термостатована при температурі 28 °C, заповнена іонообмінною смолою Dowex 1×2 (Cl<sup>-</sup>-форма, 200-400 меш, Sigma) і забуферена 0.2M NaCl [4]. Швидкість потоку складала 1 мл/хв. Елюцію проводили з використанням ступінчастого градієнту концентрацій NaCl [4, 10]. В спеціальних експериментах з використанням стандартних зразків глікозаміногліканів (Sigma—Aldrich) було показано, що в таких умовах елюції вихід глікозаміногліканів з колонки складав 87—100 %.

Вміст гіалуронової кислоти, гепарансульфату та хондроітинсульфатів визначали за вмістом D-глюкуронової кислоти, яку визначали в аліквотах за карбазоловою реакцією. Вміст дерматансульфату оцінювали за кількістю L-ідуронової кислоти, яку виміряли в аліквотах орциновим методом [5]. Кількість білкової складової протеогліканів, яка відображає наявність корових білків, оцінювали за тирозином [16, 3], який виміряли в зразках сумарних ГАГ. При статистичній обробці результатів використовували критерії вірогідності Стьюдента і Манна—Уітні. Вірогідними вважали результати з p < 0.05.

### Результати дослідження

В табл. 1 наведено дані про залежність інтенсивності включення  $^{14}$ С-глюкози в сумарні ГАГ шкіри 3-місячних шурів від величини механічного напруження в ній, які відображають його вплив на інтенсивність їх синтезу. Вони свідчать, що загальна інтенсивність синтезу ГАГ в шкірі при підвищенні напруги в діапазоні від 0 до  $0.05 \text{ MH/m}^2$  спочатку збільшується, а потім, досягнувши максимуму, починає знижуватися. Аналогічні особливості впливу напруження, що зростає, на синтез колагену та еластину в шкірі було відмічено раніше [1, 6].

Збільшення інтенсивності синтезу ГАГ, як і конструкційних фібрилярних білків, знаходиться вірогідно в області фізіологічних навантажень, де можлива адаптивна клітинна відповідь на зовнішню напругу. Зниження ж цього показника відбувається в області напружень, де починається порушення тканинної будови, в зв'язку з чим синтетичні спроможності клітин в умовах експерименту вичерпуються.

Таблиця 1

Вплив механічного напруження на питому радіоактивність  $^{14}$ С-глюкози в загальних ГАГ, синтезованих в шкірі 3-місячних щурів *in vitro* 

Напруження, МН/м <sup>2</sup>	0	0,05	0,12	0,18	0,24
Радіоактивність, (імп/хв)/мг ГАГ×10 <sup>3</sup>	7,80±0,66	13,02±0,94*	12,68±0,80*	6,94±0,5**	7,26±0,60

Примітка. В цій і наступній таблицях: \*— вірогідно (p < 0.05) відносно контролю (напруження = 0); \*\*— вірогідно (p < 0.05) відносно попереднього значення показника; n = 5 - 6.

При дії механічного напруження в діапазоні 0—0,025 МН/м² паралельно інтенсифікації синтезу відбувається збільшення як кількості всіх типів ГАГ, так і їх загальної концентрації в шкірі. В діапазоні напруг, де інтенсивність синтезу знижується, концентрація кожного з окремих типів ГАГ і їх загальний вміст в шкірі теж зменшуються (табл. 2). Це явище може пояснюватися тим, що на початку росту напруження інтенсивність синтезу ГАГ значно перевищує інтенсивність їх фізіологічного розпаду, а після досягнення максимуму розпад починає перевищувати синтез.

Порівнювання даних табл. 2 і 3 показує, що максимуми показників включення радіоактивної мітки та загального вмісту ГАГ не співпадають. Це явище можна пояснити таким чином. Природно, що при дії механічного напруження повинна змінюватися інтенсивність не тільки синтезу ГАГ, а також і їх деградації. Отримані результати можуть свідчити про те, що максимум активності ферментів деградації ГАГ наступає пізніше, ніж максимум їх синтезу. Внаслідок цього і спостерігається зниження їх концентрації вже до досягнення максимуму остатнього.

Таблиця 2

Вплив механічного напруження на вміст глікозаміногліканів в шкірі 3-місячних щурів *in vitro*, мг/г сирої тканини

		Напруження, МН/м <sup>2</sup>				
ТИП ГАГ	0	0,025	0,05	0,18	0,24	
Гіалуронова кислота Гепарансульфат Хондроітинсульфат Дерматансульфат Кератансульфат Загальний вміст	5,0±0,37 3,7±0,33 5,3±0,55 3,5±0,29 3,6±0,24 21,3±1,5	7,7±0,56* 5,7±0,48* 7,2±0,69* 5,3±0,45* 4,4±0,39* 30,5±2,8	3,5±0,29*,** 2,8±0,34*,** 5,1±0,37*,** 3,3±0,36*,** 4,9±0,45* 20,0±1,6	1,9±0,19*,** 2,7±0,30* 3,7±0,28*,** 4,0±0,43* 2,5±0,32*,** 15,0±1,8	1,7±0,18* 3,12±0,36 3,4±0,31* 2,4±0,27*.** 1,2±0,15*.** 12,1±1,4	

Відносні зміни вмісту окремих типів  $\Gamma A\Gamma$  (як їх збільшення, так і зменшення в шкірі) в залежності від величини механічного напруження відрізняють-

ся в усьому діапазоні напруг. Це свідчить про те, що якісний склад протеогліканів, що містять різні  $\Gamma A \Gamma$ , змінюється під впливом механічної напруги (див. табл. 2)

Для з'ясування цього питання за даними табл. 2 були розраховані питомі вмісти кожного з досліджуваних типів ГАГ відносно загальної їх кількості в залежності від величини механічного напруження в шкірі.

Отримані результати наведені в табл. 3. Як бачимо, залежність питомого вмісту гіалуронової кислоти в загальній кількості ГАГ від напруження відрізняється від таких залежностей для їх сульфатованих форм.

Таблиця 3 Вплив механічного напруження на концентрацію глікозаміногліканів в шкірі 3-місячних щурів *in vitro*, %

ΓΑΓ			Напруження, М	MH/m²	
I AI	0	0,025	0,05	0,18	0,24
Гіалуронова кислота Гепарансульфат Хондроітинсульфати Дерматансульфат Кератансульфат	23,75±2,88 17,47±1,71 25,04±2,95 16,56±1,68 17,2 ±1,89	25,56±2,97 18,89±1,83 23,61±2,87 17,47±1,72 14,47±1,36	26,76±3,09	13,20±1,56*.** 18,48±1,81** 25,01±2,99 26,89±3,00*.** 16,38±1,91**	14,47±1,61* 25,73±2,97*.** 28,77±3,68 20,39±2,84*.** 10,66±1,23*.**

З ростом напруження її питомий вміст зменшується майже в 2 рази, в той час як питомий вміст сульфатованих ГАГ або зовсім не змінюється (гепарансульфат, хондроітинсульфати), або коливається відносно середніх значень (дерматансульфат, кератансульфат). Оскільки гіалуронова кислота є «стрижнем», до якого приєднуються в протеогліканах комплекси сульфатованих ГАГ, об'єднаних коровими білками, в зразках, що вміщали загальні ГАГ, була виміряна залежність кількості тирозину (табл. 4), який входить до амінокислотного складу ц и х білків [16].

Таблиця 4 Вплив механічного напруження на концентрацію тирозину в глікозаміноглікан-білкових комплексах шкіри 3-місячних щурів

Напруження, МН/м <sup>2</sup>	0	0,05	0,12	0,18	0,24
Тирозин, мг/г сирої тканини	0,86±0,17	1,10±0,25*	0,63±0,11**	0,65±0,11	0,78±0,17

Згідно з ними залежність вмісту тирозину і, відповідно, корових білків від напруження якісно подібна такій для гіалуронової кислоти.

Зменшення питомої ваги гіалуронової кислоти та корових білків на фоні майже незмінних показників для сульфатованих ГАГ вказує на накопичення в міжклітинному просторі сполучної тканини вільних ГАГ. При цьому не створюються зрілі молекули протеогліканів.

Оскільки протеоглікани відповідають за створення трьохмірної міжклітинної сполучнотканинної сітки, зменшення кількості зрілих протеогліканових комплексів при накопиченні вільних сульфатованих ГАГ повинно призвести до збільшення внутрішнього діаметру «отворів» в міжклітинній сітці. Таке порушення її будови може бути причиною змін її специфічних властивостей, в першу чергу, рівня гідратації і функціонування як молекулярного сита.

### Висновки

- 1. Загальна інтенсивність синтезу протеогліканів при дії механічного напруження у шкірі 3-місячних щурів у діапазоні 0—0,24 МН/м² спочатку зростає, досягає максимуму при 0,05 МН/м², після чого знижується.
- 2. Залежність концентрації гіалуронової кислоти, гепарансульфата, хондроітинсульфатів, дерматансульфата та кератансульфата від механічного напруження мають той же характер, що і залежність загального синтезу ГАГ від напруги. Максимум концентрації для всіх типів ГАГ спостерігається при одній і тій же величині напруження  $0,025 \text{ MH/m}^2$ .
- 3. Питомі долі гіалуронової кислоти і сульфатованих ГАГ по-різному залежать від росту напруження. Питома доля гіалуронової кислоти при дії механічного напруження вірогідно знижується. Питомі долі сульфатованих ГАГ в діапазоні 0—0,05 МН/м² вірогідно не змінюється. Однак в проміжку 0,05—0,24 МН/м² питома доля гепарансульфата та дерматансульфата збільшується. Питома доля хондроїтинсульфатів вірогідно не змінюється.
- 4. Концентрація тирозину в діапазоні 0—0,24 МН/м² спочатку зростає, досягає максимуму при 0,05 МН/м², після чого знижується.
- 5. Під впливом механічного напруження питома доля протеогліканових комплексів в шкірі знижується, а питома доля ГАГ, які не входять до складу цих комплексів, збільшується.

### Література

- 1. *Гарбузенко О. Б., Емец Е. Б, Перский Е. Э.* Влияние деформации на обмен белков и механические свойства аорты и кожи крыс in vitro // Вестн. пробл. биол. и мед. 1997. № 25. С. 19—26.
- 2. *Европейская* конвенция «По защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» [Электронный ресурс] // Совет Европы. Протокол ETS no. 170. Страсбург, 1998.
- 3. *Ёрмаков А. И., Арасимович В. В., Ярош П. Н.* Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
- 4. *Меркурьева З. В., Гусева М. Р.* Сравнительная оценка методов определения гли-козаминогликанов // Лаб. дел. 1974. № 3. С. 162—167.
- 5. *Слуцкий Л. И*. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина, 1969. 375 с.
- 6. Перский Е. Э., Никитина Н. А., Наглов А. В., Кот Ю. Г. Возрастные особенности индукции синтеза и интенсивности некоторых стадий процессинга коллагена в соединительной ткани под действием механической нагрузки // Биологический вестник 2006. Т. 10, № 2. С. 126—129.
- 7. Al Jamal R., Roughley P. J., Ludwig M. S. Effect of glycosaminoglycan degradation on lung tissue viscoelasticity // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2001. Vol. 280. P. 306—315.
- 8. Gillard G. C., Merrilees M. J. The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon // Biochemistry Journal. 1977. V. 163. P. 145—151.
- 9. *Greene S. A.* Veterinary anesthesia and pain management secrets // Henlay & Belfuc Inc. 2002. P. 99, 266.
- 10. *Hardingham T*. Chondroitin sulphate and joint disease // Osteoarthritis Cartilage. 1998. Vol. 6, suppl. A. P. 3—5.
- 11. *Kelly G. S.* The role of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate in the treatment of degenerative joint disease // Alt. Med. Rev. 1998. Vol. 3. P. 27—39.
- 12. *Verziji N.*, *DeGroot J.*, Thorpe S. R. et al. Effect of Collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products // The Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275, № 50. P. 39027—39031.

- 13. *Nagai N. A, Yunoki S., Saton Y*. et al. Method of cell-sheet preparation using collagenase digestion of salmon atelocollagen fibrillar gel // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2004. Vol. 98, № 6. P. 493.
- 14. Silver F. N., Harvarth I, Foran D. J. Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers // Crit. Rev. Biomed. Eng. 2001. Vol. 29, № 3. P. 279—301.
- 15. Stephen A. G. Effects of drugs commonly used during anesthesia on autonomic nervous system // Veterinary Anesthesia and Pain Management Secrets. 2002. Philadelphia: Hanley and Befus, Inc. P. 51, 226.
- 16. Glant T. T., Mikecz K. Age-related changes in protein-related epitopes of humanarticular-cartilage proteoglycans // Biochem. J. 1986. Vol. 236. P. 71—75.

### А. Н. Пономаренко

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, кафедра биохимии, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина, e-mail: Apon08@mail.ru

# ВЛИЯНИЕ ДЕФОРМАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В ПРОТЕОГЛИКАНАХ КОЖИ КРЫС

#### Резюме

Изучено влияние деформации кожи при ее механическом напряжении на концентрацию и удельный состав гликозаминогликанов, а также содержание связанных с ними нефибрилярными белками в коже 3-месячных крыс. Методом ионообменной хроматографии показано, что механическое напряжение в диапазоне 0—0,24 МН/м² приводит сначала к повышению общей интенсивности синтеза гликозаминогликанов и к их суммарному накоплению в коже с последующим уменьшением обоих показателей. Таким же образом изменяется и содержание нефибрилярных белков, связанных с гликозаминогликанами. Под действием напряжения фракционный состав гликозаминогликанов изменяется. При повышении напряжения удельная доля гиалуроновой кислоты сначала растет, после чего постоянно снижается. В то же время удельные доли сульфатированных гликозаминогликанов не изменяются достоверно с ростом напряжения. Это свидетельствует о том, что при деформации кожи *in vitro* часть свежесинтезированных сульфатированных гликозаминогликанов не входит в состав протеогликановых комплексов, что, по-видимому, должно вызвать структурные, а таким образом и функциональные изменения ее свойств.

**Ключевые слова**: соединительная ткань, протеогликаны, гликозаминогликаны, синтез, коровые белки.

### A. N. Ponomarenko

Kharkiv National Karazin University, Svoboda sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine, e-mail: apon08@mail.ru

## THE EFFECT OF DEFORMATION ON THE CONTENT AND QUALITATIVE GLYCOSAMINOGLYCANS COMPOSITION IN PROTEOGLYCANS OF RAT SKIN

### **Summary**

The effect of skin deformation under the influence of mechanical stress on the concentration and percent content of glycosaminoglycans, as well as non–fibrillar proteins linked with them, was studied in 3-months old rat skin. It was shown, through the method of ion-exchange chromatography, that mechanical stress within the range of 0—0,24 MN/m² first leads to an

increase in the intensity of total glycosaminoglycans synthesis and to their total accumulation in skin with their subsequent decrease in both parameters. In this way, the content of non-fibrillar proteins linked with glycosaminoglycans also changes. Under the effect of mechanical stress the fractional composition of glycosaminoglycan is changed. With increasing of mechanical stress, percent content of hyaluronic acid first rises, and then continuously decreases. At the same time, percent content of sulphated glycosaminoglycans does not change, perhaps with increasing of mechanical stress. This proves that, during deformation of the skin *in vitro*, some parts of freshly synthesized sulphated glycosaminoglycans are not included in the composition of proteoglycan complexes; this perhaps leads to the skin structural and thereby functional changes of it's properties.

**Key words**: connective tissue, proteoglycans, glycosaminoglycans, synthesis core proteins'.

УДК 547.913

О. А. Ульянова <sup>1</sup>, канд. биол. наук, доцент, ст. н. с., В. Е. Тарабанько <sup>2</sup>, д-р хим. наук, профессор, зав. лаб. <sup>1</sup> Красноярский государственный аграрный университет, пр. Мира, 90, Красноярск, 660049, Россия <sup>2</sup> Институт химии и химической технологии СО РАН, ул. К. Маркса, 42, Красноярск, 660049, Россия

# РОСТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОСТОВ НА ОСНОВЕ ЕЛОВОЙ КОРЫ И СОДЕРЖАНИЕ В НИХ ДИТЕРПЕНОВ

Методом хромато-масс-спектрометрии изучен химический состав еловой коры. Исследована ростостимулирующая активность водных экстрактов коры. Установлены корреляционные зависимости (r=0.90-0.99) между ростостимулирующей активностью водных экстрактов коры для роста бобовых и содержанием дитерпенов в коре.

**Ключевые слова**: еловая кора, гексановый экстракт, дитерпены, водный экстракт, ростостимулирующая активность.

Россия обладает четвертью мировых запасов древесины, половина из которых находится в Сибири. В процессе деревообработки образуется огромное количество отходов, которые сжигаются или вывозятся на свалки, загрязняя окружающую среду. Использование невостребованных отходов могло бы улучшить экологическую обстановку в лесных регионах России [1]. В комплексной переработке лесных ресурсов утилизация коры является наиболее слабым звеном [2]: запасы коры составляют 20—30 млн т в год, но в целевые продукты перерабатывается всего 10 % от массы образующейся коры, а многие миллионы тонн хранятся в многолетних отвалах или сжигаются [3, 4]. В то же время кора является богатым источником терпеновых соединений: монотерпенов, сесквитерпенов, дитерпенов, тритерпенов и т. д., играющих важную роль в жизнедеятельности растений, животных и человека. Известна значимая роль терпеновых соединений в почвообразовательных процессах. Вклад терпеноидов в образование гумусовых веществ почв может составлять 2—3 % [5]. Перспективно использовать кору для производства удобрительных композиций (компостов), почвогрунтов, мульчи. Об эффективности действия компостов, приготовленных на основе коры различных пород деревьев, свидетельствуют многочисленные работы [6—9]. Однако в литературе отсутствуют данные о природе (механизме) действия компостов из коры на рост растений. Поэтому целью данной работы являлось исследовать связь между химическим составом компостов из еловой коры и их рострегулирующей активностью.

### Материал и методы исследования

В качестве исходного сырья для исследования использовали кору ели (*Picea*), содержащую в своем составе в порядке убывания следующие макро- и микроэлементы (в скобках указано количество элемента в %): С (51,34) > N (0,33) K (0,22) > Ca (0,20) > Mg (0,20) > P (0,04) > Fe (0,03) > > Zn (0,029) > Mn (0,021) > B (0,01) > V (0,006) > Sr (0,0014) > Pb (0,0013) >

> As (0,001) > Co (0,001) > Cd (0,0005). Содержание токсичных элементов в коре ниже ПДК, что обуславливает возможность ее использования. Кора ели характеризуется высоким содержанием углерода и низким — азота (отношение C:N составляет 156). Для того чтобы уменьшить это отношение, кору ели компостировали в течение 12 месяцев в аэробных условиях при 60 % влажности, при температуре 18—21 °C с NP-удобрениями: CO(NH $_2$ ) $_2$  в количестве 1,5 % и Ca(H $_2$ PO $_4$ ) $_2$  в дозе 0,25 % на а. с. м. коры. В компост на основе еловой коры, кроме указанных добавок, вносили вермикулит Татарского месторождения, расположенного в Красноярском крае.

Для изучения рострегулирующей активности компостов из коры готовили водный экстракт (ВЭ): измельченную до размера частиц 0,5—1,0 мм пробу коры или компоста заливали горячей водой в соотношении 1:20 и настаивали в течение часа, периодически перемешивая полученную смесь. Указанное соотношение (кора: вода) оптимизировалось в предварительных опытах и использовалось нами ранее [10]. После охлаждения фильтровали ее через бумажный фильтр (белая лента). В качестве тест-объекта были взяты черенки фасоли по методике [11], которые получали из 10-суточных проростков фасоли, выращенных на почве в лабораторных условиях, при температуре 20—24 °C при достаточном освещении. Затем черенки срезали и помещали в стаканы с подготовленными водными экстрактами для укоренения. В каждый стакан помещали по 3 черенка фасоли. Повторность опыта трехкратная. В качестве контроля служил вариант с кипяченой водопроводной водой. Укоренение черенков фасоли происходило при комнатной температуре в течение 2 недель. Затем на каждом черенке определяли количество и длину образовавшихся корней, общую массу сформировавшейся корневой системы фасоли.

Для изучения химического состава исходной и компостированной коры измельченные до размера частиц 0,5—1,0 мм пробы экстрагировали гексаном в соотношении 1:20. Компонентный состав гексановых экстрактов исходной и компостированной коры ели исследовали методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890 A (фирмы США) с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5975 С в качестве детектора. Анализ проводили на 30 м кварцевой колонке НР-5 (сополимер 5 %-дифенил-95 % диметилсолаксана) внутренним диаметром 0,25 мм. Газ-носитель — гелий, 1 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл рабочего раствора. Температура испарителя 280 °C. Температура колонки: 40 °C (3 мин), 40—270 °C (6 °C/мин), с последующей выдержкой при 270 °C (25 мин). Температура интерфейса между газовым хроматографом и масс-селективным детектором — 280 °C. Температура источника ионов — 173 °C. Энергия ионизирующих электронов — 70 эВ. Содержание компонентов вычисляли по площадям газохроматографических пиков без использования корректирующих коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении полных масс-спектров с данными библиотеки масс-спектрометрических данных Wiley 275 (275 000 масс-спектров), а также по атласам масс-спектров.

Обработка и анализ полученных результатов проведен статистическими методами с использованием программных пакетов «Excel».

### Результаты исследования и их анализ

Полученные результаты показывают, что в гексановых экстрактах во всех вариантах опыта преобладают дитерпеновые соединения, составляющие от 47 до 92 % от общего химического состава экстракта (рис. 1).

Фитостерины в составах гексановых экстрактов в зависимости от варианта опыта занимают 29—31 %, а жирные кислоты — 9—22 %. Содержание моно-

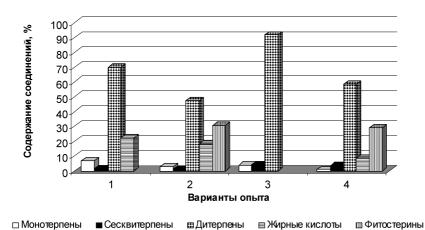


Рис. 1. Химический состав гексановых экстрактов коры ели и компостов на ее основе:

I— исходная кора; 2 — компостированная кора без добавок; 3 — компостированная кора с NP-удобрениями; 4 — компостированная кора с NP-удобрениями и вермикулитом

терпеновых и сесквитерпеновых соединений мало и составляет  $3-7\ \%$  и  $1-4\ \%$ , соответственно. Следует отметить, что в еловой коре, компостированной с минеральными удобрениями, дитерпены составляют до  $92\ \%$  от общего количества соединений.

Методом хромато-масс-спектрометрии в гексановых экстрактах идентифицированы монотерпены (борнил ацетат,  $\alpha$ -пинен), сесквитерпены (кариофилленоксид), жирные кислоты (олеиновая, эйкозановая, докозановая), фитостерины (стигмаст-4-ен-3-он,  $\gamma$ -ситостерин) (табл. 1).

	Еловая кора				
Название соединения	исходная	компости- рованная без доба- вок	компости- рованная с NP-удоб- рениями	компостированная с NP- удобрениями и вермику- литом	
α-Пинен	0,12	0,05	0,13	_	
Борнил ацетат	1,01	0,06		0,23	
Кариофиллен оксид	0,70	0,45	0,55	1,4	
Маноилоксид	1,56	0,68	1,46	2,24	
Маноол	7,70	3,01	2,64	12,02	
12-нор-амбреинолид	2,80	2,46	_	1,22	
8,12-эпокси-13 гидрокси лабд-14-ен	3,82	1,50	1,24	4,12	
Каурен-16-ен-18-оиковая кислота	7,40	2,86	1,02	3,46	
Дегидроабиетиновая кислота	15,58	7,96	3,12	2,48	
Абиета-8,11,13,-триен-7-он	0,82	0,51	2,47	_	
Эйкозановая кислота	3,11	2,90	_	3,55	
Олеиновая кислота	6,76	2,34	_	3,55	
Докозановая кислота	2,34		_		
Стигмаст-4-ен-3-он	не опр.	6,16	_	3,21	
ү-ситостерин	не опр.	6,12	_	8,89	

Примечание: прочерк означает, что соединение не обнаружено.

Среди идентифицированных химических соединений преобладающими являются дитерпены. В гексановых экстрактах выявлены бициклические, трициклические, тетрациклические дитерпеноиды лабданового, абиетанового и кауранового рядов. Из бициклических дитерпеновых соединений лабданового типа обнаружены: маноол, маноилоксид — гетероциклическое производное маноола, 12-нор-амбреинолид — деградированный лабданоид, 8,12-эпокси-13-гидрооксилабд-14-ен. Из трициклических дитерпеноидов абиетанового типа — abieta-8,11,13,-trien-7-one и дегидроабиетиновая кислота. Из тетрациклических дитерпенов кауранового ряда — каурен-16-ен-18-оиковая кислота. Следует отметить, что среди обнаруженных дитерпеновых соединений в гексановых экстрактах исходной и компостированной без добавок и компостированной с минеральными удобрениями коре ели доминирует дегидроабиетиновая кислота. Исключение составил вариант с добавкой вермикулита, где преобладающим соединением является дитерпеновый спирт — маноол. Вероятности идентификации обнаруженных в гексановом экстракте соединений со спектрами библиотеки масс-спектрометрических данных Wiley 275 достигают 83—99 % в зависимости от варианта опыта.

Анализ полученных результатов по ризогенезу черенков фасоли показывает, что максимальное количество корней образовалось в водном экстракте из исходной еловой коры (табл. 2), что свидетельствует о наличии в ней физиологически активных веществ, способствующих делению клеток и увеличению количества корней. В процессе компостирования, в зависимости от варианта опыта, количество этих веществ уменьшается.

Таблица 2 Ризогенез черенков фасоли в водном экстракте из коры ели и компостов на ее основе

Вариант	Количество корней, шт.	Средняя длина, мм	Общая сырая масса корней, г
Вода — контроль	7±0,5	6±0,6	0,55±0,05
Исходная кора	50±0,6	9±0,6	1,58±0,12
Компостированная кора без добавок	40±1,2	20±1,0	1,26±0,05
Компостированная кора с NP-удобрениями	20±1,0	25±0,6	0,84±0,04
Компостированная кора с NP-удобрениями и вермикулитом	30±1,2	25±1,0	1,17±0,09

Корреляционно-регресионный анализ показывает, что образование корней у фасоли определяется количеством дитерпеновых соединений в компостах (табл. 3).

Коэффициенты корреляции между содержанием дитерпенов в компостах и количеством образовавшихся корней у черенков фасоли, а также общей массы корней максимальны и составляют 0,92 и 0,97 соответственно.

Какое же из идентифицированных дитерпеновых соединений в большей степени влияет на образование корней и, как следствие, формирует большую их массу? Высокие коэффициенты корреляции (r = 0.90-0.99) между содержанием дитерпеновых соединений в компосте и количеством образовавшихся корней у черенков фасоли и их массой выявлены со многими соединениями: абие-

Таблица 3

Корреляционная зависимость между содержанием терпеновых соединений в экстракте и ризогенезом у черенков фасоли

Терпеновые соединения	Количество ко	рней, шт.	Общая масса корней, г		
- <b>-</b>	$r \pm S_r$	r <sup>2</sup>	$r \pm S_r$	r <sup>2</sup>	
Монотерпены Сесквитерпены Дитерпены Общая сумма терпеновых соединений	0,77±0,24 0,79±0,23 0,92±0,15 0,74±0,25	0,59 0,63 0,84 0,55	0,87±0,19 0,79±0,23 0,97±0,08 0,75±0,25	0,75 0,63 0,95 0,57	

 $\Pi$  р и м е ч а н и е. Здесь и далее: r — коэффициент корреляции,  $S_r$  — ошибка коэффициента корреляции,  $r^2$  — коэффициент детерминации.

