

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.1-67

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

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флоре и фауне Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" в областях физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные о биохимических и биофизических основах регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

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

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**

Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.

Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); Шандор Макай, д-р біол. наук, проф. (м. Сомбатхей, Угорщина); Іван Бубриак, канд. мед. наук (Оксфорд, Велика Британія); В. Г. Хоперія, д-р мед. наук, проф.; Д. М. Говорун, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України (м. Київ, Україна); В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; Н. Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; В. В. Джаган, канд. біол. наук, доц.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. (м. Гродно, Білорусь), О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Брайон Каленгем, д-р мед. наук, проф. (м. Кембридж, Велика Британія); Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, д-р біол. наук, проф. (м. Полтава, Україна); М. Є. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р мед. наук, проф. (м. Львів, Україна); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія)

Адреса редколегії

ННЦ "Інститут біології та медицини";
просп. акад. Глушкова, 2 а, м. Київ, 03127, Україна
☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com

Затверджено

Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини"
09.02.21 (протокол № 8)

Атестовано

Вищою атестаційною комісією України.
Постанова Президії ВАК України
№ 1-05/3 від 14.04.10

Зареєстровано

Міністерством юстиції України.
Свідоцтво про державну реєстрацію
КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09

Засновник та видавець

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет".
Свідоцтво внесено до Державного реєстру
ДК № 1103 від 31.10.02

Адреса видавця

ВПЦ "Київський університет",
6-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна,
☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

Журнал входить до наукометричних баз:

Index Copernicus (з 2012 р. ICV – 2019 = 65,93), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (із 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (із 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (із 2014 р.); HINARI (із 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (із 2012 р.); The Knowledge Network (із 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (із 2012 р.); WorldCat (із 2013 р.); "Наукова періодика України" в Національній бібліотеці України імені В. І. Вернадського та в Національному депозитарії академічних текстів

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.1-67

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

For scientists, professors, aspirants and students.

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

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флоре и фауне Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" в областях физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные о биохимических и биофизических основах регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, Dr Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, PhD; Sergii Vakal, PhD (Tech. Editor); Sandor Makai, Prof. Dr Sci., Dr h. c. (Szombathely, Hungary); Ivan Boubriak, PhD (Oxford, United Kingdom); Khoperiay Viktiriay, Dr Sci.; Dmytro Hovorun, Dr Sci., Prof., Corresponding Member of the NASU, Deputy Director (Kyiv, Ukraine); Viktor Martynyuk, Dr Sci., Prof.; Mykola Makarchuk, Dr Sci., Prof. Head of the Chair; Nataliia Taran, Dr Sci., Prof., Head of the Chair of Plant Biology; Andrii Sivolob, Dr Sci., Prof.; Veronika Dzhagan, PhD, Associate Prof.; Andrei Moisieenok, Dr Sci., Prof., Corresponding Member of the NASB (Grodno, Belarus), Alexander Zholos, Dr Sci., Prof.; Brian Callingham, Dr Sci., M. D., Prof. (Cambridge, United Kingdom); Tetiana Berehova, Dr Sci., Prof.; Sergey Pilipenko, Dr Sci., Prof. (Poltava, Ukraine); Mykola Dzerzhynskyi, Dr Sci., Prof.; Olexandr Sklyarov, Dr Sci., M. D., Prof. (Lviv, Ukraine); Ludovico Abenavoli, PhD, M. D., Associate Prof. (Catanzaro, Italy)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 09.02.21 (Protokol № 8)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4525 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Taras Shevchenko National University of Kyiv, Publishing house "Kyiv University". Certificate included in the State Register ДК № 1103 від 31.10.02
Publisher's Address	Publishing and Polygraphic Center "Kyiv University", 14, Taras Shevchenka Blvd., Kyiv, 01601, Ukraine, ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; fax 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Academic Keys, CiteFactor, Directory of Open Access Journals (DOAJ), E-Library.ru, Hinari, Geneva Foundation for Medical Education and Research, DRJI, Open Academic Journal Index (OAJI), Quality Open Access Market (QOAM), ResearchBib, Ulrich's Periodicals, WorldCat, Ukrainian scientific journals; V. I. Vernadsky National Library of Ukraine, The journal uses CLOCKSS digital archiving policy as well as an electronic archive of Vernadsky National Library of Ukraine.

ЗМІСТ

Мусієнко Микола Миколайович (до 80-річчя вченого)	6
Березовчук Л., Макарчук М. Марганцева енцефалопатія і міжпівкулева асиметрія головного мозку	8
Бороменський Д., Бісько Н., Аль-Маалі Г., Поліщук О. Вміст ганодерових кислот у міцелії різних видів роду <i>Ganoderma</i> (Ganodermataceae), отриманого різними способами культивування	14
Кир'яченко Є., Галенова Т., Савчук О. Аналіз слизу садового равлика (<i>Helix aspersa Muller</i>) на присутність потенційних ефекторів системи гемостазу	19
Бєляєва А., Гарманчук Л. Аналіз функціональних змін під час застосування кандесартану циклексетилу з ресвератролом у тварин	24
Мацап'як Л. Раритетний фітогенотип Національного природного парку "Верховинський" і його аналіз	27
Одукалець І., Цимбалюк Д., Григорчук А. Морфологічна характеристика шафрану Гейфеля (<i>Crocus heuffelianus</i> Herb.) в умовах Національного природного парку "Подільські Товтри"	34
Ракша Н., Масвська Т., Савчук О. Одержання пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону	38
Федічкіна Р., Коркач Ю., Охай І., Гошовська Ю., Сагач В. Вплив моделювання синтезу сірководню та глутатіону на окисно-нітрозативний метаболізм міокарда в умовах ішемії-реперфузії	43
Черних М., Зима І. Особливості передачі інформації у функціональних мережах кори під час сприйняття нейтральних облич в умовах емоційного впливу	48
Регеда Л., Бісько Н., Аль-Маалі Г. Вплив міцелію <i>Pholiota</i> spp. (<i>Strophariaceae, Basidiomycota</i>) на схожість насіння й ріст <i>Lepidium sativum</i> L. та <i>Cucumis sativus</i> L.	53
Пастошук А., Коваленко М., Сківка Л. Антиоксидантні реакції проростків озимої пшениці за впливу <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> та їхніх ліпополісахаридів <i>in vitro</i>	61

СОДЕРЖАНИЕ

Мусяенко Николай Николаевич (к 80-летию ученого)	6
Березовчук Л., Макачук Н. Марганцевая энцефалопатия и межполушарная асимметрия головного мозга	8
Бороменский Д., Бисько Н., Аль-Маали Г., Полищук О. Содержание ганодермовых кислот в мицелии различных видов рода <i>Ganoderma</i> (Ganodermataceae), полученного различными способами культивирования	14
Кирьяченко Е., Галенова Т., Савчук О. Анализ слизи садовой улитки (<i>Helix aspersa Muller</i>) на присутствие потенциальных эфффекторов системы гемостаза	19
Беляева А., Гарманчук Л. Анализ функциональных изменений при применении кандесартана цилексетила с ресвератролом у животных	24
Мацапьяк Л. Раритетный фитогеофонд Национального природного парка "Верховинский" и его анализ	27
Одукалец И., Цимбалюк Д., Григорчук А. Морфологическая характеристика шафрана Эйфеля (<i>Crocus heuffelianus Herb.</i>) в условиях Национального природного парка "Подольские Товтры"	34
Ракша Н., Маевская Т., Савчук О. Получение пептидов из гидробионтов Антарктического региона	38
Федичкина Р., Коркач Ю., Охай И., Гошовская Ю., Сагач В. Влияние моделирования синтеза сероводорода и глутатиона на окислительно-нитрозативный метаболизм миокарда в условиях ишемии-реперфузии	43
Черных М., Зима И. Особенности передачи информации в функциональных сетях коры во время восприятия нейтральных лиц в условиях эмоционального влияния	48
Регеда Л., Бисько Н., Аль-Маали Г. Влияние мицелия <i>Pholiota</i> spp. (<i>Strophariaceae, Basidiomycota</i>) на всхожесть семян и рост <i>Lepidium sativum</i> L. и <i>Cucumis sativus</i> L.	53
Пастощук А., Коваленко М., Скивка Л. Антиоксидантные реакции проростков озимой пшеницы разных сортов, подвергшихся влиянию <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> и их липополисахаридов <i>in vitro</i>	61

CONTENTS

Musienko Mykola Mykolajovych (to the 80th anniversary of the scientist)	6
Berezovchuk L., Makarchuk M. Manganese encephalopathy and interhemispheric asymmetry of the brain	8
Boromenskyi D., Bisko N., Al-Maali G, Polishchuk O. The contents of ganoderic acids in mycelium of different <i>Ganoderma</i> species (Ganodermataceae) obtained by different methods of cultivation	14
Kyriachenko Y., Halenova T., Savchuk O. Analysis of garden snail (<i>Helix aspersa Muller</i>) mucus for the presence of potential effectors of hemostasis system	19
Beliayeva A., Garmanchuk L. Analysis of functional changes under using of candesartan cilexetil with resveratrol in animals	24
Matsapiak L. Rare phytoenofund of Verkhovynsky national natyre park and its analysis	27
Odykalets I., Tsumbaljuk D., Grigorchuk A. Morphological characteristics of Heifel saffron (<i>Crocus heuffelianus</i> Herb.) in the Podilsky Tovtry National Nature Park	34
Raksha N., Maievska T., Savchuk O. Obtaining peptides from aquatic organisms of the Antarctic region.....	38
Fedichkina R., Korkach Yu., Okhai I., Goshovska Yu., Sagach V. Effect of modulation of hydrogen sulfur and glutathione synthesis on oxidative and nitrosative metabolism under myocardial ischemia-reperfusion	43
Chernykh M., Zyma I. Peculiarities of information transfer within functional cortical networks during emotion-modified neutral face perceptation.....	48
Regeda L., Bisko N., Al-Maali G. Influence of <i>Pholiota</i> spp. (Strophariaceae, Basidiomycota) mycelial biomass on seed germination and seedlings growth of <i>Lepidium sativum</i> L. and <i>Cucumis sativus</i> L.....	53
Pastoschuk A., Kovalenko M., Skivka L. Antioxidant reactions in winter wheat seedlings of different cultivars, exposed to the <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> its lipopolysaccharides <i>in vitro</i>	61

Кафедра біології рослин

*Ювілей – це не свято старості,
ювілей – це зрілість життя!
Він дарує вам море радості безмежжя людського буття*

МУСІЄНКО МИКОЛА МИКОЛАЙОВИЧ
(до 80-річчя вченого)



Видатному вченому і педагогу, добре знаному в Україні і за її межами, провідному фахівцю в галузі фітофізіології, доктору біологічних наук, професору, академіку Національної академії аграрних наук, заслуженому діячу науки і техніки України, заслуженому професору Київського національного університету імені Тараса Шевченка Миколі Миколайовичу Мусієнко виповнилося 80 років від дня народження і 55 років наукової та педагогічної діяльності.

Народився Микола Миколайович 11 січня 1941 року в с. Смош, Прилуцького району, Чернігівської області в селянській родині й виховувався на кращих традиціях українського села. Після закінчення школи вступив до Сокиринського сільськогосподарського технікуму, отримав диплом із відзнакою за фахом "Агрономія" і вже з весни 1961 року почав працювати агрономом-економістом колгоспу імені Жданова в смт Куликівка, Чернігівської області. Далі він продовжує свою професійну освіту на заочному відділенні Української сільськогосподарської академії, а після закінчення двох курсів агрономічного факультету вступає до Київського державного університету імені Т. Г. Шевченка (КДУ), де в 1963–1968 рр. навчався на денному відділенні біологічного факультету.

Після успішного завершення навчання в університеті вступає до аспірантури кафедри фізіології рослин КДУ, яку закінчив успішним захистом кандидатської дисертації на тему "Сортовые особенности метаболизма и термоустойчивости озимой пшеницы" (1971 р.). Можна вважати, що 1971–1976 рр. були періодом становлення М. М. Мусієнка як педагога, у ці роки ним підготовлено й апробовано програми нових спецкурсів, навчально-методичні розробки певних розділів спецпрактикумів із фітофізіології. Водночас його залучають до науково-організаційної роботи. Із серпня 1972 року Микола Миколайович призначений на посаду заступника декана біологічного факультету КДУ. У жовтні 1976 року Мінвуз СРСР командує доцента М. М. Мусієнка в Республіку Куба, спочатку як консультанта Центру живлення цукрової тростини Гаванського університету, а пізніше, після реорганізації структури університету, він займає до 1979 року посаду радника. Микола Миколайович сформував наукову школу фітофізіологів у Гаванському університеті, яка стала науково-методичним центром не лише для Куби, а і для фахівців з інших країн Латинської Америки. За пропозицією радника М. М. Мусієнка, уперше на Кубі затверджено Спеціалізовану вчену раду для захисту дисертацій на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за фахом "фізіологія рослин" в інтернаціональному складі, куди ввійшли вчені різних країн світу. Співпраця М. М. Мусієнка з кубинськими колегами не припинилась із закінченням цього контракту і донині. Він продовжує координацію науково-дослідних робіт департаменту, проводить короткотермінові курси з підвищення кваліфікації викладачів для інших вузів Куби, організовує створення біотехнологічного центру Куби. З вересня 1979 року Микола Миколайович повертається в рідний університет і продовжує працювати доцентом кафедри фізіології рослин, заступником декана, деканом (1982–1985 рр.) біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 1985 року він захистив докторську дисертацію ("Жароустойчивость озимой пшеницы и её диагностика").

1990 року Микола Миколайович очолює кафедру фізіології рослин і створює при ній науково-дослідну лабораторію "Фізіологічні основи продуктивності і стійкості рослин". У нашій країні і далеко за її межами академіка М. М. Мусієнка знають як фундатора і керівника наукової школи "Фізіолого-біохімічні основи формування стійкості та продуктивності рослин у стресових умовах", затвердженої Міністерством науки України 1996 року, як керівника спільних науково-дослідних проєктів з ученими Республіки Куба, Польщі, Бельгії, Швейцарії, США, Канади.

Микола Миколайович підготував понад 30 кандидатів і докторів наук, які успішно розвивають дослідження в галузі екологічної фітофізіології, продовжує керувати аспірантами й докторантами.

Учений завжди прагнув до інтеграції в міжнародні наукові організації. З перших років незалежності України з власної ініціативи провів роботу щодо вступу Українського Товариства Фізіологів Рослин до Європейської Асоціації фізіологів рослин (FESPP), а з 1992 року впродовж 8–11 Конгресів FESPP працював у цій міжнародній організації, як національний делегат від фізіологів рослин України.

Професор М. М. Мусієнко добре розумів, що для розв'язання актуальних проблем екології потрібні кваліфіковані кадри. Тому він обґрунтував відкриття спеціалізації з екології рослин у Київському університеті, підготував і видав перший на теренах країн СНД підручник "Екологія рослин" – К., Либідь, 2006, 428 с. За пропозицією Миколи Миколайовича, рішенням ученої ради Київського університету імені Т. Г. Шевченка 1995 року очолювану ним кафедру перейменовують на кафедру фізіології та екології рослин. Уперше за його пропозицією в Київському університеті відкрито аспірантуру за фахом 03.00.16–"Екологія".

Микола Миколайович підготував перший в Україні навчально-методичний комплекс із фізіології рослин, куди ввійшли підручники: "Корневое питание растений" (1989), "Фізіологія рослин" (1995), "Фотосинтез" (1995), "Фізіологія рослин. Практикум" (1995), які були затверджені Міністерством освіти для всіх вузів України, де вивчається нормативний курс "Фізіологія рослин". Цю роботу відзначено Премією Тараса Шевченка Київського національного університету (1998). Свій багатий педагогічний досвід він узагальнив у майже 30 підручниках, навчальних посібниках із грифом МОН України, рекомендованих для всіх вузів і загальноосвітніх закладів, де вивчають нормативні та спеціальні дисципліни з біології, екології, фітофізіології.

Професійні успіхи М. М. Мусієнка в науково–педагогічній діяльності відзначено науковою громадськістю та державою: золота і срібні медалі ВДНГ СРСР (1984, 1986), почесна відзнака "Відмінник народної освіти" МО України (1986), нагорода Ярослава Мудрого АН ВШ України (1995); міжнародне звання "Соросівський професор" (1996); Лауреат премії імені Тараса Шевченка Київського національного університету (1998), премії Президії НАН України імені М. Г. Холодного (1999), заслужений діяч науки і техніки України (2000), заслужений професор Київського національного університету імені Тараса Шевченка" (2008).

Щасливі його учні, бо знають, що завжди знайдуть розуміння, дружню підтримку, конструктивні поради свого Вчителя, постійне спілкування з яким породжує натхнення, інтелектуально збагачує. Усі, хто знає Миколу Миколайовича Мусієнка, бажають йому сили і наснаги, великого щастя ще багато років бачити, як праця розуму, серця й рук іде на добро рідній Україні. Щиро вітають ювіляра, бажають міцного здоров'я, творчого довголіття й успіхів у науково-педагогічній діяльності.



УДК 611. 81
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.8–13

Л. Березовчук, канд. біол. наук, М. Макарчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МАРГАНЦЕВА ЕНЦЕФАЛОПАТІЯ І МІЖПІВКУЛЕВА АСИМЕТРІЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Хворі, які страждають на марганцеву енцефалопатію, що розвивається на фоні приймання сурогатних наркотиків, страждають вираженим підкірковим псевдобульбарним синдромом, пірамідною недостатністю і комплексом вегетативних порушень. Найбільш вираженими з них є порушення рухових функцій. Робота присвячена вивченню біоелектричної активності головного мозку у хворих із марганцевою енцефалопатією з метою розроблення ЕЕГ-критерію діагностики такого захворювання. Обстежуваним проведено запис ЕЕГ із використанням 16-канального електроенцефалографа "NeuroCom standart" (ХАІ-Медика, Україна) відповідно до міжнародної системи запису "10-20". Аналізувалися потужності сигналів основних ритмів фонових ЕЕГ, відносні показники потужності сигналів основних ритмів ЕЕГ, зокрема коефіцієнт активації кори, коефіцієнт активації підкірки, показники міжпівкулевих асиметрій, за потужністю біоелектричних сигналів у білатерально-синхронних точках голови. Установлено, що у хворих із марганцевою енцефалопатією коефіцієнти активації кори і коефіцієнти активації підкірки мали значення, які можуть спостерігатися у хворих з іншими захворюваннями. У свою чергу, міжпівкулева асиметрія за потужністю сигналів окремих ритмів і міжпівкулева асиметрія за сумарною потужністю сигналів у білатерально-синхронних точках голови у хворих із марганцевою енцефалопатією мали значення, що суттєво відрізнялися від таких у хворих з іншими видами патології. Так, при показниках 16–18 міжпівкулевих асиметрій у здорових людей і 9–25 міжпівкулевих асиметрій у хворих у комі, у хворих із марганцевою енцефалопатією спостерігалася: в одного хворого – 12 міжпівкулевих асиметрій, у решти хворих – 9, 7, 3 і 2 міжпівкулевих асиметрій за потужністю сигналів окремих ритмів у білатерально-синхронних точках голови. Причиною такої вираженої згладженості міжпівкулевих асиметрій у хворих із марганцевою енцефалопатією, очевидно, можуть бути ті деструктивні зміни в підкіркових відділах ГМ, які є у вказаній групі пацієнтів.

Ключові слова: марганцева енцефалопатія, міжпівкулева асиметрія, біоелектрична буферна система головного мозку.

Вступ. У статті "About bioelectric buffer system of the brain" [1] розглядалося питання міжпівкулевої асиметрії за потужністю біоелектричного сигналу в білатерально-синхронних точках голови. Проведені дослідження показали, що у нормальної здорової людини у стані неспання у спокої на фоновій ЕЕГ може спостерігатися від 16 до 18 значущих (різниця у значеннях більш ніж в 1,4 рази) міжпівкулевих асиметрій за потужністю сигналів окремих ритмів. Також установлено, що при зміненому функціональному стані головного мозку (наприклад, у комі), кількість значущих міжпівкулевих асиметрій за потужністю сигналів окремих ритмів може як значно знижуватися (до 9), так і збільшуватися (до 25). Установлено, що міжпівкулеві асиметрії за потужністю сигналів окремих ритмів не завжди простежуються під час аналізу міжпівкулевих асиметрій за потужністю сумарного біоелектричного сигналу в білатерально-синхронних точках голови. Механізми, які спрямовані на компенсацію міжпівкулевих асиметрій окремих ритмів і здійснюють згладжування або урівноваження асиметрій сумарних потужностей біоелектричних сигналів у білатерально-синхронних точках голови, були названі "біоелектричною буферною системою мозку" (БеБСМ) [1].

Хворі з марганцевою енцефалопатією, що розвивається на тлі приймання сурогатних наркотиків [3, 6, 8, 9], страждають вираженим підкірковим псевдобульбарним синдромом, пірамідною недостатністю і комплексом вегетативних порушень [4, 5, 7]. Оскільки деструктивні пору-

шення за такої патології спостерігаються в підкіркових відділах головного мозку (ГМ), зміни на фоновій ЕЕГ можуть бути слабо виражені або зовсім відсутні.

З використанням зазначеного показника БеБСМ, а також додаткових діагностичних критеріїв оцінювання функціонального стану (ФС) ГМ людини – коефіцієнта активації кори (КАК) і коефіцієнта активації підкірки (КАП) [2], проведено аналіз ФС ГМ у групі хворих із діагнозом "марганцева енцефалопатія" (МЕП).

Мета роботи. Розроблення ЕЕГ-критерію діагностики марганцевої енцефалопатії з використанням додаткових методів аналізу даних ЕЕГ.

Матеріали та методи. Було обстежено 5 хворих із діагнозом "марганцева енцефалопатія", чоловіки віком від 36 до 43 років (середній вік 39 років). Хворі були інвалідами 2-ї (4 чоловіки) і 1-ї (1 чоловік) груп і мали виражені порушення рухових функцій верхніх і нижніх кінцівок. Хворим було проведено дослідження ФС ГМ методом ЕЕГ за допомогою 16-канального електроенцефалографа "NeuroCom standart" (ХАІ-Медика, Україна) відповідно до міжнародної системи запису "10-20". Під час дослідження обстежувани знаходилися в темному екранованому приміщенні в сидячому положенні із закритими очима. Були проаналізовані потужності сигналів основних ритмів фонових ЕЕГ, показники КАК, КАП та БеБСМ. Епоха аналізу – одна хвилина.

Результати та обговорення. Результати проведеного дослідження такі: у двох обстежуваних на фоновій ЕЕГ переважала бета-активність (рис. 1), у двох – альфа-активність (рис. 2, 3).

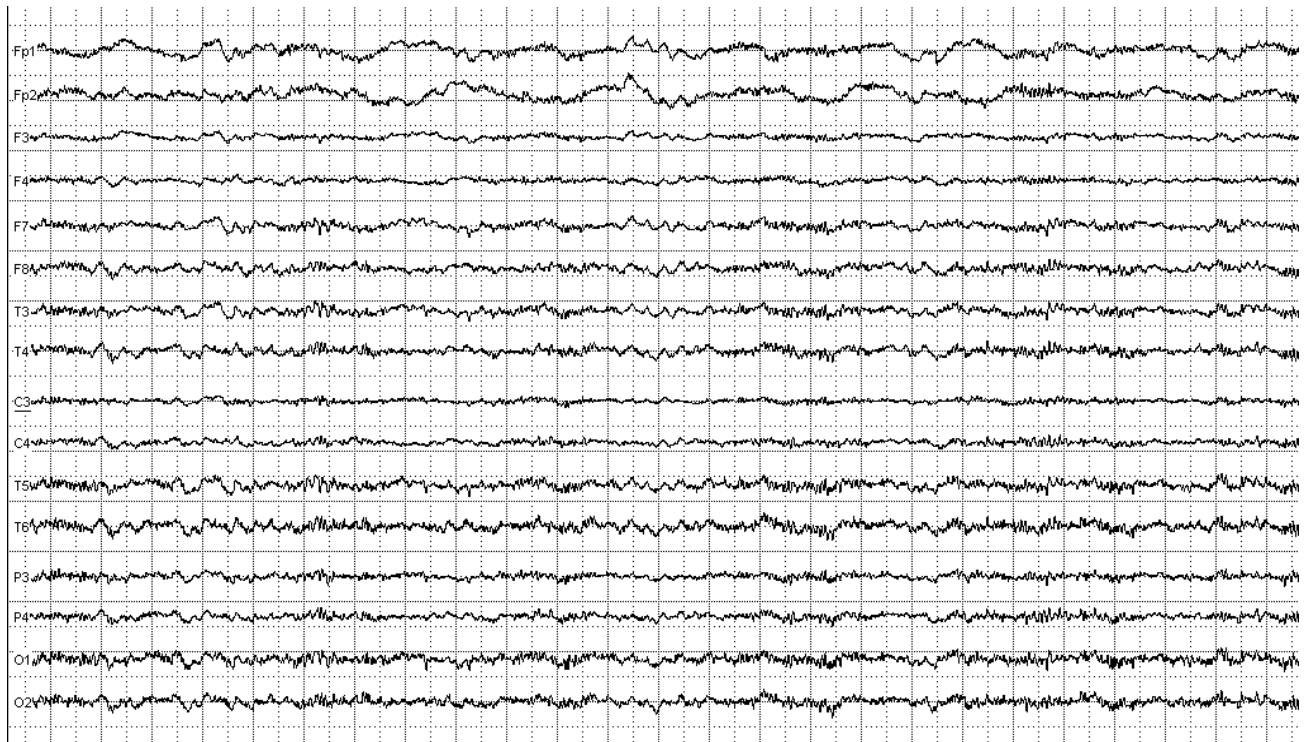


Рис. 1. Фонова ЕЕГ хворого В. В., чол., 43 роки

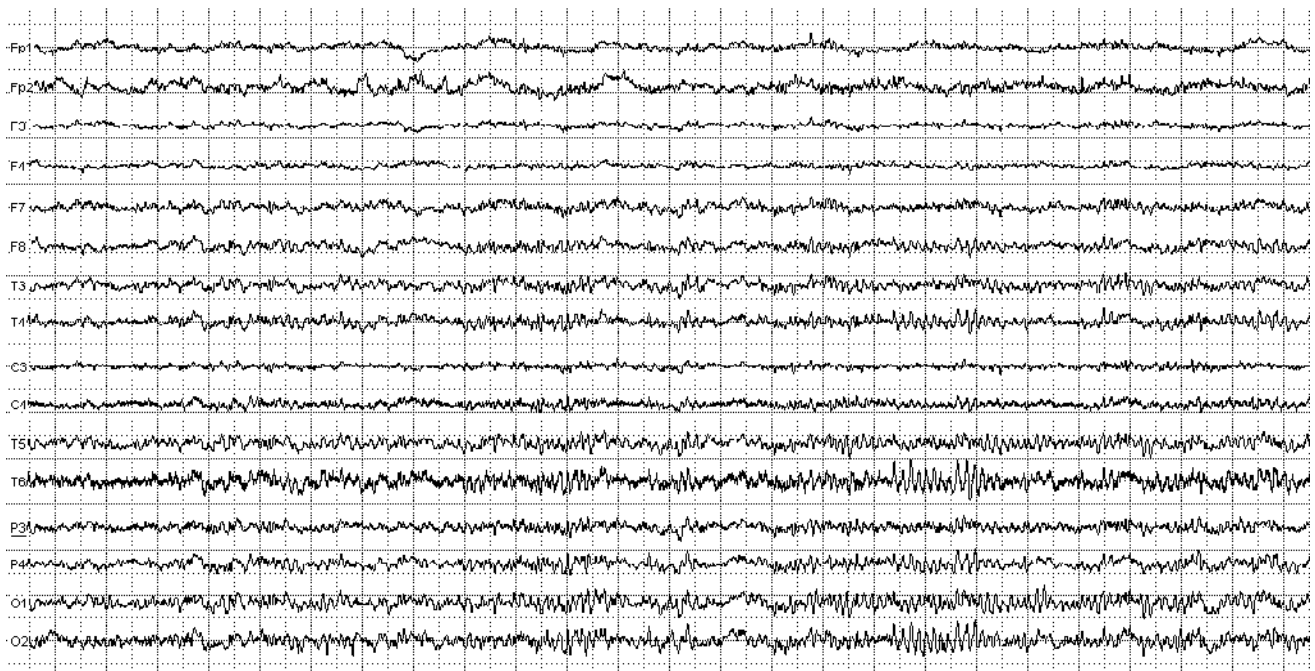


Рис. 2. Фонова ЕЕГ хворого В. П., чол., 37 років

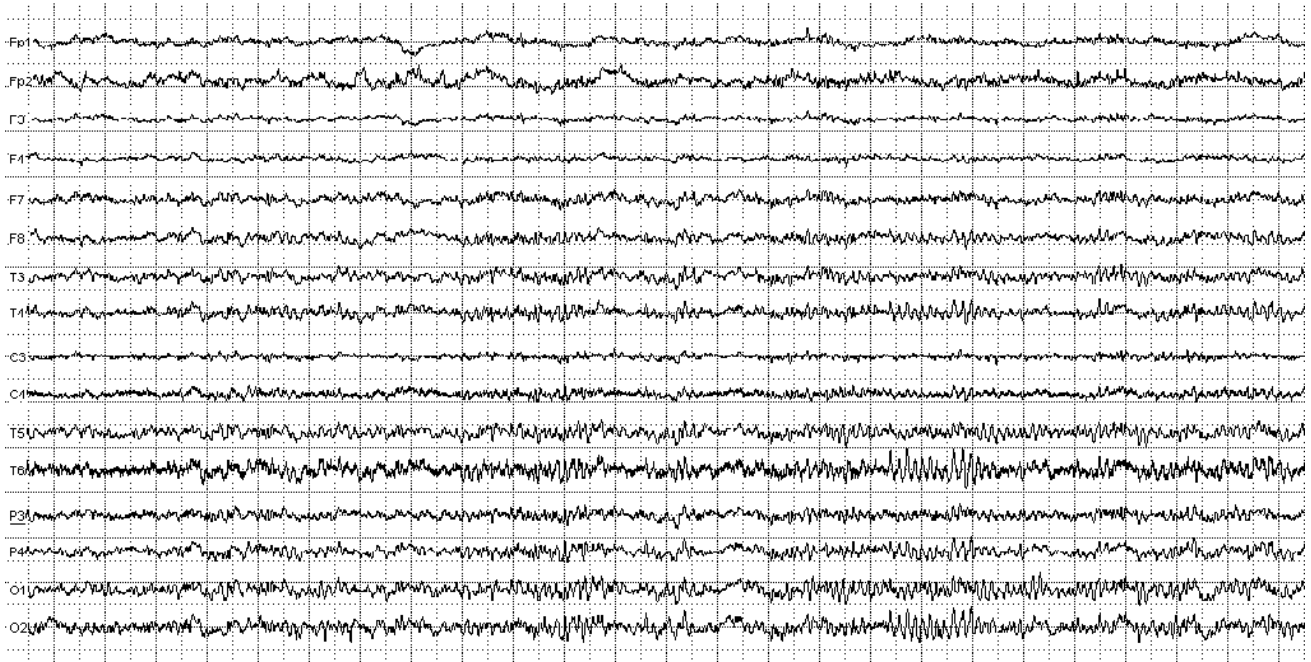


Рис. 3. Фонова ЕЕГ хворого Х. А., чол., 38 років

У одного хворого реєструвалася бездомінантна активність із вираженими зональними відмінностями (переважаням бета-активності в передніх відділах головного мозку й альфа-активності в тім'яно-потиличних відділах головного мозку) (рис. 4).