та-8,11,13,-триен-7-он, каурен-16-ен-18-оиковая кислота, маноол, дегидроабиетиновая кислота (табл. 4).

Таблица 4 Корреляционная зависимость между содержанием дитерпеновых соединений в экстракте и ризогенезом у черенков фасоли

Литерионал соодинация	Общее количество	корней, шт.	Общая масса корней, г		
Дитерпеновые соединения	$r \pm S_r$	r <sup>2</sup>	$r \pm S_r$	r <sup>2</sup>	
Абиета-8,11,13,-триен-7-он	0,97±0,08	0,95	0,99±0,04	0,99	
Каурен-16-ен-18-оиковая кислота	0,91±0,16	0,83	0,98±0,07	0,97	
Маноол	0,91±0,16	0,83	0,94±0,13	0,88	
Дегидроабиетиновая кислота	0,90±0,16	0,81	$0,92\pm0,15$	0,84	
8,12-эпокси-13 гидрокси лабд-14-ен	$0,84\pm0,20$	0,71	$0,89\pm0,17$	0,79	
Маноилоксид	0,62±0,30	0,39	0,70±0,27	0,49	

Наиболее тесная корреляционная зависимость выявлена между количеством образовавшихся корней у черенков фасоли и дитерпеноидом — абиета-8,11,13,триен-7-он. Полученная экспериментальная зависимость носит нелинейный характер и хорошо аппроксимируется полиномом второй степени ( $R^2 = 0.9481$ ) (рис. 2).

Высокая ростостимулирующая активность дегидроабиетиновой кислоты отмечена нами ранее [12]. Результаты работ других исследователей [13, 14] доказывают, что кауреновая кислота является предшественником гиббереллинов.

Следует отметить, что в исходной коре ели присутствуют физиологически активные соединения как стимулирующие образование корней, так и ингибирующие их рост. Средняя длина образовавшихся корней у черенков фасоли минимальна именно в варианте с исходной еловой корой. Компостирование коры способствует увеличению средней длины корневой системы фасоли (см. табл. 3).

Таким образом, методом хромато-масс-спектрометрии изучен химический состав и содержание соединений в исходной и компостированной коре ели. Показано, что преобладающими химическими соединениями в них являются дитерпены. Выявлена высокая ростостимулирующая активность водных экстрактов из компостированной еловой коры. Установлено, что ризогенез у черенков фасоли в значительной степени определяется содержанием дитерпенов

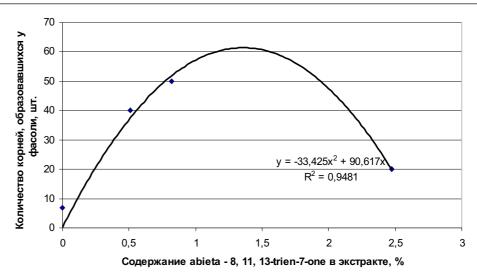


Рис. 2. Зависимость между содержанием абиета-8,11,13,-триен-7-он в экстракте и количеством корней, образовавшихся у черенков фасоли

в экстрактах. Найдены сильные корреляционные зависимости (r = 0.90-0.99) между ризогенезом фасоли и содержанием дитерпенов в исходной еловой коре и компостах на ее основе.

### Литература

- 1. *Ломовский О. И., Болдырев В. В.* Механохимия в решении экологических задач: аналит. обзор. Новосибирск: ГПНТБ СО РАН, 2006. 221 с.
- 2. Ушанова В. М., Зашка Н. А., Громовых Т. И. Альтернативные пути использования коры хвойных в различных технологиях // Химия и химическая технология. 2006. Т. 49. С. 72—77.
- 3. *Варфоломеев Л. А.* Приготовление промышленных компостов на основе твердых отходов деревообработки. М.: ВНИИТЭИагропром, 1992. 52 с.
- 4. *Садовникова Л. К., Орлов Д. С., Лозановская И. А.* Экология и охрана окружающей среды: учеб. пособие. 3-е изд., перераб. М.: Высш. шк., 2006. 334 с.
- 5. *Степень Р. А., Репях С. М.* Запасы терпеноидных соединений в сосновых лесах Красноярской лесостепи // Сибирский экологический журнал. 2005. № 1. С. 113—116.
- 6. *Кириенко О. А., Имранова Е. Л.* Влияние корокомпоста на плодородие осушенной лугово-глеевой почвы // Агрохимия. 1998. № 7. С. 35—40.
- 7. Ульянова О. А., Чупрова В. В., Луганцева М. В., Кулебакин В. Г. Получение удобрительных композиций и влияние их на содержание и состав органического вещества в черноземе обыкновенном Красноярской лесостепи // Агрохимия. 2007. № 6. C 42—49
- 8. *Куликова Н. Н.* Экологическая оценка органоминеральных компостов из отходов Селенгинского целлюлозно-картонного комбината: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2003. 20 с.
- 9. *Ульянова О. А.* Трансформация органического вещества почвы под действием композиций из древесной коры и цеолита // Плодородие. 2009. № 2. С. 23—25.
- 10. Ульянова О. А., Тарабанько В. Е. Изучение биологической активности водных экстрактов из коры лиственницы и компостов на ее основе // Вестник КрасГАУ. 2009. № 6. С. 93—97.

- 11. *Турецкая Р. Х.* Метод определения активности веществ, стимулирующих корнеобразование // Методы определения регуляторов роста и гербицидов. М.: Наука, 1966. С. 15—20.
- 12. *Tarabanko V. E., Ulyanova O. A., Kalachova G. S., Chuprova V. V., Tarabanko N. V.* Study of plant growth promoting activity and chemical composition of pine bark after various storage periods // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. 2008. № 4. P. 363—368.
- 13. Гэлстон А., Девис П., Сэттер Р. Жизнь зеленого растения. Пер. с англ. М.: Мир, 1983. 552 с.
- 14. *David T., Dennis C., West A.* Biosynthesis of Gibberellins // Journal of Biological Chemistry. 1967. Vol. 242. № 14. P. 3293—3300.

### О. А. Ульянова <sup>1</sup>, В. С. Тарабанько <sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Красноярський державний аграрний університет, пр. Миру, 90, Красноярськ, 660049, Росія
- <sup>2</sup> Інститут хімії і хімічної технології СО РАН СО РАН, вул. К. Маркса, 42, Красноярськ, 660049, Росія

### РОСТ-СТИМУЛЮЮЧА АКТИВНІСТЬ КОМПОСТІВ НА ОСНОВІ ЯЛИНОВОЇ КОРИ ТА ВМІСТ У НИХ ДИТЕРПЕНІВ

#### Резюме

Методом хромато-масс-спектрометрії досліджено хімічний склад ялинової кори. Досліджено рост-стимулюючу активність водних екстрактів кори. Для бобових рослин встановлено кореляційну залежність (r=0.90-0.99) між рост-стимулюючою активністю зазначених водних екстрактів та вмістом дитерпенів у корі.

**Ключові слова:** ялинова кора, гексановий екстракт, дитерпени, водний екстракт, рост-стимулююча активність.

### O. A. Ulyanova, V. E. Tarabanko

- <sup>1</sup> Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, pr. Mira, 90, 660049, Russia
- Institute of Chemistry and Chemical Technology of SB RAS, Krasnoyarsk, K. Marksa st., 42, 660049, Russia

### GROWTH-STIMULATING ACTIVITY OF COMPOSTS BASED ON PICEA BARK AND DITERPENE CONTENT IN IT

### Summary

The chemical composition of Picea bark was studied by GLC-MS. The growth stimulating activity of bark water extracts was researched. There were determined correlation dependences (r=0.90-0.99) between the growth stimulating activity of barks' water extracts and content of diterpene.

**Key words:** fir bark, hexane extract, diterpene, water extract, growth stimulating activity.



## ГЕНЕТИКА, МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ, ЦИТОЛОГІЯ



УДК 577.29

**О. Ф. Мутерко** <sup>1</sup>, студент,

**О. В. Галаєв**  $^{2}$ , канд. биол. наук, ст. науков. співроб.

- Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра генетики та молекулярної біології, пров. Шампанський, 2, Одеса, 65058, Україна, е-mail: muterko@gmail.com
- <sup>2</sup> Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААНУ, Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна, е-mail: genome2006@mail.ru

# МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ПШЕНИЦІ В ПЛР-АНАЛІЗІ ГЕНОМУ AEGILOPS CYLINDRICA HOST

Визначалась можливість використання мікросателітних (МС) маркерів пшениці в ПЛР-аналізі геному *Aegilops cylindrica* Host. Протестовано 20 пар праймерів до 27 МС локусів пшениці на 23 лініях егілопсу. Виявлено 17 пар праймерів, за якими вдається отримати продукти ампліфікації в геномі егілопсу. За продуктами ампліфікації восьми з них вдалося виявити поліморфізм серед досліджуваних ліній. Обговорюється можливість використання мікросателітних маркерів пшениці для аналізу геному *Ae. cylindrica*.

**Ключові слова:** молекулярно-генетичні маркери, *Aegilops cylindrica,* поліморфізм, ПЛР-аналіз.

В наш час Aegilops cylindrica Host (егілопс циліндричний) розглядають як один із видів, що є перспективним джерелом збагачення геномів культурних злаків генами стійкості до різного роду фізичних, хімічних та біологічних стресорів [1—6]. А оскільки таке збагачення значно зменшує втрату врожаю зернових культур, то використання Ae. cylindrica в селекції має і економічний зиск. У зв'язку з тим, що останнім часом все частіше для поліпшення геному м'якої пшениці використовується генетичний пул Ae. cylindrica, існує значний інтерес в створенні молекулярно-генетичних карт геному Ae. cylindrica для ефективного їх використання: при оцінці потоку генів за гібридизації між пшеницею та егілопсом; у порівняльному картуванні геномів; для визначення локалізації господарсько-цінних генів; «головних» генів кількісних ознак (QTL (quantitative trait locus)), а також у вирішенні ряду інших прикладних та теоретичних завдань.

Ідентифікація інтрогресивних ділянок та визначення їх хромосомної локалізації в гібридних пшенично-егілопсних лініях вимагає, щоб маркери були картовані в геномах батьківських видів. На даний час немає інформації ні в літературних джерелах, ні в електронних базах даних про наявність молекулярногенетичних карт  $Ae.\ cylindrica\ (2n=4x=28;\ renom\ CCDD)$ , тоді як удосталь представлені карти геномів  $Triticum\ aestivum\ L.\ (2n=6x=42;\ renom\ AABBDD)$  або  $Ae.\ tauschii\ Coss.\ (2n=2x=14;\ renom\ DD)$ , отримані за допомогою різних маркерних систем [7—9].

Існує безліч методів отримання молекулярних маркерів для картування геномів рослин [10]. Однак одним з найбільш перспективних типів молекулярних ДНК-маркерів є мікросателітні маркери (SSR (simple sequence repeat)-маркери), які отримують в ході полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за участю специ-

фічних праймерів, що фланкують ділянки ДНК геному з короткими тандемними повторами нуклеотидів. Молекулярно-генетична карта *Т. aestivum* налічує більше 2000 мікросателітних маркерів [8, 11—13]. Проте, не дивлячись на всі переваги SSR-маркерів, на сьогодні відсутні публікації про видоспецифічні мікросателітні локуси, які були б картовані в геномі *Ae. cylindrica* та в інших диких видах, а проблема їх власного картування полягає у високих економічних витратах.

Велика кількість пар праймерів до мікросателітів пшениці успішно використано для ампліфікації ДНК декількох близьких видів, таких як *Triticum diccocoides* [14], *T. durum* [15], *Ae. squarrosa* [16] та *T. timopheevii* [17], а також видів *Aegilops* з секції *Sitopsis*, у тому числі *Ae. longissima*, *Ae. searsii* і *Ae. speltoides* [18]. SSR-маркери пшениці можуть бути ефективно використані для аналізу гібридів пшениці з *T. timopheevii* [17, 19], *Ae. squarrosa* [20], *Hordeum chilense* [21] та *Ae. cylindrica* [5]. Пшеничні SSR-маркери успішно застосовані для виявлення генетичного різноманіття видів [14, 16], картування агрономічно важливих генів [5, 17, 22, 23], у філогенетичних дослідженнях споріднених з пшеницею видів [18].

Метою дослідження було визначити можливість використання мікросателітних маркерів пшениці в дослідженні геному *Ae. cylindrica*.

### Матеріали і методи досліджень

Матеріалом дослідження були 23 лінії місцевої (Одеської) популяції *Ae. cylindrica*, надані д-ром біол. наук, зав. відділом якості зерна (Селекційно-генетичний інститут — НЦНС, м. Одеса) А. І. Рибалкою.

ДНК виділяли з етиольованих паростків за допомогою СТАВ-буфера [24]. Реакційна суміш ПЛР об'ємом 12,5 мкл містила: 50 мМ КСІ, 20 мМ трис-HCl (рН 8,4 при 25 °C), 2 мМ MgCl $_2$ ; 0,01 % Tween-20; 0,15 мМ кожного dNTP; 0,2 мкМ кожного праймера; 10—20 нг ДНК, 1 од. Таq-полімерази.

ПЛР-аналіз проводили за допомогою 20 пар праймерів до 27 мікросателітних локусів м'якої пшениці, з відомою локалізацією на хромосомах (Хдумп165-4A, Хдумп165-4B, Хдумп186-5A, Хдумп325-6D, Хдумп389-3B, Хдумп499-5B, Хдумп577-7B, Хдумп192-5D, Хдумп3-3D, Хдумп437-7D, Хдумп18-1B, Хдумп182-5D, Хдумп382-2A, Хдумп382-2B, Хдумп382-2D, Хдумп314-3D [8]; Храгс88-5B, Хсfd7-5B, Храгс286-5D, Хдумп443-5A, Хдумп443-5B, Хумп66-3B, Хдумп66-4B, Хдумп66-5B, Хсfd48-1B, Хсfd48-1D) [7].

Для ампліфікації використовували прилад «Терцик» («ДНК-технология», Росія) з параметрами ампліфікації згідно М. S. Roder [8] та GrainGenes [7]. Продукти ампліфікації фракціонували електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили шляхом їх фарбування 0,012 М AgNO<sub>3</sub> [25]. Молекулярну масу продуктів ампліфікації визначали відносно маркера pUC18/MspI за допомогою комп'ютерної програми «Ітаде Маster 1D Elite» (Атегьат Pharmacia Biotech, USA). Документували отримані електрофореграми відеосистемою VDS.

### Результати досліджень та їх обговорення

Під час дослідження було протестовано 20 пар праймерів до 27 мікросателітних локусів м'якої пшениці на ДНК 23 ліній *Ae. cylindrica*. В результаті ПЛР-аналізу, за 17 парами праймерів вдалося отримати продукти ампліфікації в усіх досліджуваних лініях егілопсу, загалом ампліфікується 24 локуси, при цьому 4 з них (16,7 %) картовані в геномі А (*Xgwm165-4A*, *Xgwm186-5A*, *Xgwm* 

443-5A, Xgwm382-2A), 12 (50 %) в геномі В (Xcfd7-5В, Xbarc88-5В, Xgwm499-5В, Xgwm165-4В, Xcfd48-1В, Xgwm66-3В, Xgwm66-4В, Xgwm66-5В, Xgwm443-5В, Xwmc31-1В, Xgwm18-1В, Xgwm382-2В) та 8 (33,3 %) в геномі D (Xgwm325-6D, Xcfd48-1D, Xgwm192-5D, Xgwm3-3D, Xgwm437-7D, Xgwm182-5D, Xgwm382-2D, Xgwm314-3D) пшениці (табл. 1).

Таблиця 1 ПЛР-аналіз 23 ліній *Ae. cylindrica* за 27 мікросателітними локусами пшениці

Геном пшениці	Кількість МС локусів пшениці	Кількість МС локусів, що детектуються в геномі Ae. cylindrica	Кількість поліморфних МС локусів в геномі Ae. cylindrica
Геном А	4	4	0
Геном В	14	12	2
Геном D	9	8	6
Загалом:	27	24	8

Серед 24 локусів, що ампліфікуються в геномі *Ae. cylindrica*, при використанні 17 пшеничних пар праймерів, тільки за 8 з них (33,3 %) виявлено поліморфізм серед 23 ліній егілопсу. Фланкуються ці локуси парами праймерів: BARC88-5B, WMS18-1B, WMS314-3D, WMS382-2D, WMS3-3D, WMS192-5D, WMS182-5D, WMS437-7D.

Слід зазначити, що низький відсоток поліморфізму, вочевидь, пов'язаний з близькою спорідненістю ліній егілопсу, які фактично є представниками однієї популяції. Як відомо, ступінь поліморфності серед представників однієї популяції завжди значно нижче поліморфності між представниками різних популяцій, саме тому можна вважати, що при ПЛР-аналізі представників виду  $Ae.\ cylindrica$  з різних популяцій слід чекати більшого поліморфізму.

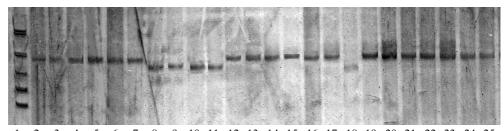
Відомо, що основними критеріями придатності ДНК маркера для його використання в процесі генетичного картування  $\varepsilon$ , по-перше, здатність маркера до детекції в геномі, що картується, та по-друге, маркер повинен бути поліморфним, тобто можлива реєстрація поліморфізму за цим маркером серед окремих представників виду. Саме виявлена під час дослідження здатність МС маркерів пшениці до детекції в геномі  $Ae.\ cylindrica$  та встановлений поліморфізм серед представників популяції егілопсу за декількома з цих маркерів дозволяють припустити можливість використання мікросателітних маркерів пшениці для картування геному  $Ae.\ cylindrica$ . Для підтвердження чи спростування цього припущення необхідно провести картування хоча б одного гена (або групи зчеплення)  $Ae.\ cylindrica$  з використанням МС маркерів пшениці.

Не вирішеним залишається питання стосовно природи ампліфікованих в геномі егілопсу фрагментів. Грунтуючись на тому, що споріднені види злаків мають гомеологічні мікросателітні послідовності, ми припускаємо, що в геномі егілопсу ампліфікується саме мікросателітна ДНК, до того ж розміри отриманих в ході ПЛР геному егілопса фрагментів близькі до розмірів фрагментів, отриманих в ході ПЛР геному пшениці з використанням аналогічних праймерів (див. рис. 1).

Та для підтвердження цього припущення необхідне секвенування ампліфікованих в ході ПЛР ділянок ДНК *Ae. cylindrica*.

### Висновки

1) Показана здатність пар праймерів до мікросателітних локусів пшениці давати в ході ПЛР-аналізу продукти ампліфікації в геномі *Ae. cylindrica*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній *Ae. cylindrica* та м'якої пшениці за пшеничним мікросателітним маркером BARC88-5B:

1 — маркер молекулярної ваги pUC18/MspI, 2—24 — лінії Ae. cylindrica, 25 — м'яка пшениця

2) Виявлено поліморфізм серед досліджуваних 23 ліній *Ae. cylindrica* за восьма з 24 локусів, що ампліфікуються в ході ПЛР-аналізу з використанням МС маркерів пшениці.

### Література

- 1. Бабаянц Л. Т., Рибалка О. І., Аксельруд Д. В. Нове джерело стійкості пшениці до основних хвороб // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційногенетичного інституту в умовах України: Зб. наук. пр. Одеса, 1996. С. 111—116.
- 2. Hanson D. E., Ball D. A., Mallory-Smith C. A. Herbicide resistance in jointed goat-grass (Aegilops cylindrica): Simulated responses to agronomic practices // Weed Tech. 2002. Vol. 16. P. 156—163.
- 3. Singh S., Franks C. D., Huang L., Brown-Guedira G. L., Marshall D. S., Gill B. S., and Fritz A. Lr41, Lr39, and a leaf rust resistance gene from Aegilops cylindrica may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 108 (4). P. 586—91.
- 4. *Галаев А. В., Бабаянц Л. Т., Сиволап Ю. М.* Молекулярное картирование и маркирование перенесенного от *Aegilops cylindrica* в мягкую пшеницу гена устойчивости к твердой головне // Цитология и генетика. 2006. Т. 40 (2). С. 3—11.
- 5. Perez-Jones A., Mallory-Smith C. A., Zemetra R. S., Watson C. J. Introgression of a strawbreaker foot rot (Pseudococercosporella herpotrichoides) resistance gene from winter wheat (Triticum aestivum) into jointed goatgrass (Aegilops cylindrica) // Crop Sci. 2006a. Vol. 46. P. 2155—2160.
- 6. Perez-Jones A., Mallory-Smith C. A., Hansen J. L., Zemetra R. S. Introgression of an imidazolinone-resistance gene from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) into jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host) // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 114 (1). P. 177—86.
- 7. GrainGenes: A Genomic Database // Режим доступу: (http://wheat.pw.usda. gov/GG2/index. shtml).
- 8. Roder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P., Ganal M. W. A microsatellite map of wheat // Genetics. 1998. Vol. 149 (4). P. 2007—2023.
- 9. Boyko E., Kalendar R., Korzun V., Fellers J., Korol A., Schulman A. H., Gill B. S. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function // Plant Mol. Biol. 2002. Vol. 48(5—6). P. 767—790.
- 10. Semagn K., Bjornstad A., Ndjiondjop M. N. An overview of molecular marker methods for plants // African Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 5 (25). P. 2540—2568.
- 11. Bryan G. J., Collins A. G., Stephenson P., Orry A., Smith J. B., Gale M. D. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 94. P. 557—563.

- 12. Pestsova E., Ganal M. W., Ruder M. S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat // Genome. 2000. Vol. 43. P. 689—697.
- 13. Röder M. S., Huang X. Q., Ganal M. W. Wheat microsatellites in plant breeding-potential and implications / In: Molecular markers in plant breeding. Edited by H. Loerz and G. Wenzel. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 2004. P. 255—266.
- 14. Fahima T., Ruder M., Grama A., Nevo E. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust // Theor. Appl. Genet. 1998. Vol. 96. P. 187—195.
- 15. Korzun V., Röder M., Wendehake K., Pasqualone A., Lotti C., Ganal M. W., Blanco A. Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid bread wheat into a genetic linkage map of durum wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. Vol. 98. P. 1202—1207. 16. Pestsova E., Korzun V., Goncharov N. P., Hammer K., Ganal M. W., Röder M. S.
- 16. Pestsova E., Korzun V., Goncharov N. P., Hammer K., Ganal M. W., Röder M. S. Microsatellite analysis of Aegilops tauschii germplasm // Theor. Appl. Genet. 2000. Vol. 101. P. 100—106.
- 17. Salina E. A., Leonova I. N., Ruder M. S., Laikova L. I., Maystrenko O. I., Budashkina E. B., Shumny V. K. Wheat microsatellites: the prospects of application for gene mapping and analysis of the reconstructed genomes // Rus. J. Physiol. 2001. Vol. 48. P. 377—381.
- 18. Sourdille P., Tavaud M., Charmet G., Bernard M. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes // Theor. Appl. Genet. 2001. Vol. 103. P. 346—352.
- 19. Leonova I. N., Röder M. S., Budashkina E. B., Kalinina N. P., and Salina E. A. Molecular analysis of leaf rust resistant introgression lines obtained by crossing of hexaploid wheat *Triticum aestivum* with tetraploid wheat *Triticum timopheevii* // Rus. J. Genet. 2002. Vol. 38. P. 1397—1403.
- 20. Pestsova E. G., Börner A., Röder M. S. Development of wheat D-genome introgression lines assisted by microsatellite markers // Proceedings of the 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, 10—12 September, 2001. Edited by Hernández P., Moreno M. T., Cubero J. I., Martin A., Junta de Andalucia, Consejera de Agricultura y Pesca, Cordoba, Spain. 2002. P. 207—210.
- 21. Hernandez P., Laurie D. A., Martin A., Snape J. W. Utility of barley and wheat simple sequence repeat (SSR) markers for genetic analysis of Hordeum chilense and tritordeum // Theor. Appl. Genet. 2002. Vol. 104. P. 735—739.
- 22. Korzun V., Ruder M. S., Ganal M. W., Worland A. J., Law C. N. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1998. Vol. 96. P. 1104—1109.
- 23. Xie C., Sun Q., Ni Z., Yang T., Nevo E., Fahima T. Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 2003. Vol. 106. P. 341—345.
- 24. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (Научно-методическое руководство) Под. ред. Ю. М. Сиволапа. К.: Аграрна наука, 1998. 156 с.
- 25. *Promega* Technical Manual. USA Gene Print. STR Systems. 1999. Vol. 7. P. 52.

### А. Ф. Мутерко <sup>1</sup>, А. В. Галаев <sup>2</sup>

- Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, биологический факультет, кафедра генетики и молекулярной биологии; пер. Шампанский, 2, Одесса, 65058, Украина, e-mail: muterko@gmail.com
- <sup>2</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААНУ, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, e-mail: genome2006@mail.ru

### ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ПШЕНИЦЫ В ПЦР-АНАЛИЗЕ ГЕНОМА AEGILOPS CYLINDRICA HOST

#### Резюме

Определялась возможность использования микросателлитных (МС) маркёров пшеницы в ПЦР-анализе генома Aegilops cylindrica Host. Протестировано 20 пар праймеров к 27 МС локусам пшеницы на 23 линиях Ae. cylindrica. Обнаружено 17 пар праймеров, по которым удается получить продукты амплификации в геноме эгилопса. По продуктам амплификации восьми из них удалось обнаружить полиморфизм среди исследуемых линий. Обсуждается возможность использования МС маркеров пшеницы для исследования генома Ae. cylindrica.

**Ключевые слова**: молекулярно-генетические маркеры, *Aegilops cylindrica*, полиморфизм, ПЦР-анализ.

### A. F. Muterko <sup>1</sup>, A. V. Galaev <sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: muterko@gmail.com
- <sup>2</sup> South Plant Biotechnology Center Ukrainian National Academy of Agrarian Science, Ovidiopolska str., 3, Odesa, 65036, Ukraine, e-mail: genome2006@mail.ru

### THE POSSIBILITY OF USING MICROSATELLITE MARKERS OF WHEAT FOR GENOME PCR-ANALYSYS'S OF AEGILOPS CYLINDRICA HOST

### Summary

Ability of using microsatellite markers of wheat in the genome mapping *Aegilops cylindrica* was investigated. It is tested 20 pair primers of wheaten MC markers on 23 lines *Ae. cylindrica*. 17 pair primers detected amplification products in genome egilops, 8 of them has appeared polymorphic. The possibility using of wheat microsatellite markers for analysys's of genome *Ae. cylindrica* were discus. sed.

Key words: molecular markers, Aegilops cylindrica, polymorphism, PCR-analysis.

### УДК 575.11.113:854.78

**А. Є. Солоденко** <sup>1</sup>, канд. біол. наук, провід. наук. співроб.,

**О. Є. Александрова** <sup>1</sup>, аспірант,

**В. В. Бурлов** <sup>2</sup>, аспірант, **В. Бурлов** <sup>2</sup>, д-р біол. наук, голов. наук. співроб.,

**Ю. М. Сиволап** 1, д-р біол. наук, академік НААН України

- Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України, Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна, e-mail: genome2006@mail.ru
- Селекційно-генетичний інститут Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна

### ПЛР-МАРКЕР СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

Оцінено здатність ДНК-маркерів ОРА-02, ОРВ-08, ОРС-20, які зчеплені з геном соняшника Pl2, слугувати показниками стійкості соняшника до несправжньої борошнистої роси (НБР), носієм якої є лінія RHA-419. Виявлено ПЛР-маркер ОРА-02\_348, що дозволяє ідентифікувати стійкі генотипи соняшника. Проведено гібридологічний аналіз та встановлено генетичну відстань між геном стійкості та маркерним фрагментом ДНК, яка дорівнює 4 сМ.

Ключові слова: соняшник, несправжня борошниста роса, стійкість, ПЛР-маркери.

Соняшник є однією з найважливіших олійних культур в Україні. Під його вирощування виділяється близько половини площ, зайнятих технічними культурами [1]. У 2010 році відведено під посів близько 4,5 млн га [2].

Найбільше зниження врожайності соняшника викликають такі патогенні гриби: несправжня борошниста роса (НБР), альтернарія, септорія, склеротінія та фомопсис. НБР — захворювання соняшника, яке спричиняється ооміцетами Plasmopara halstedii (Farl.). Створення ліній і гібридів соняшника з генетичною стійкістю до НБР є одним із приоритетних напрямів селекційних програм [3]. Вирішення такого завдання можливе при використанні досягнень генетики стійкості та створення методів оцінки, відбраковування і добору рослин з певним генотипом. Відомо понад 12 генів стійкості соняшника до різних рас НБР, деякі з котрих знайдені в окремих селекційних лініях, інші — у дикорослих видів Helianthus [4]. Домінантні гени, що позначені Pl, обумовлюють стійкість до однієї чи декількох рас патогена. Так, наприклад, ген Pl1 контролює стійкість до раси 100, ген Pl2 — до рас 100 і 300. Кожен з генів Pl6, Pl7 та Pl8, що були виявлені у різних Helianthus sp., забезпечують стійкість проти чотирьох рас НБР (100, 300, 700 та 730) [5]. Ген  $Pl_{Arg}$ , інтрогресований з H. argophyllus, та ген  $Pl_{13}$ , наявний в генотипі лінії аргентинської селекції HA-R5, надають стійкість до 300, 700, 710, 730 та 770 рас патогена. Нараховується 10 вірулентних патотипів (рас) НБР. Переважними (pre-dominant) расами НБР в країнах Європи та в США € 700, 703, 710, 730 та 770 [6].

Складною проблемою  $\epsilon$  ідентифікація окремих генів Pl. Традиційні методи оцінки, що використовуються в селекційних програмах, не в змозі розрізнити генотипи, які несуть різні домінантні алелі (один чи більше) різних генів Pl.

Існує стандартний набір ліній-диференціаторів, які є стійкими проти певної раси (рас) НБР: RHA-265, RHA-274, PMI3, PM17, 803-1, HAR-4, HAR-5, QHP-1, HA-335, RHA-419. Ці лінії є носіями домінантних алелів різних генів Pl та активно залучаються до інтродукції цих генів в геном культурного соняшника [7].

Завданням селекції соняшника на стійкість до НБР є створення ліній та гібридів, що поєднують у своїх генотипах різні гени Pl. Проведення цієї роботи може бути прискорено завдяки використанню сучасних MAS (marker assisted selection) технологій. Запропонована низка ДНК-маркерів, зчеплених з генами Pll, Pl2 та Pl6, які отримані завдяки аналізу поліморфізму рестрикційних фрагментів та поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК [8, 9]. Методами молекулярно-генетичного картування доведена належність генів Pl до трьох великих, не зчеплених між собою локусів [10]. Для гена Pl2, що входить до кластеру Pl1-Pl2-Pl6-Pl7 і контролює стійкість соняшника до раси 300 НБР, відомо декілька маркерів, тісно зчеплених з ним: маркер OPC-20\_831 знаходиться на відстані 2 сМ, маркери OPA-02\_630 та OPB-08\_730 розташовані на відстані до 10 сМ [11].

Метою даної роботи було оцінити здатність ДНК-маркерів OPA-02, OPB-08, OPC-20 діагностувати стійкість генотипів соняшника до НБР, носієм якої є лінія RHA-419.

### Матеріали та методи досліджень

В якості матеріалу для досліджень використано популяцію  $F_2$  (5403/1) від схрещування контрастних за стійкістю до НБР інбредних ліній соняшника, яка створена у відділі селекції олійних культур Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААНУ. Материнська форма — інбредна лінія, нестійка до НБР (носій генів pl в рецесивному стані) — Н14А. Батьківська форма — інбредна лінія RHA-419, яка є стійкою до усіх рге-dominant рас НБР. Інформація щодо ідентифікації в генотипі батьківської лінії певних генів Pl відсутня.

Тестування стійкості до НБР провадили наступним чином: насіння пророщували протягом 2 тижнів. Сім'янки поміщали на смужки фільтрувального паперу по 20—25 сім'янок в кожну. Смужки закручували в циліндри і поміщали у воду, насичену спорами НБР. Після закінчення двотижневого терміну паростки поміщали в умови вологої камери на 12 годин. У цей період на листі з'являлися спорангії в тих випадках, коли рослина виявлялася нестійкою до НБР. Нестійкі рослини визначали завдяки наявності білої поволоки на листі. Виділення рослинної ДНК, ПЛР-аналіз, електрофоретичне розподілення продуктів ампліфікації та документування результатів провадили згідно [11]. Для ампліфікації ДНК використовували праймери, синтезовані у відділі молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру. Аналіз зчеплення проводили згідно [12].

### Результати досліджень та їх обговорення

Для селекції ліній соняшника, стійких до найбільш розповсюджених рас НБР, необхідно контролювати наявність в їх генотипах домінантних алелів Pl, що забезпечують стійкість. Такими генами, за даними літератури, є гени Pl6, Pl7, Pl8, Pl13,  $Pl_{Aro}$ .

Враховуючи, що Pl6, Pl7 та Pl2 є складовими одного кластеру генів, вважали доцільним оцінити придатність ДНК-маркерів до Pl2, розроблених із використанням ліній соняшника французької селекції, діагностувати стійкість до НБР, що забезпечується геном Pl генотипу лінії RHA-419.

Для оцінки використали 55 рослин популяції 5403/1. Двотижневі паростки піддавали зараженню в штучних умовах збудниками несправжньої борошнистої роси (культура являє собою суміш pre-dominant патотипів). За даними візуальної оцінки рослини розділили на дві категорії: чутливі (зі спорангіями у вигляді білої поволоки на листях) та стійкі (без спорангіїв). Виявлено 42 (76 %) стійкі рослини та 13 (24 %) чутливих рослин.

За моногенного контролю стійкості очікуване розщеплення в  $F_2$  за фенотипом становитиме 3:1. Фактично отримані дані, що узгоджуються з цим припущенням ( $\chi^2=0.056,\,P>0.01$ ).

Для виділення ДНК використовували частину стебла. Перед початком виділення зразки додатково промивали дистильованою водою. Для проведення ПЛР використовували ДНК рослин популяції 5403/1 та одноланцюгові праймери OPA-02, OPB-08 та OPC-20 [11].

Ампліфікація ДНК рослин популяції 5403/1 з праймерами OPB-08 та OPC-20 не виявила специфічних фрагментів, що надавали б можливість диференціювати рослини з контрастним проявом стійкості до НБР. Детектовані «мажорні» (чіткі та відтворювані) фрагменти ампліфікованої ДНК були типовими для рослин даної гібридної популяції: як стійких, так і сприйнятливих до НБР.

В спектрах ампліфікації ДНК з праймером OPA02 детектували фрагмент розміром 348 п. н., що був характерним для генотипів стійких рослин (рис. 1). В спектрах ампліфікації 4 % стійких рослин такого специфічного маркерного фрагмента не знайдено.

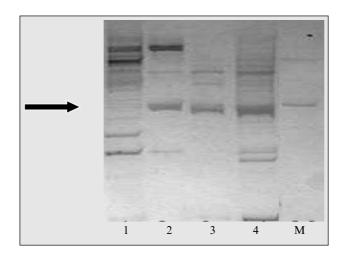


Рис. 1. Спектри ампліфікації ДНК рослин популяції 5403/1: 1— нестійка рослина, 2—4— стійкі рослини, М— маркер рGEM (фрагменти 369, 350 п. н.)

На підставі отриманих даних встановлена генетична відстань між геном та маркерним фрагментом, яка дорівнює 4 сМ ( $\chi^2 = 0.150$ , P > 0.01). Така генетична відстань свідчить про тісний зв'язок між геном стійкості Pl та ДНК-маркером OPA02\_348, що робить останній придатним для подальшого використання в селекції нових стійких до НБР генотипів соняшника із використанням лінії RHA-419 як джерела стійкості до pre-dominant pac.

Враховуючи, що отриманий в дослідженні [11] маркерний фрагмент OP-A02\_630 зчеплений з геном *Pl2*, який входить до кластеру генів

*Pl1/Pl2/Pl6/Pl7*, можна припустити, що батьківська рослина RHA419 є носієм цього кластеру домінантних алелів.

### Висновки

Отримано ДНК-маркер OPA-02\_348, за допомогою якого можна ідентифікувати генотипи соняшника, для яких джерелом стійкості до несправжньої борошнистої роси слугувала лінія RHA-419. Встановлено генетичну відстань (4 cM) між локусом Pl та маркерним фрагментом ДНК.

### Література

- 1. *Никитчин Д. И.* Подсолнечник, биохимия, селекция, возделывание. Пологи: Пологівська друкарня, 2002. 492 с.
  - 2. www.proagro.com.ua/art/4024693.html
- 3. *Skoric D*. Achievements and future directions of sunflower breeding // Field Crops Res. 1992. V. 30. P. 231—270.
- 4. *Miller J. F.* Update on inheritance of sunflower characteristics // In: Proc. Int. Sunflower Conf. (Pisa, Italy, 7—11 Sept., 1992). 1992. P. 905—945.
- 5. Miller J., Gulya T. Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower // Crop. Sci. 1991. V. 31. P. 40—43
- interspecific crosses in sunflower // Crop. Sci. 1991. V. 31. P. 40—43.
  6. Mulpuri S., Liu Z., Femg J., Gulya T., Jan C. Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, Pl13 in cultivated sunflower (Helianthus annuus L.) // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 795—803.
- 7. Jocic S., Cvejic S., Hladni N., Miladinovic D., Miklic V. Development of sunflower genotypes resistant to downy mildew // Proc. Int. Sym. «Sunflower Breeding on Resistance to Diseases» (Krasnodar, Russia, 23—24 June, 2010). 2010. P. 93—97.
- 8. Mouzeyar S., Roeckel-Drevet P., Gentzbittel L., Philippon J., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., Nicolas P. RFLP and RAPD mapping of the sunflower Pll locus for resistance to Plasmopara halstedii race 1 // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 733—737.
- 9. Vear F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestrie E., Roeckel-Drevet P., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P. The genetics of resistance to five races of downy mildew (Plasmopara halstedii) in sunflower (Helianthus annuus L.) // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 95. P. 584—589.
- 10. Roeckel-Drevet P., Gagne G., Mouzeyar S., Gentzbittel L., Philippon J., Nicolas P., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F. Colocation of downy mildew (Plasmopara halstedii) resistance genes in sunflower (Helianthus annuus L.) // Euphytica. 1996. V. 91. P. 225—228.
- 11. Brahm L., Rocher T., Friedt W. PCR-Based Markers Facilitating Marker Assisted Selection in Sunflower for Resistance to Downy Mildew // Crop Sci. 2000. V. 40. P. 676—682.
- 12. Солоденко А. Е., Саналатий А. В., Толмачев В. В., Ведмедева К. В., Сиволап Ю. М. Маркирование гена устойчивости к заразихе  $Or\ 3$  у подсолнечника // Цитология и генетика. 2005. Т. 39. № 5. С. 9—12.
- 11. Тихомирова М. М. Генетический анализ // Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1990. 280 с.

### А. Є. Солоденко $^1$ , О. Є. Александрова $^1$ , В. В. Бурлов $^2$ , В. В. Бурлов $^2$ , Ю. М. Сиволап $^1$

- <sup>1</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, e-mail: genome2006@mail.ru
- <sup>2</sup> Селекционно-генетический институт Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина

### ПЛР-МАРКЕР СТІЙКОСТІ СОНЯШНИКА ДО НЕСПРАВЖНЬОЇ БОРОШНИСТОЇ РОСИ

#### Резюме

Определена пригодность ДНК-маркеров OPA-02, OPB-08, OPC-20, которые сцеплены с геном подсолнечника Pl2, для диагностики устойчивости подсолнечника к ложной мучнистой росе, носителем которой является линия RHA-419. Проведен гибридологический анализ и определено генетическое расстояние между геном устойчивости и маркерным фрагментом ДНК, которое составляет 4 сМ.

**Ключевые слова:** подсолнечник, ложная мучнистая роса, устойчивость, ПЦР-маркеры.

### A. Solodenko 1, E. Alexandrova 1, V. Burlov 2, V. Burlov 2, Yu. Sivolap 1

- <sup>1</sup> South Plant Biotechnology Center NAAS of Ukraine, Ovidiopolska str., 3, Odesa, Ukraine, e-mail: genome2006@mail.ru
- <sup>2</sup> Plant Breeding and Genetics Institute NAAS of Ukraine, Ovidiopolska str., 3, Odesa, Ukraine

### PCR MARKER OF SUNFLOWER RESISTANCE TO POWDERY MILDEW

### Summary

DNA markers OPA-02, OPB-08, OPC-20 that linked with *Pl2* gene of sunflower were used to test the resistance to powdery mildew. The source of this resistance was diferenciator line RHA-419. PCR marker OPA-02\_348 was discovered. An linkage between marker ORS1036 and locus *Pl* is defined.

**Key words:** sunflower, powdery mildew, resistance, polymerase chain reaction, marker.



# ГІДРОБІОЛОГІЯ



УДК 577.152.3:597.556.33.1(262.5-16)

В. В. Заморов, канд. біол. наук, доцент

І. Л. Рижко, ст. викладач

О. В. Друзенко, аспірант

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра гідробіології та загальної екології вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна E-mail: hydrobiologia@mail.ru

### ПОЛІМОРФІЗМ ЕСТЕРАЗ БИЧКА-КРУГЛЯКА NEOGOBIUS MELANOSTOMUS (PALLAS) З АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЇНИЙ

Досліджували електрофоретичні спектри естераз (КФ: 3.1.1) тканин зябер, м'язів, гонад, кишечника і печінки бичка-кругляка, якого виловлено в прибережних водах о. Зміїний. В усіх тканинах встановлено наявність чотирьох основних форм естераз, відмінних за електрофоретичною рухливістю. Виявлено відмінності спектрів естераз тканин зябер риб, виловлених в різні роки. На цій підставі зроблено припущення, що в акваторії о. Зміїний можуть мешкати генетично неідентичні угруповання бичка-кругляка.

Ключові слова: естерази, поліморфізм, бичок-кругляк, о. Зміїний.

Завдяки розвитку електрофоретичних методів дослідження білків у багатьох видів риб виявлені генетично детерміновані варіанти різних білкових (у тому числі ферментних) систем, що відкриває можливість нових підходів до вирішення таких питань популяційної біології, як структура, динаміка, стійкість популяцій у часі тощо [11, 13, 20, 21]. Результати таких досліджень у поєднанні з іншими існуючими уявленнями про механізми формування внутрішньовидової, міжвидової і більш високих рівнів мінливості можуть істотно вплинути на реконструкцію історії формування сучасної іхтіофауни [2, 7, 9, 22].

Для дослідження поліморфізму популяцій різних видів тварин в якості маркерів широко використовуються естерази [3, 4, 12, 16, 17], оскільки вони відзначаються простотою гістохімічного виявлення, добре відображають ступінь внутрішньовидової мінливості і надають можливість одномоментно вивчати експресію декількох генів, контролюючих синтез їх ізоформ. Першим кроком у подібних дослідженнях є з'ясування органно-тканинної гетерогенності спектрів естераз. В спектрах ферментів різних тканин часто спостерігаються певні відмінності щодо наявності та експресивності тих чи інших ізоформ, які сумарно дають уяву про внутрішньовидовий та міжвидовий поліморфізм досліджуваних об'єктів. Поліморфізму естераз у риб присвячено багато досліджень [15, 18, 19, 21, 24], але даних про його молекулярні і генетичні основи поки що недостатньо.

Під назвою «естерази» об'єднуються різні ферменти, загальною властивістю яких є здатність розщеплювати ефірні зв'язки карбонових кислот з нафтолом (КФ: 3.1.1). Ці ферменти поділяють на чотири групи — карбоксил-, арил-, ацетил- і ацетилхолін- (включаючи псевдохолін) естерази. У риб естерази частіше є продуктами декількох локусів, і за багатьма з них спостерігають індивідуальну мінливість [14].

Серед численних видів риб, які зустрічаються в акваторії о. Зміїний, особливу увагу на себе звертає бичок-кругляк Neogobius melanostomus (Pallas). Цей вид відіграє важливу роль в донних біоценозах, а також має промислове значення. Існування кругляка як у Чорному морі, так і в прісних водоймах Північно-Західного Причорномор'я дозволяє вивчати його адаптаційні реакції на різні чинники екологічного середовища. Особливого значення набувають дослідження, які провадяться в районі о. Зміїний. Для прибережної екосистеми острова характерна різноманітність умов існування, багатий видовий склад флори і фауни, а також низький рівень антропогенного навантаження. Внутрішньовидова структура бичка-кругляка в північно-західній частині Чорного моря, зокрема, в акваторії острова, залишається недослідженою. Виходячи з цього, метою даної роботи було вивчення органно-тканинного поліморфізму (наявності та експресії ізоформ) естераз у бичка-кругляка із прибережних вод о. Зміїний.

### Матеріали та методи досліджень

Вилов риби здійснювали в акваторії о. Зміїний у 2008 і 2009 роках. Зібраний матеріал обробляли на кафедрі гідробіології та загальної екології і в лабораторії фізико-хімічних методів досліджень біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Дослідження електрофоретичних спектрів естераз провадили на тканинах зябер, м'язів, гонад, кишечника, печінки самців і самок бичка-кругляка (380 особин). Для аналізу відбирали рибин віком приблизно 3 роки; стандартна довжина особин — 16,0—19,3 см.

Рибу заморожували і до проведення аналізу зберігали при температурі —20 °С. Перед експериментом матеріал дефростували, відокремлювали органи риб і гомогенізували їх у 0,1 М гліцин-NaOH буфері (рН 9,0), який містив 1 %-вий Тритон X-100. Приготовлені гомогенати центрифугували, після чого отриманий супернатант використовували для електрофоретичного розподілу естераз. Електрофорез ферментів провадили в 7 %-вому поліакриламідному гелі за системою Davis [25].

Для виявлення молекулярних форм ферментів (МФФ) використовували методику, яка описана Л. І. Корочкіним [17], з модифікаціями [5, 10]. З метою виявлення зон локалізації естераз в гелі, ферментативну реакцію провадили за наявності діазонія — синього міцного RR [8]. В якості субстрату використовували  $\alpha$ -нафтилпропіонат.

Кількісну оцінку електрофореграм здійснювали за допомогою спеціальної комп'ютерної програми «АнаИС».

Експресію виявлених естераз оцінювали за показниками оптичної щільності ( $\Delta$ Do, відносні одиниці — в. од.) відповідних ферментутримуючих зон гелевого блоку [5, 17]. Отримані цифрові дані, що відображають рівень активності досліджуваних ферментів, обробляли статистично [6]. Для розрахунку частоти відповідних генів і генотипів у вибірках риб використовували формулу Харді—Вайнберга [1].

### Результати досліджень та їх обговорення

Всі виявлені ізоформи естераз за їх електрофоретичною рухливістю можна розділити на чотири групи (рис. 1, табл. 1). Перша група є найбільш електрофоретично рухливою (Rf від 0,324 до 0,380) і одночасно має досить невелику експресивність. Друга і третя групи у більшості органів бичків представлені двома фракціями: однією більш рухливою (F) і другою менш рухливою (S). Четверту

групу складають ізоформи, які мають нафтилацетазну і ліпазну активність. Це група найменш рухливих форм естераз (Rf від 0,090 до 0,114), вони мають велику молекулярну масу [4, 14] і слабко експресуються. Інші групи естераз ліпазної активності не проявляють.

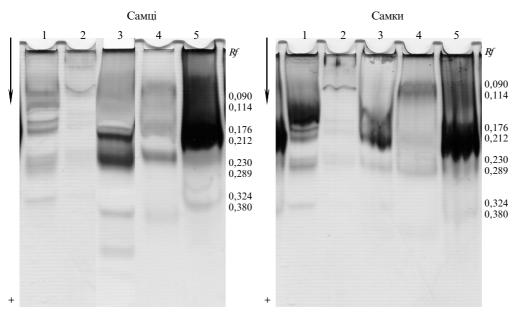


Рис. 1. Електрофоретичні спектри естераз тканин самців і самиць бичка-кругляка з акваторії о. Зміїний:

1 — зябра, 2 — м'язи, 3 — гонади, 4 — кишечник, 5 — печінка; Rf — показник коефіцієнта відносної електрофоретичної рухливості окремої форми естерази; стрілками зазначено напрямок руху ферментів у ході електрофорезу

В результаті електрофоретичного розподілу естерази зябрової тканини утворюють шість смуг, які відносяться до чотирьох вищезазначених форм з певними для кожної величинами Rf. Найбільша активність спостерігається в третій групі  $(0,586\,$  в. од. — естераза  $3_{\rm F}$  у самок,  $1,523\,$  в. од. — естераза  $3_{\rm S}$  у самців), яка представлена двома фракціями (S з Rf 0,176 і F з Rf 0,212). Найменша експресивність притаманна першій формі  $(0,223\,$  в. од. у самок і  $0,324\,$  в. од. у самців), яка є найбільш електрофоретично рухливою (Rf=0,324).

У м'язовій тканині всіх особин також виявлено чотири групи естераз, які за електрофоретичною рухливістю поділяються на шість смуг. У цілому спектри естераз тканин м'язів та зябрових пелюстків досить схожі. Однак майже всі фракції естераз тканин м'язів проявляють більш низьку активність, а у деяких випадках вона ледь виявляється (максимальна активність ферментів досягала значення лише 0,575).

Незважаючи на те, що тканини кишечника і печінки характеризуються високою активністю естераз, кількість виявлених форм ферментів в цих органах (всього їх знайдено чотири) дещо менша, ніж в м'язах і зябрах, де виявлено шість форм. Це відбувається завдяки тому, що в другій і третій групах естераз відсутні F- і S-форми ферменту. У переважної частини проаналізованих особин бичків (90 %) в кишечнику та печінці спостерігаються електрофоретично більш рухливі (F-форми) першої та другої груп естераз у порівнянні з такими ж групами естераз у тканинах зябрових пелюстків і м'язів.

Таблиця 1 Активність молекулярних форм естераз у різних органах бичка-кругляка з акваторії о. Зміїний

	D.C.	Активність ( $\Delta D_0$	, відносні одиниці)					
МФФ	Rf	Самці (n = 30)	Самки (n = 13)					
Зяброві пелюстки								
${4_F\atop 3_S\atop 3_F\atop 2_S\atop 2_F\atop 1_S}$	0,114 0,176 0,212 0,230 0,289 0,324	$\begin{array}{c} 0,837 \pm 0,014 \\ 1,523 \pm 0,040 \\ 1,367 \pm 0,034 \\ 0,853 \pm 0,027 \\ 1,255 \pm 0,050 \\ 0,324 \pm 0,024 \end{array}$	$0,678* \pm 0,013$ $1,430* \pm 0,040$ $0,586* \pm 0,011$ $0,238* \pm 0,007$ $0,247* \pm 0,007$ $0,223* \pm 0,007$					
		М'язи						
$4_{S}$ $3_{S}$ $3_{F}$ $2_{S}$ $2_{F}$ $1_{S}$	0,090 0,176 0,212 0,230 0,289 0,324	$\begin{array}{c} 0,575 \pm 0,036 \\ 0,355 \pm 0,040 \\ 0,281 \pm 0,011 \\ 0,352 \pm 0,047 \\ 0,436 \pm 0,090 \\ 0,217 \pm 0,004 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0,546^* \pm 0,064 \\ 0,315 \pm 0,011 \\ 0,248^* \pm 0,007 \\ 0,206^* \pm 0,007 \\ 0,205^* \pm 0,002 \\ \end{array}$					
		Гонади						
$egin{array}{c} 4_S & & & & & & & & & & & & & & & & & & &$	0,090 0,114 0,176 0,212 0,230 0,289 0,324	$\begin{array}{c} 0,726 \pm 0,012 \\ 1,937 \pm 0,066 \\ 1,010 \pm 0,026 \\ 0,357 \pm 0,010 \\ 0,327 \pm 0,033 \\ 0,314 \pm 0,044 \\ 0,268 \pm 0,015 \end{array}$	$0,243* \pm 0,010$ $$					
		Кишечник						
$4_F \\ 3_S \\ 2_F \\ 1_F$	0,114 0,176 0,289 0,380	1,392 ± 0,047 1,545 ± 0,046 1,063 ± 0,037 0,299 ± 0,024	$\begin{array}{c} 0,262* \pm 0,007 \\ 0,245* \pm 0,007 \\ 0,341* \pm 0,010 \\ 0,409* \pm 0,020 \end{array}$					
	Печінка							
$\begin{array}{c} 4_F \\ 3_S \\ 2_F \\ 1_F \end{array}$	0,114 0,176 0,289 0,380	$\begin{array}{c} 2,305 \pm 0,082 \\ 1,218 \pm 0,028 \\ 0,390 \pm 0,028 \\ 0,235 \pm 0,007 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1,150^* \pm 0,070 \\ 0,729^* \pm 0,030 \\ 0,322^* \pm 0,007 \\ 0,233 \pm 0,007 \end{array}$					

 $\Pi$  р и м і т к а:  $M\Phi\Phi$  — молекулярні форми ферментів, Rf — показник коефіцієнта відносної електрофоретичної рухливості окремої форми естерази, «\*» — відмінності у порівнянні активності естераз самців і самиць кругляка достовірні при P < 0.05.

Найбільша кількість ізоформ естераз виявляється в тканинах гонад. Крім фракцій, які є спільними для гонад, зябер і м'язів, в статевих залозах наявна ще одна форма ферменту, яка відноситься до найменш рухливої четвертої групи естераз. Ця група гонадних естераз включає в себе дві ізоформи зі значеннями Rf 0,090 і 0,114. Значна експресивність малорухливих фракцій в гонадах ускладнює ідентифікацію інших форм естераз на електрофореграмах і погіршує розрізняльну здатність аналізу.

Суттєві кількісні, а у випадку гонад і якісні відмінності ізоформ естераз спостерігаються у риб різної статі (табл. 1). Так, у самців кругляка в переважній

більшості органів спостерігається більш висока активність ферментів, ніж у самок. У випадку тканин гонад самок на електрофореграмах наявні лише три смуги, тоді як в спектрах гонад самців їх виявлено сім. У гонадах самок бичків третя група естераз взагалі відсутня, а решта форм представлена лише однією S або F фракцією. На відміну від самців, у тканинах м'язів самок кількість ізоформ естераз менша — відсутня форма з Rf 0,324. В інших досліджуваних органах кількість форм ферменту у риб обох статей співпадає, але кількісні показники експресивності дуже розрізняються. За винятком двох форм естераз, що належать гонадам і печінці, експресивність всіх інших ізоформ естераз у особин різної статі достовірно відрізняється, причому, як правило, у самиць ця експресивність значно менша.