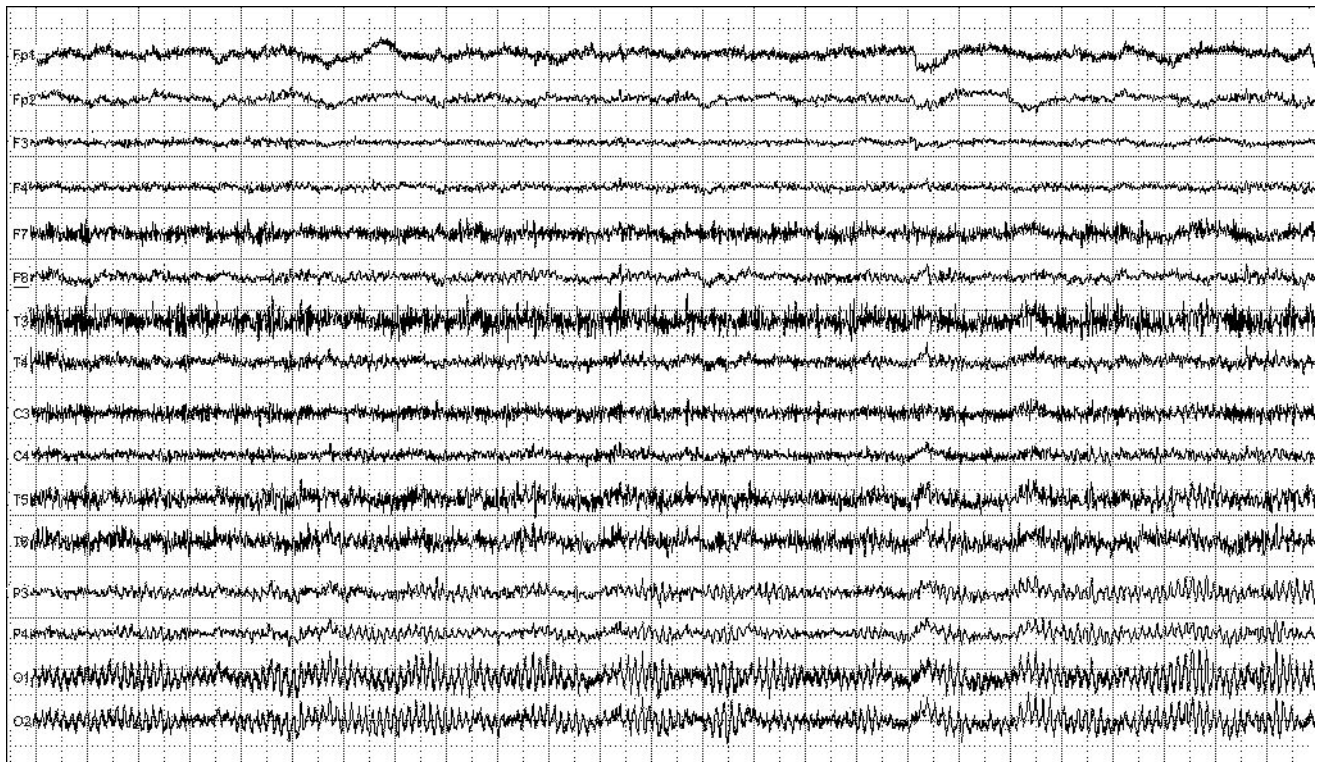


Рис. 4. Фонова ЕЕГ хворого С. І., чол., 36 років

Показники КАК у хворих із цією патологією мали значення і більше 1, і менше 1 залежно від ступеня вираженості альфа- або бета-ритму, і були в межах норми.

Показники КАП у всіх обстежуваних цієї групи в усіх відведених мали значення менше 1. Це свідчить про те, що у цих хворих на фоновій ЕЕГ дельта-активність переважає за потужністю сигналів тета-активності, що є показ-

ником погіршеного ФС ГМ. Однак КАП не є головним критерієм під час оцінювання ФС ГМ людини у стані неспання, і значення менше 1 можуть спостерігатися у хворих із різною патологією. Співвідношення сумарної потужності сигналів швидких ритмів (бета + альфа) до повільних ритмів (тета + дельта) є найважливішим критерієм для оцінювання ФС ГМ у людей у стані неспання. У вказаній групі обстежуваних переважає потужність сигналів

швидких ритмів над повільними спостерігалось у двох хворих у 9 відведеннях із 16, у одного хворого у 8 відведеннях і у одного хворого в 6 відведеннях. У одного хворого у всіх відведеннях переважала потужність сигналів повільних ритмів над потужністю сигналів швидких ритмів. Це свідчить про наявність у хворих цієї категорії ознак гіпоксії різного ступеня вираженості. Такі ознаки гіпоксії спостерігають при великій кількості патологічних станів і вони не можуть бути характерними ЕЕГ-ознаками саме марганцевої енцефалопатії.

У ході вивчення питання про міжпівкулеву асиметрію (МПА) головного мозку за потужністю сигналів окремих ритмів у білатерально-синхронних точках голови встановлено, що у здорових людей із нормальним ФС ГМ у стані неспання у спокої на фоновій ЕЕГ реєструється від 16 до 18 МПА за потужністю сигналів окремих ритмів [1]. У вкрай важкому стані, у хворих в комі, на фоновій ЕЕГ реєструється від 9 до 25 МПА за потужністю сигналів окремих ритмів. Це свідчить "про значну нестабільність ФС ГМ у цієї категорії хворих, що проявляється як у значному зниженні, так і в значному підвищенні функціональної лабільності ЦНС" [2].

Результати аналізу МПА мозку за потужністю сигналів окремих ритмів у білатерально-синхронних точках у групі хворих з МЕР були такими. У хворого С. І. спостерігалось 12 МПА, у хворого Ж. А. – 9 МПА, що відповідає найменшому числу асиметрій, що спостерігається у хворих у комі. У хворого В. П. спостерігалось 7 МПА, і у хворих Х. А. і В. В. – по 3 і 2 МПА відповідно.

Показники БеБСМ у хворих з МЕР мали такі значення: в обстежуваного С. І. = 12:1 (табл. 1), в обстежуваного Ж. А. = 9:2 = 4,5:1, в обстежуваного В. П. = 7:2 = 3,5:1 (табл. 2), в обстежуваного Х. А. = 2:0 (табл. 3), в обстежуваного В. В. = 3:0 (табл. 4).

Показник БеБСМ 12:1 можна розцінювати як дуже хороший, позаяк із 12 міжпівкулевих асиметрій за потужністю сигналів окремих ритмів, у ході аналізу міжпівкулевих асиметрій за сумарною потужністю сигналу в білатерально-синхронних точках голови, залишилася тільки одна. Показник БеБСМ 4,5:1 є показником слабо вираженої БеБСМ.

Таблиця 1. Значення потужності сигналів основних ритмів ЕЕГ, показники КАК, КАП і МПА за потужністю сигналів окремих ритмів і за сумарною потужністю сигналу в білатерально-синхронних точках голови у обстежуваного С. І.

Відведення	β , мкВ ²	МПА по β	α , мкВ ²	МПА по α	θ , мкВ ²	МПА по θ	δ , мкВ ²	МПА по δ	КАП θ/δ	$\beta+\alpha/\theta+\delta$	МПА по Σp	КАК β/α
Fp1	47		27		45		449		0,10	0,15		1,73
Fp2	43	1,09	26	1,04	36	1,25	302	1,5	0,12	0,21	1,39	1,62
F3	24		8		9		54		0,18	0,51		2,76
F4	33	1,37	14	1,8	10	1,11	46	1,17	0,22	0,84	1,07	2,27
F7	200		33		19		96		0,20	2,01		6,03
F8	58	3,5	36	1,09	24	1,26	146	1,5	0,17	0,55	1,35	1,64
T3	511		78		28		140		0,20	3,49		6,51
T4	118	4,3	47	1,7	29	1,03	205	1,5	0,14	0,70	1,9	2,5
C3	183		32		13		64		0,21	2,76		5,64
C4	100	1,8	29	1,1	16	1,23	97	1,5	0,16	1,14	1,21	3,44
T5	316		149		36		241		0,15	1,68		2,12
T6	215	1,5	90	1,7	38	1,06	249	1,03	0,16	1,06	1,25	2,39
P3	81		170		25		180		0,14	1,23		0,48
P4	56	1,5	133	1,28	26	1,04	209	1,16	0,13	0,80	1,08	0,42
O1	75		575		35		256		0,14	2,23		0,13
O2	103	1,37	561	1,02	47	1,34	351	1,37	0,14	1,66	1,13	0,18

Примітки. 1) Σp – сумарна потужність сигналу; 2) цифри, які виділено жирним шрифтом, відповідають значущим МПА; 3) показники КАК та КАП, які мають значення більше одиниці, виділено жирним шрифтом.

Таблиця 2. Значення потужності сигналів основних ритмів ЕЕГ, показники КАК, КАП і МПА за потужністю сигналів окремих ритмів і за сумарною потужністю сигналу в білатерально-синхронних точках голови в обстежуваного В. П.

Відведення	β , мкВ ²	МПА по β	α , мкВ ²	МПА по α	θ , мкВ ²	МПА по θ	δ , мкВ ²	МПА по δ	КАП θ/δ	$\beta+\alpha/\theta+\delta$	МПА по Σp	КАК β/α
Fp1	38		59		46		275		0,17	0,30		0,63
Fp2	104	2,78	81	1,35	94	2,09	360	1,31	0,26	0,41	1,53	1,29
F3	19		27		22		66		0,34	0,52		0,72
F4	17	1,18	21	1,3	20	1,1	51	1,29	0,39	0,53	1,24	0,81
F7	62		132		67		182		0,37	0,78		0,47
F8	50	1,22	112	1,19	56	1,22	135	1,35	0,41	0,85	1,25	0,45
T3	91		249		91		149		0,61	1,42		0,37
T4	79	1,15	235	1,06	83	1,09	147	1,02	0,57	1,36	1,07	0,34
C3	31		41		31		40		0,77	1,01		0,74
C4	42	1,36	66	1,6	41	1,32	69	1,7	0,60	0,99	1,52	0,63
T5	120		380		126		194		0,65	1,56		0,31
T6	134	1,12	479	1,25	157	1,23	349	1,79	0,45	1,21	1,36	0,28
P3	80		149		70		103		0,68	1,33		0,54
P4	96	1,21	231	1,55	81	1,16	146	1,43	0,55	1,44	1,38	0,42
O1	157		576		159		233		0,69	1,87		0,27
O2	174	1,11	609	1,06	179	1,12	260	1,12	0,69	1,78	1,08	0,29

Примітки такі, як до табл. 1.

Таблиця 3. Значення потужності сигналів основних ритмів ЕЕГ, показники КАК, КАП і МПА за потужністю сигналів окремих ритмів і за сумарною потужністю сигналу в білатерально-синхронних точках голови у обстежуваного Х. А.

Відведення	β , мкВ ²	МПА по β	α , мкВ ²	МПА по α	θ , мкВ ²	МПА по θ	δ , мкВ ²	МПА по δ	КАП θ/δ	$\beta + \alpha/\theta + \delta$	МПА по Σp	КАК β/α
Fp1	40		84		96		514		0,19	0,20		0,48
Fp2	43	1,05	82	1,01	97	1,01	353	1,45	0,28	0,28	1,28	0,52
F3	23		36		38		51		0,76	0,65		0,64
F4	21	1,04	40	1,11	33	1,15	44	1,16	0,76	0,79	1,06	0,53
F7	93		109		99		142		0,70	0,84		0,85
F8	53	1,76	112	1,02	102	1,03	156	1,09	0,66	0,64	1,05	0,47
T3	65		201		122		159		0,76	0,95		0,32
T4	65	1,01	181	1,12	121	1,01	203	1,27	0,60	0,76	1,04	0,36
C3	36		130		63		79		0,79	1,17		0,28
C4	38	1,06	140	1,08	62	1,02	95	1,19	0,65	1,14	1,09	0,27
T5	119		564		186		229		0,81	1,65		0,21
T6	90	1,31	444	1,27	179	1,04	223	1,03	0,80	1,33	1,17	0,2
P3	76		633		139		181		0,77	2,21		0,12
P4	63	1,19	515	1,23	114	1,22	167	1,08	0,68	2,06	1,2	0,12
O1	151		1648		260		388		0,67	2,77		0,09
O2	123	1,22	1509	1,09	258	1,01	331	1,17	0,78	2,77	1,1	0,08

Примітки такі, як до табл. 1.

Але сам факт невеликої кількості міжпівкулевих асиметрій за потужністю сигналів окремих ритмів у цієї категорії хворих і такі показники БеБСМ як 3:0 і 2:0, дають підставу припустити, що у хворих із МЕР не просто виражена біоелектрична буферна система мозку, а взагалі

спостерігається значне зниження міжпівкулевих асиметрій за генерацією біоелектричних сигналів у білатерально-синхронних точках голови.

Таблиця 4. Значення потужності сигналів основних ритмів ЕЕГ, показники КАК, КАП та МПА за потужністю сигналів окремих ритмів і за сумарною потужністю сигналу в білатерально-синхронних точках голови у обстежуваного В. В.

Відведення	β , мкВ ²	МПА по β	α , мкВ ²	МПА по α	θ , мкВ ²	МПА по θ	δ , мкВ ²	МПА по δ	КАП θ/δ	$\beta + \alpha/\theta + \delta$	МПА по Σp	КАК β/α
Fp1	41		21		75		707		0,11	0,08		1,95
Fp2	39	1,02	16	1,31	55	1,37	664	1,06	0,08	0,08	1,1	2,39
F3	13		6		20		76		0,26	0,20		2,26
F4	16	1,15	7	1,4	18	1,11	56	1,37	0,32	0,31	1,2	2,24
F7	33		19		53		163		0,33	0,24		1,71
F8	39	1,18	19	1,05	49	1,1	159	1,02	0,31	0,28	1	2,08
T3	43		24		58		234		0,25	0,23		1,76
T4	49	1,14	24	1,14	59	1,01	188	1,24	0,31	0,29	1,1	2,02
C3	17		8		15		47		0,32	0,39		2,06
C4	24	1,4	12	1,37	21	1,33	56	1,17	0,38	0,46	1,3	2,03
T5	65		33		70		330		0,21	0,25		2
T6	64	1,03	30	1,06	78	1,13	234	1,41	0,33	0,30	1,2	2,12
P3	39		18		30		95		0,31	0,45		2,15
P4	37	1,02	18	1,05	34	1,17	101	1,05	0,34	0,41	1	2,05
O1	83		36		58		191		0,30	0,48		2,29
O2	65	1,27	32	1,16	71	1,22	222	1,16	0,32	0,33	1,1	2,05

Примітки такі, як до табл. 1.

Причиною такої згладженості МПА, можливо, є саме ті дегенеративні процеси в підкіркових структурах ГМ, на які страждають ці хворі.

Висновки. Можна припустити, що виражена згладженість міжпівкулевих асиметрій за генерацією біоелектричних сигналів у білатерально-синхронних точках голови є діагностичним ЕЕГ-критерієм дегенеративних змін підкіркових структур мозку, у цьому випадку – марганцевої енцефалопатії.

Список використаної літератури

1. Berezovchuk L. About bioelectric buffer system of the brain / L. Berezovchuk, M. Makarchuk // Klinichna khirurgiia. – 2020 July / August; 87(7-8):53-57, doi: 10.26779/2522-1396.2020.7-8.53

2. Березовчук Л. В. Коэффициент активации подкорковых структур мозга при коматозном состоянии // Л. В. Березовчук // Журн. Клінічна хірургія. – 2012. – № 6. – С. 35–39.

3. Волошина Н. П. Злоупотребление эфедриноподобными психостимуляторами и применение препарата нимотоп для его коррекции / Н. П. Волошина, И. Л. Левченко, И. В. Богданова // Журн. неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова. – 2004. – Т. 104, № 12. – С. 51–55.

4. Клинические проявления марганцевой токсической энцефалопатии / Н. В. Федорова, Л. М. Савченко, Т. Ф. Исмаилова и др. // Экстремальные захворования та вік: II Укр. симпозиум. – К.: ІВЦ АЛКОН, 2004. – С. 67–68.

5. Марганцевая токсическая энцефалопатия: патогенез, клиника, лечение / В. А. Яворская, О. Л. Плеханова, А. В. Гребенков, С. А. Кривчун // Международный невролог. журн. – 2005. – Т. 11, № 4 – С. 52–55.

6. Manganese Encephalopathy among Ephedron Abusers: Case Reports / Justyna Janocha Litwin, Katarzyna Marianska, Sylwia Serafinska, Krzysztof Simon // NeuroImagie. – Vol. 25, Issue 5. September / October 2015. – P. 832–835, doi.org/10.1111/jon.12173.

7. Manganese Encephalopathy: An Under-Recognized Condition in the Intensive Care Unit / Julio A. Chalela, Leo Bonilha, Ron Neyens, Angela Hays // Springer 2011. Jun. 14(3):456-8, doi: 10.1007/s12028-010-9476-5. PMID: 21174173
8. Rajoriya Neil. Implications of Manganese in Chronic Acquired Hepatocerebral Degeneration / Neil Rajoriya, Mayur Brahma, Jordan J. Feld // Annals of Hepatology. – Vol. 18, Issue 1. – P. 274–278 (January – February 2019), doi: 10.5604/01.3001.0012.7938
9. Interaction of Manganese and Ammonia in the Brain of Hepatic Encephalopathy Rats / J. Lu, Y. Li, C. Zhang et al. // Hepatitis Monthly 2020; 20(8): e102208, doi: 10.5812/hepatmon.102208.

Reference (Scopus)

1. L. Berezovchuk, M. Makarchuk About bioelectric buffer system of the brain // Klinichna khirurgiia. 2020 July/August; 87(7-8):53-57. DOI: 10.26779/2522-1396.2020.7-8.53
2. L.V. Berezovchuk. Coefficient of activation of the brain subcortex structures in a comatose state // Klinichna khirurgiia. 2012; 6:35-39
3. Voloshina N.P., Levchenko I.L., Bogdanova I.V. Abuse of ephedrine-like psychostimulants and the use of the drug nimotop for its correction // S.S. Korsakov Jour. of neurol. and psychiatry. 2004;104 (12): 51–55.
4. Fedorova N.V., Savchenko L.M., Ismailova T.F. and other Clinical manifestations of manganese toxic encephalopathy // Extrapyramidni morbidity and mortality: II Ukr. symposium. K.: IVTS ALKON, 2004; 67-68.

5. Yavorskaya V.A., Plekhanova O.L., Grebenyuk A.V., Krivchun S.A. Manganese toxic encephalopathy: pathogenesis, clinical picture, treatment. // International Neurological Journal. 2005;11(4):52-55.
6. Justyna Janocha Litwin, Katarzyna Marianska, Sylwia Serafinska, Krzysztof Simon. Manganese Encephalopathy among Ephedron Abusers: Case Reports. // Neuro Imagine. September/October. 2015; 25 (5): 832-835. https://doi.org/10.1111/jon.12173.
7. Julio A. Chalela, Leo Bonilha, Ron Neyens, Angela Hays. Manganese Encephalopathy: An Under-Recognized Condition in the Intensive Care Unit // Springer. 2011 Jun;14(3):456-8, doi: 10.1007/s12028-010-9476-5. PMID: 21174173
8. Neil Rajoriya, Mayur Brahma, Jordan J. Feld. Implications of Manganese in Chronic Acquired Hepatocerebral Degeneration // Annals of Hepatology. 2019;18 (1): 274-278, DOI: 10.5604/01.3001.0012.7938.
9. Lu J, Li Y, Zhang C, Yang X, Qiang J W. Interaction of Manganese and Ammonia in the Brain of Hepatic Encephalopathy Rats // Hepatitis Monthly 2020; 20(8):e102208. doi: 10.5812/hepatmon.102208.

Надійшла до редколегії 04.01.2021
Отримано виправлений варіант 01.02.2021
Підписано до друку 01.02.2021

Received in the editorial 04.01.2021
Received a revised version on 01.02.2021
Signed in the press on 01.02.2021

Л. Березовчук, канд. биол. наук, Н. Макачук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

МАРГАНЦЕВАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ И МЕЖПОЛУШАРНАЯ АСИММЕТРИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Больные, страдающие марганцевой энцефалопатией, которая развивается на фоне приема суррогатных наркотиков, страдают выраженным подкорковым псевдобульбарным синдромом, пирамидной недостаточностью и комплексом вегетативных нарушений. Наиболее выражены из них нарушения двигательных функций. Работа посвящена изучению биоэлектрической активности головного мозга больных с марганцевой энцефалопатией с целью разработки ЭЭГ-критерия диагностики данного заболевания. Обследуемым была проведена запись ЭЭГ с использованием 16-канального электроэнцефалографа "NeuroCom standart" (ХАИ-Медика, Украина) в соответствии с международной системой записи "10-20". Анализировались мощности сигналов основных ритмов фоновых ЭЭГ, относительные характеристики мощности сигналов основных ритмов ЭЭГ, в том числе коэффициент активации коры, коэффициент активации подкорки, показатели межполушарных асимметрий по мощности биоэлектрических сигналов в билатерально-синхронных точках головы. Было установлено, что у больных с марганцевой энцефалопатией и коэффициенты активации коры, и коэффициенты активации подкорки имели значения, которые могут наблюдаться у больных с другими заболеваниями. В свою очередь, такие показатели, как межполушарная асимметрия по мощности сигналов отдельных ритмов и межполушарная асимметрия по суммарной мощности сигналов в билатерально-синхронных точках головы у больных с марганцевой энцефалопатией имели значения, которые значительно отличались от таковых у больных с другими видами патологии. Так, при показателях 16–18 межполушарных асимметрий у здоровых людей и 9–25 у больных в коме, у больных с марганцевой энцефалопатией наблюдалось: у одного больного – 12 межполушарных асимметрий, у остальных больных – 9, 7, 3 и 2 межполушарных асимметрий по мощности сигналов отдельных ритмов в билатерально-синхронных точках головы. Причиной такой выраженной сглаженности межполушарных асимметрий у больных с марганцевой энцефалопатией, очевидно, могут быть те деструктивные изменения в подкорковых отделах ГМ, которые имеются у данной группы пациентов.

Ключевые слова: марганцевая энцефалопатия, межполушарная асимметрия, биоэлектрическая буферная система головного мозга.

L. Berezovchuk, PhD, M. Makarchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MANGANESE ENCEPHALOPATHY AND INTERHEMISPHERIC ASYMMETRY OF THE BRRAIN

Patients suffering from manganese encephalopathy, which develops while taking surrogate drugs, suffer from pronounced subcortical pseudobulbar syndrome, pyramidal insufficiency and a complex of autonomic disorders. The most pronounced of them are disorders of motor functions. The work is devoted to the study of the bioelectrical activity of the brain of patients with manganese encephalopathy in order to develop an EEG-criterion for diagnosing this disease. The subjects underwent EEG recording using a 16-channel electroencephalograph "NeuroCom standart" (KhAI-Medika, Ukraine) in accordance with the international recording system "10-20". The following were analyzed: the power of the signals of the main rhythms of the background EEG, the relative characteristics of the power of the signals of the main EEG rhythms – the activation coefficient of the cortex, the activation coefficient of the sub cortex, the indices of interhemispheric asymmetries in terms of the power of bioelectric signals in bilaterally synchronous points of the head. It was found that in patients with manganese encephalopathy both the cortical activation coefficients and the sub cortex activation coefficients had values that can be observed in patients with another diseases. In turn, such indicators as interhemispheric asymmetry in the power of signals of individual rhythms and interhemispheric asymmetry in the total power of signals at bilaterally synchronous points of the head in patients with manganese encephalopathy had values that significantly differed from those in patients with other types of pathology. So, with indicators of 16-18 interhemispheric asymmetries in healthy people and 9-25 in patients in coma, in patients with manganese encephalopathy, it was observed: in one patient – 12 interhemispheric asymmetries, in the other of the patients – 9, 7, 3 and 2 interhemispheric asymmetries in signal power of individual rhythms at bilaterally synchronous points of the head. The reason for such a pronounced smoothing of interhemispheric asymmetries in patients with manganese encephalopathy, obviously, may be those destructive changes in the subcortical parts of the GM that are present in this group of patients.

Keywords: manganese encephalopathy, interhemispheric asymmetry, bioelectrical buffer system of the brain.

УДК 582.284.5 : 579.222

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.14-18

D. Boromenskyi, PhD Student, N. Bisko, Dr Hab., G. Al-Maali, PhD, O. Polishchuk, PhD
M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE CONTENTS OF GANODERIC ACIDS IN MYCELIUM OF DIFFERENT *GANODERMA* SPECIES (GANODERMATACEAE) OBTAINED BY DIFFERENT METHODS OF CULTIVATION

The effect of different cultivation methods on the content of ganoderic acids of 7 species, 10 strains of the Ganoderma genus (Ganoderma applanatum 1899; Ganoderma carnosum 2502; Ganoderma lucidum 1904; Ganoderma resinaceum 2477, 2503; Ganoderma sinense 2516; Ganoderma tsugae 1848, 2024, 2566, Ganoderma oregonense 2560) genus fungi from the IBK Mushroom Culture Collection M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine was investigated. It has been shown that the submerged cultivation method is more efficient for the accumulation of ganoderic acids for five strains. In the mycelium of the strain G. sinense 2516 was the highest content of ganoderic acids – 25.2 ± 1.5 mg / g. The productivity (yield) of ganoderic acids synthesis is much higher with using the submerged culture cultivation method for mycelium of all used species and strains since the use of this method provides the accumulation of much more biomass in comparison with the static liquid cultivation method. The highest yield amount of ganoderic acids was in the mycelium of the G. tsugae 2024 and G. tsugae 2566 species, namely: 0.35 ± 0.019 and 0.36 ± 0.028 g / l. It was proved that the modified extraction method significantly reduces the extraction time of ganoderic acids. Extraction time is reduced from 14 to 2 days. For the G. sinense 2516 and G. tsugae 2024 strains was determined content of the ganoderic acids and their yield in dynamics of grows in the submerged culture on 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 day of cultivation. The highest amount of the ganoderic acids content was accumulated by the mycelium of the strain G. sinense 2516 – it was 26.4 ± 1.5 mg / g on the 14th day of cultivation. The highest yield of the ganoderic acids was in G. sinense 2516 on 14th day, and G. tsugae 2024 mycelium on the 16th day of cultivation with the next numbers 0.6 ± 0.031 , 0.62 ± 0.033 and 0.62 ± 0.027 g/l.

Keywords: *Ganoderma*, ganoderic acids, submerged cultivation, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma sinense*.

Introduction. *Ganoderma* P. Karst. is a genus of polypore fungi, growing on different types of both conifers and deciduous trees. Species of *Ganoderma* are well-known for their medicinal effects, and in Asian countries they have been used in traditional medicine for over 2000 years [1]. It was discovered that not only fruit bodies, but also mycelium of fungi of this genus contain biologically active compounds [2]. Among them are polysaccharides, proteins, amino acids, cytokines and more than 150 different triterpenoids, including ganoderic acids [3, 4, 5]. According to the PubChem database, there are currently over 60 types of ganoderic acids [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov]. Ganoderic acids show antitumor, antiviral (including HIV), anti-inflammatory, antihistamine activity [6, 7]. Such properties make these substances promising for medical and pharmaceutical applications. However, most of the global studies were focused on *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. as a source of ganoderic acids, while other species have not been sufficiently studied [8]. Therefore, the study of ganoderic acids from different species and strains of *Ganoderma* and the effect of cultivation conditions on their amount in the fungal biomass is promising and necessary.

Material and methods. Strains from the IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany NASU [9] cultivated by static and submerged cultivation methods were selected for the study: *Ganoderma applanatum* 1899 (Pers.) Pat., *G. carnosum* 2502 Pat., *G. lucidum* 1904 P. Karst., *G. resinaceum* 2477, 2503 Boud., *G. sinense* 2516 J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang, *G. tsugae* 1848, 2024, 2566 Murrill, *G. oregonense* 2560 Murrill.

The inoculum was initially prepared by cultivating mycelium on a glucose-yeast-peptone agar medium at 26 ± 0.1 °C containing (g/l): glucose – 25, peptone – 3, yeast extract – 3, MgSO₄ – 0,25; KH₂PO₄ – 1; K₂HPO₄ – 1; agar-agar – 22; pH – 6,0. Glucose Peptone Yeast (GYP) was used for static and submerged cultivation (g/l): glucose – 25, peptone – 3, yeast extract – 3, MgSO₄ – 0,25; KH₂PO₄ – 1; K₂HPO₄ – 1; pH – 6,0.

Liquid static cultivation was conducted under the following conditions: temperature 26 ± 0.1 °C, 50 ml of GYP in 250 ml Erlenmeyer flasks for 14 days. Inoculation was performed with 5 discs of mycelium grown on a glucose-yeast-peptone medium. Mycelium discs 5 mm in diameter were cut out with a sterile steel tube at a distance of 8-10 mm from the edge of active colony growth.

Submerged cultivation was conducted on a laboratory shaker under the following conditions: temperature 26 ± 0.1 °C, agitation speed 120 rpm, 100 ml of GYP in 500 ml Erlenmeyer flasks for 14 days. Inoculation was conducted with homogenized inoculum, which was grown in Petri dishes on a glucose-yeast-peptone agar medium. The inoculum was put into flasks in the amount of 10% of the nutrient medium.

To study the dynamics of biomass and productivity of synthesis of ganoderic acids, mycelium was grown by submerged cultivation method. Biomass was taken on 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, and 20 days of cultivation. After cultivation, the mycelium was separated from the nutrient medium by filtration through a nylon filter and washed with a potassium-phosphate buffer. The mycelium was dried to a constant weight at 60 ± 0.1 °C. The amount of dry biomass was calculated in g/l considering the mass of inoculum.

Ganoderic acids (GAs) were extracted from biomass by two methods – according to the classical method [10]: in the initial stage, the mycelium biomass (0.1 g) was extracted in 3 ml 70% methanol by temperature 4 ± 0.1 °C for 7 days; the procedure was repeated twice; after mycelium removal by centrifugation, the supernatant was evaporated at 50 °C under vacuum. The residue was dissolved in distilled water, after which chloroform extraction was performed. GAs from chloroform extract were further extracted with 5% NaHCO₃. At the next stage, the pH of the NaHCO₃-phase was brought to 2.5 with 2N HCl, after which GAs were extracted from NaHCO₃-phase with chloroform. After chloroform removal on vacuum evaporator, the residue containing GAs was dissolved in absolute methanol. Concentration of GAs was measured at 245 nm on spectrophotometer SF 46 LOMO (USSR). A modified version of the classic extraction method was also used. At the initial stage, the mycelium biomass (0.1 g) was extracted in 3 ml 70% methanol at 26 ± 0.1 °C and 120 rpm, for 24 hours. The procedure was repeated twice. Further stages of extraction were carried out according to the classical method. The productivity of GAs synthesis was determined as the amount of ganoderic acids in biomass (g) per unit of nutrient medium (l) during the time of cultivation [11].

The number of repeats was 4. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel software.

Results and discussion. When comparing the amount of GAs in mycelium of different species and strains of *Ganoderma* fungi in different cultivation conditions, the higher concentrations were generally observed while using submerged cultivation methods (Fig. 1).

The strains of *G. tsugae* 1848 and *G. sinense* 2516 contained 58% and 42.9% more GAs, respectively, when cultivated by submerged method, as compared to static liquid. Strains of *G. resinaceum* 2477, 2503, *G. oregonense* 2502 and *G. carnosum* 2502 produced approximately the same amount of GAs under static liquid and submerged cultivation conditions (the values are within statistical error limits). Mycelia of *G. tsugae* 2024, 2566, *G. applanatum* 1899, and *G. lucidum* 1904 grown by submerged cultivation had significantly higher amounts of GAs than those grown under

static liquid conditions (Fig. 1). The highest level of GAs, 25.2 ± 1.5 mg/g, was found in the mycelium of *G. sinense* 2516, grown by submerged cultivation. As for the strain diversity of species, the GAs content of both strains of *G. resinaceum* was practically the same under both cultivation conditions. At the same time, *G. tsugae* strains had differences in the GAs content in the mycelium grown under static liquid conditions. Namely, the mycelium of *G. tsugae* strain 2566 accumulated 23.3% more GAs than *G. tsugae* 2024 and 56.7% more than *G. tsugae* 1848 (Fig. 1).

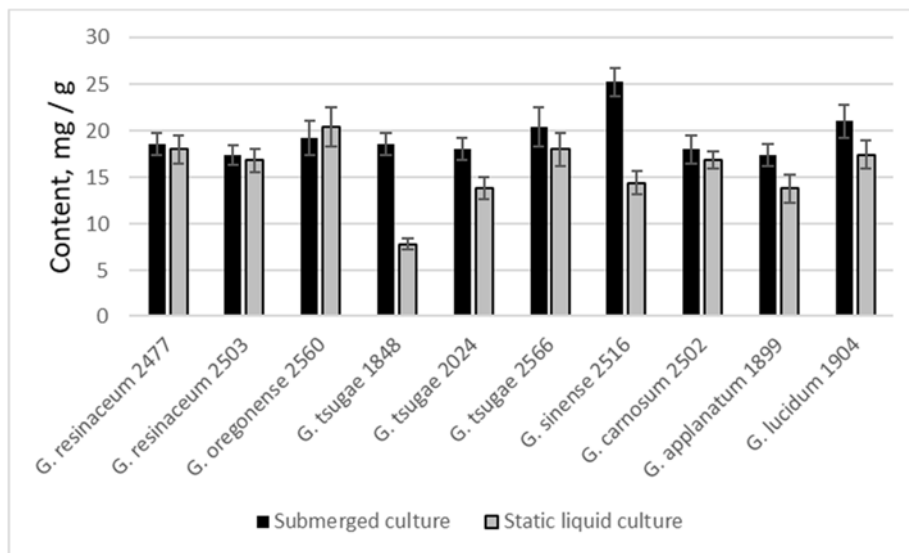


Fig. 1. The content of ganoderic acids in the mycelium of various species and strains of *Ganoderma* fungi under static and submerged cultivation conditions

All strains, except *G. oregonense* 2560, had a significant advantage in the productivity of GAs synthesis by mycelium when grown under submerged cultivation conditions (Fig. 2). This is due to the fact that most species and strains accumulate significantly higher amounts of biomass in submerged culture, which was described in our previous study [11]. The highest productivity of GAs synthesis ≈ 0.35 g/l, was in *G. tsugae* 2024 and 2566 strains grown in submerged culture, with the difference between them being in the range of statistical error (Fig. 2). Also the highest yield of endopolysaccharides synthesis was in mycelium of *G. tsugae* 2024, that was demonstrated in our previous

experiment [11]. These results are due to the fact that strain *G. tsugae* 2024 accumulated the highest level of biomass, than other strains. Based on the results of this part of the study, strains of *G. sinense* 2516 (with the highest GAs content) and *G. tsugae* 2024 (with the highest biomass accumulation and productivity of GAs synthesis) in submerged culture were selected for further research. The application of the modified method of GAs extraction allowed to significantly reduce the total time of GAs extraction without loss of substance in comparison with the classical method. Therefore, in our further research a modified method was used.