Отримані результати дають можливість прийти до висновку, що з усіх досліджуваних органів найбільш сприйнятливими для вивчення внутрішньовидової різноманітності системи естераз бичка-кругляка є зяброві пелюстки. Чіткий поділ окремих ізоформ ферментів цієї тканини на шість смуг, їх висока активність, легкість ідентифікації окремих форм, їх гетерогенність за різних умов та інші чинники дозволяють вважати зяброву тканину зручною для подальшого вивчення внутрішньовидової мінливості бичка-кругляка. Виходячи із цих міркувань, подальші дослідження поліморфізму естераз бичків, які були виловлені біля острова Зміїний у різні роки, провадили виключно на тканинах зябер риб.

Порівняння спектрів естераз бичка-кругляка акваторії о. Зміїний вказує на відмінності кількості молекулярних форм та їх активності у окремих екземплярів риб як в різні роки лову, так і в різні сезони одного і того ж року (табл. 2). В 2008 р. кількість смуг на електрофореграмах варіювала від 8 весною та восени до 7 влітку — у риб, яких виловили літом, була відсутня форма естерази  $3_{\rm S}$ . Влітку в тканинах зябер виловлених бичків спостерігали більшу експресивність ізоформ естераз, ніж навесні або восени. Так, активність повільної форми  $4_{\rm S}$  влітку збільшилася на 72 %, а форм  $2_{\rm S}$  і  $2_{\rm SF}$ — майже у 4 рази порівняно з весною. Висока експресивність естераз спостерігалася також восени.

Електрофоретичний спектр естераз у риб, виловлених у 2009 році, був більш різноманітним у порівнянні з 2008 роком і складався з більшої кількості форм, які відрізнялися також іншою інтенсивністю експресії. У 2009 році найменша кількість форм (8) виявлена у виловлених осінню риб, тоді як навесні та влітку в зябрах знайдено по 10 ізоформ. Експресивність естераз у цьому році, як і в 2008, мінімальною була весною, але максимальною не літом, а восени, коли кількість ізоформ була найменшою. Слід також зазначити, що величини експресивності всіх форм естераз у 2008 р. достовірно відрізнялися від експресивності відповідних форм ферменту у риб, що виловлені у 2009 р.

Бички, які виловлені у вищезазначені роки, відрізнялися також частотою зустрічальності окремих форм естераз. У 2008 році на електрофореграмах було виявлено тільки по одному алельному варіанту генів двох локусів, а саме швидкорухливі форми (F) естераз 1 і 4, малорухливі форми (S) зазначених ферментів були відсутні. Таким чином, у риб досліджуваної у 2008 р. вибірки відповідні два локуси виявлялися мономорфними. На відміну від цього, серед бичків 2009 р. вилову, крім гомозиготних генотипів, зустрічалися особини із обома формами (F і S) цих ферментів, тобто гетерозиготи. Розраховані по Харді—Вайнбергу частоти зустрічальності алельних генів F і S склали 0,5 і 0,5 та 0,42 і 0,58 для естераз 1 і 4 відповідно.

Поліморфізм ізоформ естераз (різна кількість фракцій, неоднакова експресивність їх на електрофореграмах) та відмінності частот зустрічальності виявлених електрофоретично фенотипів дають можливість припустити, що в прибережних водах о. Зміїний мешкають генетично гетерогенні угруповання бичка-

Таблиця 2 Експресивність молекулярних форм естераз у зябрах бичка-кругляка з акваторії о. Зміїний в різні роки досліджень

372.2	D.C.	Активність ( $\Delta D$ о,	відносні одиниці)							
МФФ	Rf	2008 piκ (n = 187)	2009 рік (n = 150)							
	весна									
$4_S$	0,090	<del>_</del>	$0,481 \pm 0,003$							
$4_F$	0,114	$2,658 \pm 0,021$	$0,484* \pm 0,002$							
$egin{array}{c} 4_F \ 3_S \ 3_{SF} \ 3_F \ 2_S \ 2_{SF} \ 2_F \ 1_S \ \end{array}$	0,176	$0,797 \pm 0,008$	$0,526* \pm 0,006$							
$3_{SF}$	0,196	$0,515 \pm 0,004$	$0,615* \pm 0,003$							
$3_F$	0,212	$0.374 \pm 0.002$	$0,667* \pm 0,004$							
$2_S$	0,230	$0,257 \pm 0,001$	$0,751* \pm 0,006$							
$2_{SF}$	0,271	$0,255 \pm 0,001$	$0,508* \pm 0,002$							
$2_F$	0,289	$0,267 \pm 0,001$	$0,522* \pm 0,002$							
$1_S$	0,324	_	$0,696 \pm 0,010$							
$1_{\mathrm{F}}$	0,380	$0,185 \pm 0,003$	$0,474* \pm 0,003$							
		літо								
45	0,090	_	$0.716 \pm 0.010$							
$egin{array}{l} 4_S & 4_F & & & & & & & & & & & & & & & & & & &$	0,114	$4,584 \pm 0,050$	$0.927* \pm 0.010$							
$3_s$	0,176	_	$0.857 \pm 0.020$							
$3_{SF}$	0,196	$2,551 \pm 0,040$	$0.922* \pm 0.030$							
$3_F$	0,212	$0.880 \pm 0.030$	$1,030* \pm 0,021$							
$2_S$	0,230	$0.824 \pm 0.020$	$0,869 \pm 0,020$							
$2_{SF}$	0,271	$1,072 \pm 0,020$	$0.977* \pm 0.020$							
$2_F$	0,289	$1,047 \pm 0,020$	$1,058 \pm 0,020$							
$1_{s}$	0,324	<u> </u>	$0,685 \pm 0,010$							
$1_F$	0,380	$0,234 \pm 0,001$	$0,891 \pm 0,010$							
		осінь								
45	0,090	$1,073 \pm 0,030$	1,251* ± 0,026							
$egin{array}{l} 4_{S} & 4_{F} & & & & & & & & & & & & & & & & & & &$	0,114	$0,968 \pm 0,020$	$0,747* \pm 0,045$							
$3_S$	0,176	$2,817 \pm 0,060$	_							
$3_{SF}$	0,196	$1,794 \pm 0,053$	$0.876* \pm 0.053$							
$3_F$	0,212	$2,039 \pm 0,049$	$0.624* \pm 0.004$							
$2_S$	0,230	<u> </u>								
$2_{SF}^{S}$	0,271	$1,160 \pm 0,020$	$1,250* \pm 0,020$							
$2_F^{\circ}$	0,289	$1,353 \pm 0,020$	$0.952* \pm 0.059$							
$1_S$	0,324	· _ ·	$0,679 \pm 0,052$							
$1_F^{\circ}$	0,380	$0,366 \pm 0,003$	$0.656* \pm 0.079$							

 $\Pi$  р и м і т к а: МФФ — молекулярні форми ферментів, Rf — показник коефіцієнта відносної електрофоретичної рухливості окремої форми естерази. «\*» — відмінності у порівнянні активності естераз кругляка 2008 р. з активністю естераз бичків 2009 р. достовірні при P < 0.05.

кругляка, представники яких домінували у вибірках різних років, що досліджувались.

Дані щодо біологічної та генетичної різноякісності популяцій, які можна отримати при одночасному проведенні іхтіологічних, морфометричних і генетикобіохімічних досліджень, є корисними для удосконалення режиму промислу і збереження генофонду окремих видів риб. Отримані дані, які відображають індивідуальні якісні та кількісні особливості ізоформ естеразної системи, можуть бути показником біохімічного поліморфізму і генетичної гетерогенності досліджуваних угруповань чорноморських бичків і суттєво доповнювати результати традиційних морфометричних досліджень.

#### Висновки

- 1. Естерази бичка-кругляка електрофоретично можна розділити на чотири групи, які в тканинах різних органів можуть складатися із швидких, середньорухливих та повільно рухливих форм.
- 2. Для вивчення внутрішньовидового поліморфізму ензимної системи естераз бичка-кругляка найбільш придатним матеріалом досліджень  $\varepsilon$  зяброві пелюстки.
- 3. Спостерігаються істотні зміни кількості та експресивності форм естераз у риб, виловлених у різні сезони одного року.
- 4. Спектри естераз зябер бичків, виловлених у різні роки поблизу о. Зміїний, достовірно відрізняються як кількісними, так і якісними показниками (кількістю смуг у спектрі, їх експресивністю, наявністю F- і S-алозимних фракцій, частотою стрівальності їх у спектрах), що свідчить про можливість мешкання генотипово відмінних угруповань бичка-кругляка в акваторії цього острова.

Автори вдячні науковому співробітнику Регіонального центру екологічного моніторингу природного середовища С. М. Снігірьову за надання іхтіологічного матеріалу та молодшому науковому співробітнику кафедри генетики і молекулярної біології В. О. Кучерову за допомогу у проведенні електрофорезу.

### Література

- 1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. Москва: Мир, 1988. Т. 3. С. 137—138.
- 2. Алексеев Ф. Е., Алексеева Е. И., Титова Н. В. Полиморфная система мышечных эстераз, экологическая структура поселений и исследование вида у макруруса (*Macrurus rupestis Gunn.*). Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 58—62.
- 3. Алферова Н. М., Нефедов Г. Н. Электрофоретическое исследование эстераз некоторых видов рыб Восточной Атлантики // Биохимическая генетика рыб. Материалы 1-го всесоюзн. совещ. Ленинград, 6—9 февраля 1973 г. Л., 1973. С. 195—199.
- 4. Андриевский А. М., Заморов В. В., Черников Г. Б., Кучеров В. А., Косенко С. Ю. Разнообразие карбоксиэстераз как генетико-биохимический показатель гетерогенности черноморских популяций бычка-кругляка и бычка-ратана // Тез. докл. Межд. науч. конф., март 2005 г., Саранск. С.: Изд-во Мордов. ун-та, 2005. С. 11—14.
- 5. *Андриєвський О. М.* Фізико-хімічні методи дослідження білків. Одеса: Вознесенська друкарня, 2003. 39 с.
- 6. *Атраментова Л. О., Утевська О. М.* Статистичні методи в біології: Підручник. Х.: XHV імені В. Н. Каразіна, 2007. 288 с.
- 7. Афанасьев Б. И., Беккер В. Э., Фетисов А. Н. Электрофоретическое исследование изозимов трех видов семейства *Myctophidae* // Вопросы ихтиологии. 1989. Т. 29, вып. 6. С. 1018—1026.
  - 8. *Берстон М.* Гистохимия ферментов. Москва: Мир, 1965. 464 с.
- 9. Богданов Л. В., Фрусова Г., Д., Билиле Л. А. и др. Популяционно-генетические исследования тихоокеанской сельди (Clupea parengus Pallas). Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 74—82. 10. Гаркуша О. П., Андриевский А. М., Заморов В. В., Олейник Ю. Н., Кучеров В. А.
- 10. *Гаркуша О. П., Андриевский А. М., Заморов В. В., Олейник Ю. Н., Кучеров В. А.* Полиморфизм карбоксиэстераз бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) из северо-западной части Черного моря // Экология моря, 2005. Вып. 69. С. 12—17.
- 11. Дьяков Ю. П., Коваль Е. З., Богданов А. В. Внутривидовой биохимический полиморфизм и популяционная структура черного палтуса Reinhardtius hyppoglossoides (Walbaum) (Pleuronectidae) в Беринговом и Охотском морях // Вопросы ихтиологии. 1981. Т. 21, вып 5. С. 809—815.

- 12. Зенкин В. С., Рязанцева Е. И., Лосев О. Д. Полиморфизм мышечных эстераз и анализ популяционной структуры обыкновенной и капской ставрид *Trachurus trachurus trachurus* L. и *T. trachurus capensis castelnau* шельфа Западной Африки. Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 94—98.
- 13. Зенкин В. С. Биохимический полиморфизм и популяционно-генетический анализ атлантической сельди (*Clupea harengus H.*). Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 64—68.
  - 14. *Кирпичников В.* С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.
- 15. *Коваль Л. И.* Термическая структура вод и распределение фенотипов эстераз Est-1-Вс у придунайской ставриды // Тез. докл. 12-й Междунар. конф. по промысловой океанологии, Светлогорск, 9—14 сент., 2002. Калининград, 2002. С. 115—116. 16. *Корешкова Н. Д., Паюсова А. Н.* Популяционная структура рыбца (*Vimba vim*-
- 16. Корешкова Н. Д., Паюсова А. Н. Популяционная структура рыбца (Vimba vimba), выявленная на основании электрофоретического анализа мышечных эстераз. Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 116—118.
- 17. *Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И.* и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
- 18. *Логвиненко Б. М., Кодолова О. П., Полянская М. Б.* Полиморфизм мышечных неспецифических эстераз у ерша *Gymnocechalus cernua* (L.) (*Percidae*) // Вопросы ихтиологии. 1983. Т. 23, вып. 2. С. 339—342.
- 19. *Мартинсон М. А., Оявеер Э. А., Таннер Р. Х.* О встречаемости мышечных эстераз у балтийской сельди (*Clupea harengus membras H*). Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 70—73.
- 20. *Махоткин М. А.* Биологический полиморфизм пеленгаса *Mygil soiuy bas*. Азовского моря // Тез. докл. Всерос. конф. молодых ученых, посвященной 140-летию со дня рождения Н. М. Книповича. Мурманск, 2002. С. 133—134.
- 21. *Павлов С. Д.* Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция тихоокеанских форелей (род *Parasalmo*) западной Камчатки // Генетика. 2000. Т. 36, № 9. С. 1251—1261.
- 22. Пудовкин А. И. Использование аллозимных данных для оценки генетического сходства. Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. Л., 1979. С. 10—17.
- 23. *Салменкова Е. А.* Генетика изоферментов рыб // Успехи современной биологии. 1973. Т. 75, № 2. С. 217—235.
- 24. Семенова А. В., Андреева А. П., Карпов А. К., Фролов С. Ю., Феоктистов Е. И., Новиков П. Г. Генетическая изменчивость сельдей рода Clupea Белого моря // Вопросы ихтиологии. 2004. Т. 44, № 2. С. 207—217.
- 25. *Davis B. J.* Disk electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. 121. P. 404—427.
  - В. В. Заморов, канд. биол. наук, доцент
  - И. Л. Рыжко, ст. преподаватель
  - О. В. Друзенко, аспирант

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, биологический факультет, кафедра гидробиологии и общей экологии ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина E-mail: hydrobiologia@mail.ru

### ПОЛИМОРФИЗМ ЭСТЕРАЗ БЫЧКА-КРУГЛЯКА NEOGOBIUS MELANOSTOMUS (PALLAS) ИЗ АКВАТОРИИ ОСТРОВА ЗМЕИНЫЙ

### Резюме

Исследовали электрофоретические спектры эстераз тканей жабр, мышц, гонад, кишечника и печени бычка-кругляка, выловленного в прибрежных водах о. Змеиный. Во всех тканях установлено наличие четырех основных форм эстераз, отличающихся по электрофоретической подвижности. Выявлены различия спектров эстераз тканей жабр рыб, выловленных в разные годы. На этом основании сделано предположение, что в акватории о. Змеиный могут обитать генетически неидентичные группировки бычкакругляка.

Ключевые слова: эстеразы, полиморфизм, бычок-кругляк, о. Змеиный.

V. V. Zamorov, PhD. Biol., Assistant professor I. L. Ryzhko, senior teacher O. V. Druzenko, graduate student Odessa National University named after I. I. Mechnikov Faculty of Biology, Department of Hydrobiology and General Ecology st. Dvoryanska, 2, Odessa, 65026, Ukraine E-mail: hydrobiologia@mail.ru

### ESTERASES POLYMORPHISM OF *NEOGOBIUS MELANOSTOMUS* (PALLAS) FROM THE ZMEINY ISLAND WATER AREA

#### **Summary**

The electrophoretic esterases spectrum tissues of gills, muscles, gonads, intestine and liver of *Neogobius melanostomus* caught in the waters of the Zmeiny island were investigated. The presence of four main forms of esterases that differ in electrophoretic mobility were revealed in all studied tissues. There were exposed the differences between the spectra of esterases of the tissues of fish gills caught in different years. On this basis there was made the assumption that in the waters of the is. Zmeiny can inhabit genetically non-identical groups *N. melanostomus*.

**Key words:** esterase, polymorphism, Neogobius melanostomus, the Zmeiniy island.

УДК 594.124(262.5)

**С. В. Стадниченко**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Одесский филиал Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского НАН Украины, отдел популяционной экологии беспозвоночных, ул. Пушкинская, 37, Одесса, 65125, Украина, e-mail: stadiki@ukr.net

## КОСВЕННЫЕ ОЦЕНКИ СМЕРТНОСТИ И ВЫЖИВАЕМОСТИ МИДИЙ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЧЕРНОГО МОРЯ

Проведено сравнение коэффициента смертности мидии Mytilus galloprovincialis Lam. из донных поселений северо-западной части Черного моря, определенного по численности возрастных групп, с его косвенными оценками по биомассе и средней массе одной особи. Показана возможность использования полученных ранее эмпирических зависимостей годовой продукции от биомассы и средней массы особи для оценки смертности и выживаемости мидии в пространственном и временном аспекте.

**Ключевые слова:** *Mytilus galloprovincialis*, смертность, выживаемость, биомасса, масса особи.

Одним из важнейших популяционных параметров оценки состояния различных видов гидробионтов, является показатель их смертности, определяющий особенности размерно-возрастной структуры, продукционные свойства и продолжительность жизни гидробионта в различных частях его ареала. Смертность и продолжительность жизни являются фундаментальными биологическими характеристиками, которые зависят от комплекса генетических и экологических факторов. Эти показатели используются в исследованиях роста и старения животных, формирования популяционной структуры вида, биологических последствий воздействия факторов среды на различные виды гидробионтов [1, 2], для оценки возможностей и масштабов их хозяйственного использования.

Методы прямых определений смертности животных — наиболее точные, но остаются трудоемкими и не всегда применимы при изучении жизнедеятельности различных видов гидробионтов в естественных условиях их обитания. Поэтому в гидробиологических исследованиях используются различные косвенные способы оценки смертности по другим, легче определяемым популяционным характеристикам [3].

При стационарном типе размерно-возрастной структуры поселений моллюсков коэффициент смертности Z определяется с высокой точностью по соотношению численности возрастных классов. Однако определение возраста моллюска по слоям роста его раковины требует достаточного времени и опыта исследователя. Раннее было показано, что в стационарных поселениях гидробионтов коэффициент смертности равен P/B-коэффициенту — количественному показателю продуктивности гидробионтов [4, 5], численно равному отношению их продукции (P) к средней биомассе (B) за изучаемый период времени, в данном случае за год. Но для определения P/B-коэффициента необходимы данные о годовой продукции гидробионта (P), что без сведений о его смертности также затруднительно. В связи с этим актуальным для мониторинга двустворчатых моллюсков является выявление смертности и выживаемости в их поселениях по

стандартным гидробиологическим характеристикам — биомассе и численности моллюска.

Одним из наиболее удобных модельных объектов является черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* Lam. — активный фильтратор морских вод, многочисленный компонент различных зооценозов Черного моря, перспективный объект марикультуры. Выявление в перламутровом слое раковины *M. galloprovincialis* разноокрашенных сезонных слоев роста позволяет достаточно точно определять индивидуальный возраст моллюсков [1] и проводить наблюдения за их ростом, продукцией, смертностью и выживаемостью в различных условиях среды.

Цель исследования — обосновать способ косвенной оценки коэффициента смертности и выживаемости мидий с использованием расчетных значений P/B-коэффициента на примере поселений моллюска в северо-западной части Черного моря. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1. Определить базовые значения коэффициента смертности и ежегодной выживаемости мидий для их различных локальных поселений по соотношениям численности возрастных классов.
- 2. Получить косвенные оценки *P/B*-коэффициента, которые при стационарном типе возрастной структуры моллюска равны коэффициенту его смертности, а также рассчитать ежегодную выживаемость.
- 3. Выявить относительные отклонения косвенных оценок коэффициента смертности и ежегодной выживаемости от их базовых значений как для отдельных поселений мидий, так и для мидий северо-западной части Черного моря в целом.

### Материалы и методы исследования

Материалом послужили пробы мидии M. galloprovincialis из естественных донных поселений, собранные в 1993 г. в северо-западной части Черного моря на глубине 5,5—35 м (рис. 1), в 2005 г. — в Тендровском заливе, в 2008 г. в авандельте Дуная.

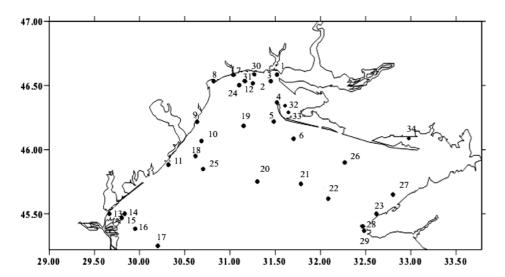


Рис. 1. Схема станций отбора проб мидий Mytilus galloprovincialis в северо-западной части Черного моря в 1993 г.

Индивидуальный возраст моллюсков определяли по сезонным слоям роста их раковин [6]. Для всех вариантов возрастной структуры были получены базовые значения коэффициента смертности Z по соотношениям численности возрастных классов мидий с использованием уравнения оценки коэффициента смертности по среднему возрасту моллюсков [7]:

$$Z = \ln\left(\frac{\overline{t} - t_x + 1}{\overline{t} - t_x} \cdot \frac{n}{n+1}\right),\,$$

где  $\overline{t}$  — средний возраст,  $t_{\scriptscriptstyle X}$  — начальный возрастной класс, n — численность моллюсков.

Средний возраст  $\overline{t}$  рассчитывался как средневзвешенная численности возрастных групп моллюсков. Кроме этого, P/B-коэффициент мидий был определен по обоснованному ранее эмпирическому уравнению [8], позволяющему рассчитывать значения годовой продукции мидий по их биомассе (B) и средней массе одной особи (W):

$$\ln P = 1,004 \ln B - 0,484 \ln W. \tag{1}$$

По отношению рассчитанной таким способом годовой продукции к биомассе были получены значения *P/B*-коэффициента, которые явились косвенными оценками коэффициента смертности мидий.

Ежегодную выживаемость мидий (V) как наглядного показателя смертности моллюска Z вычисляли по уравнению  $V=e^{-z}$  по базовым значениям коэффициента смертности и по его косвенным оценкам.

Для всех анализируемых поселений мидий были вычислены отклонения ( $\Delta$ , %) косвенных оценок смертности (P/B) и выживаемости ( $V_{P/B}$ ) от базовых значений этих показателей (Z,  $V_Z$ ):

$$Z_{\Delta} = \frac{Z_{P/B} - Z}{Z} \cdot 100, \ V_{\Delta} = \frac{V_{P/B} - V_{Z}}{V_{Z}} \cdot 100.$$

### Результаты и обсуждение

Значения P/B-коэффициента, рассчитанные на основе уравнения (1), незначительно отличаются от значений базового коэффициента смертности мидий (Z), рассчитанного прямым способом по численности возрастных классов моллюска (табл.) как в сторону занижения, так и их завышения. Максимальное его отклонение в сторону завышения составляет 28,8 % (ст. 15), а занижения — 19,2 % (ст. 8). Среднее относительное отклонение  $Z_{\it I}$  для всего массива данных равно 0,45  $\pm$  2,8 %.

Соотношение между базовым коэффициентом смертности Z и вычисленным P/B-коэффициентом определяется следующим выражением:

$$Z = 0.152 + 0.853 (P/B), (R^2 = 92.3; SE = 0.147),$$
 (2)

где  $R^2$  — коэффициент детерминации, SE — стандартная ошибка.

Аналогично определяется соотношение между базовыми значениями ежегодной выживаемости  $V_Z$  и ее значениями  $V_{P/B}$ , рассчитанными на основе P/B-коэффициента:

$$V_Z = 0.984 \ V_{P/B}, (R^2 = 89.5; SE = 0.053).$$
 (3)

Таблица

Популяционные характеристики и относительные отклонения смертности и выживаемости Mytilus galloprovincialis в северо-западной части Черного моря

Стан- ция	В	W	Z	V <sub>z</sub> , %	<i>Р/В-</i> коэф- фициент	V <sub>P/B</sub> , %		гельные нения	
ция					фициент		$Z_{\!\scriptscriptstyle \Delta}$	$V_{\Delta}$	
Северо-западная часть Черного моря, 1993 г.									
1 2 3 4 5 8 8 8a 9 10 11 12 14 15 17 20 24 30	259,0 1542,0 242,0 444,0 88,4 1525,0 3583,4 1850,0 158,3 4000,0 92,7 3111,0 598,1 356,9 20,5 944,3 689,8	2,32 4,63 5,1 0,47 0,46 2,8 1,65 0,47 0,50 5,97 1,75 2,08 2,40 0,77 0,09 2,23 0,47	0,64 0,53 0,55 1,75 1,23 0,78 0,98 1,60 1,44 0,34 0,71 0,71 0,52 1,13 2,73 0,69 1,25	53 59 58 17 29 46 38 20 24 71 49 49 59 32 7 50 29	0,69 0,49 0,46 1,48 1,52 0,63 0,80 1,48 1,43 0,43 0,78 0,72 0,67 1,16 3,25 0,69 1,49	50 61 63 23 22 53 45 23 24 65 46 49 51 31 4 50 23	+7,8 -7,5 -16,4 -15,4 +23,6 -19,2 -18,4 -7,5 -0,7 +26,5 +9,9 +1,4 +28,8 +2,7 +19,0 0 +19,2	-5,7 +3,4 +5,2 +35,3 -24,0 +15,2 +18,4 +15,0 0 -8,5 -6,1 0 -13,6 -3,1 -42,9 0 -20,7	
31	802,8	0,47	1,87	15	1,90	15	+1,6	0	
			Тендро	вский з	алив, 2005 г.				
	4861,0	4,41	0,45	64	0,5	61	+11,1	-4,7	
			Дунайс	ское взм	юрье, 2008 г.				
2 3 3a 2b 3b 4 9	3409,0 949,0 157,1 15,1 495,0 482,0 92,3 731,4	1,51 1,33 1,31 1,16 0,83 1,34 1,30 1,41	0,98 1,26 1,10 0,88 1,24 1,1 0,85 0,85	38 28 33 42 29 33 43 43	0,85 1,19 0,90 0,94 1,12 0,89 0,87 0,87	43 30 41 39 33 41 42 42	-13,3 -5,6 -18,2 +6,8 -9,7 -19,1 +2,4 +2,4	+13,2 +7,1 +24,2 -7,1 +13,8 +24,2 -2,3 -2,3	

П р и м е ч а н и е: B — биомасса, г/м²; W — средняя масса одной особи, г; Z — коэффициент смертности;  $V_Z$  — ежегодная выживаемость по Z, %;  $V_{P/B}$  — ежегодная выживаемость по P/B-коэффициенту, %.

Наибольшие значения относительных отклонений ежегодной выживаемости мидий  $V_{\rm J}$  составляют +35,3 % (ст. 4) и –42,9 % (ст. 20). Такие значения характерны для поселений мидий, находящихся в условиях высокого уровня смертности моллюсков, при котором, как правило, наблюдается нарушение стационарности поселений в результате различий смертности мидий разной длины [9]. Среднее относительное отклонение  $V_{\rm J}$  и его ошибка для всех анализируемых поселений мидий составляет 1,26  $\pm$  3,1 %.