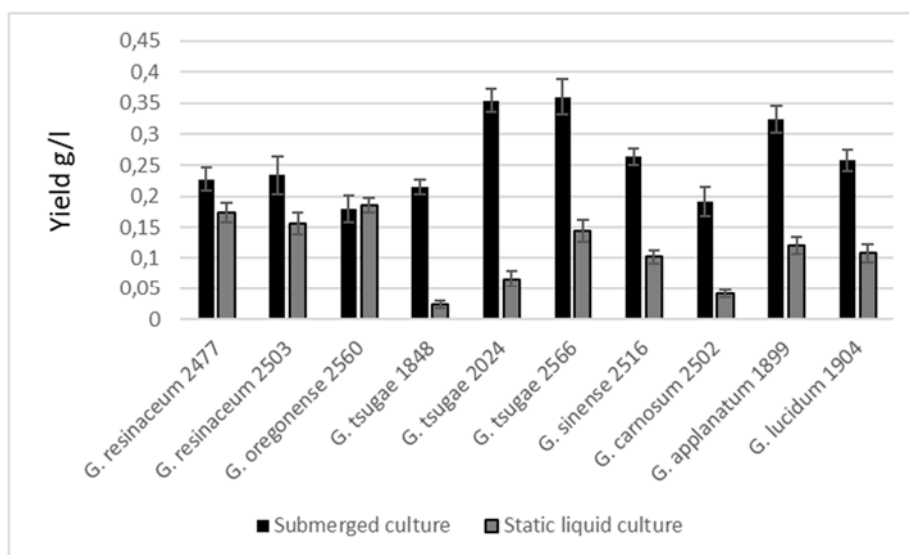


Fig. 2. Productivity of synthesis of ganoderic acids by the mycelium of various species and strains of *Ganoderma* fungi under static and submerged cultivation

As the diagram in Fig. 3 shows, the mycelium GAs content of *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516 strains increased gradually from the 6th day to a peak on the 14th day of cultivation, and after that, it began to decline. On the 6th day of cultivation, the amount of GAs in mycelium of both species was almost equal, and increased significantly already on the 8th day of cultivation, by 56.5% and 63.3% in *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516, respectively. In all other days there was a gradual increase in the content of GAs, with a dominant strain of *G. sinense* 2516. On the 14th day, the GAs content in the mycelium of both strains

reached its maximum, while in *G. tsugae* 2024 this parameter was 9% lower than for *G. sinense* 2516. After that the trend of higher content of GAs was maintained in *G. sinense* 2516 (Fig. 3) In addition, on the 16th, 18th, and 20th day of cultivation, the content of GAs in *G. sinense* 2516 mycelium varied within the statistical error and was lower than that on the 14th day of cultivation. On the 16th day of cultivation, the GAs content in mycelium of *G. tsugae* 2024 was as high as on the 14th day of cultivation, but decreased and remained almost unchanged on the 18th and 20th days of cultivation.

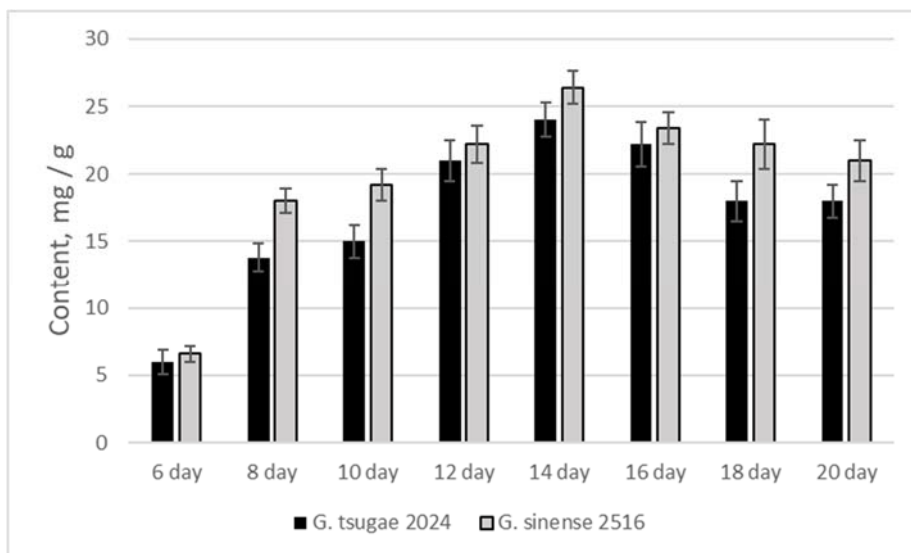


Fig. 3. The dynamics of ganoderic acids content in the mycelium of *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516

Data analysis in Fig. 4 indicates that both studied strains, *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516 showed extremely low yield of GAs synthesis on the 6th day of cultivation. This is related both to the small amount of biomass and the low level of GAs. On the 8th day of cultivation, the yield of GAs synthesis by both strains increased remarkably, although in *G. sinense* 2516 this value was almost twice as high as in *G. tsugae* 2024. However, on the 10th, 12th, and 14th days this parameter was almost the same for each of the strains (the values lied within the statistical error limits). The peak of productivity in *G. sinense* 2516 occurred on the 14th day and gradually decreased up to the 20th day of cultivation,

which was related to the reduction of biomass and GAs content. The difference between the yield of *G. sinense* 2516 on the 14th and 6th days of cultivation (the highest and lowest value) was 98% (Fig. 4). For the mycelium of *G. tsugae* 2024, the peak of productivity occurred on the 16th day of cultivation, but on the 14th, 18th, and 20 days of cultivation the value varied within the statistical error, which was associated with an increase in the biomass accumulation of the mycelium of this strain. The difference between the synthesis productivity of *G. tsugae* 2024 on the 14th and 6th days of cultivation (the highest and lowest value) was also 98% (Fig. 4).

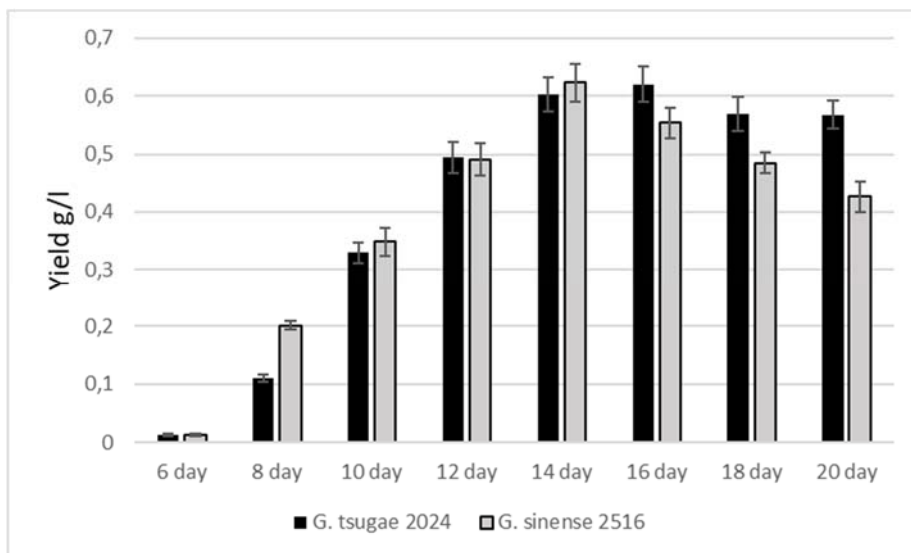


Fig. 4. Dynamics of synthesis productivity of ganoderic acids by *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516

Analysis of literature data on the content and productivity of GAs in the mycelium of different species and strains of the genus *Ganoderma*, including the impact of different cultivation conditions shows that the majority of researchers used strains of *G. lucidum* in their studies [14].

Fang and Zhong report GAs content of 18.6 mg/g and GAs synthesis yield of 0.267 g/l under submerged cultivation conditions for *G. lucidum* [12], which is 29.5% and 57.1% lower, respectively than similar parameters in the highest results, what we got in our study: GAs content of *G. sinense* 2516 is 26,4 mg/g, and productivity of *G. tsugae* 2024 is 0.623 g/l. In another study, Zhang and Tang [13] published the results on the positive effect of light exposure on *G. lucidum* mycelium in submerged culture and GAs content was 31 mg/g, which is 14.8% more than the same parameter in our experiment, but the productivity was 0.466 g/l [13], which is 25% lower than the maximum value in our study. According to Tang et al. [15], the GAs content and productivity were higher, but they were using a bioreactor for *G. lucidum* cultivation. The two-stage cultivation method in flasks allowed to obtain very high values for the specified parameters, GAs content was 44.7 mg/g, and the productivity of GAs synthesis was 1.427 g/l in mycelium of *G. lucidum* [16], which was 50% and 56.3% higher than the maximum values obtained in our study.

Wei et al. [8] in their study screened different species for GAs content and optimized cultivation conditions for the selected *G. lucidum* strain. As a result, after selecting the optimal nutrient medium and using 300 l bioreactor, the values of 20 mg/g on the GAs content and productivity of 0.677 g/l were obtained. Therefore, the highest GAs content of *G. sinense* 2516 strain we used in the study was 24.2% higher than that of the above researchers, but the maximum yield what we got was 7% lower. It should be noted that the cultivation time in our study was 5 days longer. It was, because using a bioreactor is better way to cultivation mycelium biomass than the Erlenmeyer's flasks with laboratory shaker.

Based on the results of the experiment, it is advisable to consider strains *G. tsugae* 2024 and *G. sinense* 2516 from the IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany NASU as promising producers of valuable biologically active substances – ganoderic acids.

Conclusion. It was found that the submerged cultivation method has an advantage over the static cultivation method in terms of GAs accumulation parameter for 5 out of 10 studied strains and species (for 2 strains of *G. tsugae*, *G. sinense* 2516 as well as *G. lucidum* 1904 and *G. applanatum* 1899).

It was proved that the submerged cultivation method has a significant advantage over the static culture in terms of GAs synthesis productivity for all strains and species used in the study, except *G. oregonense* 2560.

It was established that our modified method of GAs extraction allows to significantly reduce the total time of their extraction from mycelium.

It was proved that the mycelium of the different strains of one specie (*G. tsugae*) could accumulate different number of GAs in the same conditions of cultivation.

References

1. Wasser S. P. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*) / S. P. Wasser // Encyclopedia of Dietary Supplements – 2005; 603-622, doi: 10.1081/E-EDS-120022119
2. Wasser S. P. Medicinal mushrooms science: history, current status, future trends and unsolved problems / S. P. Wasser // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2010; 12(1): 1–16.
3. Al-Maali G. A. The influence of the metal citrates, obtained using aquananotechnology, on the biology of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. and *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. in culture: Cand. Sci. Diss. / G. A. Al-Maali. – Kyiv, M. G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine. – 2016. – Ukraine.
4. Belova N. V. Lanostane triterpenoids and steroids of higher fungi / N. V. Belova // Advances in Biology & Earth Sciences. – 2016; 1(1): 111–114.
5. Comparative Analysis of Cytokinins in Mycelial Biomass of Medicinal Mushrooms / N. P. Vedenicheva, G. A. Al-Maali, N. A. Bisko, N. Yu. Mytropolska // International Journal of Medicinal Mushrooms, 2018; 20(9): 837–847, doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018027797
6. Mizuno T. *G. lucidum* and *G. tsugae*: bioactive substances and medicinal effects / T. G. Mizuno // Food Rev Int 1995; 11(1): 151–166.
7. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds / B. Boh, M. Berovic, J. Zhang, L. Zhi-Bin. Biotechnology Annual Review. – 2007; 13: 265–267, doi.org/10.1016/s1387-2656(07)13010-6
8. Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods / Z. Wei, Y. Duan, Y. Qian et al. // Bioprocess and Biosystems Engineering/ – 2014; 37(9): 1789–1797, doi.org/10.1007/s00449-014-1152-2
9. The IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.1. / N. A. Bisko, M. L. Lomberg, O. B. Mychaylova, N. Yu. Mytropolska // The IBK Mushroom Culture Collection. – 2020, M. G. Kholodny Institute of Botany, doi.org/10.15468/dzdsqu
10. Manufacture of ganoderic acid by fermentation of *Ganoderma lucidum* (in Japanese) / Y. Tsujikura, T. Higuchi, Y. Miyamoto, S. Sato // Jpn Kokai Tokkyo Koho. – 1992; JP 04304890
11. Boromenskyi D. O. Influence of cultivation conditions on biomass and endopolysaccharide production by species of the genus *Ganoderma* (Ganodermataceae) / D. O. Boromenskyi, N. A. Bisko // Ukrainian Botanical Journal. – 2020; 77(2): 117–124, doi.org/10.15407/ukrbotj77.02.117
12. Fang Q. H. Two-Stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* / Q. H. Fang, J. J. Zhong // Biotechnol Prog. – 2002; 18: 51–54.
13. Zhang W. A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides / W. Zhang, Y. J. Tang // Biotechnol Prog. – 2008; 24: 1249–1261.
14. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation and Biological Activity of Triterpenoids from *Ganoderma* spp / Q. Xia, H. Zhang, X. Sun et al. // Molecules. – 2014. – 19(11), 17478–17535, doi: 10.3390/molecules191117478
15. Tang Y. J. Performance analyses of a pHshift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* / Y. J. Tang, W. Zhang, J. J. Zhong // Bioresource Technol. – 2009; 100: 1852–1859.
16. Zhang W. X. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum* / W. X. Zhang, J. J. Zhong // Bioprocess Biosyst Eng. – 2009; 33(6): 683-690, doi: 10.1007/s00449-009-0379-9

References (Scopus)

1. Wasser S.P. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*) / Wasser S.P // Encyclopedia of Dietary Supplements, 2005; 603-622. DOI: 10.1081/E-EDS-120022119
2. Wasser S.P. Medicinal mushrooms science: history, current status, future trends and unsolved problems. / Wasser S.P // International Journal of Medicinal Mushrooms, 2010; 12(1): 1–16.
3. Al-Maali G.A. [The influence of the metal citrates, obtained using aquananotechnology, on the biology of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst. and *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. in culture] Cand. Sci. Diss. Kyiv, / Al-Maali Galeb Adnanovych // M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine., 2016. Ukraine.
4. Belova N.V. Lanostane triterpenoids and steroids of higher fungi. *Advances in Biology & Earth Sciences*, / Belova N.V // 2016; 1(1): 111–114.
5. Vedenicheva N.P. Comparative Analysis of Cytokinins in Mycelial Biomass of Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, / Vedenicheva N.P., Al-Maali G.A., Bisko N.A., Mytropolska N.Yu. // 2018; 20(9): 837–847.
6. Mizuno T. *G. lucidum* and *G. tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. / Mizuno T. // *Food Rev Int* 1995; 11(1):151–166.
7. Boh B.. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. / Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L // *Biotechnology Annual Review*, 2007; 13: 265–267.

8. Wei Z. Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods. / Wei Z., Duan Y., Qian Y., Guo X., Li Y., Jin S., Zhou X., Shan S., Wang C., Chen X., Zheng Y., Zhong J. // *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014; 37(9): 1789–1797.

9. Bisko N.A.. The IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.1./ Bisko N.A., Lomborg M.L., Mychaylova O.B., Mytropolska N.Yu. // The IBK Mushroom Culture Collection M.G. Kholodny Institute of Botany. 2020

10. Tsujikura Y. Manufacture of ganoderic acid by fermentation of *Ganoderma lucidum* (in Japanese). Jpn Kokai Tokkyo Koho / Tsujikura Y., Higuchi T., Miyamoto Y., Sato S // 1992; JP 04304890

11. Boromenskyi D.O. Influence of cultivation conditions on biomass and endopolysaccharide production by species of the genus *Ganoderma* (Ganodermataceae) / Boromenskyi D.O., Bisko N.A. // *Ukrainian Botanical Journal*, 2020; 77(2): 117–124.

12. Fang QH. Two-Stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. / Fang QH, Zhong J.J. // *Biotechnol Prog* 2002; 18:51–54.

13. Zhang W. A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. / Zhang W, Tang Y.J // *Biotechnol Prog* 2008; 24:1249–1261.

14. Xia, Q. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation and Biological Activity of Triterpenoids from *Ganoderma* spp. / Xia, Q., Zhang, H., Sun, X., Zhao, H., Wu, L., Zhu, D. She, G. // *Molecules* 2014; 19(11): 17478–17535.

15. Tang Y.J. Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. / Tang Y.J., Zhang W., Zhong J.J. // *Bioresource Technol* 2009; 100:1852–1859.

16. Zhang W.X. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. / Zhang W.X., Zhong J.J. // *Bioprocess Biosyst Eng*. 2009; 33(6):683-690 doi:10.1007/s00449-009-0379-9

Надійшла до редколегії 06.01.2021
Отримано виправлений варіант 03.01.2021
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021
Received a revised version on 03.01.2021
Signed in the press on 03.01.2021

Д. Бороменський, асп., Н. Бісько, д-р біол. наук, Г. Аль-Маалі, канд. біол. наук, О. Поліщук, канд. біол. наук
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ, Україна

ВМІСТ ГАНОДЕРОВИХ КИСЛОТ У МІЦЕЛІЇ РІЗНИХ ВИДІВ РОДУ *GANODERMA* (GANODERMATACEAE), ОТРИМАННОГО РІЗНИМИ СПОСОБАМИ КУЛЬТИВУВАННЯ

У ході дослідження перевірено вплив різних способів культивування на вміст ганодерових кислот 7 видів, 10 штамів грибів роду *Ganoderma* з Колекції культур шапінкових грибів (ІБК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України: *Ganoderma applanatum* 1899; *Ganoderma carnosum* 2502; *Ganoderma lucidum* 1904; *Ganoderma resinaceum* 2477, 2503; *Ganoderma sinense* 2516; *Ganoderma tsugae* 1848, 2024, 2566, *Ganoderma oregonense* 2560. Доведено, що для 5 видів глибинний спосіб культивування є ефективнішим для накопичення ганодерових кислот. Визначено, що найбільший вміст ганодерових кислот був у міцелії штаму *G. sinense* 2516 – 25,2±1,5 мг/г. Продуктивність синтезу ганодерових кислот набагато вища за використання глибинного способу культивування для міцелію всіх видів і штамів, завдяки тому, що застосування вказаного способу забезпечує накопичення значно більшої кількості біомаси порівняно з методом поверхневого культивування. Найбільша продуктивність синтезу ганодерових кислот була отримана для міцелію видів *G. tsugae* 2024 та *G. tsugae* 2566 зі значеннями 0,35±0,019 та 0,36±0,028 г/л. Доведено, що модифікований спосіб екстракції дозволяє значно скоротити час екстракції ганодерових кислот. Порівняно з класичним методом час екстракції зменшується із 14 до 2 діб. Перевірено вміст ганодерових кислот і продуктивність їхнього синтезу для штамів *G. sinense* 2516 та *G. tsugae* 2024 в динаміці, вирощених у глибинній культурі, на 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 та 20 добу культивування. Найвищу кількість ганодерових кислот накопичував міцелій штаму *G. sinense* 2516 – 26,4±1,5 мг/г на 14 добу культивування. Найбільша продуктивність синтезу ганодерових кислот була у *G. sinense* 2516 та *G. tsugae* 2024 на 14 добу культивування та *G. sinense* 2516 на 16 добу, і складала 0,6±0,031, 0,62±0,033 та 0,62±0,027 г/л відповідно.

Ключові слова: *Ganoderma*, ганодерові кислоти, глибинне культивування, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma sinense*.

Д. Бороменский, асп., Н. Бисько, д-р биол. наук, Г. Аль-Маали, канд. биол. наук, О. Полищук, канд. биол. наук
Институт ботаники имени М. Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

СОДЕРЖАНИЕ ГАНОДЕРОВЫХ КИСЛОТ В МИЦЕЛИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *GANODERMA* (GANODERMATACEAE), ПОЛУЧЕННОГО РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В ходе проведенного исследования было проверено влияние различных способов культивирования на содержание ганодеровых кислот 7 видов, 10 штаммов грибов рода *Ganoderma* из коллекции культур шляпочных грибов (ІБК) Института ботаники имени М. Г. Холодного НАН Украины: *Ganoderma applanatum* 1899; *Ganoderma carnosum* 2502; *Ganoderma lucidum* 1904; *Ganoderma resinaceum* 2477, 2503; *Ganoderma sinense* 2516; *Ganoderma tsugae* 1848, 2024, 2566, *Ganoderma oregonense* 2560. Доказано, что для 5 видов глибинный способ культивирования является эффективным для накопления ганодеровых кислот. Определено, что наибольшее содержание ганодеровых кислот было в мицелии штамма *G. sinense* 2516 – 25,2±1,5 мг/г. Производительность синтеза ганодеровых кислот гораздо выше при использовании глибинного способа культивирования для мицелия всех видов и штаммов, благодаря тому, что использование указанного способа обеспечивает накопление значительно большего количества биомассы по сравнению с методом поверхностного культивирования. Наибольшая производительность синтеза ганодеровых кислот была получена для мицелия видов *G. tsugae* 2024 и *G. tsugae* 2566 со значениями 0,35±0,019 и 0,36±0,028 г/л. Доказано, что модифицированный способ экстракции позволяет значительно сократить время экстракции ганодеровых кислот. По сравнению с классическим методом экстракции время уменьшается с 14 до 2 суток. Было проверено содержание ганодеровых кислот и производительность их синтеза для штаммов *G. sinense* 2516 и *G. tsugae* 2024 в динамике, выращенных в глибинной культуре, на 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 сутки культивирования. Наибольшее количество ганодеровых кислот накапливал мицелий штамма *G. sinense* 2516 – 26,4±1,5 мг/г на 14 сутки культивирования. Наибольшая производительность синтеза ганодеровых кислот была в *G. sinense* 2516 и *G. tsugae* 2024 на 14 сутки культивирования и *G. sinense* 2516 на 16 сутки, и составляла 0,6±0,031, 0,62±0,033 и 0,62±0,027 г/л соответственно.

Ключевые слова: *Ganoderma*, ганодеровые кислоты, глибинное культивирование, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma sinense*.

УДК 57.021

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.19–24

Є. Кир'яченко, студ., Т. Галенова, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНАЛІЗ СЛИЗУ САДОВОГО РАВЛИКА (*Helix aspersa Muller*) НА ПРИСУТНІСТЬ ПОТЕНЦІЙНИХ ЕФЕКТОРІВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

Нині існує багато підходів до створення нових лікарських препаратів, однак жоден із них не може замінити важливу роль природних продуктів у відкритті й розробці ліків. Природна сировина залишається надзвичайно важливим джерелом лікарських засобів. Багато біологічно активних молекул природного походження вже знайшли безпосереднє лікарське застосування, інші можуть служити хімічними моделями або шаблонами для проєктування та синтезу нових фармацевтичних агентів. Слиз равликів уже багато років привертає увагу науковців, як джерело природних біологічно активних речовин. Компоненти слизу равликів неодноразово досліджено на антимікробну, антиоксидантну, протизапальну і протиракову активності. У цій роботі досліджено біологічні ефекти компонентів слизу садового равлика *Helix aspersa*, поширеного на теренах України. Результати досліджень довели присутність білкових молекул, серед яких частина мала виражений протеолітичний потенціал зі специфічністю до желатину, колагену та фібриногену. Після додавання слизу до плазми крові його складові ініціювали утворення активного тромбіну, а також подовжували час зсідання плазми у коагуляційному тесті АЧТЧ. Крім того, компоненти слизу *H. aspersa* посилювали ефект індуктора агрегації тромбоцитів й інгібували їхню дезагрегацію. Доведено, що компоненти слизу *H. aspersa* не мали цитотоксичного ефекту. Отримані результати вказують на перспективність і важливість подальших експериментів із вивчення окремих білкових фракцій слизу з метою ідентифікації окремих біологічно активних молекул, що відповідають за прояв показаних ефектів. Детальний аналіз складу та вивчення властивостей слизу равликів слугуватиме підґрунтям для отримання потенційно нових речовин із цільовими активностями і їхнього подальшого застосування в різних сферах промисловості, включаючи фармацевтичну.

Ключові слова: равлик, слиз, протеолітична активність, система гемостазу, хронометричні тести, гемолітична активність.

Вступ. Протягом століть м'ясо равликів, через його вишукані смакові властивості, а також поживну цінність, використовували в їжу. Однак равлики також користуються підвищеним попитом у фармації та косметології, оскільки є відмінною сировиною біологічно активних речовин. Равлики здатні виробляти в'язко-еластичну речовину, яка називається слизом, що має адгезивні, зволожувальні, захисні та репаративні властивості й виконує різноманітні функції, включаючи полегшення руху по землі, спілкування та неспецифічну, захисну реакцію на фізичне або хімічне подразнення [1, 2]. Слиз равликів є багатим джерелом біологічно активних природних речовин, що вже давно ввійшли до складу ряду косметичних засобів, призначених для догляду за шкірою та для лікування шкірних захворювань, наприклад, ран, опіків, рубців, кератозу, псоріазу та вугрів [1, 3]. Більше того, слиз слимаків добре відомий своїми антивіковими властивостями, а останнім часом його компоненти широко досліджують щодо антибактеріальної активності [4, 5].

Зважаючи на те, що територія України має сприятливі кліматичні умови для вирощування їстівних равликів і беручи до уваги високий попит на цю сировину на світовому ринку, не дивно, що в Україні активно формується нова галузь тваринництва – равликівництва. У зв'язку з популяризацією вирощування равликів актуальним наразі є пошук і розвиток сфер застосування продуктів їхньої переробки. Так, сьогодні українські фермери активно вирощують равликів видів *Helix aspersa Muller* та *Helix aspersa Maxima*, експортуючи близько 400 т сировини до країн Європи щорічно, а отже ці види, а точніше продукти їхньої життєдіяльності, зокрема слиз і продукти переробки їхньої неїстівної частини (мушлі), є перспективною сировиною, що відповідає ключовим вимогам біотехнологічного виробництва – доступність і вартість.

Helix aspersa та *Cornu aspersum* – дві альтернативні назви одного і того самого виду равликів. Таксономічно правильна назва – *S. aspersum*, але попередня назва *H. aspersa* використовується ширше. Ми провели аналіз літературних джерел і даних мережі інтернет щодо потенційних цільових активностей слизу равликів *Helix aspersa Muller* та *Helix aspersa Maxima* та їх найближчих таксономічно-споріднених видів. Згідно з результатами

кількох нещодавніх досліджень, слиз равликів виду *Helix aspersa* містить ряд природних речовин, що мають виражені корисні та лікувальні властивості для шкіри людини – алантоїн і гліколевую кислоту [6]. Також із слизу равлика *H. aspersa* виділено кілька фракцій пептидів, що мали антибактеріальні [7, 8] й антиоксидантні [9] властивості. Так показано, що компоненти слизу *H. aspersa* демонстрували ефективну антибактеріальну дію щодо двох різних штамів *Pseudomonas aeruginosa* [3]. Антимікробні пептиди, що були ідентифіковані та виділені зі слизу *H. aspersa* – це мітимацин-AF [3] та гемоціанін β c-HaH [3]. Ще два глікозильовані пептиди, що були виділені зі слизу *H. aspersa*, демонстрували інгібуючий ефект щодо росту *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli* та *Helicobacter pylori* [5]. Серед цільових молекул особливу увагу заслужують ті, що відповідають за реалізацію антиоксидантних ефектів. Оскільки равлики *H. aspersa* мешкають у природному середовищі, їхній секрет має добре розвинену систему антиоксидантного захисту, що включає ферментативну і неферментативну ланки [10, 11]. Установлено А. Brivva та співавторами [12], що слиз *H. aspersa* містить ферменти із супероксиддисмутазою та глутатіон-трансферазою активностями. Також із слизу видів *H. aspersa* та *H. pomatia* виділено декілька пептидів [5] та глікопротеїдів [13], що мали виражений антиоксидантний потенціал; антиоксидантні властивості слизу також пояснюють наявність алантоїну [14].

Показано, що екстракти з тканин *H. aspersa Muller* мають виражену протипухлинну активність, що була доведена експериментами на клітинах раку молочної залози (Hs578T) [15]. Гемоціаніни, отримані з *H. aspersa Muller* та *H. lucorum*, і структурна субоднина гемоціаніну *H. aspersa Muller* знижували життєздатність клітин раку сечового міхура (T-24 та CAL-29) [16]. Більше того, гемоціаніни, виділені з *H. aspersa Muller*, знижували життєздатність ракових клітин яєчників (FraWü), ракових клітин простати (DU-145), клітин гострого моноцитарного лейкозу (THP-1), клітин лімфоми Буркітта (Daudi) та ракових клітин гліоми (LN-18). В експериментах *in vitro* на культурах фібробластів, виявлено, що екстракт з *Helix aspersa* не мав цитотоксичності, захищав клітини від апоптозу і, що важливо, суттєво індукував проліферацію та міграцію

клітин за допомогою прямих і непрямих механізмів, що спостерігаються за умов ранозаживлення [17]. Указані ефекти були пов'язані з морфологічними змінами, реорганізацією цитоскелета та вивільненням цитокінів.

Отже, зауважимо таке: хоча равликовий слиз нині є інгредієнтом декількох косметичних і парафармацевтичних продуктів, дослідження щодо характеристики його хімічного складу та біологічних ефектів його компонентів лише набувають популярності. Беручи до уваги перспективність указаної сировини як потужного джерела біологічно активних речовин, метою цієї роботи було проведення попереднього аналізу слизу *H. aspersa* щодо присутності компонентів із потенційною ефекторною функцією відносно системи гемостазу.

Матеріали та методи. У досліджах використовували статевозрілих особин виду *H. aspersa* ($n = 50$) вирощених на равликовій фермі "Вілла Греція" (фермерське господарство "Здравлик", с. Гречане, Петриківський р-н, Дніпропетровська обл., Україна). Слиз равликів отримували працівники ферми за їхньою власною технологією "Здравлик-муцин". Чисту сировину (без додавання води чи інших розчинників) фільтрували, після чого ліофільно висушували (Telstar LyoQuest). Сухий матеріал зберігали при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ліофілізований секрет перед використанням розчиняли з розрахунку 5 мг сухої речовини на 1 мл 50 мМ Тріс-НСІ буфера ($\text{pH } 7,4$), що містив $0,13\text{ М}$ NaCl. З метою відокремлення нерозчинних компонентів суспензію центрифугували при 3000 г протягом 5 хв . Концентрацію білка у супернатанті визначали за методом Бредфорд [18]. Білково-пептидний склад слизу досліджували методом диск-електрофорезу у 10% -му поліакриламідному гелі згідно з описаною методикою [19]. Ензим-електрофорез проводили відповідно до методики [20]. Розділяючий гель полімеризували за присутності желатину, колагену та фібриногену з розрахунку 1 мг відповідного субстратного білка на 1 мл розділяючого гелю. Аналіз одержаних електрофореграм здійснювали з використанням програми TotalLab 2.04. Представлені електрофореграми є типовими для серії повторних дослідів.

Гемолітичну активність компонентів слизу *H. aspersa* досліджували в умовах *in vitro* за раніше розробленим методом [21]. Для цього експерименту використовували свіжоприготовлену 2% -ву (об./об.) суспензію еритроцитів кроля в Na-фосфатному буфері, $\text{pH } 7,2$. Різну кількість білкового матеріалу слизу *H. aspersa* додавали до суспензії еритроцитів (кінцеві концентрації загального білка складала – $100; 50; 20$ і 5 мкг на 1 мл суспензії клітин) та інкубували за $\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв . Після інкубації всі зразки центрифугували протягом 6 хв при 2500 г . Супернатанти використовували для визначення вільного гемоглобіну, що з'являвся в розчині за умов лізису клітин. Вимірювання проводили при довжині хвилі 541 нм (μQuant , BioTek Instruments, США). У дослідженні використано два контролі: негативний контроль – суспензія еритроцитів, яка містила лише Na-фосфатний буфер, $\text{pH } 7,2$, та позитивний контроль – суспензія клітин, що містила 1% -й тритон X-100. Оптичні показники позитивного контролю використовували як значення, що характеризує кількість вивільненого гемоглобіну за умови 100% -го лізису клітин.