Выявленные соотношения (2) и (3) могут быть использованы для косвенных оценок смертности и выживаемости мидий в северо-западной части Черного моря с достаточно высокой точностью. В частности, если выявленный P/B-коэффициент равен 2,73, то рассчитанный по уравнению (2) коэффициент смерт-

ности равен 2,48 с доверительным 95 %-ным интервалом от 2,30 до 2,66. При ежегодной выживаемости, вычисленной по Р/В-коэффициенту и равной 0,65, рассчитанное по уравнению (3) значение этого показателя равно 0,64 с доверительным 95 %-ным интервалом от 0,598 до 0,680.

Предлагаемый вариант косвенных оценок показателей смертности и выживаемости мидий позволяет избегать длительных и трудоемких операций по определению возрастной структуры поселений моллюска.

### Выводы

Оценки коэффициента смертности и ежегодной выживаемости мидий на основе Р/В-коэффициента, рассчитываемого по стандартным гидробиологическим характеристикам — биомассе и средней массе одной особи, имеют средние отклонения от их базовых значений, не превышающие 2 % при ошибке их определений менее 3,5 %. Такая сходимость двух рассмотренных способов выявления смертности и выживаемости моллюсков дает возможность косвенных оценок этих показателей по P/B-коэффициенту для мидий M. galloprovincialis северозападной части Черного моря с достаточно высокой точностью.

### Литература

- 1. Золотарев В. Н. Склерохронология морских двустворчатых моллюсков. К.: Наукова думка, 1989. — 112 c.
- 2. Золотарев В. Н., Шурова Н. М. Продолжительность жизни гидробионтов как экологический индикатор // Наукові записки Тернопільського державного педагогічного університету. Серія: Біологія. — № 3 (14). — Спеціальний випуск: Гідроекологія. 2001. — C. 52—53.
- 3. Золотарев В. Н., Шурова Н. М. Методы оценки смертности животных по продолжительности их жизни // Современные проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений — 2. Мат. международной. науч. конф. — Херсон, 2008. — С. 11—16.
- 4. Allen J. A. Relation between production and biomass // J. Fish. Res. Board Can. –
- 1971. Vol. 28. P. 1573—1581. 5. Brey T., Arntz W. E., Pauly D., Rumohr H. Arctica (Cyprina) islandica in Kiel Bay (Western Baltic): growth, production and ecological significance // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1990. — Vol. 136. — P. 217—235.
- 6. Шурова Н. М., Золотарев В. Н. Сезонные слои роста в раковинах мидий Черного моря // Биология моря. — 1988. — № 1. — С. 18—22.

  7. Ssentongo G. W., Larkin P. A. Some simple methods of estimating mortality rates of
- exploited fish populations // J. Fish. Research Board Canada. 1973. Vol. 30, № 5. —
- 8. Stadnichenko S. V., Shurova N. M. Estimating productivity of the Black Sea mussels from their density and biomass // The Black Sea Ecological Problems: Collected papers. Odessa: SCSEIO, 2000. — P. 297—300.
- 9. Shurova N. M. Influence of hypoxia on the state of the population of the Black Sea mussels // The Black Sea Ecological Problems: collected papers. — Odessa: SCSEIO, 2000. — P. 286—290.

### С. В. Стадніченко

Одеський філіал Інституту біології південних морів НАН України, вул. Пушкінська, 37, Одеса, 65125, Україна, e-mail: stadiki@ukr.net

### НЕПРЯМІ ОЦІНКИ СМЕРТНОСТІ І ВИЖИВАНОСТІ МІДІЙ ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОЇ ЧАСТИНИ ЧОРНОГО МОРЯ

#### Резюме

Для виявлення смертності і виживаності мідії *Mytilus galloprovincialis* в поселеннях в північно-західній частині Чорного моря можна використовувати *P/B*-коефіцієнт, що розраховується за стандартними гідробіологічними характеристиками — біомасі та середній маси однієї особини.

Ключові слова: Mytilus galloprovincialis, коефіцієнт смертності, виживаність, біомаса, маса однієї особини

### S. V. Stadnichenko

Odesa branch, Institute of Biology of the Southern Seas, NASU, Pushkinska St., 37, Odesa, 65125, Ukraine; e-mail: stadiki@ukr.net

### INDIRECT ASSESSMENTS OF MUSSELS MORTALITY RATE AND ANNUAL SURVIVAL FROM THE NORTHWESTERN PART OF THE BLACK SEA

### **Summary**

For revealing of mortality rate and annual survival of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the settlements in the northwestern Black Sea it is possible to use *P/B*-coefficient counted on the base of standard hydrobiological characteristics — a biomass and average individual mass of mollusks.

**Key words:** *Mytilus galloprovincialis*, mortality rate coefficient, annual survival, biomass, individual mass.



### ІСТОРИЧНІ НАРИСИ





УДК 581.9:504.73(477.74)

О. Ю. Єрмолаєва, ст. лаборант Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, біологічний факультет, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

### ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ РІДКІСНИХ ТА ЗНИКАЮЧИХ ЕФЕМЕРОЇДНИХ ГЕОФІТІВ ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Наведено уточнений перелік видів рідкісних та зникаючих цибулинних, бульбоцибулинних та бульбових ефемероїдних геофітів природної флори Одеської області. Відмічено та проаналізовано зміни до категорій їх охорони. Розглянуто історію вивчення вказаних видів та подано стислу інформацію щодо їх досліджень в природі і в культурі за період від початку XIX сторіччя до теперішнього часу. Відмічено неповність та фрагментарність накопичених даних.

**Ключові слова:** рідкісні та зникаючі види, ефемероїдні геофіти, Червона книга України, історія, Одеська область.

### Вступ

Ефемероїдні геофіти — багаторічні трав'яні рослини з коротким, переважно весняним періодом вегетації. Це екологічна група рослин, які в несприятливих умовах існування, в основному, дефіциту вологи влітку, що характерно для півдня України [1], перебувають у стані спокою у вигляді підземних запасаючих органів відновлення. Незважаючи на незначний відсоток ефемероїдних геофітів у флорі регіону [2], у весняний період вони домінують у рослинному покриві, оскільки є першими рослинами, що з'являються після зимового періоду та утворюють природні ландшафти як невід'ємні компоненти фітоценозів [3].

Високі декоративні якості ефемероїдних геофітів  $\varepsilon$  однією з причин скорочення їх чисельності у природних місцезростаннях (зривання та викопування рослин), іншою причиною  $\varepsilon$  господарська діяльність людини, яка призводить до знищення природних локалітетів рослин [4].

Мета роботи — визначити перелік видів рідкісних та зникаючих цибулинних, бульбоцибулинних та бульбових ефемероїдних геофітів природної флори Одеської області, які підлягають охороні та з'ясувати ступінь їх вивченості на даний момент.

Назви усіх видів рослин наведено за сучасною номенклатурою [5]. Уточнення назв проведено за допомогою номенклатурних довідників (переліків), визначників і флор [2, 5—9].

### Результати та їх обговорення

У другому виданні Червоної книги України (далі — ЧКУ(1996) [4]) для Одеської області вказано 14 видів ефемероїдних геофітів. Додатково в роботі О. М. Попової [10] налічуємо ще 6 видів ефемероїдних геофітів державного рівня охорони. Окрім того, ще 10 видів ефемероїдних геофітів підлягають охороні на місцевому рівні та включені до Червоного Списку Одеської області (далі — ЧСОО [11]). Отже, за попередніми даними, в Одеській області налічува-

лось 30 видів рідкісних та зникаючих ефемероїдних геофітів, з яких 20 видів занесено до ЧКУ (1996): І категорія (зникаючі) — 4 види, ІІ (вразливі) — 9, ІІІ (рідкісні) — 7 видів [12] (табл.).

Нещодавно вийшло друком третє видання Червоної книги України (далі — ЧКУ (2009) [13]), в якому для Одеської області налічуємо до 21 виду ефемероїдних геофітів, з яких *Hyacintella pallasiana* (Steven) Losinsk. (гіацинтик Палласів), включений до Світового Червоного списку (СЧС) [14]), вперше опинився серед рослин державного рівня охорони, але для Одеської області він вказаний як сумнівний [13], про що було зазначено в роботі [15]. Оскільки його зростання в області не підтвердилось [16], до переліку видів рідкісних та зникаючих ефемероїдних геофітів Одеської області (див. табл.) його не внесено. Слід відмітити, що для Одеської області у ЧКУ (2009) наведено ще Crocus heuffelianus Herb. (шафран Гейфелів), не вказаний в роботах [10, 15, 16], який поширений у західних регіонах Україні, але зрідка зустрічається і на півночі Одеської області [13]. Решта — це 19 видів, наведених в роботі [10], окрім Allium ursinum L. (цибуля ведмежа), який у ЧКУ (2009) знов чомусь не вказаний для Одеської області. Оскільки його зростання в області було підтверджено [10, 17], то його треба залишити у переліку (див. табл.). Таким чином, на території Одеської області охороні підлягає 31 вид рідкісних та зникаючих ефемероїдних геофітів: 10 видів включено до нині чинного ЧСОО та 21 вид занесено до ЧКУ (2009), з яких 6 видів включено до СЧС та Європейського Червоного списку (ЄЧС) [18]

Окрім того, у ЧКУ (2009) відмічено деякі зміни щодо ступенів охорони даних видів ефемероїдних геофітів у порівнянні з такими у ЧКУ (1996). Так, у ЧКУ (2009) до категорії «зникаючі» віднесено 2 види, «вразливі» — 14, «неоцінені» — 5 (див. табл.). Аналіз такого перерозподілу показав, що ступінь охорони змінено у 13 (62 %) видів, переважно тих, що у ЧКУ (1996) належали до ІІІ категорії. У більшості видів, у тому числі трьох видів І категорії, категорію охорони змінено на «вразливий». Решта видів, ступінь охорони яких залишився без змін, належали, в основному, до ІІ категорії. Помічено, що у ЧКУ (2009) жоден з ефемероїдних геофітів Одещини не віднесено до категорії «рідкісний», проте близько чверті видів (ІІ та ІІІ категорій) отримали категорію «неоцінений». Слід відмітити, що в результаті цих змін, у ЧКУ (2009) в порівнянні з ЧКУ (1996) кількість видів категорії «вразливий» збільшилась майже в 1,5 рази. Окрім того, виходячи з визначення категорій охорони [4, 13], їх зміни вказують на покращення стану природних популяцій у трьох видів ефемероїдних геофітів, але у шести видів — на погіршення такого (див. табл.).

Сучасна Одеська область складається з територій колишніх Одеського, Ананьївського та Тираспільського повітів Херсонської губернії, до якої вона входила до 1920 р., та частини Балтського повіту Подільської губернії. У 1954 р. до складу Одеської області увійшла Ізмаїльська область, яка складалась з колишніх Акерманського та Ізмаїльського повітів Бессарабської губернії [19].

Найперші відомості про рослинність у межах колишніх Херсонської, Подільської та Бессарабської губерній зустрічаються у роботах П. С. Палласа (1771—1776), С. Г. Гмеліна (1771—1783), М. фон Біберштейна (1808—1819), В. Г. Бессера (1822), А. Л. Андржійовського (1823—1869) та О. Д. Нордмана (1847) [20]. Це був період первинних флороінвентаризаційних досліджень, коли накопичувалась інформація про видовий склад і природну диференціацію флори.

Наприкінці XIX — початку XX ст. з'явилась низка праць, де наведено дані про місцезнаходження багатьох рідкісних видів ефемероїдів, які пізніше було включено до охоронних списків області. У цих працях представлено фенологічні спостереження, морфологічний опис видів та їх приуроченість до певних

Таблиця

### Рідкісні та зникаючі ефемероїдні геофіти Одеської області

№	Таксономічна належність	С	татус охо	рони	Знахідки видів у XIX — початку XX ст.	Гербарій ОНУ (MSUD) (дати збору)	Ботан.
3/п		ЧКУ (1996)	ЧКУ (2009)	Інші рівні охоро- ни			сад ОНУ, (кільк. особин)
	Alliaceae						
1.	Allium sphaeropodum Klok. (цибуля круглонога)	I	вразл.	_	_	_	_
2.	A. ursinum L. (ц. ведмежа)	П*	неоцін.	_	[21, 23, 24, 26]	_	до 10
	Amaryllidaceae						
3.	Galanthus elwesii Hook. fil. (підсніжник Ельвеза)	Ш	вразл.	CYC (I)	_	_	до 1000
4.	G. nivalis L. (п. звичайний)	II	неоцін.	_	[23, 24]	_	_
5.	Leucojum aestivum L. (білоцвіт літній)	П*	вразл.	_	[23, 24]	_	_
6.	Sternbergia colchiciflora Waldst. et Kit. (штернбергія пізньоцвіта)	П	вразл.	_	[21, 23, 24, 27]	2008	до 50
	Berberidaceae						
7.	Gymnospermium odessanum (DC.) Takht. (гімносперміум одеський)	П	вразл.	СЧС (І)	[21, 22, 25, 27]**	1872 1835 1988— 1989	до 500
	Fumariaceae						
8.	Corydalis cava (L.) Schweigg. et Koerte (ряст порожнистий)	_		ЧСОО	[22, 25, 26]	_	_
9.	C. marschalliana Pers. (р. Маршалла)	_	_	ЧСОО	[22, 25]	_	_
10.	<i>C. solida</i> L. (р. ущільнений)	_		ЧСОО	[22, 25, 27]	1870	> 1000
11.	C. paczoskii N. Busch. (р. Пачоського)	_		ЧСОО	[8]	_	_
	Hyacinthaceae						
12.	Bellevalia sarmatica (Georgy) Woronow (белевалія сарматська)	_		ЧСОО	[21, 23, 24, 27]**	1936 1988— 1989	до 10
13.	Hyacinthella leucophaea (K. Koch.) Schur. (гіацинтик блідий)	_	_	ЧСОО	[23, 24, 27]**	1936 1987— 1989	до 10
14.	Leopoldia temuiflora (Tausch.) Heldr. (леопольдія тонкоцвіта)	_	_	ЧСОО	[23, 24, 27]**	1907 1937	до 100

Продовження табл.

	Таксономічна належність	C	татус охо	рони	Знахідки	Гербарій	Ботан.
3/п		ЧКУ (1996)	ЧКУ (2009)	Інші рівні охоро- ни	видів у XIX — початку XX ст.	ОНУ (MSUD) (дати збору)	сад ОНУ, (кільк. особин)
15.	Ornithogalum amphibolum Zahar. (рястка двозначна)	Ш	зник.	€ЧС (I)	_	_	_
16.	O. boucheanum (Kunth) Aschers. (p. Буше)	III*	неоцін.		[21, 23, 24, 27]**	1987— 1989	до 100
17.	O. fimbriatum Willd. (р. торочкувата)	_	_	ЧСОО	[23, 26]	_	до 500
18.	O. kochii Parl. (p. Koxa)	_		ЧСОО	[21, 23, 24, 27]**	1936 1987— 1989	_
19.	O. oreoides Zahar. (р. гірська)	П	вразл.	CYC(R)	_	_	до 10
20.	O. refractum Schlecht. (р. відігнута)	П	вразл.		[26]	_	до 50
21.	Scilla bifolia L. (проліска дволиста)	_		ЧСОО	[23, 24, 26, 27]	_	до 1000
	Iridaceae						
22.	Crocus heuffelianus Herb. (шафран Гейфелів)	II*	неоцін.	CYC (I)	[23, 24]	_	_
23.	C. reticulatus Stev. ex Adam. (ш. сітчастий)	Ш	неоцін.	_	[21, 23, 24, 26, 27]**	_	до 50
	Liliaceae						
24.	Fritillaria montana Hoppe (рябчик гірський)	I*	зник.	_	[23, 24, 26]**	_	_
25.	F. ruthenica Wikstr. (р. руський)	П	вразл.	_	[24]	1907	до 10
26.	Tulipa hypanica Klok. et Zoz (тюльпан бузький)	Ш	вразл.	_	[23, 24, 27]**	_	до 10
27.	T. quercetorum Klok. et Zoz (т. дібровний)	Ш*	вразл.	_	[23, 24]**	_	до 10
28.	T. schrenkii Regel (т. Шренка)	Ш*	вразл.	_	[21, 23, 24, 27]**	_	до 10
	Melanthiaceae						
29.	Bulbocodium versicolor (KerGawl.) Spreng (брандушка різнокольорова)	I	вразл.		[23, 24]**		
30.	Colchicum ancyrense В. L. Burtt. (пізньоцвіт анкарський)	Ш	вразл.	_	[21, 23, 24, 27]**	1835 1872 1913 1937	до 10

Закінчення табл

№ 3/п	Таксономічна належність	Статус охорони			Знахідки видів у XIX —	Гербарій ОНУ (MSUD)	Ботан. сад ОНУ,
		(1996)	(2009)	рівні охоро- ни	початку XX ст.	(дати збору)	(кільк. особин)
31.	C. fominii Bordz. (п. Фоміна)	I	вразл.	€ЧС (V) СЧС (I)	_	_	_
	Всього	21	21	16	26	10	19

У м о в н і п о з н а ч е н н я. Категорії охорони для ЧКУ (1996): І — зникаючий вид, ІІ — вразливий, ІІІ — рідкісний; для ЧКУ (2009): зник. — зникаючий вид, вразл. — вразливий, неоцін. — неоцінений; для ЄЧС та СЧС: V — вразливий вид, R — рідкісний, I — неоцінений; \* — види, не вказані для Одеської області у ЧКУ (1996, 2009); \* — види, наведені в роботах [21—27] під іншими назвами.

місцезростань. Рідкісність видів спеціально не вивчалась, але в роботах наведено дані з стрівальності, що підвищує цінність праць цього періоду для созологічного аналізу флори. Однією з перших слід згадати роботу Е. Е. Ліндемана [21], у якій нараховуємо 19 видів ефемероїдних геофітів, які зараз зростають в області та підлягають охороні, але автором не завжди чітко вказувались місця збору рослин, тому в таблиці наведено лише 9 видів, вказаних для Одещини. Значно детальнішу інформацію знаходимо у фундаментальних зведеннях І. Ф. Шмальгаузена [22, 23], де наведено дані про зростання 24 видів ефемероїдних геофітів поблизу Одеси, Балти, Кодими, Саврані та на півдні Бессарабії. Найвагоміший внесок у вивчення флори даного регіону зробив видатний вчений, географ, ботанік-систематик Й. К. Пачоський. У його ґрунтовних працях [24, 25], окрім детального опису видів, строків цвітіння та чисельності рослин, наводяться точні вказівки їх місцезростань. Ретельний аналіз праць Й. К. Пачоського [24—26] показав, що на той час у колишніх Одеському, Тираспільському, Ананывському повітах Херсонської губернії, південної частини Подільської губернії та півдня Бессарабії зростало 26 видів ефемероїдних геофітів, які зараз підлягають охороні. Не втратила своєї цінності у сучасний період і найбільш відома праця П. С. Шестерикова [27], де описано 14 видів ефемероїдних геофітів, які зустрічались у південно-західній частині колишнього Одеського повіту.

Порівняння видового складу ефемероїдних геофітів Одеської області минулого та сучасного періодів досліджень показало, що тоді вже було зафіксовано більш 80 % видів при 100 %-вій представленості родів, тобто 26 видів, серед яких, як слід зауважити, на той час 13 видів мали іншу, ніж сучасна, систематичну належність (таблиця). Ще 4 види (Allium sphaeropodum, Ornithogalum amphibolum, O. oreoides та Colchicum fominii), не зазначених в роботах [21—27], на території Одеської області було знайдено та визначено як нові для науки дещо пізніше [8, 28, 29]. Окремих пояснень потребують знахідки Galanthus elwesii на півдні області, а саме поблизу Тилігульського лиману. В роботах дослідників кінця XIX — початку XX ст. для вказаного району наведено Galanthus nivalis [21, 23, 24, 27], але на незвичайність даного виду звернув увагу лише Й. К. Пачоський. У його праці [24], а також у праці П. С. Шестерикова [27], де зроблено посилання на зразки рослин, зібраних Й. К. Пачоським на східному березі Тилігульського лиману поблизу колонії Нейзац колишнього Одеського повіту, знаходимо досить повний морфологічний опис, який доводить, що мова

йде саме про *G. elwesii*. Підтверджується це і тим, що південна межа поширення *G. nivalis* проходить значно північніше [30, 31]. Також у цій місцевості пізніше було виявлено ще декілька нових місцезростань *G. elwesii* [32—34] та жодного *G. nivalis* [31], тобто тут не могло зростати ніякого іншого виду підсніжнику, окрім *G. elwesii*. Таким чином, слід вважати, що перші знахідки *G. elwesii*, які були зроблені в Україні, належать Й. К. Пачоському. Слід відмітити, що цей локалітет, який знаходився поблизу колонії Нейзац, зараз входить до складу сучасної Миколаївської області (нині с. Прогресівка Березанського району) [35, 36], тому в таблиці знахідки цього виду не показані.

Щодо *Corydalis paczoskii*, то у Флорі УРСР є вказівка, що поблизу Одеси цей вид був знайдений О. Д. Нордманом [8], хоча у Й. К. Пачоського було зазначено, що в Херсонській губернії цей вид зустрічається тільки в пониззях Бугу поблизу Миколаєва [25]. Так чи інакше, але цей вид було включено у ЧСОО [11], хоча за останніми даними, його єдиний локалітет в Одеській області вва-

жається втраченим [37].

Порівняльний аналіз стрівальності ефемероїдних геофітів, які наведено в роботах [21—27], показав, що деякі види, які зараз, внаслідок скорочення їх чисельності, мають охоронний статус, на той час були досить звичайними та зустрічались у великій кількості: Colchicum ancyrense, Corydalis solida, Crocus reticulatus, Gymnospermium odessanum, Hyacinthella leucophaea, Scilla bifolia. А такі види, як Fritillaria montana, Leucojum aestivum, Tulipa schrenkii, а також Bellevalia sarmatica та Leopoldia tenuiflora, вже тоді зазначались як рідкісні.

Перші спроби вирощування видів в умовах культури в Одеській області було зроблено ще на початку XIX ст. Так, вперше колекція місцевої флори була створена видатним вченим-натуралістом О. Д. Нордманом, який у 1834—1848 рр. очолював роботу першого Одеського ботанічного саду, закладеного у 1820 р. Я. Л. Десметом. Колекцію було розташовано на ботанічному партері, де було «систематически распределено по естественным семействам 500 пород многолетних растений флоры полуденной России». З партеру неодноразово відправлялись до Києва, Петербурга, Берліна бульбоцибулини Colchicum ancyrense, Gymnospermium odessanum, Sternbergia colchiciflora [38]. У ботанічному саду Новоросійського Імператорського університету, який був заснований у 1867 р., колекція місцевої флори з'явилась лише 30 років потому, коли садом керував професор ботаніки університету Ф. М. Каменський [39].

Наступний період досліджень, який продовжувався до початку 1970-х рр., характеризується більш системним підходом до вивчення флори регіону. Так, у часи роботи видатного ботаніка, академіка АН УРСР В. І. Липського на посаді директора Одеського ботанічного саду у 1928—1937 рр., було започатковано вивчення рослиних ресурсів півдня України. Його учні продовжили науководослідні роботи у цьому напрямку шляхом інтродукції та акліматизації рослин природної флори [40]. З ефемероїдів вивчались лише окремі види — насамперед, *Gymnospermium odessanum* — ендемік наших причорноморських степів [41] та *Galanthus elwesii*, який в Україні зустрічається лише на півдні [31, 32, 42]. Дослідження у природі були поширені спостереженнями в умовах культури: вивчались, в основному, їх біологічні та репродуктивні особливості [43]. У цей період при вивченні флори і рослинності Одеської області повстало питання організації природно-заповідних територій з метою збереження локалітетів рідкісних видів від знищення в результаті зростання господарської діяльності людини [44].

З початку 1970-х років, коли стала очевидною втрата частини генофонду, дослідники флори і рослинності почали приділяти увагу еколого-ценотичним особливостям рідкісних видів та практичним заходам їх збереження *in situ* та *ex* 

situ. Так, цілеспрямовані роботи по інтродукції рослин природної флори в ботанічному саду Одеського, на той час державного, університету імені І. І. Мечникова розпочались у 1976 р., коли була започаткована ділянка рідкісних та зникаючих видів рослин Одещини [45]. Протягом кількох років у первинну культуру було введено 20 рідкісних видів, з яких 11 були ефемероїдними геофітами: Colchicum ancyrense, Corydalis solida, Crocus reticulatus, Galanthus elwesii, Gymnospermium odessanum, Hyacinthella leucophaea, Ornithogalum boucheanum, О́. kochii, Scilla bifolia, Sternbergia colchiciflora, Tulipa schrenkii. Іх біологічні та репродуктивні особливості досліджувались, в основному, в природних умовах та лише частково — в умовах культури [46]. У 1990 р. колекція рідкісних рослин збільшилась до 40 видів, серед яких налічувалось вже 19 видів ефемероїдних геофітів. Окрім вищезгаданих, на ділянці зростали Bellevalia sarmatica, Bulbocodium versicolor, Fritillaria ruthenica, Leopoldia tenuiflora, Ornithogalum fimbriatum, O. oreoides, O. refractum, Tulipa hypanica. При інтродукційному випробуванні ефемероїдні геофіти отримали максимальні оцінки у порівнянні з іншими досліджуваними рідкісними видами [47]. Більш детально в умовах культури досліджувались такі види, як Bulbocodium versicolor, Colchicum fominii, Sternbergia colchiciflora [48]. Інвентаризація рідкісних та зникаючих видів рослин у 2006—2008 рр. показала, що у ботанічному саду Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (ОНУ) налічувалось 19 видів ефемероїдних геофітів природної флори Одеської області, які підлягають охороні [49], що складає 60 % від їх видового складу (див. табл.). Помічено, що у 2008 р. видовий склад колекції рідкісних ефемероїдних геофітів, у порівнянні з таким у 1990 р., практично не змінився. Також слід зазначити, що, окрім видів, які утримуються на колекційних ділянках, на території ботанічного саду ОНУ сформувалось декілька гомеостатичних інтродукційних популяцій ефемероїдів [50, 51]. Таким чином, з моменту створення колекції рідкісних та зникаючих видів рослин в Ботанічному саду ОНУ, в умовах культури детально досліджувались лише деякі види державного рівня охорони — Bulbocodium versicolor, Colchicum fominii, Galanthus elwesii, Sternbergia colchiciflora.

3 1970-х pp. почалась активна діяльність з охорони природної флори — на Одещині було досліджено і запропоновано для охорони ділянки степової рослинності з цінними флористичними комплексами [52, 53]. Саме у цей час (до 1984 р.) в Одеській області було створено більшість заповідних територій [54]. У відповідності до прийнятої у 1980-х рр. стратегії збереження рослинної різноманітності почалось здійснення, в основному, співробітниками кафедри ботаніки ОНУ, систематичних досліджень рідкісних та зникаючих рослин області, зокрема, ефемероїдів [55—57]. В результаті накопичено значний об'єм інформації щодо їх хорологічних, біологічних, еколого-ценотичних та популяційних особливостей. У природних умовах було досліджено популяції Colchicum ancyrense [58, 59], C. fominii [28, 60], Crocus reticulatus [61], Fritillaria montana [62], Galanthus elwesii [30, 34, 63], Gymnospermium odessanum [64, 65], Hyacinthella leucophaea [61], Ornithogalum refractum [66], Sternbergia colchiciflora [67], але отримані дані виявились неповними. Найбільш вичерпно було досліджено лише Galanthus elwesii, Gymnospermium odessanum ta Sternbergia colchiciflora. Про стан популяцій решти видів відомостей практично немає.

Аналіз гербарних матеріалів ОНУ імені І. І. Мечникова (MSUD) показав, що з 31 виду рідкісних та зникаючих ефемероїдних геофітів природної флори Одеської області у гербарію зберігаються зразки лише 10 видів, з яких деякі востаннє були зібрані ще наприкінці XIX — початку XX ст. (див. табл.).