Протеолітичну активність визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у складі таких синтетичних хромогенних субстратів: Phe-Pip-Arg-pNA (S_{2238} , субстрат до тромбіну), Val-Leu-Lys-pNA (S_{2251} , субстрат до плазміну), Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S_{2222} , субстрат до фактору Ха), puoGlu-Pro-Arg-pNA (S_{2366} , субстрат до активованого протеїну С) [22]. Реакцію проводили в лунках

96-лункового мікропланшету. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища складав 250 мкл . У ході дослідження до $0,05\text{ М}$ Тріс-НСІ буфера, $\text{pH } 7,4$, додавали зразок слизу *H. aspersa*, з вмістом загального білка – 20 мкг . Після 5 хв інкубації за $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ реакцію ініціювали додаванням відповідного специфічного хромогенного субстрату, кінцева концентрація кожного з них становила $0,3\text{ мМ}$. Контрольний зразок включав ті самі компоненти, але замість відповідних фракцій секрету містив рівний об'єм 50 мМ Тріс-НСІ буфера, $\text{pH } 7,4$. Інкубацію проводили за $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 120 хв . Оптичну щільність проб визначали через рівні проміжки часу при довжині хвилі 405 нм , використовуючи мікропланшеточний спектрофотометр (μQuant , BioTek Instruments, США).

Для вивчення здатності компонентів слизу *H. aspersa* активувати певні проферменти системи гемостазу, використовували інкубаційне середовище аналогічного складу як описано вище, куди крім досліджуваних зразків також вносили 20 мкл плазми крові кроля. Реакцію ініціювали додаванням відповідного хромогенного субстрату з кінцевою концентрацією $0,3\text{ мМ}$. Контрольний зразок включав ті самі компоненти, але замість досліджуваних зразків секрету містив рівний об'єм 50 мМ Тріс-НСІ буфера, $\text{pH } 7,4$. За динамікою розщеплення хромогенних субстратів слідкували за тотожних умов, описаних вище. Аналізуючи потенційний ефект компонентів слизу *H. aspersa* на проензими плазми, отримані результати обчислювали таким чином: значення оптичної щільності проб у експерименті щодо дослідження прямої гідролітичної дії компонентів секрету, віднімали від відповідних значень проб у експерименті з додаванням до інкубаційного середовища плазми. Така маніпуляція дозволила виокремити активність активних ензимів плазми, що потенційно могли утворитися внаслідок дії компонентів секрету на відповідні проензими.

Потенційні ефекти компонентів слизу на час зсідання плазми крові досліджували у хронометричних тестах: "тромбіновий час" (ТЧ), "протромбіновий час" (ПЧ) та "активований частковий тромбoplastиновий час" (АЧТЧ) з використанням готових реактивів відповідних комерційних наборів (Ренам, РФ) [22]. У кюветі коагулометра змішували 45 мкл плазми крові кроля та 5 мкл зразка слизу *H. aspersa* з вмістом білка 20 мкг . Для визначення ТЧ до суміші вносили 50 мкл розчину тромбіну з активністю 3 МО/мл ; для визначення ПЧ – 100 мкл тромбoplastинкальцієвої суміші; для визначення АЧТЧ – 50 мкл АЧТЧ-реагенту з подальшим додаванням 50 мкл розчину $0,025\text{ М}$ CaCl_2 . Час зсідання в секундах фіксували на коагулометричному аналізаторі (Rayto RT-2201С, Китай).

Агрегацію тромбоцитів досліджували впродовж перших 3 годин після забору крові на фотооптичному агрегометрі АТ-02 (Medtech, Росія) за методикою описаною раніше [22]. Плазму, збагачену тромбоцитами (ПЗТ), з вмістом клітин $230\text{--}250\text{ тис.}$ на 1 мл інкубували зі зразками слизу *H. aspersa* (кінцеві концентрації загального білка становили: $50; 35; 25$ і 15 мкг на 1 мл ПЗТ) протягом 2 хв при $\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ та постійному перемішуванні при 600 об./хв . Агрегацію тромбоцитів індукували, додаючи до зразків АДФ у кінцевій концентрації $5 \times 10^{-6}\text{ М}$, а процес агрегації контролювали протягом наступних 8 хв . Криві агрегації аналізували за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення АТ-02 (Medtech, Росія). Криві, що відображали процес агрегації тромбоцитів у ПЗТ, інкубованої протягом 2 хв із рівним об'ємом 50 мМ Тріс-НСІ буфера, $\text{pH } 7,4$, були використані як контроль для цього експерименту.

Одержані дані оброблено методом варіаційної статистики. Різниця вважалася достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Садовий равлик *Helix aspersa* є багатим джерелом біологічно активних природних речовин, які можуть стати важливою вихідною сировиною для отримання нових молекул із різними цільовими активностями, серед яких можуть бути і перспективні фармацевтичні агенти. В останні роки лікарі та косметологи використовують препарати слизу у складі кремів, лосьйонів та аерозолів. За рахунок високого вмісту біологічно активних речовин ці препарати сприяють швидкому загоєнню ран, регенерації шкіри, збереженню її еластичності й запобіганню утворення зморшок. Зважаючи на наш попередній досвід у сфері ідентифікації ефекторів системи гемостазу серед компонентів сировини природного походження, нам було цікаво проаналізувати слиз *H. aspersa* щодо присутності біологічно активних молекул із потенційними цільовими активностями, серед яких протеолітична дія, гемолітичний ефект, ефекторна дія на проензими плазми, вплив на коагуляційну та тромбоцитарну ланки гемостазу.

Якісний аналіз білкового складу слизу *H. aspersa* із застосуванням методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію показав присутність у складі слизу широкого спектра білкових молекул, що різняться за молекулярними масами. Подальший аналіз електрофореграм за допомогою програми TotalLab 2.04 дозволив ідентифікувати 11 білкових зон, локалізація яких відповідала поліпептидам із молекулярною масою 17, 19, 21, 25, 28, 31, 45, 60, 82, 101 та 122 кДа (рис. 1).

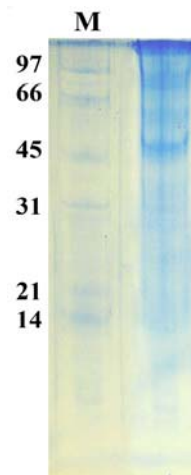


Рис. 1. Типова електрофореграма розділення білків слизу *H. aspersa*.

Трек М – маркери молекулярних мас (кДа)

Протеолітичну активність компонентів слизу *H. aspersa* досліджували методом ензим-електрофорезу. Поява світлих зон гідролізу у площині розділяючих гелів, що містили желатин, колаген і фібриноген як субстратні білки, слугувала доказом присутності у слизі *H. aspersa* активних ферментів, що виявляли специфічність до відповідних субстратів (типів ензим-електрофореграми не представлено). Отримані ензим-електрофореграми проаналізовано за допомогою програми TotalLab 2.04, що дозволило визначити молекулярні маси активних протеолітичних ферментів у слизі *H. aspersa* (табл. 1).

Таблиця 1. Молекулярні маси протеолітичних ферментів, ідентифікованих у слизі *H. aspersa*

Субстратний білок	Молекулярні маси ідентифікованих ензимів, кДа
Желатин	15, 33, 47, 59, 70, 83
Колаген	73, 93
Фібриноген	31, 50, 81, 96, 109

Специфічну протеолітичну активність компонентів слизу *H. aspersa* визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у синтетичних хромогенних субстратах, специфічних до плазміну (S₂₂₅₁), тромбіну (S₂₂₃₈), фактора Ха (S₂₂₂₂) і протеїну С (S₂₃₆₆). Ми також дослідили потенційний ефект компонентів слизу *H. aspersa* на відповідні проензими плазми. Для проведення цього експерименту в інкубаційне середовище, що містило зразок секрету *H. aspersa* додавали плазму крові кроля, а після 5-

хвилинної інкубації вносили відповідний субстрат. Результати дослідження наведено на рис. 2. Установлено, що компоненти слизу, незважаючи на свій протеолітичний потенціал (табл. 1), не чинили значного ефекту на розщеплення відповідних синтетичних хромогенних субстратів (рис. 2, А), однак вони активували протромбін плазми й ініціювали утворення активного тромбіну, що виражалося в інтенсивному розщепленні субстрату – S₂₂₃₈ (рис. 2, Б).

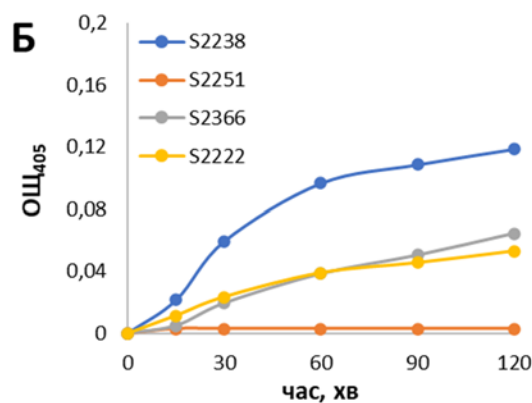
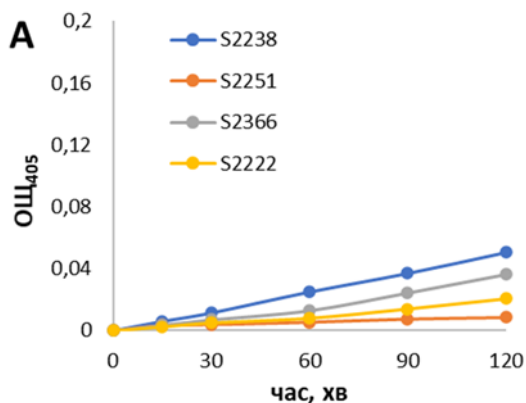


Рис. 2. Динаміка розщеплення специфічних пептидних субстратів компонентами слизу *H. aspersa* (А) та динаміка розщеплення специфічних пептидних субстратів ензимами плазми за умов її попередньої інкубації з компонентами слизу *H. aspersa* (Б); дані представлено як зміну оптичної щільності проб при 405 нм (ОШ₄₀₅)

Оскільки отримані результати вказують на можливі ефекторні дії біомолекул слизу *H. aspersa* щодо компонентів коагуляційного гемостазу, ми дослідили час згортання плазми крові у коагулометричних тестах – ПЧ, ТЧ і АЧТЧ, що разом дають можливість оцінити функціонування внутрішнього та зовнішнього шляхів коагуляційного гемостазу. Нам не вдалося виявити статистично значущих змін часу зсідання плазми крові у тестах ПЧ та ТЧ за умов інкубації плазми зі зразками слизу *H. aspersa* (табл. 2). Тоді як у ході інкубації плазми крові

кроля зі зразком слизу *H. aspersa*, час згортання плазми у тесті АЧТЧ перевищив контрольні значення на 75 %. Оскільки серед компонентів слизу *H. aspersa* відмічено досить високий рівень протеолітичної активності, отримані результати можуть бути обумовлені деградацією факторів внутрішнього шляху коагуляційного гемостазу під впливом компонентів слизу. Однак це припущення має бути перевірене у подальших дослідженнях із використанням окремих білкових фракцій або, навіть, окремих компонентів слизу.

Таблиця 2. Час зсідання плазми крові у коагуляційних тестах, за умови попередньої інкубації плазми зі зразком слизу *H. aspersa*

Назва тесту	Контрольні показники (у секундах)	Показники за дії компонентів слизу <i>H. aspersa</i> (у секундах)
ПЧ	7,8 ± 0,2	7,2 ± 0,3
ТЧ	8,4 ± 0,3	8,3 ± 0,4
АЧТЧ	20,8 ± 1,3	36,7 ± 4,6*

* $p < 0,05$ – різниці достовірні, порівняно з контрольними показниками.

У нашому дослідженні ми оцінили потенційний ефект компонентів слизу *H. aspersa* на процес АДФ-залежної агрегації тромбоцитів. Як видно з отриманих результатів, компоненти слизу *H. aspersa* не чинили безпосереднього індукуючого ефекту на процес агрегації тромбоцитів, однак мали виражений потенціал посилювати ефект індуктора – 5×10^{-6} М АДФ (рис. 3). Показано, що показник

ступеня максимальної АДФ-індукованої агрегації зростає пропорційно кількості білкового матеріалу зі слизу *H. aspersa* у збагаченій тромбоцитами плазмі (рис. 3). Відмічено виражений інгібуючий ефект на процес дезагрегації тромбоцитів. Такі результати, на нашу думку, представляють собою практичний інтерес і потребують детальнішого вивчення із залученням очищених білкових фракцій слизу.

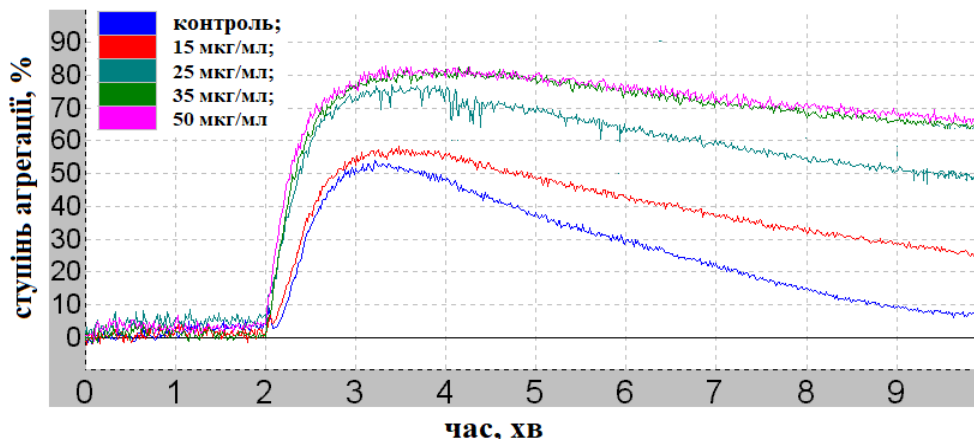


Рис. 3. Типові агрегатограми, що відображають АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у ПЗТ за умови її попередньої 2-хвилинної інкубації зі зразком слизу *H. aspersa*

Аналіз гемолітичних ефектів компонентів слизу *H. aspersa* є швидким способом дослідити його цитотоксичний потенціал. Ступінь лізису еритроцитів (гемоліз) визначали спектрофотометричним методом, шляхом вимірювання вивільнення гемоглобіну в еритроцитарній суспензії після її півгодинної інкубації зі зразком слизу

H. aspersa (100, 50, 20, 5 мкг загального білка на 1 мл суспензії клітин). Гемолітичний ефект порівнювали з ефектом 1% тритона X-100 (табл. 3). Показано, що компоненти слизу *H. aspersa* не мали вираженого гемолітичного ефекту, що може слугувати доказом відсутності цитотоксичного потенціалу.

Таблиця 3. Показники гемолітичної активності компонентів слизу *H. aspersa*

Зразок		Оптична щільність зразків при 541 нм	Ступінь гемолізу в еритроцитарній суспензії
Негативний контроль		0,050 ± 0,001	-
Позитивний контроль		1,016 ± 0,004*	100 %
Слиз <i>H. aspersa</i>	100 мкг/мл	0,051 ± 0,001	ефект відсутній
	50 мкг/мл	0,052 ± 0,001	те саме
	20 мкг/мл	0,050 ± 0,001	"
	5 мкг/мл	0,053 ± 0,001	"

* $p < 0,05$ – різниці достовірні, порівняно з негативним контролем.

Висновки. Отже, унаслідок попереднього скринінгу потенційних ефектів компонентів слизу *H. aspersa* на окремі параметри системи гемостазу показано, що вказана

природна сировина може бути перспективним джерелом біологічно активних речовин із вираженою протеолітичною активністю, здатністю впливати на коагуляційну та

тромбоцитарну ланку гемостаз. На нашу думку, перспективним є подальші дослідження, спрямовані на ідентифікацію окремих білкових молекул слизу *H. aspersa* та вивчення механізму їхньої дії. Розв'язання цих питань сприятиме цільовому використанню продуктів переробки неістивних частин равликів і продуктів їхньої життєдіяльності, зокрема слизу, що є цікавим і перспективним з наукової й економічної точок зору, забезпечуючи "равликове господарство" додатковим доходом.

Список використаної літератури

- Effects of feed protein and lipid contents on fatty acid profile of snail (*Helix aspersa maxima*) meat / M. C. Milinsk, R. das Graças Padre, C. Hayashi et al. // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2006. – Vol. 19 (2-3). – P. 212–216, doi:10.1016/j.jfca.2004.09.011
- Hämäläinen E. M. Snails: biology, ecology, and conservation / E. M. Hämäläinen, S. Järvinen // Hauppauge. – NY: Nova Science Publisher's. – 2012. – 185 p.
- Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa* / S. Pitt, M. A. Graham, C. Dedi et al. // *British Journal of Biomedical Science*. – 2015. – Vol. 72(4). – P. 174–181, doi.org/10.1080/09674845.2015.11665749.
- Etim L. B. Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection / L. B. Etim, C. Aleruchi, G. A. Obande // *Brit. Microbiol. Res. J.* – 2016. – Vol. 11 (2). – P. 1–9, doi: 10.9734/BMRJ/2016/21731.
- Bioactive compounds isolated from garden snails / P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova et al. // *J Biosci Biotechnol.* – 2015 – P. 147–155;
- Mubarak M. Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection / M. Mubarak, F. N. Lamari, Ch. Kontoyannis // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1322. – P. 49–53, doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.086.
- Glycine-rich peptides from *Cornu aspersum* snail with antibacterial activity / L. Velkova, A. Nissimova, A. Dolashki et al. // *Bul Chem. Com.* – 2018. – Vol. 50 (C). – P. 169–175.
- Structure and antibacterial activity of isolated peptides from the mucus of garden snail *Cornu aspersum* / A. Dolashki, A. Nissimova, E. Daskalova et al. // *Bul. Chem. Com.* – 2018. – Vol. 50 (C). – P. 195–200.
- Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail *Cornu aspersum* // N. Kostadinova, Y. Voynikov et al. // *P. Bul. Chem. Com.*, 2018. – Vol. 50 (C). – P. 176–183.
- Ramos-Vasconcelos G. R. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa* / G. R. Ramos-Vasconcelos, M. Hermes-Lima // *J Exp Biol.* – 2003. – Vol. 206 (4). – P. 675–685, doi: 10.1242/jeb.00124.
- Ramos-Vasconcelos G. R. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa* / G. R. Ramos-Vasconcelos, L. A. Cardoso, M. Hermes-Lima // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 140 (2). – P. 165–174, doi: 10.1016/j.cca.2005.01.015.
- Molecular basis for the regenerative properties of a secretion of the mollusk *Cryptomphalus aspersa* / A. Brieve, N. Philips, R. Tejedor et al. // *Skin Pharmacol Physiol.* – 2008. – Vol. 21(1). – P. 15–22, doi: 10.1159/000109084.
- Gabriel U. I. Quantification of mucoproteins (glycoproteins) from snails mucus, *Helix aspersa* and *Helix pomatia* / U. I. Gabriel, S. Mirela, J. Ionel // *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*1. – 2011. – Vol. 17 (4). – P. 410–413.
- Allantoin as a free-radical scavenger / E. P. Gus'kov, M. E. Kletskii, I. V. Kornienko et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 383. – P. 105–107, doi: 10.1023/a:1015331601169.
- Effect of *Helix aspersa* extract on TNF α , NF- κ B and some tumor suppressor genes in breast cancer cell line Hs578T / I. El Ouar, C. Braicu, D. Naimi et al. // *Pharmacogn. Mag.* – 2017. – Vol. 13 (50). – P. 281–285, doi: 10.4103/0973-1296.204618.
- In vitro antiproliferative effect of *Helix aspersa* hemocyanin on multiple malignant cell lines / O. Antonova, P. Dolashka, D. Toncheva et al. // *Z. Naturforsch. C J Biosci.* – 2014. – Vol. 69 (7-8). – P. 325–334, doi: 10.5560/znc.2013-0148.
- In Vitro Influence of Extracts from Snail *Helix aspersa* Müller on the Colon Cancer Cell Line Caco-2 / M. Matusiewicz, I. Kosieradzka, T. Niemiec et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19(4). – P. 1064, doi.org/10.3390/ijms19041064.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 7(72). – P. 248–254.
- Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227(5259). – P. 680–685.
- Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 2. – P. 20–26, doi:10.4236/abb.2011.21004.
- Hemolytic activity of skin secretions of amphibians that inhabit the Ukraine territory / Y. Kyriachenko, O. Oskyrko, I. Udovychenko, T. Halenova // *Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology*. – 2020. – № 1(80). – P. 6–10, doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.6-10.

22. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C₆₀ fullerenes in rabbit / T. Halenova, N. Raksha, O. Savchuk et al. // *BioNanoScience*. – 2020, doi.org/10.1007/s12668-020-00762-w.

Reference (Scopus)

- Milinsk M.C., das Graças Padre R., Hayashi C., de Oliveira C.C., Visentainer J.V., de Souza N.E., Matsushita M. Effects of feed protein and lipid contents on fatty acid profile of snail (*Helix aspersa maxima*) meat. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19(2-3):212-216. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.09.011.
- Hämäläinen E.M, Järvinen S. Snails: biology, ecology, and conservation. Hauppauge, NY: Nova Science Publisher's. 2012: 185.
- Pitt SJ, Graham MA, Dedi CG, Taylor-Harris PM, Gunn A. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*. *British Journal of Biomedical Science*. 2015 ;72(4):174-81; quiz 208. DOI: 10.1080/09674845.2015.11665749.
- Etim, L., Aleruchi, C., Obande, G. Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection. *Microbiology Research Journal International*. 2015; 11(2), 1-9. https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/21731
- Dolashka P, Dolashki A, Velkova L, Stevanovic S, Molin L, Traldi P, et al. Bioactive compounds isolated from garden snails. *J Biosci Biotechnol*. 2015; SE:147–55.
- El Mubarak MA, Lamari FN, Kontoyannis C. Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *J Chromatogr A*. 2013; 1322:49-53. doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.086.
- Velkova L., Nissimova A., Dolashki A., et al. Glycine-rich peptides from *Cornu aspersum* snail with antibacterial activity. *Bul Chem. Com*. 2018; 50 (C), 169-175.
- Dolashki A., Nissimova A., Daskalova E., Velkova L., Topalova Y., Hristova P., et al. Structure and antibacterial activity of isolated peptides from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*. *Bulgarian Chemical Communications C*. 2018; 50. doi:10.13140/RG.2.2.23394.38086
- Kostadinova N., Voynikov Y., Dolashki A., Krumova E., Abrashev R., Kowalewski D., et al. Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*. *Bul. Chem. Com*. 2018; 50(C), 176–183.
- Ramos-Vasconcelos GR, Hermes-Lima M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J Exp Biol*. 2003; 206(Pt 4):675-85. doi: 10.1242/jeb.00124.
- Ramos-Vasconcelos GR, Cardoso LA, Hermes-Lima M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005;140(2):165-74. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.015.
- Brieve A, Philips N, Tejedor R, Guerrero A, Pivel JP, Alonso-Lebrero JL, Gonzalez S. Molecular basis for the regenerative properties of a secretion of the mollusk *Cryptomphalus aspersa*. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21(1):15-22. doi: 10.1159/000109084.
- Gabriel UI, Mirela S, Ionel J. Quantification of mucoproteins (glycoproteins) from snails mucus, *Helix aspersa* and *Helix pomatia*. *J Agroalimnt Process Technol*. 2011; 17:410–13.
- Gus'kov EP, Kletskii ME, Kornienko IV, Olekhovich LP, Chistyakov VA, Shkurat TP, Prokofev VN, Zhdanov Y. Allantoin as a free-radical scavenger. *Dokl Biochem Biophys*. 2002; 383:105-7. doi: 10.1023/a:1015331601169.
- El Ouar I, Braicu C, Naimi D, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Effect of *Helix aspersa* extract on TNF α , NF- κ B and some tumor suppressor genes in breast cancer cell line Hs578T. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(50):281-285. doi:10.4103/0973-1296.204618.
- Antonova O, Dolashka P, Toncheva D, Rammensee HG, Floetnemeier M, Stevanovic S. In vitro antiproliferative effect of *Helix aspersa* hemocyanin on multiple malignant cell lines. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2014;69(7-8):325-334. doi:10.5560/znc.2013-0148
- Matusiewicz M, Kosieradzka I, Niemiec T, et al. In Vitro Influence of Extracts from Snail *Helix aspersa* Müller on the Colon Cancer Cell Line Caco-2. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1064. doi:10.3390/ijms19041064
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
- Ostapchenko, L., Savchuk, O., Burlova-Vasilieva, N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2011; 2:20-26. doi: 10.4236/abb.2011.21004.
- Kyriachenko Y., Oskyrko O., Udovychenko I., et al. Hemolytic activity of skin secretions of amphibians that inhabit the Ukraine territory. *Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology*. 2020; 1(80): 6-10. doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.6-10.
- Halenova T., Raksha N., Savchuk O., et al. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C₆₀ fullerenes in rabbit. *BioNanoScience*. 2020. doi.org/10.1007/s12668-020-00762-w.

Надійшла до редколегії 4.01.2021
Отримано виправлений варіант 1.02.2021
Підписано до друку 1.02.2021

Received in the editorial 4.01.2021
Received a revised version on 1.02.2021
Signed in the press on 1.02.2021

Е. Кирьяченко, студ., Т. Галенова, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

АНАЛИЗ СЛИЗИ САДОВОЙ УЛИТКИ (*Helix aspersa Muller*) НА ПРИСУТСТВИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОРОВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗА

На сегодняшний день существует много подходов к созданию новых лекарственных препаратов, однако ни один из них не может заменить важную роль природных продуктов в открытии и разработке лекарств. Природное сырье остается чрезвычайно важным источником лекарственных средств. Ряд биологически активных молекул природного происхождения уже нашли непосредственное лекарственное применение, многие другие могут служить химическими моделями или шаблонами для проектирования и синтеза новых фармацевтических агентов. Слизь улиток уже много лет привлекает внимание ученых как источник природных биологически активных веществ. Компоненты слизи улиток были неоднократно исследованы на антимикробную, антиоксидантную, противовоспалительную и противораковую активности. В данной работе были исследованы биологические эффекты компонентов слизи садовой улитки *Helix aspersa*, распространенной на территории Украины. Результаты исследований показали присутствие белковых молекул, среди которых часть имела выраженный протеолитический потенциал со специфичностью к желатину, коллагену и фибриногену. При добавлении слизи к плазме крови ее составляющие инициировали образования активного тромбина, а также продлевали время свертывания плазмы в коагуляционном тесте АЧТВ. Кроме того, компоненты слизи *H. aspersa* усиливали эффект индуктора агрегации тромбоцитов и ингибировали их дезагрегацию. Доказано, что компоненты слизи *H. aspersa* не имели цитотоксического эффекта. Полученные результаты указывают на перспективность и важность дальнейших экспериментов по изучению отдельных белковых фракций слизи с целью идентификации отдельных биологически активных молекул, отвечающих за проявление показанных эффектов. Детальный анализ состава и изучение свойств слизи улиток служит основой для получения потенциально новых веществ с целевыми активностями и их дальнейшего применения в различных сферах промышленности, включая фармацевтическую.

Ключевые слова: улитка, слизь, протеолитическая активность, система гемостаза, хронометрические тесты, гемолитическая активность.

Y. Kyriachenko, Student, T. Halenova, PhD, O. Savchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALYSIS OF GARDEN SNAIL (*Helix aspersa Muller*) MUCUS FOR THE PRESENCE OF POTENTIAL EFFECTORS OF HEMOSTASIS SYSTEM

Today, there are many approaches to new drugs development, but none of them can replace the important role of natural products in the discovery and development of drugs. Natural raw materials remain an extremely important source of medicines. A number of biologically active molecules of natural origin have already found a direct medicinal use, while many others can serve as chemical models or templates for the design and synthesis of new pharmaceutical agents. Snail mucus has been attracting the attention of scientists for many years as a source of natural biologically active substances. The components of snail mucus have been repeatedly tested for antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities. In this work, the biological effects of components of the mucus of the garden snail *Helix aspersa*, distributed in Ukraine, were studied. The research results proved the presence of protein molecules, some of which had a pronounced proteolytic potential with specificity for gelatin, collagen and fibrinogen. When mucus was added to blood plasma, its components initiated the formation of active thrombin, and also prolonged the clotting time of plasma in the coagulation test APTT. In addition, the components of *H. aspersa* mucus enhanced the effect of platelet aggregation inducer and inhibited their disaggregation. It was proved that the components of *H. aspersa* mucus had no cytotoxic effect. The obtained results indicate the prospects and importance of further experiments on the study of mucus protein fractions in order to identify individual biologically active molecules responsible for the manifestation of these effects. A detailed analysis of the composition and study of the properties of snail mucus will serve as a basis for obtaining potentially new substances with targeted activities and their further use in various industries, including pharmaceutical.

Keywords: snail, mucus, proteolytic activity, hemostasis system, plasma coagulation tests, hemolytic activity.

УДК 577.112.8
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.24–27

A. Beliyeva, trainee, L. Garmanchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALYSIS OF FUNCTIONAL CHANGES UNDER USING OF CANDESARTAN CILEXETIL WITH RESVERATROL IN ANIMALS

Cardiovascular diseases are widespread throughout the world. The incidence of diseases of the cardiovascular system has increased several times. Cardiovascular diseases have become the leading cause of death in many countries. Currently, the efforts of many researchers are aimed at studying and creating new, more effective and safe drugs and their combinations for the treatment of pathology of the cardiovascular system. Candesartan cilexetil is an angiotensin II receptor antagonist. It is used medicinally as a long-acting antihypertensive agent. However, this drug has a number of side effects. Resveratrol is a natural antioxidant. This substance exhibits pleiotropic effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging, cardioprotective, and neuroprotective activities. The aim is investigation of acute toxicity of candesartan cilexetil and resveratrol in combination in vivo. Male and female ICR mice were used for the experiment. Animals received candesartan cilexetil and resveratrol intragastrically once. Evaluation of the effects of substances on internal organs (heart, spleen, kidneys, lungs, liver and brain) was carried out in 2 weeks after the introduction of the substances. It was shown that candesartan cilexetil with natural resveratrol did not lead to functional changes. There were no changes of behavior during the observation period. The combination of candesartan cilexetil with resveratrol did not lead to the death of mice, therefore the mean lethal dose (LD50) was not determined. The new combination of substances was safe. No side effects have been reported. The combination of candesartan cilexetil with resveratrol is non-toxic, and the use of these substances is safe for animals.

Key words: Cardiovascular diseases, candesartan cilexetil, resveratrol, acute toxicity.

Introduction. Cardiovascular diseases are widespread in the world. The incidence of diseases of cardiovascular system has increased several times in many countries. Cardiovascular diseases have become the leading mortality reason in many countries. At present many scientists and doctors try to study and create new more effective and safe drugs and their combinations to treat this pathology. It's necessary to investigate new methods of treatment of cardiovascular diseases.

Candesartan cilexetil is an angiotensin II receptor antagonist. Now it is used as a long-term antihypertensive agent [1]. Candesartan cilexetil increases resistance to stress and endurance during exercise in people with hypertension [2]. However, it is shown that candesartan has also a number of side effects, such as dizziness, weakness, headache. High doses of candesartan cilexetil influence the formation of separate subpopulations of cells in bone

marrow [3]. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, shows pleiotropic health beneficial effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging, cardioprotective and neuroprotective activities [4-6]. It's known that this substance decreases the synthesis of lipids in liver and eicosanoids in leukocytes in animals, inhibits platelet activation/aggregation, decreases the activity of protein kinases, inhibits formation of reactive oxygen species [7].

The aim of this study is investigation of acute toxicity of the combination of candesartan cilexetil and resveratrol *in vivo* using mice.

Materials and methods. Male and female ICR mice were taken for the experiment. Animals were divided into 4 groups: control 1 (male), experimental group 1 (male), control 2 (female), experimental group 2 (female).

Mice of the experimental groups received once intragastrically studied substances containing candesartan cilexetil and resveratrol: 1.5 mg per 1 kg (average therapeutic dose for treatment of hypertension according to the instruction) and 50 mg per 1 kg of animal body weight [8], respectively. Animals of the control groups received 1% starch solution once intragastrically. The administered doses of the studied substances were calculated using the interspecific conversion formula: [8]:

$$A = \frac{B \times \kappa(B)}{\kappa(A)},$$

A – required dose; B – known dose; $\kappa(B)$ – conversion factor for weight B ; $\kappa(A)$ – conversion factor for weight A .

Evaluation of the effects of substances on internal organs (heart, spleen, kidneys, lungs, liver and brain) were carried out in 2 weeks after administration of candesartan cilexetil and resveratrol. The following indicators were further evaluated: body weight of animals, weight of internal organs and relative weight coefficient of internal organs (RMC).

$$RMC = \frac{A}{B} \times 1000,$$

RMC – relative weight coefficient of internal organ; A – weight of internal organ; B – body weight.