Найбільш вичерпну інформацію щодо розповсюдження видів державного рівня охорони наведено в роботі О. М. Попової [10], де серед інших видів на-

лічуємо 183 локалітети ефемероїдних геофітів, з яких лише 55 (30 %) знаходяться на територіях природно-заповідного фонду (ПЗФ) Одеської області. Згодом рядом дослідників було виявлено ще декілька нових місцезростань рідкісних та зникаючих ефемероїдних геофітів [68—70], але це суттєво не вплинуло на відсоток популяцій, які знаходяться у межах ПЗФ.

Що стосується ефемероїдних геофітів, включених до ЧСОО, то на даний момент не наведено впорядкованих і опублікованих даних про їх розповсюдження та стан охорони в області. Частково ця інформація зустрічається в роботах по загальному вивченню флори тих чи інших заповідних об'єктів або флори окремих територій [56, 61, 71—73].

#### Висновки

На основі розглянутих літературних джерел встановлено, що на даний момент в Одеській області охороні підлягає 31 вид рідкісних та зникаючих цибулинних, бульбоцибулинних та бульбових ефемероїдних геофітів, з яких 21 вид занесено до ЧКУ(2009). Аналіз категорій їх охорони у порівнянні з такими у ЧКУ (1996) показав, що для даних видів простежується тенденція у бік погіршення стану їх природних популяцій.

З'ясовано, що дослідниками кінця XIX — початку XX ст. на територіях, що зараз входять до складу сучасної Одеської області, вже було зафіксовано більш 80 % видів ефемероїдних геофітів, які підлягають охороні.

З'ясовано, що дані еколого-ценотичних та популяційних досліджень розглянутих видів здебільшого неповні або практично відсутні. Найбільш вичерпними є дані щодо розповсюдження на території Одеської області ефемероїдних геофітів державного рівня охорони. Для видів, включених до ЧСОО, такої впорядкованої та опублікованої інформації немає.

Відмічено, що зараз в колекції Ботанічного саду ОНУ налічується 19 видів (60 %) ефемероїдних геофітів природної флори Одеської області. Усі вони успішно пройшли інтродукційне випробування, але більш детальні дослідження особливостей їх зростання в культурі проведено лише для декількох видів державного рівня охорони.

Таким чином, показана необхідність проведення подальших досліджень, в основному, у напрямку вивчення стану та структури природних популяцій, як у відомих локалітетах, так і виявлених вперше, а також поповнення колекції ботанічного саду ОНУ раритетними видами ефемероїдних геофітів та поглибленим вивченням їх біологічних особливостей в умовах культури.

### Література

- 1. *Географія* Одещини: природа, населення, господарство / О. Г. Топчієв та ін. О.: Астропринт, 1998. 87 с.
  - 2. Определитель высших растений Украины. К.: Наук. думка, 1987. 546 с.
- 3. *Горышина Т. К*. Ранневесенние эфемероиды лесостепных дубрав. Л.: Изд-во ЛГУ, 1969. 232 с.
  - 4. *Червона* книга України. Рослинний світ. К.: Укр. енцикл., 1996. 608 с.
- 5. Mosiakin S. L., Fedoronchuk M. M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. Kiev, 1999. 345 p.
  - 6. *Флора* Европейской части СССР: в 11 т. Л.: Наука, 1979. Т. 4. 355 с.
- 7. Флора СССР: в 30 т. / АН СССР. М.-Л., 1935. Т. IV. 760 с.; М.-Л., 1937. Т. VII. 792 с.
- 8. *Флора* УРСР: в 12 т. / АН УРСР. К., 1950. Т. III. 427 с.; К., 1953. Т. V. 527 с.

- 9. *Черепанов С. К.* Сосудистые растения СССР. Л.: Наука, 1981. 510 с.
- 10. *Попова О. М.* Роль природно-заповідного фонду Одеської області у збереженні судинних рослин Червоної книги України // Вісник Одеського національного ун-ту. Сер. Біологія. 2004. Т. 9, вип. 1. С. 81—87.
  - 11. Рішення Одеської обл. ради № 180-ХХІІІ від 21.04.2000 р.
- 12. *Срмолаєва О. Ю.* Біологічні та еколого-ценотичні особливості раритетних ефемероїдних геофітів Одеської області // Інтродукція, селекція та захист рослин: Матеріали II Міжнар. наук. конф. Донецьк, 2009. С. 267—270.
- 13. *Червона* книга України: рослинний світ. К.: Укрглобалконсалтинг, 2009. 912 с.
- 14. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants / Edrs. Walter K. S., H. G. Gillett. Gland (Switzerland) and Cambridge (UK), 1998. 862 p.
- 15. Попова О. М. Судинні рослини Одеської області з Червоної книги України, Світового та Європейського Червоних списків // Вісник Одеського національного ун-ту. Сер. Біологія. 2002. Т. 7, вип. 1. С. 278—290.
- 16. *Попова О. М.* Роль природно-заповідного фонду у збереженні судинних рослин міжнародного рівня охорони // Вісник Львівського ун-ту. Сер. Біологія. 2004. Вип. 36. С. 85—90.
- 17. *Ткач Є. Д., Мирза В. І.* Екотони місця виростання рідкісних видів рослин // Наукові основи збереження біотичної різноманітності: Матеріали дев'ятої наук. конф. молодих учених. Л., 2009. С. 94—96.
- 18. Европейский Красный список животных и растений, находящихся под угрозой исчезновения во всемирном масштабе. Нью-Йорк: ООН, 1992. 167 с.
- 19. *Історія* міст і сіл УРСР: в 26 т. Одеська область. К.: Головна ред. Укр. рад. енцикл. АН УРСР, 1969. 910 с.
- 20. Потапенко Г. И. Растительность северо-западного побережья Черного моря: почвы, флора, растительность и пути растениеводческого освоения причерноморских пересыпей: Дисс. ... д-ра биол. наук. О., 1943. 586 с.
  - 21. Линдеманн Э. Очерк флоры Херсонской губернии. О., 1872. 317 с.
  - 22. Шмальгаузен И.  $\Phi$ . Флора Юго-Западной России. К., 1886. 783 с.
- 23. Шмальгаўзен И. Ф. Флора Средней и Южной России, Крыма и Северного Кавказа. К., 1897. Т. 2. 752 с.
- 24. *Пачоский Й. К.* Херсонская флора. Херсон, 1914. Т. І. Высшие тайнобрачные, голосеменные, однодольные. 548 с.
- 25. *Пачоский Й. К.* Херсонская флора / Отв. ред. К. Лятовски. Познань: ун-т имени Адама Мицкевича, 2008. Т. II. Двудольные. 505 с.
  - 26. Пачоский Й. К. Очерк растительности Бессарабии. Кишинев, 1914. 51 с.
- 27. *Шестериков П. С.* Определитель растений окрестностей Одессы. О., 1912. 540 с.
- 28. Дятлов С. Е. Новые местонахождения безвременника Фомина на территории Одесской области // Материалы науч. конф. молодых ученых Одесского ун-та. Биология. О., 1984. С. 142—143.
- 29. Zahariadi C. Caracteres morphologiques, anatomiques et biologiques dans la taxonomie du genre Ornithogalum // Revue de biologie. 1962. T. 7, № 1. S. 5—41.
- 30. Діденко С. Я. Види роду Galanthus L. (Amaryllidaceae) в природі і в культурі в Україні: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.05. К., 2000. 20 с.
- 31. *Шапошнікова Л. А., Кожура М. Г.* Поширення видів підсніжніка на Одещині та їх зв'язки з основними ареалами // Матеріали IV з'їзду Укр. ботан. тов. К., 1969. С. 260—261.
- 32. Кожура М. Г., Шапошнікова Л. А. Galanthus elwesii Hook. новий вид підсніжника для півдня України // Укр. ботан. журн. 1969. Т. 26, № 5. С. 115—117.
- 33. *Мельник В. Î. Galanthus elwesii* Hook. (*Amaryllidaceae*) в Україні // Укр. ботан. журн. 1994. Т. 51, № 1. С. 29—33.
- 34. Діденко С. Я. Стан природних та інтродукційних популяцій Galanthus elwesii Hook. в Україні // Інтродукція рослин. 2000. №. 1. С. 31—33.
- 35. Українська РСР. Адміністративно-територіальний поділ на 1 вересня 1946 року. К.: Укр. вид-во політичної літератури, 1947. 1064 с.

- 36. *Загальногеографічний* атлас України. К.: Картографія, 2004. 112 с.
- 37. Коваленко О., Перегрим М. Особливості apeany Corydalis paczoskii N. Busch (Fumariaceae) та історія його формування // Вісник Київського національного ун-ту ім. Т. Г. Шевченка. Сер. «Інтродукція та збереження рослинного різноманіття». -2009. — № 22—24. — C. 130—132.
- 38. Нордманн А. Д. Описание Императорского Одесского сада с замечаниями о растительности и климате окрестностей г. Одессы // Записки Имп. общ. сельск. хоз. Южной России. — Одеса, 1847. — 33 с.
- 39. Каменский Ф. М. Обор деятельности ботанического сада Имераторского Новороссийского университета начиная с 1895 г. — Одесса, 1899. — 16 с.
- 40. Жаренко Н. 3., Бонецький А. С., Філатова С. О. Ботанічний сад Одеського державного університету (Історія науки) // Укр. ботан. журн. — 1981. — Т. 38, № 4. -
- 41. Гольд Т. М. О биологии Leontice odessana Fisch. в окрестностях Одессы // Ботан. журн. — 1965. — Т. 50, № 4. — С. 565—567.
- 42. Баканова В. В. Подснежник Эльвеза на Украине // Бюлл. Главн. Ботан. сада. 1970. — Вып. 77. — С. 46—48.
- 43. Кожура М. Г. Вплив зими 1971—72 років на утворення насіння підсніжника білого // Інтродукція рослин і паркобудівництво: Зб. ст. — К., 1975. — С. 96—99.
- 44. Шапошникова Л. А. Растительные богатства склонов и неудобий юга Одесской области // Межобл. науч. конф. по охране природы юга Украины: Тез. докл. -O., 1965. — C. 19—20.
- 45. Светловская Л. И. Анализ флористического состава травостоя старой территории ботанического сада ОГУ и экспозиции редких и исчезающих видов // VII съезд
- Укр. ботан. общ.: Тез. докл. К., 1982. С. 35—36. 46. *Шапошникова Л. А., Кожура М. Г., Светловская Л. И.* О размножении некоторых редких и исчезающих видов растений Одесщины // VII съезд Укр. ботан. общ.: Тез. докл. — К., 1982. — С. 280.
- 47. Голокоз А. В. Інтродукція рідкісних та ендемічних рослин північно-західного Причорномор'я у ботанічний сад Одеського університету // ІХ з'їзд Укр. ботан. тов.: Тез. доп. — К., 1992. — С. 189.
- 48. Голокоз А. В., Петрунь Н. В. Особливості насіннєвого розмноження ефемероїдних геофітів, культивованих у ботанічному саду ОДУ // Вісник Київського національного ун-ту ім. Тараса Шевченка. Сер. «Інтродукція та збереження рослинного різноманіття». — 1999. — Вип. 2. — С. 7—8.
- 49. Ермолаєва О. Ю. Рідкісні ефемероїди регіональної флори на території Ботанічного саду Одеського національного університету імені І. І. Мечникова // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології: Матеріали І Міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених. — Донецьк, 2009. — С. 45—46.
- 50. Ермолаева А. Ю. Состояние некоторых интродукционных популяций раритетных эфемероидов в ботаническом саду ОНУ // ІІ відкритий з'їзд фітобіологів Херсонщини: Зб. тез доп. — Херсон, 2008. — С. 25—26.
- 51. Срмолаєва О. Сучасний стан інтродукційних популяцій Galanthus elwesii Hook. fil. в умовах ботанічного саду ОНУ ім. І. І. Мечникова // Вісник Київського національного ун-ту ім. Т. Г. Шевченка. Сер. «Інтродукція та збереження рослинного різноманіття». — 2009. — № 22—24. — С. 122—124.
- 52. Шапошникова Л. А., Пашковская Н. М. Редкие и исчезающие виды растений юго-западного Причерноморья и их охрана // VI делегат. съезд Всесоюзн. ботан. общ.: Тез. докл. — Ленинград, 1978. — С. 43—44. 53. *Ткаченко В. С., Костылев А. В.* Фито-экологические аспекты гидромелиораций
- северо-западного Причерноморья. К.: Наук. думка, 1985. 196 с.
- 54. Леоненко В. Б., Стеценко М. Т., Возний Ю. М. Додаток до атласу об'єктів природно-заповідного фонду України. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2003. — 142 с.
- 55. Дятлов С. Е., Гусляков Н. Е., Ружицкая И. П. Об охране редких и исчезающих видов растений северо-западного Причерноморья // Материалы науч. конф. молодых ученых Одесского ун-та. Биология. — О., 1984. — С. 144—146.

- 56. Дятлов С. С., Васильєва Т. В., Коваленко С. Г., Ружицька І. П. Охорона рідкісних та зникаючих видів одна з основ збереження біорізноманітності // Матеріали XI з'їзду Укр. ботан. тов. X., 2001. С. 132—133.
- 57. Коваленко С. Г., Дятлов С. Е., Ружицкая И. П., Гусляков Н. Е. Новые местонахождения редких и исчезающих видов растений на территории Одесской области // VIII съезд Укр. ботан. общ.: Тез. докл. К., 1987. С. 16—17.
- 58. Дятлов С. Е. Распространение безвременника анкарского в зоне влияния воднохозяйственного комплекса Дунай—Днепр // Материалы науч. конф. молодых ученых Одесского ун-та. Биология. — О., 1984. — С. 139—141.
- 59. *Ермолаева А. Ю.* Современное состояние ценопопуляции *Colchicum ancyrense* В. L. Burtt. на склонах Хаджибейского лимана (Одесская область) // Регионы в условиях неустойчивого развития: Материалы междунар. научн.-практич. конф. «Вопросы дальнейшего развития регионов России в условиях мирового финансового кризиса»: в 2 т. Шарья, 2009. Т. 2. С. 70—71.
- 60. *Гнатюк А. М.* Рід *Colchicum* L. в Україні (систематика, хорологія, морфологія, інтродукція, фітосозологія): Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.05. K., 2008. 20 с.
- 61. *Ружицька І. П., Коваленко С. Г., Дятлов С. Є.* Особливості віталітету зникаючих видів (порядки *Amaryllidales* і *Liliales*) в Одеській області // ІХ з'їзд Укр. ботан. тов.: Тез. доп. К., 1992. С. 155—156.
- 62. Собко В. Г. Нові види та нові місцезнаходження рідкісних рослин флори України // ІХ з'їзд Укр. ботан. тов.: Тез. доп. К., 1992. С. 44.
- 63. *Мельник В. И.* Распространение, эколого-ценотические особенности и структура ценопопуляций *Galanthus elwesii* Hook. на восточном пределе ареала (Одесская обл., Украина) // Растит. ресурсы. 1993. Вып. 3. С. 43—50.
- 64. Попова Е. Н. Структура ценопопуляций гимноспермиума одесского в естественных условиях // Материалы науч. конф. молодых ученых Одесского ун-та. Биология. О., 1984. С. 125—130.
- 65. *Мельник В. И.* Ареал, местообитания и возрастная структура популяций *Gymnospermium odessanum* (DC.) Takht. (*Berberidaceae*) // Ботан. журн. 1994. Т. 79, № 7. С. 55—61.
- 66. *Немерцалова С. В., Мазура В. Ю.* Ранньовесняна флора узбережжя озера Китай // Актуальні проблеми ботаніки та екології: Матеріали конф. молодих учених-ботаніків. Канів, 2004. Вип. 9. С. 62—64.
- 67. Голокоз А. В. Эколого-биологические особенности штернбергии зимовникоцветной, итоги реинтродукции вида // Материалы VI Междунар. конф. «Теоретические основы озеленения и благоустройства городов и сел». Кишинев, 1997. С. 86—89.
- 68. Деревинська Т., Товстуха Н., Кливняк Б. Новий локалітет штернбергії зимовникоцвітої поблизу Одеси // Вісник Київського національного ун-ту ім. Т. Г. Шевченка. Сер. «Інтродукція та збереження рослинного різноманіття». 2009. № 22—24. С. 116—117.
- 69. *Єрмолаєва О. Ю.* Раритетні ефемероїди схилів Хаджибейського лиману // Відновлення порушених природних екосистем: Матеріали Третьої міжнар. наук. конф. Донецьк, 2008. С. 189—190.
- 70. Попова О. М., Артиох М. М., Бальчева Г. А. та ін. Нові місцезнаходження видів з Червоної книги України на території Одеської області // Матеріали XII з'їзду Укр. ботан. тов. О., 2006. С. 153.
- 71. Бондаренко О. Ю., Васильєва Т. В. Рідкісні рослини флорокомплексів невеликих річок півдня Одеської області // Вісник Одеського національного ун-ту. Сер. Біологія. 2009. Т. 14, вип. 8. С. 15—21.
- 72. Васильєва Т. В., Коваленко С. Г. Конспект флори південної Бессарабії. О.: Одеський нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2003. 250 с.
- 73. Попова Е. Н., Бальчева Г. А. Флористическая ценность ландшафтного заказника «Березовский» // Вісник Одеського національного ун-ту. Сер. Біологія. 2007. Т. 12, вип. 5. С. 60—68.

### А. Ю. Ермолаева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, биологический факультет, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

### ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ЭФЕМЕРОИДНЫХ ГЕОФИТОВ ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ

#### Резюме

Приведен уточненный перечень редких и исчезающих видов луковичных, клубнелуковичных и клубневых эфемероидных геофитов природной флоры Одесской области. Отмечены и проанализированы изменения категорий их охраны. Рассмотрена история изучения указанных видов и представлена сжатая информация об их исследованиях в природе и в культуре за период от начала XIX века до настоящего времени. Выяснено, что накопленные данные исследований в основном неполные и фрагментарные.

**Ключевые слова:** редкие и исчезающие виды, эфемероидные геофиты, Красная книга Украины, история, Одесская область.

### A. Yu. Yermolaieva

Odesa National Mechnykov University, Department of Botany, Dvoryanska Str., 2, Odesa, 65026, Ukraine

### THE HISTORY OF INVESTIGATION OF RARE AND ENDANGERED EPHEMEROID GEOPHYTES OF THE ODESSA REGION

#### Summary

The specify list of the rare and endangered ephemeroid geophytes with bulbs and tuber of the Odessa region is given. The changes of the category of their protection are noted and analyzed.

The history of investigation of these species was studied and condensed information about their investigation in nature and culture dating from the beginning of XX century to the present was given. It is determined that the majority of accumulating data of the investigation is uncompleted and fragmentary.

**Key words:** rare and endangered species, ephemeroid geophytes, Red Data Book of Ukraine, history, Odesa region.

### ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН





УДК: 612.821-005

**А. Г. Моренко,** канд. біол. наук, доцент Волинський національний університет імені Лесі Українки, кафедра фізіології людини і тварин, пр. Волі, 13, Луцьк, 43000, Україна

# ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАФІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РИТМІЧНОЇ СЛУХО-МОТОРНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ ЛЮДИНИ (за даними аналізу $\alpha$ - і $\theta$ -діапазонів електроенцефалограми)

У дослідженнях взяли участь 30 здорових і праворуких чоловіків і жінок 17—21 років. Оцінювали спектральну щільність потужності  $\alpha$ - і  $\theta$ -ритмів електроенцефалограми під час ритмічної слухо-моторної діяльності досліджуваних. Виконання слухо-моторної діяльності в обох статевих групах характеризується значимим зниженням спектральної щільності потужності  $\alpha$ - і  $\theta$ -ритмів у корі головного мозку, порівняно зі станом функціонального спокою. Активаційні процеси є виразнішими у лівій півкулі. У жінок установлюються менші значення та більша генералізованість динамічних змін у просторовому розподілі спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму, ніж у чоловіків.

**Ключові слова:** ритмічна слухо-моторна діяльність,  $\alpha$ - і  $\theta$ -діапазони електро-енцефалограми.

### Вступ

Сучасною науковою спільнотою активно обговорюється питання про участь вищих когнітивних функцій (уваги, оперативної пам'яті, поведінкового гальмування) у забезпеченні обробки сенсомоторної інформації у корі головного мозку [1-8]. В контексті даних досліджень одним із актуальних напрямів є з'ясування механізмів перемикання уваги з сенсорної перцепції на рухові відповіді у відповідності з актуальними мотиваційними потребами людини. Слухові відчуття відображають часові особливості діючого подразника: його тривалість, ритмічний характер тощо. Сучасні літературні дані вказують на динамічність та пластичність коркових потенціалів у відповідь на звукові подразники (сигнали, мова) в залежності від їх складності, а також статі, віку досліджуваних, їх індивідуального досвіду [2—4; 6; 7]. Рухові відчуття забезпечують досить точне відображення дійсності, швидкості і послідовності явищ [1—5]. Відомо, що в процесі стабільної ритмічної сенсомоторної діяльності у людини з'являється певна циклічність змін біоелектричної активності у корі головного мозку у відповідності із частотою та інтенсивністю сенсорного подразника [1, 4, 8]. Координація сенсорних та моторних процесів полегшує людині вибір вірної стратегії поведінки [6—8]. Не дивлячись на кількість робіт, присвячених вивченню психофізіологічних основ сенсомоторної діяльності людини, залишається ряд питань, щодо яких не має одностайної думки у наукових колах, і які потребують подальших досліджень. Серед них — з'ясування характеру міжпівкулевих взаємодій, співвідношення процесів синхронізації/десинхронізації за умов перемикання уваги між слуховим сприйняттям і запуском необхідної моторної програми. На шляху до вирішення зазначених питань виявляється актуальною мета нашого дослідження: виявлення специфіки внутрішньокоркових активаційних процесів в  $\alpha$ - і  $\theta$ -діапазонах в режимі стабільної ритмічної слухо-моторної діяльності людини (статевий аспект).

### Матеріал і методи досліджень

У наших дослідженнях на добровільній основі із дотриманням норм біомедичної етики взяли участь 30 здорових (медична картка 086/у) і праворуких чоловіків (15 осіб) і жінок (15 осіб) 17—21 років. Профіль мануальної асиметрії визначали за самооцінкою і спеціально розробленими мануальними тестами (переплетення пальців кисті, схрещування рук на грудях, аплодування тощо).

Реєстрацію електроенцефалограми здійснювали монополярно з референтним об'єднаним вушним електродом (апаратно-програмний комплекс «Нейроком», «ХАІ-Медика»). Активні електроди розміщували за міжнародною системою 10/20. У функціональних пробах аналізували 60-секундні відрізки часу. Епоха аналізу складала 2 с з 50 % перекриттям. Під час експерименту досліджувані знаходились у звуко- і світлонепрониклій кімнаті. Для режекції електроенцефалографічних артефактів використовували процедуру ІСА-аналізу. Оцінювали спектральну щільність потужності електроенцефалограми, значення якої розраховували для усіх пар відведень в усіх тестових ситуаціях для частотних діапазонів  $\theta$ - (4—8  $\Gamma$ ц) і  $\alpha$ -ритмів (8—13  $\Gamma$ ц). Під час тестування досліджувані були із закритими очима, у положенні напівсидячи у кріслі з підголовником. Електроенцефалограму реєстрували у стані функціонального спокою (фон) та в умовах ритмічної слухо-моторної діяльності. Звукові стимули (електронна версія барабанного бою, програмне забезпечення Finale 2006) мали тривалість у 10 мс, гучність у 55—60 дБ і частоту подання у 2 Гц. У відповідь на стимули піддослідні здійснювали реципрокні координації — почергово стискали і розтискали пальці кисті правої руки. Значимість відмінностей ( $p \le 0.05$ ) показників між тестами у чоловіків і жінок оцінювали за критерієм Вілкоксона для парних вибірок, між статевими групами — за критерієм Манна—Уітні (програмне забезпечення AtteStat).

### Результати та їх обговорення

Стан функціонального спокою. У чоловіків виявляється деяке переважання спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму у лівій півкулі у лобно-скроневій і центральній зонах, у правій — у тім'яно-потиличній ділянці (табл. 1). У жінок дана тенденція набуває значимого рівня в лівій півкулі — у бічній лобній частці, у правій півкулі — у потиличній ділянці ( $p \le 0.05$ ). В обох статевих групах відзначаються вищі показники спектральної щільності потужності  $\theta$ -ритму у правій півкулі, особливо у передніх скроневих частках у чоловіків ( $0.025 \le p \le 0.05$ ), а також у лобних і передніх скроневих ділянках — у жінок (табл. 2).

Виконання ритмічної слухо-моторної діяльності. У чоловіків установлюється зниження спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму по всьому «скальпу», особливо у центральних (0,025  $\leq p \leq$  0,05), задніх скроневих, тім'яних і потиличних ( $p \leq$  0,0249) частках кори головного мозку, порівняно зі станом функціонального спокою (табл. 1, рис. 1). У жінок відмічається значиме зменшення показників у лівих лобних, симетричних центральних і задніх скроневих зонах кори. В обох статевих групах установлюється переважання значень у тім'янопотиличній зоні у правій півкулі. У решти ділянок кори головного мозку міжпівкулевих асиметрій не відзначається. У чоловіків виявляється значиме знижен-

 $\label{eq:Tadinutal} \mbox{ Таблиця 1}$  Статеві особливості спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму електроенцефалограми (М $\pm m$ , мк $B^2$ /Гц)

Зони кори головного	Стан функціон	ального спокою	Ритмічна слухо-моторна діяльність							
мозку, див. рис. 1	чоловіки	жінки	чоловіки	жінки						
	У лівій півкулі кори головного мозку									
Fpl	32,0±5,2	27,2±7,7	30,4±6,6	18,1±5,0						
F3	42,6±7,1	35,2±6,3	41,7±8,5	23,4±6,4						
F7	25,7±3,9	21,0±5,9	31,2±5,3	14,6±3,6						
T3	33,1±5,0	15,5±3,7	23,0±3,9	13,9±3,0						
T5	55,3±9,9	24,6±5,5	25,9±3,8	18,0±4,8						
C3	79,3±14,2	39,9±5,3	47,9±9,1	27,7±7,1						
P3	146,7±30,3	67,3±16,8	69,7±15,6	71,2±3,3						
O1	275,9±41,3	168±32,7	169,6±31,6	149,6±29,7						
	У правій	півкулі кори голові	ного мозку							
Fp2	31,7±4,9	27,5±8,2	30,8±6,5	18,9±5,6						
F4	42,5±6,8	34,9±5,7	41,7±8,1	24,4±6,9						
F8	25,0±4,0	19,4±5,8*	26,4±5,4	15,3±4,0						
T4	25,5±3,9	16,1±4,2	23,1±4,0	14,6±3,2						
T6	41,9±6,1	23,7±5,3	22,1±3,6	17,2±3,3						
C4	70,9±12,6	36,2±5,8	48,9±8,6 27,1±6							
P4	148,2±29,6	60,2±14,4	77,7±11,6	59,0±14,1*						
O2	356,9±54,0	224,2±46,6*	209,5±43,1	181,4±38,2						

П р и м і т к и до табл. 1, 2: \* — значимі міжпівкулеві відмінності показників,  $0.025 \le p \le 0.05$ ; \*\* — значимі міжпівкулеві відмінності показників,  $p \le 0.0249$ .