Results and discussion. Creating drugs consists of investigation of efficiency and safety of new medicines [9]. Acute toxicity of candesartan cilexetil and resveratrol in ICR mice was studied. The results of the experiment are shown in Fig. 1 and Fig. 2. Using candesartan cilexetil at 1.5 mg/kg dose and resveratrol at 50 mg/kg dose did not cause the death of mice, so the median lethal dose (LD50) was not determined. Behaviour changes in the control 1, 2 and experimental groups 1, 2 of mice during the observation period were not detected. There were no visible changes in the macroscopic picture during the autopsy. There were no significant differences between RMC of internal organs (heart, spleen, kidneys, lungs, liver, and brain) of the control and experimental groups of male and female ICR mice (Fig. 1 and Fig. 2).

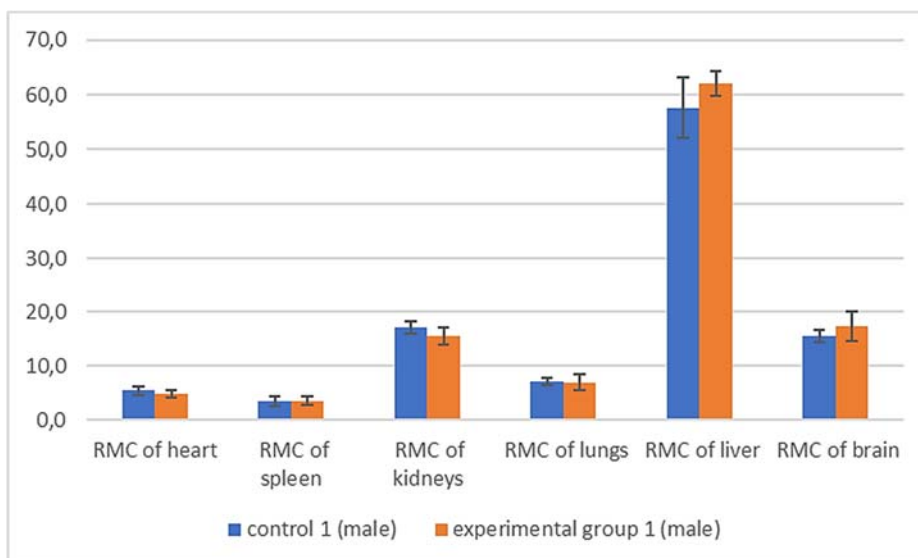


Fig. 1. RMC of internal organs under using combination of candesartan cilexetil and natural resveratrol in male ICR mice

Thus, it was established that the effect of the selected substances in the combination is not toxic. The first evidence was recorded that the combination of candesartan cilexetil with natural resveratrol is safe for animals.

Conclusions. It was found in the experiment of investigation of acute toxicity that new combination of

candesartan cilexetil and resveratrol didn't lead to death of animals in the experiment. There were no functional changes after using candesartan cilexetil with resveratrol. These results can be used in further studies aimed at elaboration of novel complex drug for treatment of diseases of cardiovascular system.

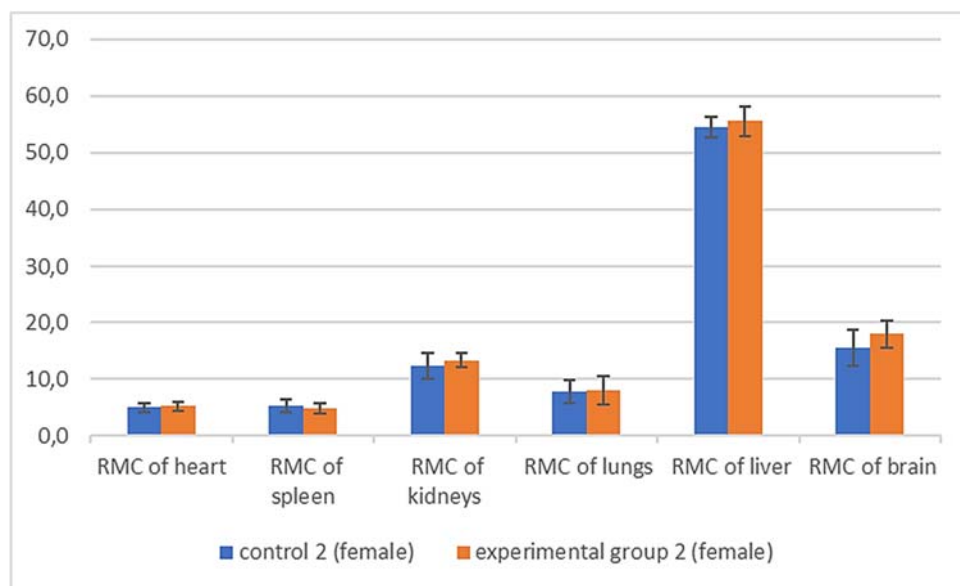


Fig. 2. RMC of internal organs under using combination of candesartan cilexetil and natural resveratrol in female ICR mice

Список використаної літератури

- Zhao D. A Meta-analysis of antihypertensive effect of telmisartan versus candesartan in patients with essential hypertension. / D. Zhao, H. Liu, P. Dong // Clin Exp Hypertens. – 2019; 41(1): 75–79.
- De Rosa M. Candesartan improves maximal exercise capacity in hypertensives results of a randomized placebo-controlled crossover trial / M. De Rosa, M. Chiariello // J. Clin Hypertens. – 2009; 11 (4): 192–200.
- Possible mechanism for the anemia induced by candesartan cilexetil (TCV-116), an angiotensin II receptor antagonist, in rats / I. Naeshiro, K. Sato, F. Chatani, S. Sato // Europ J of Pharmacology. – 1998; 354 (2/3): 179–187.
- Adi Y. Berman. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials / Adi Y. Berman, A. Rachel et al. // NPJ Precis Oncol. – 2017; 1: 35.
- Brisdelli F. Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties. / F. Brisdelli, G. D'Andrea, A. Bozzi // Curr Drug Metab. – 2009 Jul; 10(6): 530–46.
- Riba A. Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. / A. Riba, L. Deres, B. Sumegi et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017; 2017:6819281, doi: 10.1155/2017/6819281.
- Zhigang Zhang. Resveratrol, a Natural Antioxidant, Has a Protective Effect on Liver Injury Induced by Inorganic Arsenic Exposure / Zhang Zhigang, Li Gao, Yanyan Cheng et al. // BioMed Research International. – Vol. 2014, Article ID 617202. – 7 p., http://dx.doi.org/10.1155/2014/617202.
- Beliaeva A. Changing in the number of CD117+ stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters under the using of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol in vitro / A. Beliaeva, L. Garmanchuk // Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. – 2019; 3(79): 54–57.
- Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Р. У. Хабриев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
- Шилов Г. Н. Основы разработки новых лекарственных средств / Г. Н. Шилов, А. И. Хоменко, В. В. Евстигнеев. – Мед. новости. – 2009. – № 2. – С. 23–28.

Reference

- Zhao D, Liu H, Dong P. A Meta-analysis of antihypertensive effect of telmisartan versus candesartan in patients with essential hypertension. Clin Exp Hypertens 2019;41(1):75-79.

- De Rosa ML, Chiariello M. Candesartan improves maximal exercise capacity in hypertensives results of a randomized placebo-controlled crossover trial. J. Clin Hypertens. 2009; 11 (4): 192–200.
- Naeshiro I, Sato K, Chatani F, Sato S. Possible mechanism for the anemia induced by candesartan cilexetil (TCV-116), an angiotensin II receptor antagonist, in rats. Europ J of Pharmacology. 1998; 354 (2/3): 179–187.
- Adi Y. Berman, Rachel A. Motechin, Maia Y. Wiesenfeld, Marina K. Holz. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. NPJ Precis Oncol. 2017; 1: 35.
- Brisdelli F, D'Andrea G, Bozzi A. Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties. Curr Drug Metab. 2009 Jul; 10(6): 530–46.
- Riba A., Deres L., Sumegi B., Toth K., Szabados E., Halmosi R. Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017;2017:6819281. doi: 10.1155/2017/6819281.
- Zhigang Zhang, Li Gao, Yanyan Cheng, Jing Jiang, Yan Chen, Huijie Jiang, Hongxiang Yu, Anshan Shan, Baojing Cheng. Resveratrol, a Natural Antioxidant, Has a Protective Effect on Liver Injury Induced by Inorganic Arsenic Exposure. BioMed Research International. Volume 2014, Article ID 617202, 7 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2014/617202.
- Beliaeva A., Garmanchuk L. Changing in the number of CD117+ stem cells, cytogenetic and cytokinetic parameters under the using of candesartan, candesartan cilexetil and resveratrol in vitro. Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. 2019; 3(79): 54 – 57.
- Р. У. Хабриев. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд., перераб. и доп. Медицина, 2005; 832 с.
- Г. Н. Шилов, А. И. Хоменко, В. В. Евстигнеев. Основы разработки новых лекарственных средств. Мед. новости. 2009; № 2: 23–28.

Надійшла до редколегії 05.01.2021
Отримано виправлений варіант 01.01.2021
Підписано до друку 01.01.2021

Received in the editorial 05.01.2021
Received a revised version on 01.01.2021
Signed in the press on 01.01.2021

А. Беляєва, стажер, Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНАЛІЗ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН ПІД ЧАС ЗАСТОСУВАННЯ КАНДЕСАРТАНУ ЦИЛЕКСЕТИЛУ З РЕСВЕРАТРОЛОМ У ТВАРИН

Випадки широко поширених у світі захворювань серцево-судинної системи збільшилися в кілька разів. Серцево-судинні захворювання стали причинами, що є лідерами зі смертності в багатьох країнах. Нині зусилля багатьох дослідників спрямовано на вивчення і створення нових ефективніших і безпечніших препаратів та їхні комбінації для лікування патології серцево-судинної системи. Кандесартан цилексетил – антагоніст рецепторів ангіотензину II. Він використовується в медицині як антигіпертензивний засіб тривалої дії. Однак цей препарат має побічні ефекти. Ресвератрол є природним антиоксидантом і проявляє плейотропні ефекти, включаючи антиоксидантну, протизапальну, омолоджувальну, кардіопротекторну і нейропротекторну активності. Мета статті – дослідження гострої токсичності кандесартану цилексетилу і ресвератролу в комбінації *in vivo*. Для експерименту використовували самців і самок мишей ICR. Тварини отримували одноразово внутрішньошлунково кандесартан цилексетил і ресвератрол. Оцінювання впливу речовин на внутрішні органи (серце, селезінку, нирки, легені, печінку і мозок) проводили через два тижні після введення речовин. Показано, що кандесартан цилексетил із природним ресвератролом не привів до функціональних змін. Змін у поведінці за період спостереження не виявлено. Комбінація кандесартану цилексетилу, що містить ресвератрол не привела до загибелі мишей, тому середньосмертельна доза (ЛД50) не визначалася. Нова комбінація речовин була безпечною. Побічні ефекти не зареєстровано. Поснавання кандесартану цилексетилу, що містить ресвератрол, не токсичне, і використання цих речовин є безпечним для тварин.

Ключові слова: серцево-судинні захворювання, кандесартан цилексетил, ресвератрол, гостра токсичність.

А. Беляева, стажер, Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КАНДЕСАРТАНА ЦИЛЕКСЕТИЛА С РЕСВЕРАТРОЛОМ У ЖИВОТНЫХ

Случаи широко распространенных в мире заболеваний сердечно-сосудистой системы увеличились в несколько раз. Сердечно-сосудистые заболевания стали лидирующими причинами смертности во многих странах. В настоящее время усилия многих исследователей направлены на изучение и создание новых более эффективных и безопасных препаратов и их комбинации для лечения патологии сердечно-сосудистой системы. Кандесартан цилексетил – антагонист рецепторов ангиотензина II. Он используется в медицине в качестве антигипертензивного средства длительного действия. Однако этот препарат обладает побочными эффектами. Ресвератрол – естественный антиоксидант. Это вещество проявляет плейотропные эффекты, включая антиоксидантную, противовоспалительную, омолаживающую, кардиопротекторную и нейропротекторную активности. Цель статьи – исследование острой токсичности кандесартана цилексетила и ресвератрола в комбинации *in vivo*. Для эксперимента использовали самцов и самок мышей ICR. Животные получали однократно внутривенно кандесартан цилексетил и ресвератрол. Оценку влияния веществ на внутренние органы (сердце, селезенку, почки, легкие, печень и мозг) проводили через 2 недели после введения веществ. Было показано, что кандесартан цилексетил с природным ресвератролом не привел к функциональным изменениям. Изменений в поведении за период наблюдения не обнаружено. Комбинация кандесартана цилексетила с ресвератролом не привела к гибели мышей, поэтому среднесмертельная доза (ЛД50) не определялась. Новая комбинация веществ была безопасной. Побочные эффекты не зарегистрированы. Сочетание кандесартана цилексетила с ресвератролом не токсично, и использование этих веществ безопасно для животных.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, кандесартан цилексетил, ресвератрол, острая токсичность.

УДК 581.526.13 (477:292.452)
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.27–34

Л. Мацап'як, пров. наук. співроб.
Національний природний парк "Верховинський", с. Верхній Ясенів, Україна

РАРИТЕТНИЙ ФІТОГЕНОФОНД НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ "ВЕРХОВИНСЬКИЙ" І ЙОГО АНАЛІЗ

Про важливість збереження біотичного різноманіття зазначено у багатьох міжнародних документах, зокрема у "Конвенції з біологічного різноманіття" (Ріо-де-Жанейро, 1992). У цьому контексті на особливу увагу заслуговують рідкісні види, які є найвразливішими, оскільки раритетність передусім вимірюється (Darwin, 1859). Особливо актуальними є дослідження рідкісних видів в Українських Карпатах, що є найменш антропогенно зміненою територією України. Збереження біотичного різноманіття у цьому регіоні має загальноєвропейське значення, що відображено у міжнародній "Рамковій конвенції про охорону і сталий розвиток Карпат" (Київ, 2003). Кількісна і якісна характеристики раритетного фітогенотипу дозволяють охарактеризувати рівень унікальності флори, слугують основою для формування Регіональних Червоних списків і дозволяють організувати адекватні природоохоронні заходи. Созологічна характеристика флор різного рівня передбачає, перш за все, аналіз представленості таксонів, що є в її складі і занесені до червоного списку різного рівня – міжнародних, національних, регіональних. Раритетний компонент флори Національного природного парку "Верховинський" містить 125 видів судинних рослин, які мають міжнародний, національний і регіональний созологічний статус. З них 64 види рослин занесені до Червоної книги України, 3 види – до Червоного списку МСОП, 7 видів занесені до Європейського Червоного списку, 2 види – до Додатку I Бернської конвенції, 2 види – до Додатку IIb і IVb Директиви ЄС про збереження типів оселищ і видів природної фауни і флори. 21 вид занесений до Додатку II CITES, 26 видів – до Регіонального Червоного списку. Таким чином на території Парку охороняється третина (32,3 %) "червонокнижних" видів судинних рослин Івано-Франківської області, а це складає 29,9 % "червонокнижних" видів рослин Українських Карпат. Провідні родини раритетного компонента флори Парку "Верховинський" – Orchidaceae. Другу і третю позиції займають родини Ranunculaceae і Asteraceae. Загалом на частку перших трьох родин припадає 39,6 % видового складу списку. Загалом перші дев'ять таксонів охоплюють більше двох третин (64,9 %) видового складу списку. За результатами хорологічного аналізу встановлено, що найбільша кількість рідкісних видів та їхніх локалітетів зосереджена на гірських масивах: Гнетеса-Фатія Банулуї, Прелуки-Хитанка, Лостун-Глистувата, Палениця-Команова, найраритетніші види приурочено до середньогірського поясу.

Ключові слова: поширення, рідкісні види, збереження, флора, раритетний компонент, НПП "Верховинський", Чивчино-Гринявської зори.

Вступ. Національний природний парк "Верховинський" (далі – НППВ) створено Указом Президента України від 22 січня 2010 р. (№ 58/2010) в адміністративних межах Верховинського району Івано-Франківської області, загальною площею 12022,9 га.

Унікальні природні флористичні комплекси регіону є резерватами багатьох раритетних видів, що охороняються на міжнародному, державному та регіональному рівнях. Це зумовлено насамперед особливостями геологічної будови – порівняно значною присутністю тут вапняків, які є вкрай рідкісними в українській частині Східних Карпат. Чивчинські гори розташовані на прикордонні з Румунією. Майже вся українська частина Чивчинських гір приурочена до помірних висот, які відповідають лісовому поясу, і лише окремі вершини (масиви гір Команова-Палениця-Гнетеса на його південно-східному краї) належать до високогір'я. З огляду на певні кліматичні особливості первинний лісовий покрив тут представлено майже винятково хвойними лісами з домінуванням смереки і ялиці за відсутності смуги букових лісів. У Чивчинських горах чітко виражено поясний розподіл рослинності. Специфічним є

те, що у зв'язку із загальним підняттям цього району передгірний пояс, який ми спостерігаємо в інших районах Українських Карпат, тут відсутній. Ця обставина зумовлює виокремлення тут двох поясів – гірський лісовий (монтанний) і субальпійський пояси. Хоча на окремих вершинах Гнетеса (1769 м), Команова (1734 м) зустрічаються характерні види рослин, що приурочені до альпійського поясу [10, 13].

Унаслідок багатовікового випасання і супутньої антропогенної діяльності лісову рослинність на значних площах, переважно на верхівках гірських хребтів, перетворено на вторинні полонини, які заселили високогірні лучні види. Нині антропогенну діяльність тут практично припинено, а рослинність і флора регіону зазнають досить помітних демутаційних змін. Причому чисельність одних видів зростає, натомість інших – зменшується. Тому обґрунтування і розроблення заходів охорони раритетних видів рослин НППВ на підставі всебічного дослідження їхніх біоекологічних особливостей, інвентаризації всіх локалітетів та оцінювання реального стану регіональних популяцій є актуальними.

За фізико-географічним районуванням переважна більшість території парку "Верховинський" розміщена в межах Рахівсько-Чивчинської, а четверта частина – Полонинсько-Чорногірської областей Українських Карпат [10].

За геоботанічним районуванням (Національний атлас України, 2008) територія належить до Свидовецько-Покутсько-Мармароського округу Східно-Карпатської гірської підпровінції Центрально-європейської провінції Європейської широколистяно-лісової області [2].

Історія ботанічних досліджень цієї території бере свій початок в 80-х рр. минулого століття. Першим значним дослідженням видового складу Чивчинських гір були праці Г. Запаловича (Zapalowicz, 1889; 1906; 1908; 1911). Він увів у літературу й назву цього регіону – Чивчинські гори. У своїй праці "Poslinnas zlata gor Pockuko-Marmotoskich" (1889) автор ретельно описав розташування оселищ рідкісних видів на досліджуваній території [23].

Подібні за формою викладу дослідження наприкінці XIX ст. провів Е. Волощак (Woloszczak) [22].

На початку XX ст. цікаві флористичні відомості подав польський ботанік М. Раціборський У 20-х рр. минулого століття в Чивчинах екскурсував Т. Вільчинський (Wilczynski, 1928), який уперше відкрив зростання тут *Saussurea porcii* Degen (1928) та *Erigeron alpinus* L. У 30-х рр. рослинність указаної території досліджував Г. В. Козій (Kozij, 1934) [12].

У середині 30-х рр. група польських дослідників – Б. Павловський, С. Павловська, Я. Валас, Т. Сульма, С. Сьродонь і Ц. Мондальський розпочали докладне і всебічне вивчення рослинного покриву цього району. У результаті цих досліджень 1948 р. Б. Павловський опублікував цікаву працю "Ogólna charakterystyka geobotaniczna Gór Czuwczuńskich", де міститься багато відомостей про рідкісні види [18].

У повоєнний час Чивчинським горам ботаніки приділили мало уваги, оскільки територія характеризується значною віддаленістю та важкою доступністю, що залишало їх осторожні від "традиційних ботанічних маршрутів".

Найважливіший внесок у дослідженні рідкісних видів Українських Карпат належить ботаніку К. А. Малиновському (1950–1960 рр.), результати досліджень якого наведено у фундаментальній монографії "Рослинність високогір'я Українських Карпат" [6].

Вивчення високогірної флори у 60-х рр. проводив В. І. Чопик [10]. Надалі з'являються тільки повідомлення щодо знахідок окремих видів чи характеристика поширення представників окремих таксономічних груп. Відомості останніх років про флору і рослинність Чивчинських гір містяться у працях українських ботаніків І. І. Чорней і В. В. Буджак, М. В. Величко [12, 13], а також у різних "Флорах", "Визначниках", "Червоних книгах". Однак усе ще бракує конкретних даних щодо багатьох рідкісних видів, що могло б слугувати основою для окреслення перспектив їхнього збереження.

Об'єкти та методи дослідження. Метою публікації є встановлення видового складу раритетного компонента флори НППВ із подальшим здійсненням критико-таксономічного, біоморфологічного, еколого-ценотичного аналізів, визначення соціологічної цінності флори раритетного компонента парку, встановлення основних видів за-

гроз, що існують для раритетних видів флори на території НПП "Верховинський", визначення місця дії кожної із загроз, пропонування заходів щодо зменшення дії чинників негативних впливів на території НППВ.

Дослідження проводили напівстаціонарним і маршрутним методами протягом 2013–2019 рр. Маршрутним методом була охоплена вся територія НППВ. Найбагатші у флористичному відношенні ділянки відвідували по декілька разів у різні періоди польового сезону. Для складання флористичного списку використані гербарні збори із цього регіону, які зберігаються в гербаріях Чернівецького національного університету імені Ю. Федьковича, Державного природознавчого музею НАН України (м. Львів), а також матеріали літературних джерел. Номенклатура таксонів наведена за S. Mosyakin, M. Fedoronchuk (1999) [16]. Аналіз біоморфологічної структури флори проведено з використанням класифікації біологічних типів [20] (Raunkiaer, 1934). Для розгляду екологічних особливостей видів урахувувалися такі обмежувальні фактори: волога, тропність і хімізм субстрату методом фітоіндикації (Дідух, Плюта, 1984) [3]. Созологічну оцінку флори здійснено з урахуванням підходів К. А. Малиновського зі співавторами (2002) [6] і з використанням критеріїв, розроблених Міжнародним союзом охорони природи (IUCN Red List categories, 1994) [15].

Результати та обговорення. За результатами власних польових досліджень, літературних матеріалів та опрацювання гербарних зборів встановлено, що раритетний компонент флори НППВ представлено 125 видами. З них 64 види рослин занесено до Червоної книги України, 3 види – до Червоного списку МСОП, 7 видів – до Європейського Червоного списку, 2 види – до Додатку I Бернської конвенції, 2 види – до Додатку IIb і IVb Директиви ЄС про збереження типів оселищ і видів природної фауни і флори. 21 вид занесено до Додатку II CITES, 26 видів – до Регіонального Червоного списку.

За літературними даними Червоної книги судинних рослин Карпат налічує 307 видів і 37 підвидів, з них на території Українських Карпат ростуть 125 видів (36,3 %). У флорі Чивчинських гір представлено 35 видів із цього списку, що складає 10,2 % загальної кількості цих видів у Карпатах і 28 % кількості цих видів в Українській частині Карпат [12, 21].

До Червоної книги України занесено 141 вид флори Українських Карпат. З них на території Парку ростуть 64 види (45,3 %).

До Європейського Червоного списку занесено 7 видів флори Парку. На території Українських Карпат ростуть 11 видів із цього списку.

До Червоного списку МСОП на території парку занесено 3 види. На території Українських Карпат ростуть 7 видів із цього списку.

До переліку видів, що підлягають охороні за додатком I Бернської конвенції, в Українських Карпатах віднесено 11 видів. У парку ростуть 4 з них.

Наведені вище дані свідчать, що на території НПП "Верховинський" представлена більшість видів, які в Українських Карпатах занесені до офіційних міжнародних соціологічних переліків видів, що є свідченням унікальності цього регіону Українських Карпат (табл. 1).

Таблиця 1. Представленість видів флори НПП "Верховинський" в офіційних соціологічних списках

Назва офіційного соціологічного списку видів	Кількість видів у парку "Верховинський"	Відсоток загальної кількості видів в Українських Карпатах
Світовий Червоний список	3	42,8
Європейський Червоний список	7	63,6
Додаток I Бернської конвенції	4	36,3
Червоний список Карпат	35	28,0
Червона Книга України	64	45,3

Серед цих видів є дуже рідкісні, відомі з поодиноких локалітетів, які є компонентами унікальних біотопів (*Elisanthe zawadskii* – ендемік Південних і Східних Карпат, *Saussurea porcii* – ендемік Східних Карпат, один із найрідкісніших видів карпатської флори, *Parmica tenuifolia* – ендемік Південних і Східних Карпат, *Botrychium multifidum* –

дуже рідкісний вид), але є й досить поширені, відомі з багатьох оселищ у різних регіонах Українських Карпат (*Primula poloninensis*, *Pulmonaria filarszkiana*, *Silene dubia*, *Campanula abietina*).

Аналіз систематичної структури видів флори Парку, занесених до офіційних зоологічних переліків видів, подано в табл. 2.

Таблиця 2. Провідні родини раритетного компонента флори НПП "Верховинський"

№ з/п	Родини	Кількість видів	Відсоток загальної кількості видів
1	<i>Orchidaceae</i>	20	25,6
2	<i>Ranunculaceae</i>	6	7,6
3	<i>Asteraceae</i>	5	6,4
4	<i>Caryophyllaceae</i>	4	5,1
5-8	<i>Cyperaceae</i>	3	3,8
5-8	<i>Cystopteridaceae</i>	3	3,8
5-8	<i>Campanulaceae</i>	3	3,8
5-8	<i>Poaceae</i>	3	3,8
6-9	<i>Gentianaceae</i>	2	2,5
6-9	<i>Ophioglossaceae</i>	2	2,5

Установлено, що найбільшим видовим багатством відзначається родина *Orchidaceae*, що є наслідком високого рівня представленості в регіоні бореальних видів орхідей – *Corallorhiza trifida* Chatel., *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó, *D. maculata* (L.) Soó, *Coeloglossum viride* (L.) C. Hartm., *Epipactis atrorubens* (Hoffm. ex Bernh.) Besser, *E. helleborine* (L.) Crantz, *Goodyera repens* (L.) R. Br., *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br., *Listera cordata* (L.)

R. Br., *L. ovata* (L.) R. Br., *Malaxis monophyllos* (L.) Sw., *Pseudorchis albida* (L.) та деякі ін. Усі представники цієї родини у флорі України занесені до Червоної книги України. Другу і третю позиції займають види родин *Ranunculaceae* і *Asteraceae*. Загалом на долю перших трьох родин припадає 39,6 % (табл. 2.) видового складу списку. Загалом перші дев'ять таксонів охоплюють більше двох третин (64,9 %) видового складу списку.

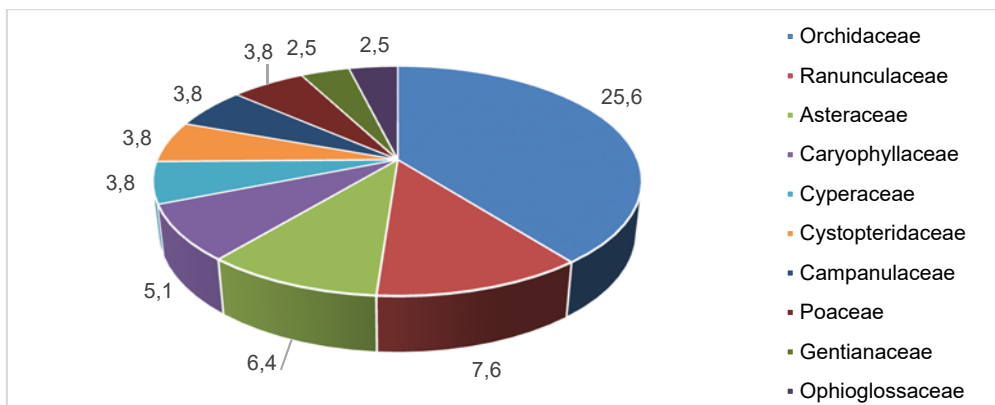


Рис. 1. Спектр провідних родин раритетного компонента флори НПП "Верховинський"

Отже, спектри провідних родин раритетного компонента флори НППВ (рис. 1) свідчать про її монтанно-бореальний характер [13]. Крім цього, слід зазначити, що всі види родини *Orchidaceae*, а також *Galanthus nivalis* L. включено до переліку CITES, на території НППВ їх зафіксовано 21 вид [14].

Аналіз біоморфологічної структури. Згідно з результатами біоморфологічного аналізу за типами життєвих форм І. Г.Серебрякова [8] серед рідкісних видів переважають багаторічні трав'янисті рослини 72 (92,3 %),

малорічники складають 2 (2,5 %) види, кущі – 3 (3,8 %), дерева – 1 (1,2 %).

У спектрі біологічних типів (Raunkiaer, 1934) переважають гемікриптофіти – 38 видів (48,7 %), на другому місці геофіти – 24 види (30,7 %), наступні позиції займають хамефіти – 7 (8,9 %) криптофіти – 5 видів (6,4 %), фанерофіти – 2 види (2,5 %) й ентомофіли – 2 (2,5 %) [20].

У цілому спектр життєвих форм флори НППВ (рис. 2) досить типовий для флор помірної зони й аналогічних ландшафтно-кліматичних умов і корелює з фізико-географічними, ґрунтово-кліматичними та фітоценотичними умовами досліджуваної території [6, 10, 21].

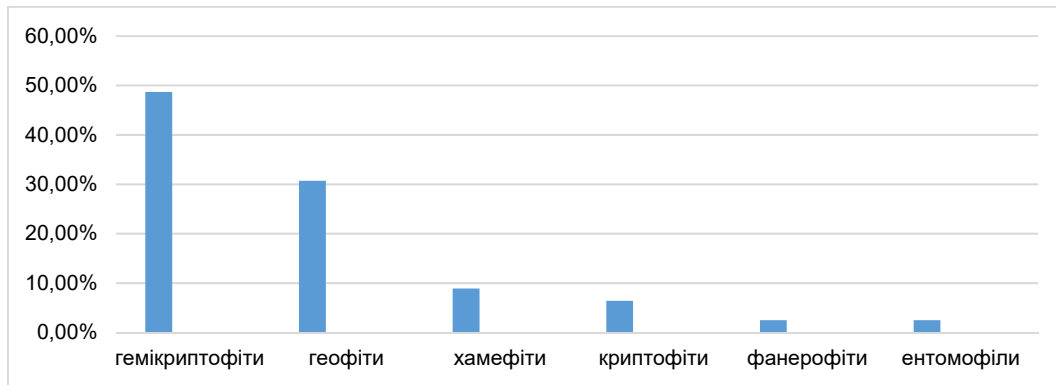


Рис. 2. Спектр життєвих форм рідкісних видів флори НПП "Верховинський"

Екологічний аналіз. Проведений екологічний аналіз щодо режиму зволоження вказує, що переважна кількість рідкісних видів зростають в умовах з середнім та підвищеним рівнем зволоження: мезофіти складають 46 (58,9 %) видів, гігрофіти – 9 (11,5 %), гігромезофіти – 8

(10,2 %), мезогігрофіти – 6 (7,6 %), ксеромезофіти – 2 (2,5 %), мезоксерофіти – 1 (1,2 %) [3,9].

Розподіл раритетних видів флори НПП "Верховинський" за еколого-ценотичною приуроченістю представлено в табл. 3.

Таблиця 3. Кількісний розподіл раритетних видів флори НПП "Верховинський" за еколого-ценотичною приуроченістю

Еколого-ценотичні групи	Кількість раритетних видів	Відсоток загальної кількості раритетних таксонів
Сильванти	14	14,7
Пратанти	40	42,1
Палюданти	15	15,7
Петрофанти	26	27,3
Акванти	–	–

Як свідчать дані табл. 3, найбільша кількість раритетних видів належить до групи пратантів – ростуть у складі лучних екосистем. Найцінніші серед них, які в першу чергу потребують уваги соціологічного характеру, є такі.

Чорнянка (нігрітеля) карпатська (*Nigritellacarpatica* (Zarafa.) Terrestrial) – дуже рідкісний реликтовий ендемічний вид, вузьколокальний східнокарпатський ендемік, один із найрідкісніших видів світової флори, відомий із шести локалітетів [9, 11, 19], один з яких розміщено на території паркуна полонини Прелука, ценопопуляція у складі угруповання *Festucetum saxatilis* налічує близько 20 генеративних особин, а в складі *Caricetum sempervirentis* – понад 50 особин;

Крім того, з поодиноких місцезнаходжень на території Парку відомі такі представники групи пратантів: *Botrychium multifidum* (S. G. Gmel.) Rupr., *Ophioglossum vulgatum* L., *Allium victorialis* L., *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Centaurea kotschyana* Heuffel ex Koch, *Tephrosia papposa* (Rchb.) Schur, *Lathyrus laevigatus* (Waldst. et Kit.) Fritsch, *Gentiana acaulis* L., *Aconitum lasiocarpum* (Rchb.) Gayer.