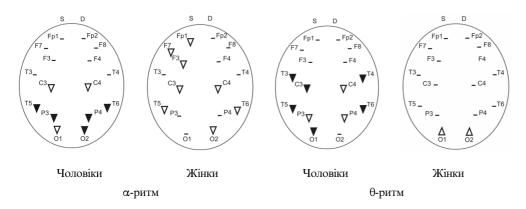


Рис. 1. Динаміка спектральної щільності потужності  $\alpha$ - і  $\theta$ -ритмів електроенцефалограми під час ритмічної слухо-моторної діяльності у чоловіків та жінок

Fp 1, 2; F 3, 4; F 7, 8 — відповідно передні, задні та бічні лобні частки; С 3, 4 — центральні частки; Т 3, 4; Т 5, 6 — відповідно передні і задні скроневі частки; Р 3, 4 — тім'яні частки; О 1, 2 — потиличні частки в лівій (s) і правій (d) півкулях кори головного мозку.

**▲▼** зростання (зниження) показників, порівняно з фоном,  $p \le 0.0249$ 

 $\label{eq:Tadinu} T\, a\, б\, \pi\, u\, ц\, s\, \, 2$  Статеві особливості спектральної щільності потужності  $\theta$ -ритму електроенцефалограми (М $\pm m$ , мк $B^2$ /Гц)

Зони кори головного	Стан функціон	ального спокою	Ритмічна слухо-моторна діяльність							
мозку, див. рис. 1	чоловіки	жінки	жінки чоловіки							
	У лівій півкулі кори головного мозку									
Fpl F3 F7 T3 T5 C3 P3	8,3±1,0 13,6±1,7 13,6±3,2 18,2±5,5* 12,5±3,4 18,3±2,7 18,6±3,5 38,1±5,9	10,1±202 14,7±2,8 8,5±2,3 8,6±2,9 10,4±1,8 19,9±7,3 21,7±4,1 15,1±3,9	8,2±0,6 11,9±1,4 17,8±4,8 8,7±1,6 6,1±0,7 12,2±1,6 12,5±1,5 19,5±2,9	$10,5\pm1,9$ $11,9\pm1,2$ $8,5\pm1,1$ $7,8\pm1,0$ $8,9\pm1,8$ $13,4\pm2,1$ $17,1\pm2,0$ $21,1\pm3,1$						
	У правій і	півкулі кори головн	ного мозку							
Fp2 F4 F8 T4 T6 C4 P4 O2	8,9±1,2 12,7±1,5 10,3±1,8 8,5±1,2 9,5±1,7 17,0±2,2 18,8±3,2 36,1±5,4	11,0±2,9 16,2±2,2 9,6±2,6 10,0±2,8 9,0±2,3 22,9±4,9 19,4±4,2 16,6±3,0	8,3±0,7 11,6±1,4 8,6±1,0 6,1±0,7 6,6±0,7 13,2±1,5 13,9±1,5 22,9±3,5*	9,9±1,6 12,4±1,9 9,7±1,6 7,3±1,2 9,8±2,1 14,4±2,8 19,0±4,2** 23,5±4,4						

ня спектральної щільності потужності θ-ритму у симетричних скроневих, центральних, тім'яних і потиличних частках кори ( $p \le 0.05$ ), а також у правих тім'яній і потиличній ділянках  $(0.025 \le p \le 0.05)$  (рис. 1). У потиличній зоні відзначається значиме превалювання у правій півкулі  $(0.025 \le p \le 0.05)$  (табл. 2). У жінок установлюється лише тенденція до певного зменшення показників у скроневих, центральних і тім'яних частках, особливо у лівій півкулі. В означених ділянках, особливо у тім'яній зоні (р  $\leq$  0,0249), виявляється правопівкулеве переважання. Разом з тим у симетричних потиличних ділянках установлюється значиме зростання спектральної щільності потужності  $\theta$ -ритму  $(0.025 \le p \le 0.05)$ , порівняно зі станом функціонального спокою (рис. 1). Подібні закономірності електрогенезу в  $\alpha$ - і  $\theta$ -діапазонах, на нашу думку та у відповідності з даними літератури [2; 5; 9—12], свідчать про зростання ролі активаційних процесів у зазначених коркових зонах, переважно лівої півкулі, при спеціалізованій діяльності. Приуроченість динамічних змін до центральних і тім'яно-потиличних структур указує на використання піддослідними у значній мірі автоматизованих стратегій [2].

Аналіз статевих відмінностей спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму указує на менші показники у жінок, порівняно з чоловіками (табл. 1, 2; рис. 2). Так, у стані функціонального спокою відмічена закономірність виявляється значимою у задніх скроневих, центральних, тім'яних і потиличних частках обох півкуль кори головного мозку ( $p \le 0.05$ ), під час слухо-моторної діяльності — у задніх лобних, скроневих, центральних, тім'яних частках,особливо у лівій півкулі (рис. 2). Установлені співвідношення свідчать про вищий рівень неспецифічної активації у жінок [5, 9, 11—12]. Значення спектральної щільності потужності  $\theta$ -діапазону не виявили значимих статевих відмінностей. Лише у стані

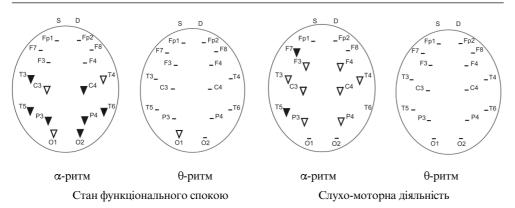


Рис. 2. Статеві особливості спектральної щільності потужності  $\alpha$ - і  $\theta$ -ритмів електроенцефалограми під час ритмічної слухо-моторної діяльності

Примітки:

 $\triangle \nabla$  значимо більші (менші) показники у жінок, ніж у чоловіків, 0,025  $\ll p \ll 0,05$ ;

**▲▼** значимо більші (менші) показники у жінок, ніж у чоловіків,  $p \le 0.0249$ 

функціонального спокою жінки відзначаються меншими показниками у потиличних частках, порівняно з чоловіками,  $0.025 \le p \le 0.05$ .

Реалізація слухо-моторної діяльності в обох статевих групах досліджуваних у цілому супроводжується подібною динамікою електрогенезу в корі головного мозку, порівняно зі станом функціонального спокою. Найбільш задіяними до діяльності  $\varepsilon$  задні скроневі, центральні, тім'яні та потиличні частки кори.

В цілому, виконання слухо-моторної діяльності у корковій організації забезпечується не лише участю центрів моторної кори, які складають ядро рухового аналізатора, але й інших — проекційних і асоціативних полів неокортексу (тім'яних і скроневих зон). Залученість цих ділянок кори створює умови для об'єднання роботи багатьох центів у єдину функціональну систему, що і забезпечує довільні моторні дії — слухо-моторне координування [3, 5, 8]. Разом з тим у чоловіків установлюється більша локальність динамічних змін у просторовому розподілі спектральної щільності потужності α-ритму та вища реактивність спектральної щільності потужності θ-ритму при переході до слухо-моторної діяльності. Натомість у жінок відзначається зростання генералізованості установлених активаційних процесів, що свідчить про вищу активність лімбіко-гіпоталамічної системи у жінок та відображає загальні біологічні особливості жіночого організму [3, 5, 8]. Отже, здійснення слухо-моторної діяльності забезпечується скоординованою діяльністю різних систем мозку, як безпосередньо контролюючих реалізацію моторного акту, так і пов'язаних с процесами сприйняття. Результати наших досліджень указують на специфічні риси обробки слухо-моторної інформації у чоловіків і жінок.

#### Висновки

Ритмічна слухо-моторна діяльність в обох статевих групах забезпечується значимим зниженням спектральної щільності потужності  $\alpha$ - і  $\theta$ -ритмів електроенцефалограми у корі головного мозку, порівняно зі станом функціонального спокою. Найбільш задіяними є задні скроневі, центральні, тім'яні та потиличні частки кори. Активаційні зміни більше виражені у лівій півкулі. Чоловіки харак-

теризуються вищою локальністю спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму та реактивністю спектральної щільності потужності  $\theta$ -ритму при переході до ритмічної слухо-моторної діяльності. У жінок установлюються менші значення та більша генералізованість динамічних змін у просторовому розподілі спектральної щільності потужності  $\alpha$ -ритму.

#### Література

- 1. Асланян Е. В., Кирой В. Н. Об индивидуальных особенностях реагирования на действие факторов монотонии // Психол. журнал, 2002. Т. 23, № 4. С. 82—89.
- 2. *Базанова О. М., Штарк М. Б.* Биоуправление в оптимизации психомоторной реактивности. Сообщение 1. Сравнительный анализ биоуправления и обычной исполнительской практики // Физиол. человека, 2007. Т. 33. № 4. С. 24—32.
- тельской практики // Физиол. человека, 2007. Т. 33, № 4. С. 24—32. 3. Болдырева Г. Н., Шарова Е. В., Добронравова И. С. и др. Роль регуляторных структур мозга в формировании ЭЭГ человека // Физиол. человека. — 2000. — Т. 26. — № 5. — С. 19—34.
- 4. *Моренко А. Г., Павлович О. С.* Особливості просторового розподілу біопотенціалів у півкулях кори головного мозку (α- і бета-ритми електроенцефалограми) під час ритмічної тонкої рухової діяльності у чоловіків // Вісник Львівс. ун-ту. Серія біол. 2009. Випуск 49. С. 165—173.
- 5. Фарбер Д. А., Анисимова И. О. Функциональная организация коры больших полушарий при выполнении произвольных движений. Возрастной аспект // Физиол. человека. 2000. Т. 26. № 5. С. 35—43.
- 6. *Bradley M.* Natural selective attention: Orienting and emotion // Psychophysiology, 2009. V. 46. I. 1. P. 1—11.
- 7. *Gherri E., Velzen Jo. V., Eimer M.* The instructed context of a motor task modulates covert response preparation and shifts of spatial attention // Psychophysiology, 2009. V. 46. I. 3. P. 655—667.
- 8. *Rykhlevskaia E., Gratton G., Fabiani M.* Combining structural and functional neuro-imaging data for studying brain connectivity: a review // Psychophysiology, 2008. V. 45. I. 2. P. 173—187.
- 9. Данько С. Г. Об отражении различных аспектов активации мозга в электроэнцефалограмме: что показывает количественная электроэнцефалография состояний покоя с открытыми и закрытыми глазами // Физиол. человека. 2006. Т. 32. № 4. С. 5—17.
- 10. Костандов Э. А., Черемушкина Е. А., Козлов М. К. Вызванная синхронизация/ десинхронизация корковой электрической активности на лицевые стимулы при формировании установки на эмоционально-отрицательное выражение // Журн. высш. нерв. леят. 2009. Т. 59. № 2. С. 144—154
- деят. 2009. Т. 59. № 2. С. 144—154. 11. *Goldman R. I., Stern J. M., Engel J. Jr. et al.* Simultaneous EEG and fMRI of the alpha rhythm // Neuroreport.. — 2002. — V. 13. — № 18. — Р. 2487.
- 12. Laufs H., Kleinschemidt A., Beyerky A. EEG-correlated fMRT of human alpha activity // Neuroimage. 2003. V. 19. № 4. P. 1463.

#### А. Г. Моренко

Волынский национальный университет имени Леси Украинки, пр. Воли, 13, Луцк, 43000, Украина

### ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РИТМИЧЕСКОЙ СЛУХО-МОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

(по данным анализа α- і θ-диапазонов электроэнцефалограммы)

#### Резюме

В исследованиях приняли участие 30 здоровых и праворуких мужчин и женщин 17—21 года. Оценивали спектральную плотность мощности α- и θ-ритмов электроэнце-

фалограммы во время ритмической слухо-моторной деятельности испытуемых. Выполнение слухо-моторной деятельности в обеих половых группах характеризуется снижением спектральной плотности мощности  $\alpha$ - и  $\theta$ -ритмов в коре головного мозга, по сравнению с состоянием функционального покоя. Активационные процессы были более выраженными в левом полушарии. У женщин установлены меньшие значения и большая генерализованность динамических изменений в пространственном распределении спектральной плотности мощности  $\alpha$ -ритма, чем у мужчин.

**Ключевые слова:** ритмическая слухо-моторная деятельность,  $\alpha$ - і  $\theta$ -диапазоны электроэнцефалограммы.

#### A. G. Morenko

Volyn National University named after Lesya Ukrainka, pr. Voli, 13, Lutsk, 43000, Ukraine

## ELECTROENCEPHALOGRAPHIC PECULIARITIES OF RHYTHMIC OTIC AND MOTOR ACTIVITY IN HUMANS (BY RESULTS A- I Q-RANGES OF ELECTROENCEPHALOGRAM)

#### **Summary**

30 healthy female and male right-handers in the age of 17—21 became the testees in the experiment. The power spectrum density of the electroencephalogram  $\alpha$ - and  $\theta$ - ranges during the rhythmic otic and motor activity of testees was detected. Performing of otic and motor activity in both sex groups is characterized by lowering of power spectrum density of  $\alpha$ - and  $\theta$ -rhythms in the cerebral cortex, compared with the state of functional rest. Activation processes were more expressed in the left hemisphere. Lower values and greater generalization of dynamic changes in spatial distribution of power spectrum density of  $\alpha$ -rhythm was set in female than in male.

Key words: the rhythmic otic and motor activity, the electroencephalogram  $\alpha$ - and  $\theta$ -ranges.

УДК: 616.341-001.26-008.6-085+612.33.014.481.084

**О. В. Сторчило,** канд. біол. наук, доцент Одеський національний медичний університет, кафедра медичної хімії, провул. Валіхівський, 2, Одеса, 65000, Україна

# ГЕНДЕРНІ ЕФЕКТИ ЗАКРІПЛЕННЯ ПОРУШЕНЬ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ТОНКОЇ КИШКИ НАЩАДКІВ ОПРОМІНЕНИХ САМІЈІВ ЩУРІВ ТА ЇХ ФАРМАКОКОРЕКЦІЯ

Присутність біологічно активних речовин плодів розторопші плямистої в організмі опромінених щурів суттєво впливає на функціональну активність тонкої кишки у їх нащадків. Показано, що вживання мелених плодів розторопші інтактними самицями протягом лактації оптимізує наслідки опромінення самців у їх нащадків. Встановлено, що нормалізуючий ефект розторопші реалізується з урахуванням гендерних особливостей: нащадків опромінених натще самців та інтактних самиць, що отримували розторопшу протягом лактації, показники транспортної активності були найвищими серед усіх досліджуваних груп.

**Ключові слова:** опромінення, *Silybum marianum* G., гендерні ефекти, нащадки щурів.

У попередніх дослідженнях нами було визначено вплив біологічно активних речовин (БАР) розторопші на функціональну активність тонкої кишки у нащадків опромінених самців та інтактних самиць [1—3]. Виявилось, що найкращий стимулювальний та нормалізуючий ефект вони справляли на систему транспорту глюкози у нащадків самців, що отримали мелені плоди розторопші перед опроміненням [1], та на системи транспорту субстратів білкового походження — у нащадків самців, що отримали їх після опромінення [2—3]. Отже, присутність компонентів розторопші в організмі опромінених щурів значно впливає на функціональну активність тонкої кишки їх нащадків. Наразі постає питання про роль самиць в передачі порушень нащадкам від опромінених самців. Багато робіт присвячено впливу опромінення на обох батьків водночас та на самців і самиць окремо [4—5]. Але вплив природного комплексу БАР — плодів розторопші — на функціональну активність тонкої кишки нащадків опромінених самців та інтактних самиць, що вживали його протягом терміну лактації, досліджувався вперше. Отже, метою дослідження стало визначення гендерного ефекту на функціональну активність тонкої кишки нащадків опромінених самців та інтактних самиць, що вживали мелені плоди розторопші протягом лактації.

#### Матеріали і методи дослідження

Досліди проведено на двомісячних щурятах-самцях лінії Вістар масою 60—70 г, що утримувалися на стандартному раціоні віварію і були позбавлені їжі протягом 18—24 год. перед експериментом. Було використано 6 груп щурят (по 5 тварин в кожній):

1 — інтактні щурята;

- 2 щурята-нащадки самців, що були опромінені натще (позбавлені їжі 18—24 год. перед опроміненням) дозою 0,5 Гр, та інтактних самиць;
- 3 щурята-нащадки самців, що були опромінені дозою 0,5 Гр натще, та самиць, які протягом терміну лактації (2 місяці) щоденно вживали по 1,5  $\varepsilon$  мелених плодів розторопші;
- 4 щурята-нащадки самців, які були опромінені дозою 0,5 Гр натще, після опромінення отримали мелені плоди розторопші плямистої з комбікормом, та самиць, які протягом терміну лактації щоденно вживали по 1,5 г плодів розторопші;
- 5 щурята-нащадки самців, які були опромінені дозою 0,5 Гр натще та після опромінення отримали мелені плоди розторопші плямистої.
- 6 щурята-нащадки самців, які були опромінені дозою 0,5 Гр натще та після опромінення отримали мелені плоди розторопші плямистої з комбікормом, та самиць, які протягом 1 місяця лактації щоденно вживали по 1,5 г плодів розторопші, а наступного місяця щурята вживали її самостійно.

Опромінення самців щурів проводили одноразово на телегаммаустановці «Агат-Р-1», потужність дози складала 120 рад/хв, поле  $20\times20$ , ВПД = 75 см, доза — 0,5 Гр, час експозиції — 32 с. Акумулюючий препарат слизової оболонки (АПС) виготовляли за методом О. М. Уголєва та співавторів [6]. Інкубували АПС протягом 1 год при t=37 °С в оксигенованому середовищі. У якості інкубаційного середовища використовували розчини 10 мМ глюкози, 5 мМ мальтози, 10 мМ гліцину та 5 мМ гліцил-гліцину, які виготовляли на розчині Рінгера рН 7,4. В усі інкубаційні середовища додавали жовч. Концентрацію вільної глюкози та M-глюкози, утвореної при гідролізі мальтози, визначали за методом [7] колориметрично на КФК-2МП ( $\lambda=625$   $\mu$ ). Концентрацію вільного гліцину та «пептидного гліцину», утвореного при гідролізі гліцил-гліцину, визначали за методом О. М. Уголєва та Н. М. Тимофєєвої [8] колориметрично на КФК-2МП ( $\lambda=540$   $\mu$ ). Статистичну обробку отриманих даних проводили з визначенням критерію Стьюдента за програмою «Primer Biostatistics».

#### Результати дослідження та їх обговорення

Аналізуючи табл. 1, можна зазначити, що найбільшу стимуляцію функціональної активності тонкої кишки зафіксовано у щурят третьої групи: в цьому разі показники транспорту глюкози в 2,7 разу перевищували показники тварин контрольної групи і в 2,8 разу — 2-ї, а показники транспорту мальтози — в 2,8 разу в обох випадках. Стабільність роботи системи можна також оцінити за розкидами від середнього значення: збільшення їх свідчить про дестабілізацію та розбалансування транспортної системи ентероциту. Розкиди від середнього значення в цій групі для глюкози були такими ж, як в контролі і навіть меншими, ніж в 2-й групі — отже, вживання самицею плодів розторопші протягом лактації сприяє не тільки значній активації системи транспорту глюкози, але й стабілізації її роботи. Активність системи транспорту гліцину у тварин 2-ї групи була вище, ніж в контрольній, майже удвічі (в 1,9 разу) і тільки в 1,2 разу — ніж в 2-й групі. Натомість активність системи транспорту дипептиду — гліцил-гліцину — в цій групі була вищою, ніж в контролі, в 1,5 рази і удвічі — ніж в 2-й групі. Слід зауважити, що розкиди від середніх показників в усіх названих групах майже не відрізнялись. Отже, вживання самицею плодів розторопші протягом лактації сприяє значному позитивному ефекту на функціональну активність нащадків опромінених щурів.

Цікаві результати зафіксовано в 4-й групі — визначено підвищення активності транспорту вуглеводних субстратів порівняно з 1-ю та 2-ю групами: для

Таблиця 1

Акумуляція глюкози, мальтози, гліцину та гліцил-гліцину препаратами слизової оболонки тонкої кишки щурів-нащадків опромінених самців за різних умов прижиттєвого впливу на самиць (мМІмг вологої маси препарату)

№ гру- пи	Групи тварин	Субстрати			
		Глюкоза	Мальтоза	Гліцин	Гліцил- гліцин
1	Інтактна	47,85±5,59* 11,7%	42,71±2,31* 5,4%	51,84±3,62* 7%	63,29±3,22* 5%
2	Нащадки опромінених натще сам- ців та інтактних самиць	42,25±6,22* 14,7%	42,67±1,95* 4,6%	83,84±5,33* 6,4%	46,97±2,34* 5%
3	Нащадки опромінених натще сам- ців та самиць, які протягом лак- тації вживали розторопшу	127,64±14,04 11%	119,21±12,52 10,5%	97,28±7,12 7,3%	96,28±4,89 5%
4	Нащадки опромінених натще сам- ців, що отримали розторопшу в їжі після опромінення, та самиць, які протягом лактації вживали розторопшу	78,40±6,72 8,6%	76,77±6,37 8,3%	32,22±3,71 11,5%	37,50±3,82 10,2%
5	Нащадки опромінених натще сам- ців, що отримали розторопшу в їжі після опромінення, та інтакт- них самиць	24,97±2,45* 9,8%	19,26±0,68* 3,5%	85,14±5,01* 5,9%	88,84±6,98* 7,9%
6	Нащадки опромінених натще сам- ців, що отримали розторопшу в їжі після опромінення, та самиць, які протягом 1 місяця лактації вживали розторопшу, та 1 місяць нащадки їли самі	16,47±3,16 19,2%	6,60±2,05 31%	35,28±4,97 14%	29,32±4,05 13,8%

 $\Pi$  р и м і т к а. Дані отримані раніше, використано з метою порівняння: \* — [12], під показниками акумуляції наведено відсотки розкидів від середнього значення при n=5

глюкози в 1,6 та 1,9 разу, відповідно, та для мальтози — в 1,8 разу в обох випадках. Розкиди від середньої в цій групі для глюкози менші, ніж в попередніх трьох групах, що свідчить про стабілізацію та нормалізацію роботи цієї транспортної системи. Отже, вживання розторопші обома батьками (самцем — одноразово після опромінення і самицею — протягом лактації) покращує роботу систем транспорту вуглеводів різного ступеню полімерності у їх нащадків. Натомість активність транспорту субстратів білкового походження в цій групі суттєво знижувалась як для вільного гліцину (в 1,6 разу, в 2,6 разу та утричі порівняно з показниками перших 3 груп), так і для його димеру гліцил-гліцину (в 1,7, 1,2 разу та в 2,6 разу відповідно). Отже, таке сполучення шляхів надходження БАР розторопші до організму нащадка диференційовано впливає на функціональну активність його тонкої кишки: стимулює її системи транспорту вуглеводів і гальмує системи транспорту білкових похідних. Слід зауважити, що розкиди від середньої в 4-й групі в останньому випадку майже удвічі перевищували такі в усіх попередніх групах, що свідчить про певну дестабілізацію роботи систем транспорту субстратів білкового походження — можливо, на користь вуглеводів.

Зіставлення даних 3-ї, 4-ї та 5-ї груп надало можливість визначити гендерний внесок в передачу наслідків опромінення нащадкам та корекцію їх препаратами розторопші. Виявилось, що вживання розторопші самцями після опромінення призводить до гальмування транспорту вуглеводів різного ступеню полімерності у їх нащадків (5-а група) порівняно з даними 1-ї та 2-ї груп — для глюкози майже удвічі (в 1,9 разу) та в 1,7 разу відповідно і в 2,2 разу в обох випадках для мальтози. Вживання розторопші самцями після опромінення та самками протягом лактації (4-а група) призводить до стимуляції транспорту вуглеводів у їх нащадків: порівняно з даними 5-ї групи — утричі для глюкози і майже в 4 рази для мальтози, порівняно з даними 1-ї та 2-ї груп — в 1,6 і в 1,8 разу відповідно для глюкози і в 1,8 разу в обох випадках — для мальтози. Отже, наявність розторопші в їжі самиці під час лактації сприяє активації систем транспорту вуглеводів різного ступеня полімерності у нащадків опроміненого самця і в такий спосіб зменшує негативні наслідки опромінення. Можна було б віднести цей результат на рахунок загального збільшення дози БАР розторопші, що надійшли до організму нащадків від обох батьків (порівняно з 3-ю та 5-ю групами), але найбільшу стимуляцію транспорту обох вуглеводів зафіксовано в 3-й групі: отже, надходження до організму нащадка опроміненого самця БАР розторопші саме з молоком самиці сприяє оптимізації транспорту вуглеводів різного ступеню полімерності в його тонкій кишці. Таким чином, опромінення батька не є безумовною гарантією утворення порушень функціональної активності тонкої кишки його нащадків — якщо коригувати цей процес на стадії молочного годування завдяки вживанню матір'ю природного комплексу БАР плодів розторопші.

Рівень транспорту субстратів білкового походження в 3-й групі також був найвищим серед усіх досліджуваних груп як для вільного гліцину, так і для його димеру (табл. 1). Зіставлення даних 3-ї, 4-ї та 5-ї груп показало найкращий (після 3-ї групи) результат у 5-й групі: отже, одноразове вживання розторопші самцем після опромінення не призвело до значного підвищення рівня транспорту вільного гліцину, натомість сприяло майже дворазовій стимуляції транспорту його диміру (в 1,9 разу порівняно з даними 2-ї групи). Раніше було наведено дані про існування декількох транспортних систем для вільного гліцину [2, 3] і декількох систем транспорту гліцил-гліцину — отже, отримані результати добре узгоджуються з цими даними. Вочевидь ферментативно-транспортний конвеєр (ФТК) для гліцил-гліцину є чутливим до компонентів плодів розторопші і навіть одноразове вживання їх самцем після опромінення сприяє стимуляції системи до рівня, що перевищує такий в 1-й та 2-й групах (в 1,4 та 1,9 разу відповідно) і тільки на 7,7 % є нижчим за такий у 3-й групі. Отже, вживання розторопші або самцем, або самицею призводить до суттєвої стимуляції ФТК для гліцил-гліцину і підтриманню транспорту вільного гліцину на рівні, визначеному для 2-ї групи (але в 1,6 разу вищому, ніж в 1-й групі). Можливо, транспорт гліцину чи гліцил-гліцину на рівні 85—90 мМ є на межі потужності ентероциту за умов *in* vitro. Слід зауважити, що розкиди від середньої для системи транспорту вільного гліцину в 5-й групі є найнижчими серед усіх досліджуваних груп на фоні найвищих абсолютних показників транспорту, що свідчить про оптимізацію роботи транспортної системи за цих умов. Натомість розкиди від середньої для гліцил-гліцину в цій групі  $\epsilon$  більшими, ніж в перших трьох групах (табл. 1). Це не пов'язано зі збільшенням абсолютної величини транспорту, оскільки в 3-й групі розкиди є меншими в 1,6 разу на фоні майже такої ж абсолютної величини. Отже, дійсно, системи транспорту вільного гліцину та його димеру по-різному реагують на джерело надходження БАР розторопші: транспорт вільного гліцину стимулюється у нащадків опроміненого натще самця та самиці, що вживала розторопшу протягом лактації (3-я група), натомість транспорт гліцилгліцину стимулювався у нащадків кожного з батьків, що отримав розторопшу (3-я і 5-а групи). Виходячи з цього, слід було б очікувати найкращий результат у нащадків, обидва батьки котрих вживали розторопшу (4-а група). Саме в цій групі було зафіксовано стимуляцію транспорту вуглеводів різного ступеню полімерності на фоні його стабілізації (табл. 1). Натомість для субстратів білкового походження в цій групі визначено найнижчі з-поміж 5 досліджуваних груп показники: рівень транспорту гліцину був нижчим, ніж в 1-й групі в 1,6 разу, ніж в 2-й — в 2,6 разу і ніж в 3-й — утричі. Рівень транспорту гліцил-гліцину був в 1,7, в 1,2 разу і в 2,6 разу нижчим відповідно. При цьому розкиди від середньої в цій групі були найвищими для обох субстратів з-поміж усіх досліджуваних груп. Отже, надходження розторопші від обох батьків сприяє стимуляції та оптимізації транспорту глюкози і стимуляції ФТК для мальтози та гальмуванню і дестабілізації транспорту субстратів білкового походження різного ступеня полімерності, але не нижче рівня активної компоненти транспорту. Таким чином, визначається певна диференціація ефекту розторопші на функціональну активність тонкої кишки нащадків опромінених самців залежно від типу субстрату та статі батьків, що вжили розторопшу: так, найкращий ефект розторопші для усіх субстратів визначено для нащадків опромінених самців та самиць, що вживали її протягом лактації, далі для стимуляції транспорту вуглеводів різного ступеня полімерності кращими  $\epsilon$  дані нащадків обох батьків, що вживали розторопшу, натомість для субстратів білкової природи кращими  $\epsilon$ дані опроміненого батька, що вжив розторопшу після опромінення — в останньому випадку рівень транспорту обох субстратів значно перевищував такий в інтактній групі. Отже, для найвищого рівня стимуляції транспорту усіх субстратів в тонкій кишці нащадків опромінених щурів необхідно, щоб розторопшу вживала лише самиця протягом лактації, для стимуляції вуглеводного транспорту — обидва батьки, для стимуляції транспорту субстратів білкового походження — самці після опромінення. Таким чином, визначаються гендерні особливості фармакокорекції порушень функціональної активності ШКТ нащадків опромінених щурів за допомогою природного комплексу БАР — плодів розторопші плямистої.