Лучні угруповання і раритетні види, які ростуть у їхньому складі, потребують особливої уваги на території парку у зв'язку із занепадом тваринництва в регіоні і припиненням викошування та випасання значної частини лук. В останні роки вони інтенсивно заростають лісом, що призводить до зміни екологічних параметрів місцезростань (освітленості, кислотності, трофності), зміни видового складу і, зокрема, скорочення чисельності або й випадання з травостою раритетних видів. У зв'язку із цим потрібен постійний моніторинг стану популяцій цих видів і застосування активних методів охорони.

Друга за чисельністю група це петрофанти – види наскельних угруповань. У складі цієї групи ростуть унікальні в соціологічному відношенні види, які приурочені до

карбонатних відслонень і відомі в Україні з поодиноких місцезростань. Серед них: *Cystopteris montana* (Lam.) Bernh. ex Desv., *Silenanthe zawadskii* (Herbich) Griseb. et Schenk., *Jovibarba hirta* (L.) Opiz.

Серед петрофантів, що потребують постійного контролю за станом популяцій, належать: *Epipactis atrorubens* (Hoffm. ex Bernh.) Besser, *Festuca saxatilis* Schur, *Carduus defloratus* L. subsp. *Glaucus* Nyman, *Campanula kladniana* (Schur) Vitasek, *Scabiosa lucida* Vill. subsp. *Barbata* E.I. Nyarady, *Aconitum lasiocarpum* (Rchb.) Gayer. Основна загроза їхньому існуванню – заростання карбонатних відслонень деревно-чагарниковою рослинністю, що призводить до скорочення площі придатних для їхнього існування екоотопів. У зв'язку із цим, також потрібен постійний моніторинг за станом популяцій цих видів і застосування активних методів охорони.

Майже однакова кількість рідкісних видів Парку належать до палюдантів та сильвантів. Серед палюдантів – видів, які ростуть у складі болотних екосистем, також присутні дуже цінні у природоохоронному відношенні види. До них належить товстянка альпійська (*Pinguicula alpina* L.) – високогірний вид, який на території Парку міститься на нижній межі зростання. А також такі види як: *Gymnadenia densiflora* (Wahlenb.) A. Dietr., *Listera cordata* (L.) R.Br., *Sparganium minimum* Wallr., *Menyanthes trifoliata* L., *Swertia perennis* L., *Tozzia carpatica* Wolf.

Найменше раритетних видів НППВ належить до групи сильвантів – лісових видів, незважаючи на те, що лісовий тип рослинності займає домінуюче положення на території Парку. Серед цих видів слід звернути увагу на гудієру повзучу (*Goodyera repens* (L.) R.Br.) – невелика ізольована популяція якої відома з урочища "Прелуки" (рис. 3).

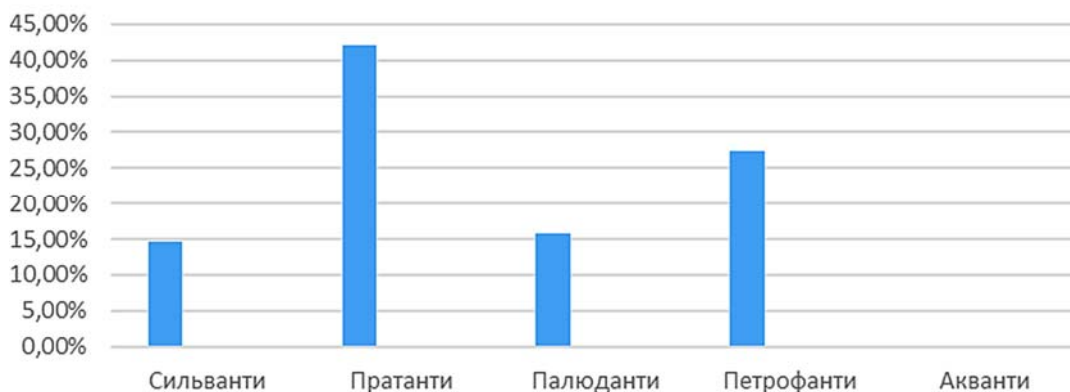


Рис. 3. Кількісний розподіл раритетних видів флори НПП "Верховинський" за еколого-ценотичною приуроченістю

Подамо в табл. 4 розподіл раритетних видів флори НПП "Верховинський" за окремими гірськими масивами.

Таблиця 4. Розподіл раритетних видів флори НПП "Верховинський" за окремими гірськими масивами

Гірські масиви	Кількість раритетних видів	Кількість раритетних видів згідно зі списками			
		СЧС	ЄЧС	БЕРН	ЧКУ
Гнетеса-Фатія Банулуї	44	2	4	1	37
Прелуки-Хитанка	42	2	5	3	32
Глистувата	18	–	2	1	15
Палениця-Команова	21	1	3	1	16
Ротундул	24	–	3	1	20
Лостун	26	2	4	1	19
Попадя	24	1	4	2	17
Мокрин	26	2	4	1	19

Відповідно до цих даних можна виділити 4 групи гірських масивів:

I група – найвищої созологічної цінності – (Гнетеса-Фатія Банулуї) – 44 раритетних види, вони досить великі за площею й охоплюють два висотні пояси – верхній лісовий і субальпійський.

II група – високої созологічної цінності – (Прелуки-Хитанка) – 42 види. Рівень екологічного різноманіття нижчий, особливо щодо болотних екоотопів.

III група – середньої созологічної цінності (Ротундул, Попадя, Лостун, Мокрин) – 24-26 видів. Площа, яку займають ці масиви, майже однакова, вони містяться в основному в межах верхнього лісового поясу, виходи вапняків мають локальний характер.

IV група – низької созологічної цінності – (Глистувата, Палениця-Команова) – 18-21 вид. Глистувата – це болота і пасовищні луки, а Палениця і Команова – гірсько-соснове криволісся і пасовищні луки. Виходи вапнякових порід відсутні.

За кількістю видів із Світового Червоного списку в усіх групах гірських масивів налічується по 1-2 види. Види з Європейського Червоного списку трапляються

практично у всіх масивах (*Pulmonaria filarszkyana*, *Primula poloninensis*, *Silene dubia*) інші (*Saussurea porcii*, *Heracleum carpaticum*, *Elisanthe zawadskii*) трапляються у 2-5 масивах.

Щодо рослин з Червоної книги України за кількістю таких видів можна виділити 2 групи. Перша – Прелуки-Хитанка і Гнетеса-Фатія Банулуї, які налічують 32-37 червонокнижні види, друга група – решта гірських масивів, які налічують від 15 до 20 видів [9, 11].

У табл. 5 показано рівень созологічної значущості різних масивів досліджуваної території Парку за кількістю в їхніх межах раритетних видів різних груп рідкості. Виділені такі групи рідкості [12]:

- 1) дуже рідкісні види, відомі в регіоні тільки з 1 місцезнаходження;
- 2) рідкісні види, відомі до 5 місцезнаходжень;
- 3) поширені спорадично, відомо до 10 місцезнаходжень;
- 4) трапляються часто, відомо до 20 місцезнаходжень;
- 5) звичайні в регіоні види, відомі понад 20 місцезнаходжень.

Таблиця 5. Рівень созологічної значущості окремих масивів НПП "Верховинський"

Гірські масиви	Кількість раритетних видів	Групи рідкості				
		Дуже зрідка	Зрідка	Спорадично	Часто	Звичайно
Гнетеса-Фатія Банулуї	44	4	24	4	6	6
Прелуки-Хитанка	42	4	21	4	7	6
Глистувата	18	2	5	1	1	9
Палениця-Команова	21	1	9	1	2	8
Ротундул	24	1	8	1	7	7
Лостун	26	3	12	1	4	6
Попадя	24	1	9	2	4	8
Мокрин	26	1	13	2	4	6

За цим показником на кожному із цих масивів є види, які більше ніде в Чивчинах не ростуть. Чотири види відомі тільки з масивів Гнетеса-Фатія Банулії (*Pulsatilla ascherfelii* (Ullep.) Skalicky, *Primula halleri*, *Cirsium heterophyllum*, *Carex rupestris* All.) і Прелуки-Хитанка (*Botrychium matricariifolium* (A. Braun ex Doll) W. D. J. Koch, *Lathyrus subalpinus*, *Aster alpinus* L., *Erigeron alpinus* L.). Три дуже рідкісні види ростуть на г. Лостун (*Erysimum hungaricum* Zapal., *Conioselinum tataricum* Hoffm, *Gagea fistulosa* Ker-Gawl.), два – на полонині Глистувата (*Dactylorhiza incarnata* (L.), *Carex xhartmanii* Cajander), по одному – на масиві Палениця-Команова (*Aira caryophillea* L.), хр. Ротундул (*Drosera rotundifolia* L.) [5, 10, 11, 13].

Таким чином, за рівнем созологічної значущості на території НПП "Верховинський" виділяють чотири гірські масиви, де зосереджена найбільша кількість раритетних видів флори: Гнетеса-Фатія Банулії, Прелуки-Хитанка, Лостун-Глистувата, Палениця-Команова. Водночас, у межах кожного масиву зосереджена значна кількість рідкісних видів, зокрема й унікальних. Це є свідченням високого рівня созологічної цінності всієї території НПП "Верховинський" [11, 13, 19, 23].

Особливості флори судинних рослин НПП "Верховинський", передусім тієї його частини, що належить до Чивчинських гір, є велика кількість ендемічних таксонів. Серед них ендеміки Східних Карпат, ендеміки Південних і Східних Карпат, ендеміки Західних і Східних Карпат, загальнокарпатські ендеміки [6, 11, 12].

У складі досліджуваної флори виявлено 54,3 % ендемічних таксонів із зведеного списку ендеміків Українських Карпат [21]. Їхній розподіл за ареалогічними групами такий: переважають південносхіднокарпатські ендеміки, а найменша частка припадає на загальнокарпатські та західносхіднокарпатські. Найбагатшими на ендеміки є родини Asteraceae, Rosaceae, Ranunculaceae, Campanulaceae, Rubiaceae [6, 11].

На території НПП "Верховинський" наявні: *Delphinium elatum* subsp. *nacladense*, *Minuartia verna* subsp. *oxypetala*, *Silenanthe zawadskii*, *Armeria pocutica*, *Erysimum wittmannii* subsp. *transsilvanicum*, *Thlaspi pawlowskii*, *Galium pawlowskii*, *Gymnadenia carpatica*, що свідчить про високий ступінь індивідуальності флори Чивчинських гір [11].

Із занепадом полонинського господарства й обезлюдненням території, де розташований НПП "Верховинський", через припинення викошування і випасу лучні ділянки заростають лісом, що є причиною випадання зі складу лучних угруповань раритетних видів флори. Разом із тим в останні десятиліття через збільшення температури відбувається підвищення верхньої межі лісу, через що заростають і затінуються відслонення і осипища карбонатних порід, які містяться на вершинах Прелуки, Гнетеса, Фатія Банулії, Мокринів Камінь, Лостун, Мінчель та ін. У складі угруповань, які приурочені до цих відслонень, росте багато раритетних видів флори, деякі з них унікальні для флори України. Проте порушення гідрологічного режиму, пов'язане в останні роки з тривалими бездощовими періодами, призводить до скорочення площі й чисельності популяцій цих видів.

Крім того, є потенційні загрози для раритетних видів флори, що зумовлені особливостями поширення цих рослин у регіоні, чисельністю, щільністю й еколого-ценотичною приуроченістю їхніх популяцій.

Для більшості раритетних видів (36) на території НППВ найбільшою потенційною загрозою є вузькоспеціалізовані вимоги до екологічної ніші. Для 27 видів – це скельні карбонатні відслонення, для решти видів – це карбонатні приджерельні та прируслові болота. 33 рарите-

тні види представлено на території НППВ однією або декількома популяціями. Для 27 видів, які трапляються переважно у складі угруповань сінокісних лук, основна загроза – це припинення викошування. 25 раритетних видів представлені невеликими за розмірами популяціями. Для 19 видів, поширених в основному на полонинах і луках, основна загроза – це сільватизація їхніх оселищ, 16 – це вузькоареальні види, для 14 властива низька щільність популяцій, для 12 болотних видів – це порушення гідрологічного режиму, для 8 – проведення лісогосподарських заходів.

Заплановані заходи:

- прорідження лісових заростей поблизу карбонатних відслонень (вершини гір Гнетеси, Прелук, Ротундула, Мокриногова Каменя) у зимовий період за наявності снігового покриву;
- регулярне сінокошення, регламентований випас худоби, вирубування чагарникових заростей;
- картування популяцій, моніторинг їхньої чисельності, щільності й життєвого стану;
- вирощування посадкового матеріалу exsitu з подальшою реінтродукцією для підтримання і збільшення чисельності популяцій;
- проведення лісогосподарських заходів (санітарні й інші види рубок) тільки за наявності снігового покриву;
- заборона будь-яких меліоративних заходів, облаштування водозаборів, вирубування навколишніх лісових ділянок.

Очікувані результати:

- збереження та підтримання видового багатства і структури лучних угруповань, попередження заростання їх лісовою рослинністю;
 - збереження популяцій раритетних видів у місцезростаннях, що відповідають їхнім потребам.
- Природоохоронні заходи в межах території НППВ спрямовано на зменшення впливу антропогенних і негативних природних чинників на рослинний покрив, як найбільш вразливий компонент природних екосистем. Метою цих заходів є запобігання збідненню видового, популяційного й екосистемного фіторізноманіття, спрощення структури фітоценозів, підтримка чисельності, щільності й життєвого стану популяцій раритетних видів флори.

Висновки.

1. Розподіл рідкісних та тих, що перебувають на межі зникнення, видів флори НПП "Верховинський" становить 78 видів, які належать до 3 відділів, 28 родин, 71 родів. За результатами аналізу систематичної структури зазначається, що найбільше видів із них належить до родини Orchidaceae. Другу і третю позиції займають родини Ranunculaceae і Asteraceae. Загалом на долю перших трьох родин припадає 39,6 % видового складу. Отже, спектри провідних родин раритетного компонента флори НПП "Верховинський" свідчать про її монотаннобореальний характер.

2. На основі вивчення біоморфологічної структури раритетного компонента флори встановлено, що серед рідкісних видів переважають багаторічні трав'янисті рослини 72 види (92,3 %), малорічники складають 2 види (2,5 %), кущі – 3 (3,8 %), дерева – 1 (1,2 %). У спектрі біологічних типів [20] (Raunkiaer, 1934) переважають гемікриптофіти – 38 видів (48,7 %), на другому місці перебувають геофіти – 24 види (30,7 %), що в цілому відповідає комплексу природних умов досліджуваної території.

3. Аналіз екологічної структури раритетного компонента флори вказує на переважання у її складі ме-

зофітів, а також значної участі гігрофітів, що відображає регіональну специфіку вертикальної поясності досліджуваної території.

4. Кількісний розподіл раритетних видів флори НПП "Верховинський" за еколого-ценотичною приуроченістю найбільше раритетних видів належать до групи пратантів – ростуть у складі лучних екосистем – 42,1 %. Друга за чисельністю група це петрофанти – 27,3 %. Майже однакова кількість рідкісних видів Парку належить до палюдантів і сільвантів (14,7–15,7) %. Найменше раритетних видів НПП належать до групи сільвантів – лісових видів, незважаючи на те, що лісовий тип рослинності займає домінуюче положення на території парку – 14,7 %.

5. Про високу соціологічну цінність території НПП "Верховинський" свідчить зростання тут 3 видів з Світового Червоного списку, 7 – з Європейського Червоного списку, 4 – з Бернської конвенції, 64 – з Червоної книги України. До регіонально рідкісних віднесено 26 видів флори.

6. За результатами регіонального хорологічного аналізу встановлено, що найбільша кількість рідкісних видів та їхні локалітети зосереджена на гірських масивах: Гнетеса-Фатія Банулуї, Прелуки-Хитанка, Лостун-Глистувата.

7. Установлено, що в межах території Парку ростуть 71,4 % види флори Українських Карпат, яким загрожує зникнення у глобальному масштабі, 36,4 % – в європейському масштабі, 47,8 % ендеміків і 54,2 % субендеміків Українських Карпат.

8. Особливу загрозу втрати видового різноманіття становить демультикація дуже рідкісних і для території досліджень, і для Українських Карпат у цілому, вторинних післялісових кальцефільних лучних угруповань, де трапляються рідкісні лучні види, таких як *Nigritella carpatica*, *Minuartia oxypetala* та ін.

Список використаної літератури

1. Визначник рослин Українських Карпат / за ред. В. І. Чопика. – К. : Наук. думка, 1977. – 434 с.
2. Геоботаничне районування Української РСР. – К. : Наук. думка, 1977. – 304 с.
3. Дідух Я. П. Фітоіндикація екологічних факторів / Я. П. Дідух, П. Г. Плюта. – К. : Наук. думка, 1994. – 280 с.
4. Каталог видів флори і фауни України, занесених до Бернської конвенції про охорону дикої флори і фауни та природних середовищ існування в Європі. Вип. 1. Флора / за ред. В. І. Чопика. – К. , 1999. – 20 с.
5. Кобів Ю. Й. Екологічні особливості оселищ рідкісних видів рослин Українських Карпат / Ю. Й. Кобів // Укр. ботан. журн. – 2010. – Т. 67. – № 3. – С. 350–372.
6. Рідкісні, ендемічні, реликтові та погранично-ареальні види рослин Українських Карпат / К. Малиновський, І. Царик, В. Кияк, Ю. Нестерук. – Львів : Ліга-Прес, 2002. – 76 с.
7. Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України (довідкове видання) / укл. : Т. Л. Андрієнко, М. М. Перегрим. – К. : Альтерпрес, 2012. – 148 с.
8. Серебряков И. Г. Жизненные формы высших растений и их изучение. Полевая геоботаника / И. Г. Серебряков. – М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1964; 3: 146–205.
9. Червона книга України. Рослинний світ / Міністерство охорони навкол. природ. середовища України, НАН України; за ред. Я. П. Дідуха. – К. : Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
10. Чопик В. І. Ботаніко-географічна характеристика Чивчино-Гринявських гір в Українських Карпатах / В. І. Чопик // Укр. ботан. журн. – 1969. – Т. 26. – № 6. – С. 26–33.
11. Чорней І. І. Нове місцезнаходження раритетних видів флори у Чивчинських горах (Українські Карпати) / І. І. Чорней, В. В. Буджак // Укр. ботан. журн., 2003. – 60, № 1. – С. 53–57.
12. Чорней І. І. Флора верхів'я річки Білий Черемош (Українські Карпати), її аналіз та охорона : автореферат дис. ... канд. біол. наук / І. І. Чорней. – 1977. – 250 с.
13. Чорней І. І. До питання про ботанічну цінність Чивчинських гір (Українські Карпати) / І. І. Чорней // Наук. вісник Чернів. ун-ту. Біологія : зб. наук. пр. – Чернівці : Рута, 2006. – Вип. 298. – С. 269–273.
14. Convention on Biological Diversity. Text and Annexes. – Chatelaine, Switzerland: UNEP/CBD, 1994 – 65 p.
15. IUCN Red List of threatened plants / eds. K. S. Walter, H. G. Gillett. – Gland; Cambridge: World Conservation Monitoring Centre, 1997. – 862 p.

16. Mosjakin S. L. Vascular Plants of Ukraine. A nomenclatural checklist / S. L. Mosjakin, M. M. Fedoronchuk. – Kyiv, 1999. – 345 p.
17. Meusel H. Vergleichende Chorologie der zentral-europäischen Flora. Bd. II / H. Meusel, Y. Jäger, E. Weinert. – Jena : Fischer, 1965. – 258 p.
18. Pawlowski B. Zagadnienie ochrony przyrody szaty roślinnej gor Czwyczynskich / B. Pawlowski // Ochrona przyrody. – Krakow, 1937. – № 17. – S. 93–110.
19. Pawlowski B. Ogólna charakterystyka geobotaniczna gor Czwyczynskich // Rozprawy wydziału mat. przyrodniczego. – Krakow, 1948. – p. 1–72.
20. Raunkiaer C. The life form of plants and statistical plant geography / C. Raunkiaer-Claredon. – Oxford, 1934. – 632 p.
21. Tassenkevich L. Flora of the Carpatians. Checklist of the native vascular plant species / L. Tassenkevich. – L'viv : State Museum of Nat. History, 1998. – 610 p.
22. Woloszczak E. Przyczynek do Flori Pokucia / E. Woloszczak // Spraw. kom. fizyogr., 1888. – 21. – S. 1–134.
23. Zapalowicz H. Roślinna szata gór Pokucko-Marmaroskich / H. Zapalowicz // Spraw. Kom. Fizjograf. – Kraków, 1889. – Vol. 24. – 389 s.

Reference (Scopus)

1. Vyznachnyk roslyn Ukrainykh Karpat. K.: Science opinion; 1977: 434. (in Ukrainian).
2. Heobotanichne raionuvannya Ukrainy RSR. K.: Science opinion; 1977: 304. (in Ukrainian).
3. Didukh Ya.P., Pliuta P.H. Phytoindication of environmental factors. Kyiv: Scientific Opinion; 1994; 280. Ukrainian.
4. Chopyk V.I. Catalog of species of flora and fauna of Ukraine included in the Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Vip. I. Flora. K.: 1999. – 20 p.
5. Kobiv Yu.Y. Ecological features of settlements of rare plant species of the Ukrainian Carpathians. KobUkr. botan. magazine. – 2010. V. 67, (3): 350-372.
6. Malinovsky K., Tsaryk J., Kiyak V., Nesteruk Y. Rare, endemic, relict and border-area species of plants of the Ukrainian Carpathians. Lviv: Liga-Press, 2002. – 76 p.
7. Andrienko T.L. Official lists of regionally rare plants of administrative territories of Ukraine (reference edition). Compilers: Dr. biol. Sciences, Prof., Ph.D. biol. Sci: Alterpress, 2012-148 p.
8. Serebryakov IG Life forms of higher plants and their study. Field geobotany. M. L.:Izd-vo AN SSSR,1964; 3:146-205.Russian
9. Red Book of Ukraine. Flora. M-in environmental protection. nature.environment of Ukraine, Nat. Acad. Sciences of Ukraine; editor. Kyiv: Global Consulting; 2009.
10. Chopyk B.I. Botanical-geographical characteristics of the Chyvychno-Grynivsky mountains in the Ukrainian Carpathians. Ukr. Botanical J. 1969; 26(6):26-33.
11. Cherney II, Budzhak VV. The new location of rare flora species in the Chyvychno Mountains (Ukrainian Carpathians).Ukr. Botanical Journal. 2003; 60 (1):53-57.
12. Cherney I.I. On the issue of endemism of the flora of the Ukrainian Carpathians. Reserve in Ukraine. 2006; 12(2): 7-16.
13. Chorney I.I. On the question of the botanical value of the Chyvychny Mountains (Ukrainian Carpathians). Sciences. Herald of Chernivtsi. un-tu. Coll. Sciences. wash. Biology. Chernivtsi: Ruta; 2006; 298:269-273.
14. Convention on Biological Diversity. Text and Annexes. – Chatelaine, Switzerland: UNEP/CBD, 1994 – 65 p.
15. IUCN Red List of threatened plants [eds. K. S. Walter, H. G. Gillett]. – Gland; Cambridge: World Conservation Monitoring Centre, 1997. – 862 p.
16. Mosjakin S. L., Fedoronchuk M.M. Vascular Plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. Kyiv; 1999:345.Ukrainian.
17. Meusel H., Jäger Y., Weinert E. Vergleichende Chorologie derzentraleuropäischen Flora. Bd. II. Jena: Fischer; 1965: 258.
18. Pawlowski B. Zagadnienie ochrony przyrody szaty roślinnej gor Czwyczynskich / B. Pawlowski // Ochrona przyrody. – Krakow, 1937. – № 17. – S. 93–110.
19. Pawlowski B. Problems of nature protection plant cover ofCzwyczynskie Gorges. Protection of the prince. Krakow; 1937. (17):93-110.Poland..
20. Raunkiaer C. The life form of plants and statistical plantgeography. Claredon, Oxford; 1934: 632.
21. Tassenkevich L. Flora of the Carpatians. Checklist of the nativevascular plant species. L'viv: State Museum of Natural History; 1998: 610.Ukrainian.
22. Woloszczak E. A contribution to Flori Pokucia. Cases. Physicalphysic. 1888. (21): 1-134. Poland.
23. Zapalowicz H. Plant cover of Pokucko-Marmaroskie Mountains. Affairs. Kom. Physiograph., Krakow; 1889 (24): 389. Poland.

Надійшла до редколегії 05.01.2021
Отримано виправлений варіант 01.01.2021
Підписано до друку 01.01.2021

Received in the editorial 05.01.2021
Received a revised version on 01.01.2021
Signed in the press on 01.01.2021

Л. Мацап'як, вед. науч. сотруд.
 Национальный природный парк "Верховинский", Верхний Ясенево, Украина

РАРИТЕТНЫЙ ФИТОГЕНОФОНД НАЦИОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКА "ВЕРХОВИНСКИЙ" И ЕГО АНАЛИЗ

Важность сохранения биотического разнообразия, отражается в ряде международных документов, в частности "Конвенции по биологическому разнообразию". В этом контексте особого внимания заслуживают редкие виды, которые являются уязвимыми, поскольку раритетность предшествует вымиранию. Особенно актуальны исследования редких видов в Украинских Карпатах, которые являются наименее антропогенно измененной территорией Украины. Сохранение биотического разнообразия в этом регионе имеет общеевропейское значение, отображается в международной "Рамочной конвенции об охране и устойчивом развитии Карпат". Количественная и качественные характеристики раритетного фитогенофонда позволяют охарактеризовать уровень уникальности флоры, служат основой для формирования региональных Красных списков и позволяют организовать адекватные природоохранные мероприятия. Зоологическая характеристика флор разного уровня предполагает анализ наличия в ее составе таксонов, занесенных в красные списки разного уровня – международные, национальные, региональные. Раритетная составляющая флоры Национального природного парка "Верховинский" включает 125 видов сосудистых растений, имеющих международные, национальные и региональные зоологические статусы. Из них 64 вида растений, занесенных в Красную книгу Украины, 3 вида включены в Красный список МСОП, 7 видов занесены в Европейский Красный список, 2 вида – в Приложение I Бернской конвенции, 2 вида – в Приложение IIb, и IVb Директивы ЕС о сохранении среды обитания и видов природной фауны и флоры. Таким образом, на территории Парка охраняется треть (32,3 %) "краснокнижных" видов сосудистых растений Ивано-Франковской области, кроме того, это составляет 29,9 % "краснокнижных" видов растений Украинских Карпат. Ведущие роды раритетного компонента флоры НПП "Верховинский" составляют Orchidaceae. Вторую и третью позиции занимают роды Ranunculaceae и Asteraceae. Всего на долю первых трех родов приходится 39,6 % видового состава списка. В общем первые девять таксонов охватывают более двух третей (64,9 %) видового состава списка. По результатам хронологического анализа установлено, что наибольшее количество редких видов и их локалитетов сосредоточено на горных массивах: Гнетеса-Фатия Банулу, Прелуки-Хитанка, Лостун-Глистувата, Паленцица-Команова. Наиболее раритетные виды приурочены к среднегорному поясу.

Ключевые слова: распространение, редкие виды, сохранение, флора, раритетный компонент, НПП "Верховинский", Чивчино-Гриняевские горы.

L. Matsapiak, Conduction, Sci. co-worker
 National Park "Verkhovyna", Upper Ash, Ukraine

RARE PHYTOGENOFUND OF VERKHOVYNSKY NATIONAL NATURE PARK AND ITS ANALYSIS

The importance of conserving biodiversity, reflected in a number of international instruments other than the Convention on Biological Diversity. In this context, rare species deserve special attention, which are the most understandable, because rarity precedes extinction. Especially relevant are the studies of rare species in the Ukrainian Carpathians, which is the smallest anthropogenically altered territory of Ukraine. Conservation of biotic diversity in this region is of European importance, which is reflected in the international "Framework Convention for the Protection and Sustainable Development of the Carpathians". Quantitative and qualitative characteristics of the rare phytogenus fund allow to characterize the level of uniqueness of flora, serve as a basis for the formation of regional Red Lists and allow to organize adequate environmental measures. Zoological characteristics of flora of different levels imply, for all, the analysis of representation is transformed into its composition of taxa listed in the "red" lists of different levels – international, national, regional. A rare component of the flora of the Verkhovynsky National Nature Park includes 125 species of vascular plants with international, national and regional sociological status. Of these, 64 species of plants listed in the Red Book of Ukraine, 3 species listed in the IUCN Red List, 7 species listed in the European Red List, 2 species – in Annex I of the Bern Convention, 2 species – in Annexes IIb and IVb of the EU Directive on the conservation of population and species of natural fauna and flora. 21 species – listed in CITES Appendix II, 26 species in the Regional Red List.

Thus, a third (32.3%) of the "Red Book" species of vascular plants of the Ivano-Frankivsk region are protected on the territory of the Park, in addition, it is 29.9% of the "Red Book" species of plants of the Ukrainian Carpathians. The leading families of the rare component of the flora of Verkhovynsky National Park are Orchidaceae. The second and third positions are occupied by the breeds Ranunculaceae and Asteraceae. In general, the first three families account for 39.6% of the species composition of the list. In total, the first nine taxa cover more than two thirds (64.9%) of the species composition of the list. According to the results of good analysis, it is established that the number of rare species and their localities located on the mountain massifs: Gnetesa-Fatiya Banului, Preluky-Hitanka, Lostun-Glistuvata, Palenytzia-Komanova, and attached to the largest rare species to the mid-mountain phenomenon.

Keywords: distribution, rare species, preservation, flora, rarity component, Verkhovynsky National Park, Chivchyno- Hryniavsky Mountains.

УДК 582.582.3:502.172(477.43-751.3)
 DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.34-38

I. Одукалець, ст. наук. співроб.,
 Д. Цимбалюк, наук. співроб.,
 А. Григорчук, наук. співроб.

Національний природний парк "Подільські Товтри", Кам'янець-Подільський, Україна

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ШАФРАНУ ГЕЙФЕЛЯ (*CROCUS HEUFFELIANUS* HERB.) В УМОВАХ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ "ПОДІЛЬСЬКІ ТОВТРИ"

Представлено результати дослідження морфометричних параметрів особин популяції *Crocus heuffelianus* Herb. на території природно-заповідного фонду в умовах Національного природного парку "Подільські Товтри". Мета роботи – дослідження адаптаційних можливостей виду в районі вивчення. Відповідно до мети здійснено морфометрію 50 генеративних особин *Crocus heuffelianus*, які зростають у 10-му кварталі Чемеровецького природоохоронного науково-дослідного відділення. На основі проведених геоботанічних описів фітоценозів за участі *Crocus heuffelianus* Herb. наведено загальну характеристику рослинного покриву досліджуваної території. У межах 10 кварталу *Crocus heuffelianus* зростає в лісових культурах *Quercus robur* L. 25-річного віку, насаджених *Pinus sylvestris* L. (40 років) та на ділянці з угрупованням QUERCUS-FAGETEA BR.-BL. ET VLIEGER 1937, Fagetalia sylvaticae Pawl. 1928, Carpinion betuli Issler 1931 et. Mayer 1937, де переважають 80-річні *Carpinus betulus* L., *Quercus robur* L. У дослідженій популяції виду проведено аналіз замірів: висоти рослини разом із суцвіттям; довжини і ширини листків. За результатами нашого дослідження встановлено, що висота рослин у популяції коливалась від 7,6 см до 14 см. У середньому цей показник становив $10,3 \pm 2,0$ см. Розміри листків переважної кількості особин популяції характеризувалися такими морфометричними показниками: ширина 0,2–0,7 см, довжина 4,9–10,7 см. Показано, що переважна більшість особин виду мають по одній квітці. У дослідженій популяції *Crocus heuffelianus* має має незначну мінливість морфологічних ознак. Це свідчить про значні потенційні можливості виду до зростання в різних екологічних умовах, які не можуть бути реалізовані за умов посиленого антропогенного навантаження. Унікальні рівнинні локалітети цього монотанно-альпійського виду на території Національного природного парку "Подільські Товтри" мають високе зоологічне і наукове значення та потребують системного, тривалого моніторингу.

Ключові слова: шафран Гейфелів, морфометрія, НПП "Подільські Товтри".

Вступ. Упродовж останніх десятиліть питання збереження навколишнього середовища набуває все більшої актуальності у зв'язку зі значним антропогенним впливом

на природні екосистеми та, як наслідок, інтенсивним збідненням різноманітності біоти загалом і рослинного світу зокрема. Серед вразливих таксонів також зустрічаються

представники фітобіоти, що мають наукове і практичне значення, а місця їхнього зростання зазнають негативного впливу внаслідок господарської діяльності людини. Загроза зникнення рослин виникає через порушення умов місцезростань, які спричинені вирубуванням лісів, розорюванням земель, осушувальною меліорацією, розробкою надр тощо. Такі процеси, як рекреаційне навантаження, неконтрольований туризм сприяють зменшенню чисельності та загрожують зникненням багатьох видів рослин, особливо з декоративними і лікарськими властивостями [2]. До них належать і ефемероїдні геофіти, біолого-екологічні властивості яких обумовлюють їхню вразливість. Переважна більшість видів роду *Crocus* L. (Iridaceae) у зв'язку з їхніми високими декоративними властивостями преребувають під загрозою зникнення, унаслідок їх безконтрольного використання. Водночас висока атрактивність, особливі терміни цвітіння (як ранньовесняного, так і осіннього) обумовлюють популярність і перспективність видів роду *Crocus* у декоративному квіткарстві й озелененні.

Під охороною рідкісних і зникаючих видів розуміємо не лише збереження на заповідних територіях та їхню інвентаризацію, але й вирощування у ботанічних садах шляхом інтродукції, а також збільшення кількості рідкісних видів у природі шляхом підсівання насіння та висаджування рослин, отриманих за умов культури. Досить

актуальним стає перенесення штучно розмножених рослин у природні умови, що називають репатріацією, чи інтродукцією [5].

Методи і матеріали. Метою нашої роботи було дослідження адаптаційних можливостей шафрану Гейфеля на території Національного природного парку (НПП) "Подільські Товтри" шляхом вивчення й аналізу його морфометричних і кількісних показників.

Національний природний парк "Подільські Товтри" – один із найбільших НПП України загальною площею 261316 га і розташований на території Хмельницької області. За геоботанічним районуванням одна частина Парку належить до Покутсько-Медоборського округу букових, грабово-дубових і дубових лісів, справжніх лук і лучних степів Південнопільської Західноподільської підпровінції, широколистяних лісів, луків, лучних степів та евтрофних боліт Центральноєвропейської провінції широколистяних лісів Європейської широколистянолісової області, а інша – до Центральноподільського округу грабово-дубових і дубових лісів і суходольних лук Української лісостепової підпровінції Східноєвропейської лісостепової провінції дубових лісів, остепнених лук і лучних степів Лісостепової підобласті Євразійської степової області [3]. На території НПП "Подільські Товтри" флористичне різноманіття нараховує близько 1500 видів вищих судинних рослин. Серед них 93 види реліктів, близько 30 ендемічних для України видів. На території парку перебуває під охороною 161 об'єкт природно-заповідного фонду (ПЗФ).



Рис. 1. Генеративна особина *Crocus heuffelianus* Herb

Crocus haiffelianus Herb. (рис. 1) – ранньовесняний ефемероїд, типовий (балканський) вид, який на Хмельниччині має східну межу свого ареалу. Вид у 70-х рр. XIX ст. на території Парку вивчав відомий ботанік М. Круцкевич. Згодом флористичні дослідження продовжували С. Ковальчук, М. Задорожний, Л. Любінська.

C. heuffelianus – геофіт. Багаторічна трав'яна рослина 10–19 см заввишки. Бульбоцибулина округла, 10–12 мм завширшки, трохи сплюснута зверху та знизу, вкрита темно-коричневою тунікою, утвореною сухими лускоподібними низовими листками. Листки (2–3 шт.) 2–7 мм завширшки, лінійні, 8–17 см завдовжки, із загорнутими краями та сріблястою смужкою по осі вздовж усього листка. Квітки поодинокі. Оцвітину фіалкового кольору, проста, віночкоподібна, 9–13 см завдовжки. Цвіте

у березні–квітні. Плодоносить у травні–липні. Плід – тригнізда коробочка. Розмножується насінням, рідше бульбоцибулинами. Розповсюдження насіння відбувається шляхом автохорії та мірмекохорії. Шафран Гейфеля охороняють на територіях Карпатського БЗ, "Медобори" та ПЗ "Гор'гани", "Карпатського", "Синевир", "Вижницький", "Сколівські Бескиди" національних природних парків і заказників, пам'яток природи і заповідних урочищ. Заборонено збирання, витоптування, організація нових місць рекреації, надмірний випас, викопування бульбоцибулин [9].

На території НПП "Подільські Товтри" вид зростає в заказнику "Циківський", Гуківському лісі, у 10–11 кварталах НПП. Також вид наводиться у наукових джерелах із Княгининського лісу та поблизу м. Кам'янець-Подільського [8].

Для дослідження адаптативних ознак виду *Crocus heuffellianus* нами закладено постійну пробну площу у 10 кварталі Чемеровецького природоохоронного науково-дослідного відділення на території НПП "Подільські Товтри". Дослідження проведено детально-маршрутним методом, назви видів подані за зведенням С. Л. Мосякіна і М. М. Федорончука [1]. У дослідженій популяції *C. heuffellianus* заміряно висоти рослини разом із суцвіттям та довжини й ширини листків. Вибірка становила 50 особин генеративного стану. Значення морфометричних ознак опрацьовували загальноприйнятими статистичними методами Microsoft "Excel 2007".

Результати та обговорення. У межах 10 кварталів *Crocus heuffellianus* зростає в лісових культурах *Quercus robur* L. 25-річного віку, насадженнях *Pinussylvestris* L. (40 років) та на ділянці з угрупованням QUERCO-FAGETEA BR.-BL. ET VLIAGER 1937, *Fagetalia sylvaticae* Pawl. 1928, *Carpinion betuli* Issler 1931 em. Mayer 1937, де переважають 80-річні *Carpinus betulus* L., *Quercus robur* L.

Асоціація, в якій зростає *Crocus heuffellianus*, – *Galeobdolon luteae-Carpinetum* Shevchyk, Bakalyna et V. Solomakha 1996. Деревний ярус представлено такими видами: *Carpinus betulus* L. (90 %), *Quercus robur* L., *Cerasus avium* L., *Acer platanoides* L. Зімкнутість у період початку вегетації і цвітіння *Crocus heuffellianus* становить 0,6. Підлісок слабко виражений. Виявлені поодинокі особини *Euonymuseuropaeus* L. Проективне покриття трав'яного ярусу – 50 %, а *Crocus heuffellianus* – 10 %. Поряд із ним виявлено рідкісні види, які включено до списку CITES, Червоної книги України (2009): *Galantusnivalis* L., *Neotianidus-avis* L.

Також відмічено ряд видів: *Sanicula europea* L., *Galeobdolon lutea* Gilib., *Hepatica nobilis* Mill., *Anemona ranunculoides* L., *Ficaria verna* Huds., *Isopirum talictroides* L., *Euphorbia amigdaloides* L., *Gagea lutea* L., *Pulmonaria officinalis* L., *Ranunculus cassubicus* L., *Dactylis glomerata* L., *Poa sylvestris* A. Gray, *Viola reichenbachiana* Jord. ex Boreau, *Coridalis cava* Schweigg. et. Korte., *Carex pilosa* Scop.



Рис. 2. Розміщення дослідних ділянок на території Національного природного парку "Подільські Товтри"

2020 р. квітування виду проходило у березні–квітні. Масове квітування спостерігалось у першій половині березня.

Виявлено, що висота рослин в популяції (табл. 1) коливалася від 7,6 см до 14 см, а усереднені дані – $10,3 \pm 2,0$ см. Розміри листків більшості особин характеризувалися такими показниками: ширина – 0,2...0,7 см, довжина – 4,9...10,7 см. Коефіцієнт варіації показників

коливався в межах 15,01–31,04 %, середнє квадратичне відхилення від 0,5 до 0,7. Виявлено особини переважно з однією квіткою, але трапляються також із двома квітками. У популяції є білоквіткові особини.

Результати наших досліджень збігаються з результатами А. В. Мигаль, який показав, що наймінливішими параметрами є довжина і ширина листка [6].

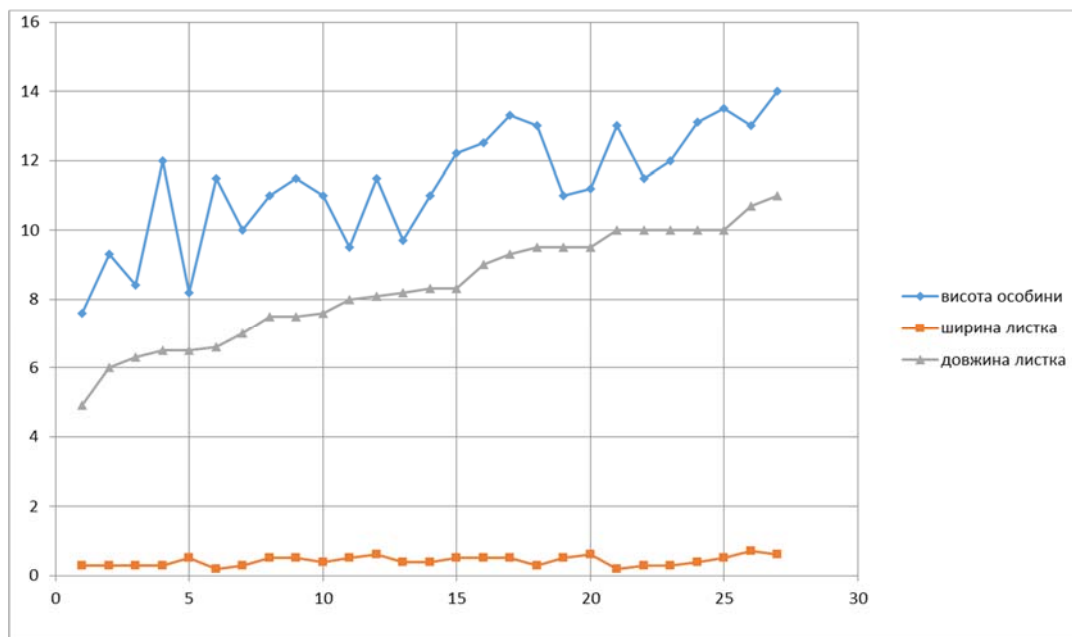


Рис. 3. Особливості біоморфологічних показників *Crocus heuffellianus*

Таблиця 1. Мінливість морфометричних показників *Crocus heuffelianus*

№ з/п	Показник	Мінімальні показники		Максимальні показники		Св, %, за Зайцевим
		Розміри, см	Кількість особин	Розмір, см	Кількість особин	
1	Висота особини	7,6±1,04	12	14±0,7	15	15,01
2	Ширина листків	0,2±0,02	10	0,7±0,05	17	31,04
3	Довжина листків	4,9±0,08	13	10,7±0,6	14	19,20

Висновки.

Наші дослідження показали, що особини шафрану Гейфеля у дослідженій популяції на території НПП "Подільські Товтри" проявили незначну мінливість за показниками. Морфологічні ознаки особин характеризувалися помірним коефіцієнтом варіації; висота рослини та довжина листків – середнім, а ширина листків – високим. Це може свідчити про значні потенційні можливості виду до зростання в різних екологічних умовах, які не можуть бути реалізовані за умов посиленого антропогенного навантаження. Для з'ясування біоморфологічних особливостей досліджуваного виду необхідно продовжувати дослідження й інших популяцій. Отримані результати нашого дослідження допоможуть у вивченні біології й екології шафрану, що оптимізує розробку нових природоохоронних рекомендацій у природних біотопах Національного природного парку "Подільські Товтри".

Список використаної літератури

1. Mosyakin S. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural check list / S. Mosyakin, M. Fedoronchuk. – Kyiv, 1999. – 345 p.
2. Атлас рідкісних і зникаючих рослин Полтавщини / О. М. Байрак, Н. О. Стецюк. – Полтава: Верстка, 2005.
3. Дідух Я. П. Геоботаничне районування України та суміжних територій / Я. П. Дідух, Ю. Р. Шеляг-Сосонко // Укр. Ботан. Журн. – 2003. – 60, № 1. – С. 6–17.
4. Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. Г. Н. Зайцев. – М.: Наука, 1984. – 423 с.
5. Ковальчук С. І. Ландшафтний заказник загальнодержавного значення "Циківський" / С. І. Ковальчук // Екологічний вісник. – 2015. – № 2. – С. 14–18.
6. Лукс Ю. Л. К вопросу о терминологии и методике искусственного переноса растений в природные экосистемы / Ю. Л. Лукс // Ботан. Журн. – 1981. – Т. 66. – № 7. – С. 1051–1060.
7. Мигаль А. В. Особливості онтогенезу *Crocus heuffelianus* Herb. (Iridaceae) в Українських Карпатах / А. В. Мигаль // Изучение онтогенеза видов природных флор в ботанических учреждениях Евразии. – К.: ЦБС АН Украины, 1993. – С. 108.
8. Мигаль А. В. Біолого-екологічна характеристика видів роду *Crocus* L. в Українських Карпатах та заходи по їх охороні: дис. ... канд.

біол. наук: 03.00.05 / Андрій Володимирович Мигаль; Ужгородський нац. ун-т. – Ужгород, 2002. – 180 с.

9. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я. П. Дідуха. – К.: Глобколсантинг, 2009.

10. Флора України / ред. М. І. Котов А. І. Барбарич. – К.: Вид-во АН УРСР, 1950. – Т. 3. – С. 279–280.

Reference (Scopus)

1. Mosyakin S., Fedoronchuk M. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural check list. Kyiv, 1999. – 345 p.
2. Atlas of rare and endangered plants of the Poltava region. / Bayrak O. M. Stetsyuk N. O. // 2005. Layout, Poltava.
3. Didukh Ya. P., Shelyag-Sosonko Yu. R. Geobotanical zoning of Ukraine and adjacent territories / Didukh Ya. P., Shelyag-Sosonko Yu. R. // Ukr. Nerd. Journal. – 2003. – 60, №1. – p. 6-17.
4. Zaitsev G. N. Mathematica Istatistics in experimental botany. Moscow: Nauka, 1984. 423 p.
5. Kovalchuk S. I. Land scape reserve of national significance "Tsikovsky" / S. I. Kovalchuk // ecological bulletin. 2015, No. 2, p. 14-18.
6. Luks Yu. L. [On the issue of terminology and methods of artificial plant transfer to natural ecosystems]. Botanical Journal 1981. – Vol. 66, No. 7. – pp. 1051-1060.
7. Migal A.V. Features of ontogenesis of *Crocus heuffelianus* Herb. (Iridaceae) in the Ukrainian Carpathians // Study of ontogenesis of natural flora species in botanical institutions of Eurasia. Kyiv: CBS of the Academy of Sciences of Ukraine, 1993, p. 108.
8. Migal A.V. Biological and ecological characteristics of species of the genus *Crocus* L. in the Ukrainian Carpathians and measures for the protection [text] : dis... Kand. Biol. Nauk: 03.00.05 / Migal Andrey Vladimirovich; Uzhgorod National University-Uzhgorod, 2002. – 180 Ark. – Ark. 131-162.
9. Red Book of Ukraine. Plant world / edited by Ya. P. Didukh. – Kyiv. Globcol santing, 2009.
10. Flora Of Ukraine / Ed. By M. I. Kotov A. I. Barbarich. – Kyiv: Ed. ANURSR, 1950. – Vol. 3. – pp. 279-280.

Надійшла до редколегії 05.01.2021
Отримано виправлений варіант 01.01.2021
Підписано до друку 01.01.2021

Received in the editorial 05.01.2021
Received a revised version on 01.01.2021
Signed in the press on 01.01.2021

И. Одукалец, ст. науч. сотр., Д. Цимбалюк, науч. сотр., А. Григорчук, науч. сотр.
Национальный природный парк "Подольские Товтры", Каменец-Подольский, Украина

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШАФРАНА ГЕЙФЕЛЯ (*CROCUS HEUFFELIANUS* HERB.) В УСЛОВИЯХ НАЦИОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКА "ПОДОЛЬСКИЕ ТОВТРЫ"

Представлены результаты исследования морфометрических параметров особей популяции *Crocus heuffelianus* Herb. на территории природно-заповедного фонда в условиях Национального природного парка "Подольские Товтры". Целью нашего исследования было изучить адаптационные возможности вида в районе изучения. В соответствии с целью исследования осуществлена морфометрия 50 генеративных особей *Crocus heuffelianus*, которые растут в 10 кварталах Черновецкого природоохранного научно-исследовательского отделения. На основе проведенных геоботанических описаний фитоценозов с участием *Crocus heuffelianus* Herb. приведена общая характеристика растительного покрова исследуемой территории. В пределах 10 квартала *Crocus heuffelianus* растет в лесных культурах *Quercus robur* L. 25-летнего возраста, в посадках *Pinus sylvestris* L. (40 лет) и на участке с группировкой *QUERCO-FAGETEA BR.-BL. ET VLIAGER 1937, Fagetalia sylvaticae* Pawl. 1928, *Carpinus betuli* Issler 1931 em. Mayer 1937, где преобладают 80-летние *Carpinus betulus* L., *Quercus robur* L. В исследованной популяции вида проведен анализ замеров: высота растения вместе с соцветием; длина и ширина листа. По результатам нашего исследования установлено, что высота растений в популяции колебалась от 7,6 см до 14 см. В среднем этот показатель составил 10,3 ± 2,0 см. Размеры листьев подавляющего числа особей популяции характеризовались следующими морфометрическими показателями: ширина – 0,2...0,7 см, длина – 4,9...10,7 см. Показано, что большинство особей вида имеют по одному цветку. В исследованной популяции *Crocus heuffelianus* имеет незначительные изменения морфологических признаков. Это свидетельствует о значительных потенциальных возможностях вида к росту в различных экологических условиях, которые не могут быть реализованы в условиях усиленного антропогенного влияния. Уникальные равнинные локалитеты этого монтанно-альпийского вида на территории Национального природного парка "Подольские Товтры" имеют высокое соэологическое и научное значение и требуют системного, длительного мониторинга.

Ключевые слова: шафран Гейфелия, морфометрия, НПП "Подільські Товтри".

I. Odykalets, Senior Researcher, D. Tsumbaljuk, Researcher, A. Grigorchuk, Researcher
Podilsky Tovtry National Nature Park, Kamyanets-Podilsky, Ukraine

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HEIFELSAFFRON (*CROCUS HEUFFELIANUS* HERB.) IN THE PODILSKY TOVTRY NATIONAL NATURE PARK

The article performs the results of the study of morphological parameters of individuals of the population of *Crocus heuffelianus* Herb on the territory of the nature reserve fund in the conditions of the Podilsky Tovtry National Nature Park. The aim of our research was to study the morphometric parameters of *Crocus heuffelianus* to establish the adaptive capacity of the species in the study area. The morphometry of 50 generative

individuals of *Crocus heuffelianus* growing in the 10th quarter of the Chemerivtsi environmental scientific-research department was performed. The general characteristic of the dynamics of vegetative cover on the investigated territory is represented basing on the conducted geobotanical descriptions of phytocenoses with the participation of *Crocus heuffelianus* Herb. *Crocus heuffelianus* grows within 10 quarters in the forest crops *Quercus robur* L. (twenty-five years old), plantations of *Pinus sylvestris* L. (forty years old) and in the area with the group of QUERCO-FAGETEA BR.-BL. ET VLIAGER 1937, Fagetalia sylvaticae Pawl. 1928, Carpinion betuli Issler 1931 em. Mayer 1937 where eighty-year-old *Carpinus betulus* L., *Quercus robur* L. predominate. The analysis of measurements was carried out in the studied population of the species: plant height together with inflorescence; length and width of leaves. According to the results of our study, it has been found out that the height of plants in the population ranged from 7.6 cm to 14 cm. On average, this figure was 10.3 ± 2.0 cm. The size of the leaves of the predominant number of individuals in the population was characterized by the following anatomical and morphological parameters: width – 0.2-0.7 cm, length – 4.9-10.7 cm. It is shown that the vast majority of individuals of the species have one flower. *Crocus heuffelianus* has some variability of morphological features in the studied population. This indicates a significant potential for the species to grow in different environmental conditions, which can not be realized under conditions of increased anthropogenic pressure. The unique plain localities of this Montana-Alpine species on the territory of the Podilski Tovtry National Nature Park have a high zoological and scientific significance and require systematic, long-term monitoring.

Key words: Heifel saffron, morphometry, Podilsky Tovtry National Nature Park.

УДК 577.122.8

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.38–43

Н. Ракша, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Т. Масвська, канд. техн. наук
ГС "Український інноваційний кластер рибної індустрії", Київ, Україна

ОДЕРЖАННЯ ПЕПТИДІВ З ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

Стрімке зростання попиту на препарати на основі пептидів актуалізує пошук нових природних та економічно обґрунтованих джерел сировини. Широке розмаїття біологічно активних сполук, зокрема і пептидної природи, що притаманне морським гідробіонтам, дозволяє розглядати їх як перспективний сировинний ресурс. Водночас використання морських об'єктів як джерела для одержання цільових молекул потребує певної оптимізації наявних методологічних підходів щодо їхнього виділення та забезпечення належного ступеня очищення. У роботі розв'язується задача оптимізації методу одержання пептидів із гідробіонтів Антарктичного регіону на прикладі гідробіонта *Nacellascopcinna*. Запропонований триетапний підхід дозволяє виділяти фракції пептидів різної молекулярної маси. Перший етап включає осадження високомолекулярного білкового матеріалу спочатку хлорною кислотою, а потім 80%-м етиловим спиртом. У результаті одержано фракцію пептидних молекул із молекулярною масою до 6,5 кДа, що містила незначну кількість високомолекулярних білкових домішок. Подальше доочищення одержаної фракції проводили шляхом ультрафільтрації з використанням мембран із розміром пор 10 кДа. Контроль білково-пептидного складу проб на всіх етапах одержання проводили методом диск-електрофорезу за денатуруючих умов у пластинах 18%-го поліакриламідного гелю. Проведений аналіз із використанням 2Д-електрофорезу виявив, що ізоелектричні точки більшості пептидів містяться у діапазоні рН від 8,0 до 10,0. Лише незначна кількість пептидів гідробіонта мала ізоелектричні точки при рН 4,0 та 5,0. Заключний етап включає фракціонування проби методом хроматографії, що поділяє за розмірами. У результаті хроматографічного розділення отримано чотири піки, що відповідають фракціям із пептидами, молекулярна маса яких становить близько 2,3 кДа (1-й пік), 1,9 кДа (2-й пік), 1,4 кДа (3-й пік) та 0,7 кДа (4-й пік).

Ключові слова: гідробіонти, пептидна фракція, метод одержання.

Вступ. Нині одним із перспективних підходів щодо профілактики, а в деяких випадках і терапії багатьох захворювань, є використання препаратів на основі пептидів. Відповідно до існуючих уявлень, пептиди як безпосередньо, так і опосередковано здатні впливати на перебіг біохімічних реакцій [1]. До безумовних переваг пептидних препаратів належить їхня фізіологічність: їхнє застосування не чинить навантаження на імунну систему; не призводить до розвитку анафілактичних реакцій та інших побічних ефектів; пептидні препарати добре засвоюються за різних способів введення; характеризуються значним терапевтичним потенціалом і виявляють виражений ефект за використання у порівняно невеликих дозах. Сукупність експериментальних даних щодо широкого спектра біологічної активності пептидів, виражені терапевтичні ефекти та клінічно підтверджена безпечність пептидних препаратів навіть за умов їх довготривалого застосування обґрунтовує доцільність пошуку нових джерел пептидів із бажаними активностями для створення оригінальних фармакологічних субстанцій.

Новітні наукові дослідження свідчать про значний потенціал морських гідробіонтів як цінного джерела нутрицевтиків і сполук із різноманітними біологічними активностями. Особливості умов існування гідробіонтів обумовлюють той факт, що деякі їхні метаболіти є структурно унікальними та/або виявляють активність, вищу ніж у наземних аналогів. Аналіз сучасної наукової літератури свідчить, що гідробіонти містять функціонально активні речовини різної хімічної будови, що виявляють широкий спектр біологічних активностей [2, 3, 4]. На основі деяких

із цих речовин створено лікувально-профілактичні засоби, спрямовані на підтримання гомеостазу за умов патологічно зміненого метаболізму [5]. Морські гідробіонти можуть бути перспективною сировинною базою для одержання білкових і пептидних молекул, що зумовлено не лише значною кількістю промислових відходів, що залишаються на кінцевих етапах переробки сировини, а й тим фактом, що ця сировина зазвичай збагачена на білки. Відомо, що до складу морських гідробіонтів, зокрема безхребетних, входять білки, які за своїм амінокислотним складом не поступаються білкам наземних тварин. Окрім того, з морських гідробіонтів було виділено пептиди, що виявляють цікаві біологічні активності, зокрема антибактеріальну, антикоагулянтну, протипухлинну, імуномодулюючу тощо [6, 7, 8]. Припускають, що саме за рахунок наявності у тканинах значної кількості компонентів пептидної природи гідролізати деяких гідробіонтів виявляють комплексну біологічну активність і здійснюють позитивний ефект на розвиток системних захворювань, обумовлених метаболічними порушеннями [9, 10]. Отже, світові дослідження у цій області свідчать про значний потенціал гідробіонтів як джерела сировини для створення оригінальних фармакологічних субстанцій і лікарських засобів. Окрім того, зниження споживчих ризиків, пов'язаних із можливою контамінацією продукції інфекційними агентами, характерними для сировини тваринного походження, та відсутність у зв'язку із цим додаткових стадій очищення слугують додатковим аргументом на користь пошуку біологічно активних речовин саме серед метаболітів морських гідробіонтів.

Враховуючи викладене, метою роботи було оптимізувати метод одержання з тканин гідробіонта Антарктичного регіону *Nacellaconcinna* фракції пептидних молекул.

Матеріали і методи. У представленому дослідженні як вихідний матеріал використано заморожену масу гідробіонта Антарктичного регіону південно-антарктичне блюдце (*Nacellaconcinna*), надану Національним антарктичним науковим центром. Зразки були зібрані біля острова Галіндес (географічні координати – 65°15' південної широти, 64°15' західної довготи) архіпелагу Аргентинських островів. Солоність води біля острова складала 28,4-32,2 ‰, температура 1,1–0,8 °С. Відбір матеріалу здійснено в межах XVII, XVIII Українських антарктичних експедицій у березні 2012 – квітні 2013 та березні 2013 – квітні 2014 рр., відповідно.

Заморожену масу м'яких тканин гідробіонта зважували та перетирали до порошкоподібного стану, додаючи рідкий нітроген. Після чого гомогенізували, використовуючи екстрагуючий розчин – 50 мл 0,05 М трис-НСІ буфер (рН 7,4), що містить 0,13 М NaCl, 1 мМ EDTA, 0,25 % сахарозу та 0,5 % тритон X-100. Екстрагуючий розчин додавали з розрахунку 5 мл розчину на кожні 10 грам матеріалу. Пробу залишали на 15 хв при +4 °С, після чого центрифугували при 10000 г упродовж 40 хв. Одержану надосадову рідину використовували для одержання пептидів. Фракцію пептидів отримували відповідно до методу [11]. Усі операції здійснювали на льоду. Для одержання фракції пептидів до проби додавали 1,2 М HClO₄ у співвідношенні 1:1 і залишали на 30 хв при +4 °С, після чого центрифугували 15 хв при 1500 г. Надосадову рідину нейтралізували 5 н КОН до рН 7,0, залишали на 15 хв та центрифугували повторно. До одержаної на цьому етапі надосадової рідини додавали етиловий спирт (60 %, 80 % та 96 %) й ізопропиловий спирт (80 %) у співвідношенні 1:5, проби витримували 15 хв та знову центрифугували 15 хв при 1500 г. Отриману надосадову рідину ліофілізували, попередньо розвівши проби дистильованою водою до кінцевої концентрації спирту 20 %.

Електрофоретичний аналіз пептидів проводили методом диск-електрофорезу у пластинах 18 % поліакриламідного гелю за присутності додецилсульфату натрію [10]. Електрофорез здійснювали в камері для вертикального препаративного диск-електрофорезу ("BioRad", США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділюючого гелю. Гелі фарбували барвником кумасі діамантовий синій (G-250) відповідно до стандартного протоколу. Двовимірний електрофорез проводили відповідно до методу [13], використовуючи стрипи ПААГ (7 см) з градієнтом рН 3,0–10,0. Спочатку стрипи піддавали регідрації у буфері (8 М сечовина, 0,02 М дитіотриетол, 1 % CHAPS, 1 % суміш амфолітів) за присутності досліджуваної фракції пептидів (1 мг пептидів на 1 мл буферу) упродовж 12 годин при температурі +20 °С. На наступний день проводили ізоелектрофокусування, після чого стрипи послідовно урівноважували у буфері (0,375 М трис-НСІ, рН 8,8, що містить 6 М сечовину, 2 % додецилсульфат натрію, 20 % гліцерол), у який на першому етапі додавали 0,130 М дитіотриетол, а на другому – 0,135 М йодацетамід. Далі стрипи піддавали аналізу методом електрофорезу у 18 % ПААГ згідно з протоколом, процитованим вище.

Фракціонування суміші пептидів проводили методом хроматографії, що поділяє за розмірами, використовуючи колонку з Sephadex G-15. Ліофілізовану пептидну фракцію розчиняли у 50 мМ трис-НСІ буферу (рН 7,4), що містить 0,13 М NaCl з розрахунку 5 мг ліофілізату на 2 мл буферу. Пробу залишали на 15 хв на шейкері з невели-

кою амплітудою, після чого наносили на колонку, попередньо урівноважену буфером. Швидкість нанесення проби становила 30 мл/год.

Результати досліджень та обговорення. Враховуючи стрімко зростаючий попит на пептидні препарати, пошук нових природних та економічно обґрунтованих джерел сировини набуває особливої актуальності. Важливим етапом технологічного процесу одержання будь-яких цільових молекул є оптимізація методологічних підходів щодо їх виділення та забезпечення належного ступеня очистки з урахуванням особливостей джерела сировини. Відповідно до літературних даних, біологічна активність притаманна переважно низькомолекулярним пептидам. Так, молекулярна маса більшості антимікробних пептидів становить близько 5 кДа [14], а пептиди з вираженою антиоксидантною активністю характеризуються молекулярною масою від 0,5 до 1,5 кДа [15]. Тому метою представленої роботи було оптимізувати метод одержання з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону фракції пептидів з молекулярною масою до 5 кДа.

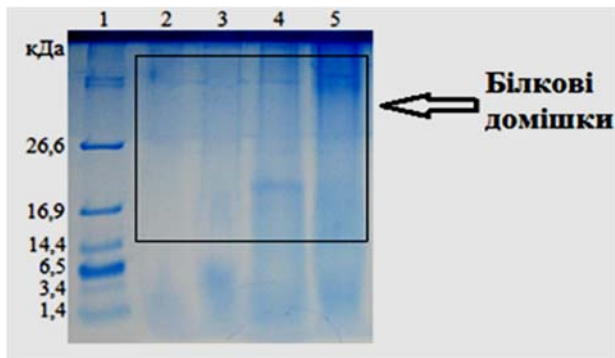
Можна виокремити декілька концептуально протилежних методологічних підходів щодо одержання з вихідної білкової сировини пептидів та низькомолекулярних білкових фрагментів. Це, зокрема, хімічний (кислотний, лужний) чи ферментативний гідроліз, який дозволяє максимально використовувати сировину й отримувати цільові молекули різної молекулярної маси, різного складу, а відтак, і з різною біологічною активністю. Інший підхід полягає в екстрагуванні з тканин пептидів, що наявні у даному організмі за умов фізіологічної норми чи утворюються/утворилися у відповідь на розвиток чи прогресування патологічних станів. Як прямий технологічний процес цей підхід є менш економічно вигідним, оскільки білкова компонента при цьому відкидається. Метод проте дозволяє одержувати пептиди, притаманні лише даному об'єкту.

Оскільки нашим завданням було отримати пептиди, що присутні у тканинах указанного гідробіонта, важливо було підібрати умови, за яких відбувається максимальна екстракція сумарної пептидної фракції. Один із методів виділення з тканин пептидів базується на поетапному осадженні високомолекулярного білкового матеріалу спочатку хлорною кислотою, а потім етиловим спиртом [11], за таких умов кінцева проба міститиме лише олігопептиди та пептиди. Цей метод є швидким, відносно простим у виконанні, але потребує використання значних об'ємів 96 % етилового спирту. Спочатку нами визначено концентрацію спирту, за якої відбувається достатнє осадження білків і при цьому зберігається максимальна концентрація пептидних молекул. Одержання фракції пептидів проводили відповідно до згаданої методики, але на етапі додавання до проб спирту було використано етиловий спирт у концентраціях 60 %, 80 %, 96 % й ізопропиловий спирт у концентрації 80 %.

Отримані фракції аналізували методом диск-електрофорезу за денатуруючих умов у пластинах 18 % поліакриламідного гелю. Результати проведеного аналізу зображено на рис. 1. Як видно з наведених даних, застосування ізопропилового спирту виявилось найменш ефективним, оскільки за його використання сумарна пептидна фракція була найменшою, а проба містила багато білкових домішок, розміщених у всій площині треку (трек 5). Нами не виявлено суттєвої різниці при використанні 96 % чи 80 % етилового спирту – в обох випадках у треках (трек 2 і 3, відповідно) реєструвалася зона, що відповідає пептидам із молекулярною масою до 6,5 кДа, і незначна кількість білків із молекулярною масою вище 20 кДа.

Враховуючи відсутність суттєвої різниці під час застосування 96 % і 80 % етилового спирту, а також коштов-

ність етилового спирту як основного реактиву у цьому методі, економічно доцільним є використовувати для виділення сумарної пептидної фракції 80 % етиловий спирт.