Для детального визначення впливу розторопші на активність транспорту нутрієнтів було досліджено 6-у групу нащадків опромінених самців (табл. 1). Виявилось, що за таких умов рівень транспорту вільної глюкози знижується майже утричі порівняно з контролем, в 2,5 рази — порівняно з 2-ю групою, в 7,7 разу — з 3-ю і в 4,8 разу — порівняно з 4-ю групою. При цьому розкиди від середньої в цій групі для глюкози були найвищими з-поміж усіх груп. Виходячи з цього, відбувалось пригнічення саме транспортера SGLT1 (sodium-glucose cotransporter), який відповідає за активну компоненту переносу субстрату [9]. Транспорт мальтози був найнижчим, ніж в усіх попередніх групах: в 6,5 рази порівняно з контролем та з 2-ю групою, у 18 разів — порівняно з 3-ю та в 11,6 разу — з 4-ю групою. Ця відмінність, швидше за все, свідчить про те, що гальмівного впливу зазнали обидві ланки ФТК. При цьому розкиди від середньої в цій групі сягали 31 % — найбільші з-поміж усіх груп, що також свідчить на користь даного припущення. Проте таке зниження показників вуглеводного транспорту жодним чином не позначилось на масі тіла та інших морфофізіологічних показниках щурят.

Таким чином, виявляється гальмівний вплив розторопші на транспорт вуглеводів (особливо мальтози) в кишці нащадків самця, що вжив розторопшу після опромінення, та самиці, що вживала її 1 місяць протягом лактації, а потім самі нащадки вживали її протягом одного місяця (до речі, вельми охоче). Можна

було б зробити висновок про загальний інгібувальний вплив розторопші на функціональну активність тонкої кишки за таких умов, але виявилось, що цей гальмівний ефект не підтверджується для субстратів білкового походження: так, показники транспорту вільного гліцину в цій групі не відрізнялись від таких у 4-й, а транспорту його димеру були тільки на 22 % нижче, при цьому розкиди від середньої були ненабагато вищими за такі в 4-й групі (табл. 1). Отже, дійсно в 5-й групі за таких умов розторопша спричинює гальмівний і дестабілізуючий вплив на системи транспорту вуглеводів, але майже не змінює показники транспорту субстратів білкового походження порівняно з такими в 4-й групі. Отже, відбувається лише перерозподіл гідролітично-транспортної активності кишки, але не загальне її пригнічення.

Таким чином, виявлено значний ефект плодів розторопші на функціональну активність тонкої кишки нащадків опромінених шурів, що реалізується з урахуванням гендерних відмінностей батьків диференційовано для систем транспорту субстратів білкового походження та вуглеводів різного ступеня полімерності. Отримані дані добре узгоджуються з даними літератури про позитивні ефекти розторопші в лікуванні як діабету (в тому числі і 2-го типу), так і численних станів, пов'язаних з розпадом білків — отже, вона спроможна обмежувати надходження глюкози до крові шляхом гальмування піруваткінази [10, 11], зменшуючи таким чином навантаження на підшлункову залозу інтактних тварин, але стимулювати цей процес за потреби в підвищенні енергетичного рівня в організмі (наприклад, після виснажливої хвороби або після опромінення). Водночас наявність розторопші в їжі самиці надає можливість коригувати порушення функціональної активності тонкої кишки нащадків її та опроміненого самця.

#### Висновки

- 1. Вживання інтактними самицями плодів розторопші протягом лактації оптимізує наслідки опромінення у нащадків опромінених самців: стимулює та нормалізує транспорт субстратів вуглеводного та білкового походження різного ступеня полімерності.
- 2. Нормалізуючий ефект природного комплексу БАР плодів розторопші плямистої на функціональну активність тонкої кишки нащадків опромінених батьків реалізується з урахуванням гендерних відмінностей їх батьків: нащадки інтактних самиць, що отримували розторопшу протягом лактації, і опромінених натще самців мали найкращі показники активності з-поміж усіх досліджуваних груп, в тому числі кращі, ніж у нащадків опромінених натще самців, що вжили розторопшу одразу після опромінення.
- 3. Природний комплекс БАР плоди розторопші плямистої може бути використано для фармакокорекції порушень функціональної активності тонкої кишки нащадків опромінених батьків.

#### Література

- 1. *Сторчило О. В.* Дослідження радіопротекторної дії плодів розторопші плямистої на транспорт глюкози в тонкій кишці нащадків опромінених щурів / Сторчило О. В. // Досягнення біології та медицини. 2008. № 2 (12). С. 33—37.
- 2. *Сторчило О. В.* Дослідження впливу деяких фітопрепаратів і рослинних екстрактів за участю жовчі на транспорт гліцину в ентероцити нащадків опромінених щурів / Сторчило О. В. // Одеський медичний журнал. 2008. № 4 (108). С. 7—11.
- 3. *Сторчило О. В.* Фармакологічні ефекти деяких фітопрепаратів у присутності жовчі на гідроліз та транспорт гліцил-гліцину в тонкій кишці нащадків опромінених тварин / Сторчило О. В. // Одеський медичний журнал. 2009. № 1 (111). С. 22—26.

- 4. Henderson M. A. Effect of gender on radiation-induced cataractogenesis / Henderson M. A., Valluri S., DesRosiers C., Lopez J. T., Batuello C. N., Caperell-Grant A., Mendonca M. S., Powers E. M., Bigsby R. M., Dynlacht J. R. // Radiat Res. 2009. № 1 (172). P. 129—133.
- 5. Nefyodov I. Regularities in Development of Radiation Effects in Ontogenesis of Progeny with Both Parents Irradiated: Experimental Studies / Nefyodov I., Nefyodova I., Palyga G. // Radiat. Prot. Dosimetry. 1995. Vol. 62 (1—2). P. 45—47.
- 6. Уголев А. М. Аккумулирующий препарат слизистой новый метод исследования начальных этапов переноса веществ через кишечную стенку / Уголев А. М., Жигуре Д. Р., Нуркс Е. Е. // Физиол. журн. СССР. 1970. Т. 56, № 11. С. 1638—1641.
- 7. Scott T. A. The determination of hexoses with antrone // Scott T. A., Melvin E. H. Analyt. Chem. 1953. № 25. P. 1656—1658.
- 8. Уголев А. М. Определение пептидазной активности / Уголев А. М., Тимофеева Н. М. // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С. 178—181.
- 9. Stearns A. T. Rapid Upregulation of Sodium-Glucose Transporter SGLT1 in Response to Intestinal Sweet Taste Stimulation / Stearns A. T., Balakrishnan, A., Rhoads, D., Tavakkolizadeh, A. // Ann Surg. 2010. Vol. 5, № 251. P. 865—871.
- 10. Oxford handbook of complementary medicine. Edited by E. Ernst, M. H. Pittler, B. Wider and Boddy K. Oxford University Press, Oxford UK. 2008. 424 p.
- 11. Maghrani M. Study of the hypoglycaemic activity of Fraxinus excelsior and Silybum marianum [Milk thistle] in an animal model of type 1 diabetes mellitus. / Maghrani M. // J. Ethnopharmacol. 2004. Vol. 91, № 2—3. P. 309—316.
- 12. Сторчило О. В. Особливості функціональної активності тонкої кишки нащадків опромінених щурів за різних умов прижиттєвого впливу на батьків / Сторчило О. В. // Одеський медичний журнал. 2009. № 5 (115). С. 21—27.

#### О. В. Сторчило

Одесский национальный медицинский университет, кафедра медицинской химии, пер. Валиховский, 2, Одесса, 65000, Украина

## ГЕНДЕРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЗАКРЕПЛЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТОНКОЙ КИШКИ У ПОТОМСТВА ОБЛУЧЕННЫХ САМЦОВ КРЫС И ИХ ФАРМАКОКОРРЕКЦИЯ

#### Резиме

Присутствие биологически активных веществ плодов расторопши в организме облученных крыс существенно влияет на функциональную активность тонкой кишки у их потомства. Показано, что употребление плодов расторопши интактными самками в период лактации оптимизирует последствия облучения самцов у их потомства. Установлено, что нормализующий эффект расторопши реализуется с учетом гендерних особенностей: у потомства облученных натощак самцов и интактных самок, которые получали расторопшу в период лактации, показатели транспортной активности были самыми высокими среди всех групп.

**Ключевые слова:** облучение,  $Silybum\ marianum\ G.$ , гендерные эффекты, потомство крыс.

#### O. V. Storchilo

## HENDER EFFECTS OF BREACH FASTENING OF THE IRRADIATED MALE RATS POSTERITY SMALL INTESTINE FUNCTIONAL ACTIVITY AND THEIR PHARMACOCORRECTION

#### Summary

The presence of milk thistle fruits biologically active substances in the irradiated rats males organism essentually effects on the functional activity in their posterity small intestine. Usage of t milk thistle fruits by the rats females due to the lactation optimizes the results of the irradiation of the rats males in the small intestine of their posterity was shown. The normalizing effect of milk thistle fruits realizes with the gender differences: the data of the functional activity were the highest in the group of the irradiated hungry males rats and intact females, which got the milk thistle fruits due to the lactation.

**Key words:** irradiation, *Silybum marianum G.*, gender effects, rats posterity.

#### ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

#### 1. Профіль журналу

- 1.1. «Вісник Одеського національного університету» (випуск «Біологія») здійснює такі публікації:
  - 1. Наукові статті.
  - 2. Короткі повідомлення.
  - 3. Бібліографія.
  - 4. Матеріали конференцій.
  - 5. Рецензії.
  - 6. Матеріали з історії науки та університету.
- 1.2. У певному конкретному випуску один автор має право надрукувати тільки одну самостійну статтю
- 1.3. Мова видання українська (в окремих випадках російська або англійська)
  - 1.4. До редакції «Вісника...» подається

Відредагований і погоджений з редколегією текст статті, записаної на електронному носії у форматі \*.doc (гарнітура Times New Roman (Суг), кегль 14, відстань між рядками 1,5 інтервали; поля: ліве — 2,5 см, праве — 1,5 см, верхнє — 2 см, нижнє — 2 см), набраний без застосування функції «Розстановка переносів» та два екземпляри «роздруківки» з неї.

Резюме двома додатковими мовами (зразок оформлення публікації наведено наприкінці Правил).

Колонтитул

Рекомендація кафедри або наукової установи до друку

#### 2. Підготовка статті — обов'язкові складові

Оригінальна стаття має включати:

- 2.1. Вступ, в якому обговорюють актуальність проблеми, формулюють мету та основні завдання дослідження
  - 2.2. Матеріали і методи дослідження
  - 2.3. Результати дослідження
  - 2.4. Аналіз результатів або їх обговорення
  - 2.5. Висновки
  - 2.6. Список літератури
  - 2.7. Анотація (мовою оригіналу статті) і резюме
  - 2.8. Ключові слова
  - 2.9. Колонтитул

## 3. Оформлення рукопису, обсяг. Послідовність та розташування обов'язкових складових статті

- 3.1. Обсяг рукопису наукової статті (з урахуванням малюнків, таблиць і підписів до них. анотацій, резюме, списку літератури) 8—12 сторінок друкованого тексту, оглядів до 20 сторінок, рецензій до 3 сторінок, коротких повідомлень до 2 сторінок. Рукописи більшого обсягу приймаються до журналу тільки після попереднього узгодження з редколегією.
- 3.2. Послідовність друкування окремих складових наукової статті має бути такою:

- 1. УДК в лівому верхньому кутку першого аркуша.
- 2. Прізвище та ініціали автора (авторів) мовою статті, вчений ступінь та посада (скорочено).
- 3. Назва наукової установи (в тому числі відділу, кафедри, де виконано працю).
- 4. Повна поштова адреса (за міжнародним стандартом), телефон та електронна адреса (e-mail) для співпраці з авторами.
- 5. Назва статті. Вона повинна точно відбивати зміст праці, бути короткою (в межах 9 повнозначних слів), містити ключові слова.
- 6. Анотація мовою оригіналу друкується перед початком статті з відступом 20 мм від лівого поля.
  - 7. Під анотацією друкуються ключові слова (не більше п'яти).
  - 8. Далі йде текст статті, список літератури.
- 9. Таблиці та малюнки разом з підписами та необхідними поясненнями до них розміщуються у тексті статті.
- 10. На окремому аркуші подаються резюме (російською та англійською мовами для україномовних статей: українською та англійською для російськомовних), оформлених таким чином: прізвище та ініціали автора (авторів), назва наукової установи, повна поштова адреса установи, назва статті, слово «Резюме» («Summary»), текст резюме, ключові слова.
  - 3.3. Стаття повинна бути підписана автором (авторами).

#### 4. Мовне оформлення тексту: Термінологія. Умовні скорочення, посилання. Таблиці, схеми, рисунки

- 4.1. Автори несуть повну відповідальність за бездоганне мовне оформлення тексту, за правильну українську наукову термінологію (її слід звіряти за фаховими термінологічними словниками).
- 4.2. Латинські біологічні терміни (назви видів, родів) подаються обов'язково латиницею і курсивом. За першого вживання латинської назви у дужках слід обов'язково подати український відповідник назви.
- 4.3. Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то такі абревіатури за першого вживання наводять у дужках. Наприклад: селекційно-генетичний інститут (далі СГІ).
- 4.4. Посилання на літературу подаються у тексті статті, обов'язково у квадратних дужках, цифрами. Цифра в дужках позначає номер праці у «Списку літератури». Назви праць у списку літератури розташовуються у порядку цитування в тексті і оформлюються за правилами ВАК (див. «Бюлетень ВАК України, 1997, № 2, с. 29—31).
- 4.5. Цифровий матеріал, по можливості, слід зводити у таблиці і не дублювати у тексті. Таблиці повинні бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Цифровий матеріал таблиць слід обробити статистично. Матеріал таблиць (як і малюнків) повинен бути зрозумілим незалежно від тексту статті.

При об'єднанні декількох рисунків або фотографій в один рисунок рекомендується позначати кожен з них прописними літерами знизу. Наприклад:





Рис. Підпис рисунку

- 4.6. Рисунки виконуються у програмах «Діаграма Microsoft Graph» або «Діаграма Microsoft Excel» та вставляються у текст. Кожна крива на рисунку повинна мати номер, зміст кривих пояснюється у підписах під рисунком. На осях абсцис і ординат рисунка зазначається лише величина, що вимірюється, і розмірність в одиницях СІ (%, мм, г і т. п.).
- 4.7. У розділі «Результати досліджень» (якщо цей розділ не поєднаний з «Аналізом результатів», див. 2.4) необхідно викласти лише виявлені ефекти без коментарів — всі коментарі та пояснення подаються в «Аналізі результатів». При викладі результатів слід уникати повторення змісту таблиць та рисунків, а звертати увагу на найважливіші факти та певні закономірності, що з них випливають. Математичні (хімічні) формули виконуються засобами внутрішнього редактора формул «Microsoft Equation» і, при потребі, нумеруються.

4.8. У розділі «Аналіз результатів» необхідно показати причинно-результативні зв'язки між встановленими ефектами, порівняти отриману інформацію з даними літератури і наголосити на виявлених нових даних. При аналізі слід посилатися на ілюстративний матеріал статті. Аналіз має закінчуватися відпо-

віддю на питання, поставлені у вступі.

#### 5. Література

Список літератури друкується мовою оригіналу відповідної праці. Назви праць у списку літератури розташовуються в алфавітному порядку в тексті.

#### Приклади бібліографічних описань

Книги, монографії

- 1. Горячковский А. М. Клиническая биохимия. Одесса: Астропринт, 1998. — 608 c.
- 2. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. М.: Мир, 1980. — 342 c.
- 3. Определитель высших растений Украины. К.: Наукова думка, 1987. 546 c.
  - 4. *Флора* УРСР: В 12 т. / АН УРСР. Київ, 1965. Т. Х. 126 с.

Статті із журналів

- 1. Андриевский А. М., Катаненко С. В., Тоцкий В. Н. Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей Drosophila melanogaster // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 5. — С. 519—524.
- 2. Zhou S., Chhan E., Duan W. Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance // Drug Metab Rev. — 2005. — V. 37 (1). — P. 41-213.

- 1. Андриевский А. М., Олейник Ю. Н., Кучеров В. А., Асманская А. С. Спектр тканевых карбоксиэстераз в онтогенезе суслика крапчатого (Spermophilus suslicus Guld.) // Тез. докл. конф. «Генетика в современном обществе». — Харьков,
- 2. Клечковская Е. А., Игнатова С. А., Слепченко А. И., Махновская М. Л., Литвиненко Н. А. Селекция in vitro генотипов пшеницы с комплексной устойчивостью к фузариозу злаков // Тез. докл. VII Международной конференции «Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда». -Москва, 1997. — Č. 372.

3. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. Cell transfer and Interferon Studies // Abstracts of the V International symposium of immunopharmacology. — Quebec, 2000. — P. 31.

Лисертації, автореферати дисертацій

- 1. Олярник О. О. Дослідження процесів перекисного окислення ліпідів та активності ферментів антиоксидантного захисту при цукровому діабеті: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04 / Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Київ, 1998. 17 с.
- 2. Олярник О. О. Дослідження процесів перекисного окислення ліпідів та активності ферментів антиоксидантного захисту при цукровому діабеті: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. Київ, 1998. 117 с.

Депоновані наукові роботи, патенти, авторські свідоцтва

- 1. *Рябушко Л. И*. Микрофитобентос Филлофорного поля Зернова. Севастополь: Деп. в ВИНИТИ 11.07.91 г., № 2981—В91, 1991. 28 с.
- 2. *Патент* України СО7Д 243/24 ФС № 953812. Способ отримання 3-окси-7-бром-5(орто-хлор)-бенздиазепина. № 19803; Заявл. 09.04.90; Опубл. 22.06.92; НКИ 355/68. 3 с.

Скорочення назв міст при вказівці міста видання: Київ — К.; Львів — Л.; Одеса — О.; Харків — Х.; Москва — М.; Ленінград — не скорочується; Санкт-Петербург — СПб.; Сімферополь — Сімф.; Дніпропетровськ — Д.; Ростов на Дону — Ростов н/Д.

#### 6. Анотація. Резюме. Колонтитули

Анотація (коротка стисла характеристика змісту праці) подається мовою оригіналу статті, містить не більше 50 повнозначних слів і передує (окремим абзацом) основному тексту статті.

Резюме (короткий висновок з основними положеннями праці) подається російською та англійською мовами, містить не більше 50 повнозначних слів та друкується на окремому аркуші. Якщо стаття написана російською мовою, то резюме подається українською та англійською.

Колонтитул (короткий або скорочений чи видозмінений заголовок статті для друкування зверху на кожній сторінці тексту праці) подається мовою оригіналу статті разом з прізвищем та ініціалами автора на окремому аркуші.

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 «Вісника ОНУ». Рукописи статей, що прийняті до публікування, авторам не повертаються.

7. Зразок оформлення публікації (див. на звороті).

#### УДК 576.315:575.222.73:633.1

# **Т. Г. Трочинська,** фахівець І категорії Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра генетики і молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

# ЕКСПРЕСІЯ ТА КОРЕЛЯЦІЙНІ ЗВ'ЯЗКИ ЦИТОМЕТРИЧНИХ ОЗНАК КЛІТИН ЧОЛОВІЧИХ ГЕНЕРАТИВНИХ СТРУКТУР ПШЕНИЦІ, ЖИТА ТА ЇХ ГІБРИДІВ В ОНТОГЕНЕЗІ РОСЛИН

За допомогою комп'ютерної цитометрії визначено показники оптичної щільності ядерець і цитоплазми клітин чоловічих генеративних структур пшениці, жита та міжродових гібридів першого покоління за забарвлення на сумарний білок. Виявлено суттєвий видовий та сортовий поліморфізм у прояві досліджуваних кількісних ознак у батьківських форм. Встановлено наявність високого кореляційного зв'язку між вмістом білків у ядерці і цитоплазмі досліджуваних клітин усіх використаних злаків протягом мікроспорогенезу. Показано зміни кореляційних зв'язків між об'ємом ядерець і вмістом білків у ядерці і цитоплазмі в процесі мікроспорогенезу.

**Ключові слова:** мінливість, каріометричні ознаки, цитохімічні ознаки, кореляція, пшениця, жито, пшенично-житні гібриди

Текст вступу до статті

#### Матеріали та методи

Текст матеріалів та методів роботи

#### Результати та їх обговорення

Викладення результатів та їх аналіз

#### Висновки

#### Література

1. *Атраментова Л. О., Утевська О. М.* Статистичні методи в біології. — X.: XHУ ім. В. Н. Каразіна, 2007. — 288 с.

2. ...

#### Т. Г. Трочинская

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

## ЭКСПРЕССИЯ И КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ КЛЕТОК МУЖСКИХ ГЕНЕРАТИВНЫХ СТРУКТУР ПШЕНИЦЫ, РЖИ И ИХ ГИБРИДОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

С помощью компьютерной цитофотометрии определены показатели оптической плотности ядрышек и цитоплазмы клеток мужских генеративных структур пшеницы, ржи и межродовых гибридов первого поколения при окрашивании на суммарный белок.

Установлен существенный видовой и сортовой полиморфизм в проявлении изученных количественных признаков родительских форм. Показана высокая корреляционная связь между содержанием белков в ядрышках и цитоплазме изученных клеток всех использованных злаков на протяжении микроспорогенеза. Выявлены изменения корреляционных связей между объемом ядрышек и содержанием белков в ядрышках и цитоплазме в процессе микроспорогенеза.

**Ключевые слова:** изменчивость, кариометрические признаки, цитохимические признаки, корреляция, пшеница, рожь, пшенично-ржаные гибриды.

#### T. G. Trochinskaya

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology, Dvoryanska St. 2, Odesa, 65026, Ukraine

## EXPRESSION AND CORRELATION OF CYTOMETRICAL CHARACTERS OF WHEAT, RYE AND WHEAT-RYE HYBRIDS $\mathbf{F}_1$ MALE GENERATIVE STRUCTURES CELLS

#### Summary

The optical density indices of nucleolei and cytoplasm of male generative structures cells of wheat, rye and  $F_1$  intergeneric hybrids, stained for the detection of total protein have been estimated. The essential differences depending on the species and cultivar have been determined for investigated characters of parental forms cells. The close correlation between protein content in the nucleolei and cytoplasm of all studied cereals cells have been shown during microsporogenesis. The dynamics of correlation between nucleolei volumes and protein content of nucleolei and cytoplasm have been observed for cells of male generative structures in microsporogenesis.

**Key words:** changeability, cariometrical characters, cytochemical characters, correlation, wheat, rye, wheat-rye hybrids.

#### 3 M I C T

ыміх
<b>Андриевский А. М.</b> Органно-тканевая локализация карбоксиэстераз у <i>Drosophila melanogaster</i> в онтогенезе
Єршова О. M.
Антиоксидантна дія біомаси штамів спіруліни на фоні хронічного стресу у щурів 1
<b>Ель Та'алу А. Б., Гоенага М. В., Перський Є. Е.</b> Вікові особливості зв'язку між окислювальним дезамінуванням і термостабільністю колагену шкіри
Макаренко О. А., Левицкий А. П., Ходаков И. В. Антипротеиназная активность флаваноидов
Орлова Л. Д., Устянська О. В., Мотрук Н. В., Чернадчук С. С., Петров С. А. Активність катепсиноподібних протеїназ у різних видів змій
Пономаренко О. М. Вплив деформації на вміст та якісний склад глікозаміногліканів в протеогліканах шкіри щурів 4
Ульянова О. А., Тарабанько В. Е. Ростостимулирующая активность компостов на основе еловой коры и содержание в них дитерпенов
ГЕНЕТИКА, МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ, ЦИТОЛОГІЯ
Мутерко О. Ф., Галаєв О. В. Можливість використання мікросателітних маркерів пшениці в плр-аналізі геному Aegilops cylindrica Host
Солоденко А. Є., Александрова О. Є., Бурлов В. В., Бурлов В. В., Сиволап Ю. М. ПЛР-маркер стійкості соняшника до несправжньої борошнистої роси
ГІДРОБІОЛОГІЯ
Заморов В. В., Рижко І. Л., Друзенко О. В. Поліморфізм естераз бичка-кругляка <i>Neogobius melanostomus (Pallas)</i> з акваторії острова Зміїний
Стадниченко С. В.
Косвенные оценки смертности и выживаемости мидий северо-западной части Черного моря 8
ІСТОРИЧНІ НАРИСИ
<b>Єрмолаєва О. Ю.</b> Історія вивчення рідкісних та зникаючих ефемероїдних геофітів Одеської області
ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН
<b>Моренко А. Г.</b> Електроенцефалографічні особливості ритмічної слухо-моторної діяльності людини (за даними аналізу $\alpha$ - і $\theta$ -діапазонів електроенцефалограми)
Сторчило О. В. Гендерні ефекти закріплення порушень функціональної активності тонкої кишки нащадків опромінених самців щурів та їх фармакокорекція
Thomas was commis

#### Наукове видання

### Odessa National University Herald

Вестник Одесского национального университета

## ВІСНИК ОДЕСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

ТОМ 15. Випуск 17

Біологія

2010

Українською та російською мовами

Зав. редакцією *Т. М. Забанова* Дизайнер обкладинки *В. І. Костецький* Технічний редактор *Д. М. Островеров* 

Підписано до друку 15.12.2010. Формат 70×108/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк офсетний. Ум. друк. арк. 11,20. Тираж 300 прим. Вид. № 200. Зам. № 39.

Видавництво і друкарня «А с т р о п р и н т» 65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21 Тел.: (0482) 37-07-95, 37-14-25, (048) 7-855-855 (Свідоцтво ДК № 1373 від 28.05.2003 р.) www.astroprint.odessa.ua www.fotoalbom-odessa.com