№ проби	Білкові домішки, кДа
2	31; 27
3	31; 27
4	31; 27; 25; 18
5	31; 29; 27; 25; 17

Рис. 1. Електрофореграма фракцій пептидів, одержаних із тканин *Nacellaconcinna* із використанням спирту різної концентрації: 1 – маркери молекулярних мас; 2 – 96 % етиловий спирт; 3 – 80 % етиловий спирт; 4 – 60 % етиловий спирт; 5 – 80 % ізопропиловий спирт

Як бачимо, застосування цього методу не дозволило отримати "чисту" фракцію пептидних молекул про що свідчить наявність в треках білкових смуг. Подальшу доочистку одержаної фракції пептидів проводили шляхом ультрафільтрації з використанням мембран з розміром пор

10 кДа. Контроль білково-пептидного складу проби проводили методом електрофорезу у ПААГ. Відсутність на електрофореграмі смуг (рис. 2), що відповідають білкам з молекулярною масою вище 10кДа доводить ефективність обраного нами підходу доочищення пептидної фракції.

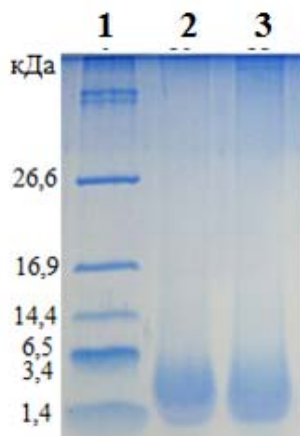


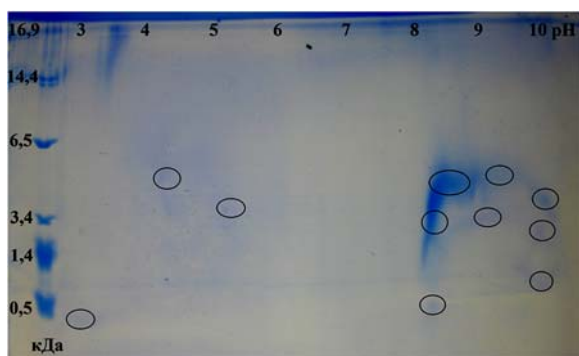
Рис. 2. Електрофореграма фракції пептидів, одержаної після етапу ультрафільтрації: 1 – маркери молекулярних мас; 2, 3 – пептидні фракції

Таким чином, у результаті поєднання двох методичних підходів, що включали модифіковану нами методику В. Николайчик із співавторами (1991) та ультрафільтрацію, з тканин гідробіонта Антарктичного регіону було одержано фракцію пептидів із молекулярною масою до 6,5 кДа, яка не містила високомолекулярних домішок.

Для детальнішої характеристики пептидних молекул було використано метод двовимірного електрофорезу. Цей метод включає два етапи – ізоелектрофокусування у стріпах із градієнтом Н від 3,0 до 10,0 та подальший електрофоретичний поділ у поліакриламідному гелі, що дозволяє розділяти молекули не лише за їхніми молекулярними масами, а й відповідно до ізо-

лектричних точок. Застосування двовимірного електрофорезу в умовах нашого дослідження є особливо доцільним з огляду на той факт, що за попередніми результатами (рис. 2) фракція пептидів не розділялася на окремі смуги відповідно до молекулярної маси пептидів, а ідентифікувалась як загальна пляма в зоні нижче 6,5 кДа. Незважаючи на схожу молекулярну масу, пептиди можуть мати різні ізоелектричні точки, тому аналіз у двох напрямках може надати додаткову інформацію щодо особливостей будови пептидів із тканин гідробіонта Антарктичного регіону.

На рис. 3 зображено 2Д-електрофореграму розділення фракції пептидів, виділеної з тканин гідробіонта *Nacellaconcinna*.



pH							
3	4	5	6	7	8	9	10
0,5 кДа	5,0 кДа	3,5 кДа	-	-	0,5 кДа; 3,4 кДа; 5,0 кДа	3,4 кДа; 5,5 кДа	0,7 кДа; 3,0 кДа; 4,0 кДа

Рис. 3. 2Д-електрофореграма фракції пептидів, одержаної з тканин гідробіонта *Nacella concinna*

Як бачимо, ізоелектричні точки пептидівмістяться переважно в діапазоні лужних значень рН. Найбільшу кількість пептидів ідентифіковано в зоні, що відповідає значенню рН 8,0; молекулярна маса пептидів, що мають ізоелектричну точку при рН 8,0 становила близько 5 кДа, 3,4 кДа та 0,5 кДа. Пептиди з ізоелектричною точкою при рН 10,0 мали молекулярну масу близько 4 кДа, 3 кДа та 0,7 кДа. Лише незначна кількість пептидів гідробіонта мала ізоелектричні точки при рН 4,0 та 5,0.

Присутність у загальному екстракті гідробіонта *Nacella concinna* пептидів з ізоелектричними точками в області лужних значень рН указує на той факт, що домінантна частина пептидів представлена катіонними пептидами. Це може бути обумовлено як нижчим вмістом у молекулах пептидів залишків негативно заряджених амінокислот (аспарагінової, глутамінової кислоти), так і/або наявністю значної кількості залишків позитивно заряджених амінокислот, зокрема, лізину та аргініну. Відповідно до даних [16, 17], присутність у молекулі пептидів позитивно заряджених амінокислот є структурною характеристикою, типовою для пептидів з антибактеріальною активністю. Саме за рахунок позитивно заряджених амінокислотних залишків такі пептиди можуть зв'язуватися з негативно зарядженими ліпосахаридами зовнішньої мембранами грамнегативних бактерій і реалізувати антимікробну активність.

Таким чином, проведений аналіз з використанням методів електрофорезу виявив, що загальна пептидна фракція включає пептиди різної молекулярної маси (6, 5, 4, 3, 1,5 кДа) з ізоелектричними точками у лужній області рН (8,0–10,0).

Дослідження властивостей пептидів із метою пошуку молекул, які виявляють певні біологічні ефекти, доцільно проводити на окремих пептидах, а не на загальній пептидній фракції. Тому надалі пептидну фракцію, одержану з тканин гідробіонта Антарктичного регіону, розділено на окремі складові методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Застосування хроматографії, що поділяє за розмірами, у цьому конкретному випадку, окрім поділу вихідного зразка на окремі фракції, дозволяє позбавитися від можливих небілкових домішок, наявних у пробі. Обраний нами метод В. Николаичик і співавторів (1991), як перший етап виділення пептидів, використовується переважно для одержання фракції молекул середніх мас, яка окрім олігопептидів і пептидів містить молекули небілкової природи.

У результаті хроматографічного розділення отримано чотири піки, що відповідають фракціям із пептидами, молекулярна маса яких становить близько 2,3 кДа (1-й пік), 1,9 кДа (2-й пік), 1,4 кДа (3-й пік) та 0,7 кДа (4-й пік).

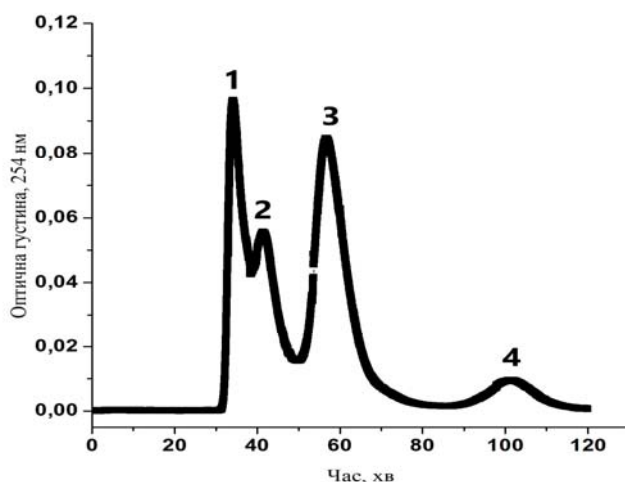


Рис. 4. Хроматограма поділу фракції пептидів методом хроматографії, що поділяє за розмірами: 1...4 – номери піків, що відповідають одержаним фракціям

Таким чином, у результаті поєднання декількох методичних підходів оптимізовано метод одержання фракції природних пептидів, який включав етап відділення білкових молекул шляхом поетапного осадження хлорною кис-

лотою й етиловим спиртом, подальше доочищення одержаної проби методом ультрафільтрації та фракціонування на колонці з Sephadex G-15. Застосування запропонованого методу на прикладі гідробіонта *Nacella concinna* дозволило виділити з тканин гідробіонта чотири фракції,

що містили пептиди різної молекулярної маси. Проведений аналіз із використанням 2Д-електрофорезу виявив, що ізоелектричні точки більшості пептидів містяться у діапазоні рН від 8,0 до 10,0.

Список використаної літератури

1. Synthetic Peptides as Therapeutic Agents: Lessons Learned From Evolutionary Ancient Peptides and Their Transit Across Blood-Brain Barriers // D. A. Lovejoy, D. W. Hogg, T. L. Dodsworth et al. // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – 10. – 730.
2. Cheng S. Extraction of polysaccharides from Mytilusedulis and their antioxidant activity in vitro / S. Cheng, X. Yu, Y. Zhang // Shipin Gongye Keji. – 2010. – Vol. 31. – P. 132–134.
3. Lordan S. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases / S. Lordan, R. P. Ross, C. Stanton // Mar. Drugs. – 2011. – Vol. 9. – P. 1056–1100, doi: 10.3390/md9061056.
4. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells / P. Ganesan, K. Noda, Y. Manabe et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – 1810. – P. 497–503, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.02.008.
5. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action / A. Mayer, A. Rodriguez, O. Tagliatalata-Scafati, N. Fusetani // Mar. Drugs. – 2013. – 11. – P. 2510–2573, doi: 10.3390/md11072510.
6. Se-Kwon Kima. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review / Kima Se-Kwon, Wijesekara Isuru // J Functional Foods. – 2010. – Vol. 2. – P. 1–9.
7. Bougateg N. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinellaaurita) by-products proteins / N. Bougateg, L. Manni Nedjar-Arroume // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 118. – 3. – P. 559–565.
8. Su Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (Pelteobagrusfulvidraco) / Y. Su // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2011. – Vol. 158. – 2. – P. 149–154.
9. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate / H. Wu, H.-L. He, X.-L. Chen et al. // Process Biochemistry. – 2008. – Vol. 43. – 4. – P. 457–461.
10. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation / N. Rajapakse, W.-K. Jung, E. Mendis et al. // Life Sciences. – 2005. – Vol. 76. – 22. – P. 2607–2619.
11. Nikolajchik V. Sposob opredeleniya srednih molekul / V. Nikolajchik, V. Moin, V. Kirkovskij // Laboratornoedelo. – 1991. – 10. – P. 13–18.
12. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227(1). – P. 680–685.
13. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont. – 2004. – 168.
14. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in Escherichia coli using a new technology / Y. Shen, H. X. Ai, R. Song et al. // Microbiol Res. – 2010. – Vol. 165(8). – P. 713–718, doi: 10.1016/j.micres.2010.01.002. Epub 2010 Jan 20.
15. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs / X. Duan, D. Ocen, F. F. Wu et al. // Food Res. – 2014. – 56. – P. 18–24.
16. Scott M. G. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system / M. G. Scott, R. E. Hancock // Crit Rev Immunol. – 2000. – 20. – P. 407–431.
17. Hilpert K. Short linear cationic antimicrobial peptides: screening, optimizing, and prediction / K. Hilpert, C. D. Fjell, A. Cherkasov // Methods Mol Biol. – 2008. – 494. – P. 127–159.

Н. Ракша, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
 Т. Маевская, канд. техн. наук
 ОО "Украинский инновационный кластер рыбной индустрии", Киев, Украина

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

*Стремительный рост спроса на пептидные препараты актуализирует поиск новых природных и экономически обоснованных источников сырья. Широкое разнообразие биологически активных соединений, в том числе и пептидной природы, присущее морским гидробионтам, позволяет рассматривать их как перспективный сырьевой ресурс. Вместе с тем, использование морских объектов в качестве источника для получения целевых молекул требует определенной оптимизации существующих методологических подходов их выделения и обеспечения надлежащей степени очистки. В работе решается задача оптимизации метода получения пептидов из гидробионтов Антарктического региона на примере гидробионта *Nacellaloscipinna*. Предложенный трехэтапный подход позволяет выделять фракции пептидов различной молекулярной массы. Первый этап включал осаждение высокомолекулярного белкового материала сначала хлорной кислотой, а затем 80%-м этиловым спиртом. В результате была получена фракция пептидных молекул с молекулярной массой до 6,5 кДа, которая содержала небольшое количество высокомолекулярных белковых примесей. Дальнейшую доочистку полученной фракции проводили путем ультрафильтрации с использованием мембран с размером пор 10 кДа. Контроль белково-пептидного состава пробы на всех этапах получения проводили методом диск-электрофореза в денатурирующих условиях в пластинах 18%-го полиакриламидного геля. Проведенный анализ с использованием 2Д-электрофореза показал, что изоэлектрические точки большинства пептидов находятся в диапазоне рН от 8,0 до 10,0. Лишь незначительная часть пептидов имела изоэлектрические точки при 4,0 и 5,0 рН. Заключительный этап получения пептидной фракции включал фракционирования пробы методом гель-хроматографии. В результате хроматографического разделения было получено четыре пика, соответствующие фракциям с пептидами, молекулярная масса которых составляет около 2,3 кДа (1-й пик), 1,9 кДа (2-й пик), 1,4 кДа (3-й пик) и 0,7 кДа (4-й пик).*

Ключевые слова: гидробионты, пептидная фракция, метод получения.

References (Scopus)

1. Lovejoy D.A., Hogg D.W., Dodsworth T.L., Jurado F.R., Read C.C., D'Aquila A.L., Barsyte-Lovejoy D. Synthetic Peptides as Therapeutic Agents: Lessons Learned From Evolutionary Ancient Peptides and Their Transit Across Blood-Brain Barriers // Front Endocrinol (Lausanne). 2019; 10: 730.
2. Cheng S., Yu X., Zhang Y. Extraction of polysaccharides from Mytilusedulis and their antioxidant activity in vitro. ShipinGongyeKeji. 2010; 31:132–134.
3. Lordan S., Ross R.P., Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. Mar. Drugs. 2011;9:1056–1100. doi: 10.3390/md9061056.
4. Ganesan P., Noda K., Manabe Y., Ohkubo T., Tanaka Y., Maoka T., et al. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. Biochim. Biophys. Acta. 2011;1810:497–503. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.02.008
5. Mayer A., Rodriguez A., Tagliatalata-Scafati O., Fusetani N. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. Mar. Drugs. 2013;11:2510–2573; doi:10.3390/md11072510
6. Se-KwonKima, IsuruWijesekaraa. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J Functional Foods. 2010;2;1–9.
7. Bougateg N. Nedjar-Arroume L. Manni. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinellaaurita) by-products proteins. Food Chemistry. 2010;118(3):559–565.
8. Su Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (Pelteobagrusfulvidraco). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2011;158(2):149–154.
9. Wu H., He H.-L., Chen X.-L., Sun C.-Y., Zhang Y.-Z., Zhou B.-C. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate. Process Biochemistry. 2008;43(4):457–461.
10. Rajapakse N., Jung W.-K., Mendis E., Moon S.-H., Kim S.-K. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. Life Sciences. 2005;76(22):2607–2619.
11. Nikolajchik V., Moin V., Kirkovskij, V. Sposob opredeleniya srednih molekul. Laboratornoe delo. 1991;10:13–18.
12. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(1):680–685.
13. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont. 2004;168.
14. Shen Y, Ai HX, Song R, Liang ZN, Li JF, Zhang SQ. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in Escherichia coli using a new technology. Microbiol Res. 2010;165(8):713–8. doi: 10.1016/j.micres.2010.01.002. Epub 2010 Jan 20.
15. Duan X, Ocen D, Wu F.F., Li M., Yang N., Xu J., Chen H.Y., Huang L.Q., Jin Z.Y., Xu X.M. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs. Food Res. 2014;56:18–24.
16. Scott M.G., Hancock R.E. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. Crit Rev Immunol. 2000;20:407–431.
17. Hilpert K., Fjell C.D., Cherkasov A. Short linear cationic antimicrobial peptides: screening, optimizing, and prediction. Methods Mol Biol. 2008;494:127–159.

Надійшла до редколегії 05.01.2021
 Отримано виправлений варіант 02.01.2021
 Підписано до друку 02.01.2021

Received in the editorial 05.01.2021
 Received a revised version on 02.01.2021
 Signed in the press on 02.01.2021

N. Raksha, PhD, O. Savchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
T. Maievska, PhD
NGO "Ukraine's fishing industry cluster of innovations", Kyiv, Ukraine

OBTAINING PEPTIDES FROM AQUATIC ORGANISMS OF THE ANTARCTIC REGION

*The rapid growth in demand for peptide drugs is actualizing the search for new natural and economically viable sources of raw materials. The wide variety of biologically active compounds, including peptide nature, inherent in marine aquatic organisms allows us to consider their promising raw material resource. However, the use of marine objects as a source for the production of target molecules requires some optimization of existing methodological approaches to their isolation and ensure the appropriate degree of purification. The problem of optimization of the method of obtaining peptides from hydrobionts of the Antarctic region on the example of the hydrobiont *Nacellaconcinna* is solved in the work. The proposed three-step approach allows to isolate fractions of peptides of different molecular weight. The first step involved the precipitation of high molecular weight protein material first with perchloric acid and then with 80% ethyl alcohol. The result was a fraction of peptide molecules with a molecular weight of up to 6.5 kDa, which contained a small amount of high molecular weight protein impurities. Further purification of the obtained fraction was performed by ultrafiltration using membranes with a pore size of 10 kDa. Control of the protein-peptide composition of the sample at all stages of production was performed by disk electrophoresis under denaturing conditions in plates of 18% polyacrylamide gel. Analysis using 2D electrophoresis found that the isoelectric points of most peptides are in the pH range from 8.0 to 10.0. Only a small proportion of the peptides had isoelectric points at 4.0 and 5.0 pH. The final step of obtaining the peptide fraction involved fractionation of the sample by gel chromatography. As a result of chromatographic separation, four peaks were obtained, corresponding to the fractions with peptides, the molecular weight of which is about 2.3 kDa (1 peak), 1.9 kDa (2 peak), 1.4 kDa (3 peak) and 0.7 kDa (4 peak).*

Keywords: hydrobionts, peptide fraction, production method.

УДК: 612.17+577.1

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.43–47

Р. Федічкіна, асп., Ю. Коркач, канд. біол. наук, І. Охай, асп.,
Ю. Гошовська, канд. біол. наук, В. Сагач, д-р мед. наук.
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ВПЛИВ МОДУЛЮВАННЯ СИНТЕЗУ СІРКОВОДНЮ ТА ГЛУТАТІОНУ НА ОКИСНО-НІТРОЗАТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МІОКАРДА В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Підтримання окисно-відновного балансу є необхідною умовою для забезпечення нормального метаболізму клітин серця. Ішемічно-реперфузійні порушення функції серця супроводжуються вибухоподібним утворенням АФК, пошкодженням мембран клітини, порушенням функцій білків, розвитком м'язової контрактури тощо. Відомо про кардіопротекторний вплив сірководню (H_2S), який синтезується з L-цистеїну. Крім того, L-цистеїн є однією з трьох амінокислот, що утворюють антиоксидант глутатіон (GSH). Зважаючи на це, метою нашої роботи було дослідити вплив модуляції синтезу GSH та H_2S на окисно-нітрозативний метаболізм тканин серця в умовах ішемії-реперфузії. Пропаргілгліцин (PAG) та бутіонінсульфоксимін (BSO) (інгібітори синтезу H_2S та глутатіону відповідно), а також L-цистеїн вводили щуром внутрішньочеревинно. Використовуючи метод реперфузії коронарних судин серця за Лангендорфом, моделювали ішемію-реперфузію. У тканинах серця до та після ішемії, визначали швидкість генерації АФК, вміст продуктів ПОЛ, активність NO-синтаз. Дослідження показали, що ефектом комбінації PAG+L-цистеїн є попередження утворення АФК, збільшення пулів низькомолекулярних нітрозотіолів, збереження активності конститутивної NO та пригнічення активності індукційної NO-синтази як у доішемійний період, так і в період реперфузії. Позитивний ефект на кардіодинаміку виражався в повному відновленні функції серця в реперфузійний період. Премедикація BSO у групі PAG+L-цистеїн значно знижувала ефективність комбінації та погіршувала відновлення функції серця під час реперфузії. Генерація O_2^- та OH збільшувалась, активність iNO-синтази зростала в 3.5 рази порівняно з групою з введенням комбінації PAG+L-цистеїн. Введення комбінації PAG+L-цистеїн в умовах моделювання ішемії-реперфузії пригнічує утворення АФК і зберігає активність sNOS, забезпечуючи таким чином стабільну продукцію NO. Попереднє введення інгібітора синтезу глутатіону BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект введення PAG+L-цистеїну за рахунок зниження біодоступності глутатіону.

Ключові слова: серце, активні форми кисню, ішемія-реперфузія, глутатіон, сірководень.

Вступ. Серцево-судинні захворювання, що десятиліттями не поступаються чільними місцями у причинах смертності людей, часто мають у своїй основі пошкодження мембран клітин активними формами кисню (АФК). Особливо чітко ці процеси спостерігаються при ішемічно-реперфузійному порушенні функції серця. Припинення кровопостачання призводить до нестачі кисню у тканинах. Метаболізм клітин переходить з аеробного на анаеробний гліколіз, унаслідок чого накопичується лактат і знижується внутрішньоклітинний рН [7], викликаючи збільшення концентрації натрію [1]. У свою чергу, перевантаження натрієм запускає Na^+ - Ca^{2+} обмінник у зворотний бік, що є причиною збільшення концентрації кальцію у клітині [13]. Відновлення кровотоку та надходження кисню в ішемізовану тканину призводить до вибухоподібного утворення АФК, зокрема супероксиданіон радикала та пероксиду водню [3], які вступають у взаємодію з молекулами сірководню (H_2S) й оксиду азоту (NO), утворюючи їх високоактивні радикали, що є надпотужними пошкоджуючими агентами [9]. Усі ці процеси спричиняють пошкодження білків і ліпідів клітини,

відкриття мітохондріальних пор транзиторної провідності (MPTP), порушення функції мітохондрій, пошкодження ДНК, м'язової контрактури тощо [4, 7].

Відомо, що кардіопротекторний вплив проявляє сірководень, який є третьою сигнальною молекулою з родини газоподібних вторинних посередників [17]. Попередником його синтезу є амінокислота L-цистеїн, що також входить до складу вагомий для антиоксидантного захисту молекули – глутатіону, який важливий у антиоксидантному захисті за рахунок своєї дії як скавенджера вільних радикалів і кофактора ряду антиоксидантних ферментів [11]. Тому від внутрішньоклітинних рівнів глутатіону, виснаження або підвищення його пулів, значно залежить окисно-відновна регуляція клітин [6].

Раніше нами показано, що попереднє введення пропаргілгліцину (PAG), інгібітора цитоплазматичного ферменту синтезу сірководню цистатіон- γ -ліази (CSE), та попередника синтезу сірководню та глутатіону – амінокислоти L-цистеїну мало виражений кардіопротекторний вплив в умовах ішемії-реперфузії ізольованого серця щура та діабету [5, 15]. Тому метою нашої роботи було

дослідити зміни оксидативно-нітрозативного метаболізму в умовах ішемії-реперфузії під час моделювання синтезу H₂S та глутатіону в тканинах міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.

Методи та матеріали. Досліди проводились на ставозрілих щурах самцях лінії Wistar, які утримувались на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольца відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010) та Закону України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (редакція від 13.02.20).

Тварин було розділено на групи, в яких моделювали ішемічно-реперфузійне пошкодження серця (I/R) та без моделювання ішемії-реперфузії. Препарати вводились внутрішньочеревинно в чотирьох комбінаціях: 1 – L-цистеїн (121 мг/кг, за 30 хв перед декапітацією), 2 – пропаргілгліцин (PAG, 11,3 мг/кг, 40 хв перед декапітацією), 3 – PAG (10 хв) + L-цистеїн (30 хв), 4 – бутіонін сульфоксимін (BSO, 22,2 мг/кг) +PAG (10 хв)+L-цистеїн (30 хв). За 100 % брали контрольну групу без введення препаратів і без моделювання ішемії-реперфузії. Зразки тканин серця збирались на 10-й хв реперфузії, коли показники роботи серця були максимальними та на 15-й хв перфузії у безішемічних груп. Кількість тварин у групах така: контроль n=8, I/R n=10, PAG+L-цистеїн n=5, PAG+L-цистеїн+I/R n=7, BSO+ PAG+L-цистеїн n=8, BSO+ PAG+L-цистеїн+I/R n=6.

У гомогенатах серцевої тканини щурів визначали біохімічні показники, що характеризують оксидативний і нітрозативний стреси, зміни синтезу оксиду азоту та сірководню. Показники окисного стресу визначали так: швидкість генерації супероксид-аніону (O₂⁻) за окисненням цитохрому С; швидкість генерації ·ОН-радикала за методом окиснення дезоксирибози; вміст пероксиду водню (H₂O₂) спектрофотометрично при довжині хвилі 353 нм, з використанням розчину йодиду калію з надлишком лактопероксидази [10]. Маркери перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ): вміст дієнових кон'югатів (DK) визначали спектрофотометрично при 232 нм гептанових екстрактів

проб [8], вміст малонового діальдегіду (MDA) – по реакції з тіобарбітуровою кислотою [4]. Показники нітрозативного стресу: активність сумарної NOS (ендотеліальної (eNOS) і нейрональної (nNOS)) визначали за вмістом утвореного L-цитруліну, розраховуючи кальцій-залежну активність cNOS за різницею між активністю сумарної NOS та активністю кальцій-незалежної індукційної NOS (iNOS) [16]; нітратредуктазну активність (Red) – в умовах насичення субстрату NO₃ та надлишку NADH; аргіназну активність (Arg) визначали за вмістом продукту її реакції – сечовини [5]. Пули стабільних метаболітів оксиду азоту: вміст нітрит-аніону (NO₂⁻) в безбілкових пробах за методом Гріна, нітрат-аніону (NO₃⁻) – у модифікації з бруцином [5]. Вміст низькомолекулярних (LMNT) S-нітрозотолів визначали за методом Saville, використовуючи реагент Гріса, що містить катіони Hg₂⁺ [14]. Визначали ендogenous стаціонарні пули сірководню (H₂S) [19] і зміни активності ферментів його синтезу. Кількість білка у пробах визначали за Лоурі.

Усі дані виражалися у вигляді середнього ± стандартна похибка. Для статистичної обробки результатів використовували критерій Манна – Уїтні. Достовірними вважали зміни при P<0,05.

Результати та обговорення. У нашому попередньому дослідженні ми показали, що вже з раннього періоду реперфузії була виражена кардіопротекторна дія спільного введення препаратів PAG та L-цистеїну [15]. Попереднє введення комбінації PAG та L-цистеїну сприяло відновленню функції серця на 95 % упродовж усього реперфузійного періоду. Це проявлялося у збереженні сили скорочення та розслаблення лівого шлуночка, а також в сталій кисневій вартості роботи міокарда. Ці ефекти відмінялись уведенням інгібітора синтезу глутатіону BSO разом із PAG та L-цистеїном. Тому виникає питання про можливі біохімічні механізми такого ефекту, а саме: залучення процесів окисного метаболізму, різних шляхів синтезу оксиду азоту, зміни синтезу сірководню та глутатіону за сумісної дії препаратів.

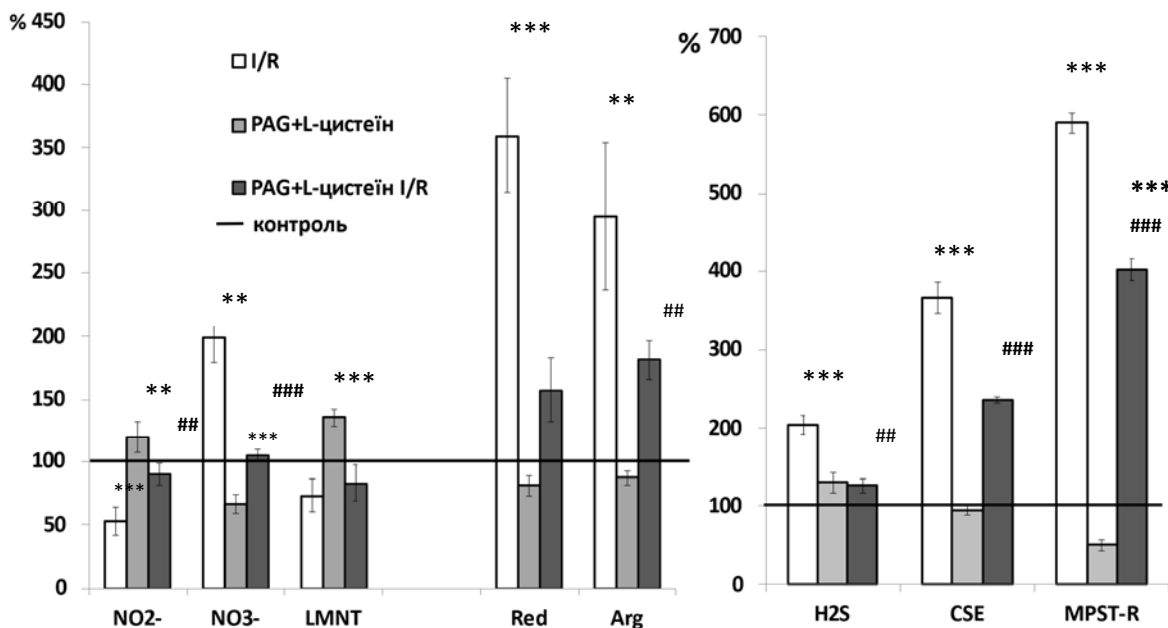


Рис. 1. Вплив інгібування синтезу H₂S та GSH на показники нітрозативного метаболізму та рівень H₂S у тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії (I/R). Дані переведено у відсотки відносно показників контрольної групи

(* – достовірність відносно значень у контрольній групі, # – достовірність відносно значень у групі з моделюванням ішемії-реперфузії)

Моделювання ішемії-реперфузії призводить до розвитку окисного стресу та порушення метаболізму оксиду азоту у тканинах серця дорослих щурів. Значно зростає активність нітратредуктази, а це означає інтенсифікацію нітратредуктазного шляху утворення NO (рис. 1). Про реутилізаційний шлях надмірного синтезу NO свідчить також достовірне підвищення концентрації його стабільного метаболіту – нітрат-аніону (NO_3^-), що говорить про утворення та розлад пероксинітриту з утворенням $\cdot\text{OH}$ -радикала NO-залежним шляхом. Причому більш ніж удвічі, відносно контрольних дорослих тварин, зростає активність індукційної аргінази II, що є ключовим ферментом неокисного шляху деградації аргініну з утворенням продуктів реакції сечовини й орнітину, що призводить до зниження біодоступності L-аргініну для роботи cNOS. Про зниження синтезу NO de novo свідчить також зменшення стабільного метаболіту оксиду азоту NO_2^- . Як результат, зниження de novo синтезу NO конститутивними cNOS супроводжувалося порушенням релаксації міокарда й помітним підвищенням кінцево-діастолічного тиску під час ішемії. Вміст LMNT знижується за умов ішемії-реперфузії, але зростає при введенні PAG+L-цистеїну, як до ішемії так і в реперфузійний період. Це опосередковано вказує на збільшення рівнів глутатіону у тканинах, оскільки GSH також належить до LMNT [15]. Крім того, низькомолекулярні нітрозотіоли, до яких належить і нітрозоглутатіон, є донорами NO. Окремо зазначимо, що за ішемії-реперфузії ендогенні пули H_2S були значно

підвищені, імовірно, за рахунок активності ферментів його синтезу, а саме збільшення активності цитоплазматичної H_2S -синтази CSE більше ніж утричі. За умов введення PAG+L-цистеїну у групі з моделюванням ішемії-реперфузії знижується активність як CSE, так і мітохондріальної синтази H_2S (меркаптопіруватсульфуртрансферази, MPST), проте її активність усе одно лишалась на третину більшою ніж у CSE. Це свідчить про компенсаторний внесок MPST в забезпечення синтезу H_2S в умовах ішемії-реперфузії та пригнічення активності CSE (рис. 1).

Порівняно з контрольною групою, показники якої на рис. 2 представлено як 100 %, після моделювання ішемії-реперфузії спостерігалось значне підвищення швидкості утворення гідроксильних ($\cdot\text{OH}$) радикалів та супероксидних аніонів ($\text{O}_2^{\cdot-}$), підвищення вмісту H_2O_2 , який утворюється при ферментативній дисмутації $\text{O}_2^{\cdot-}$ супероксиддисмутазою, та інтенсифікація процесу ПОЛ, на що вказувало зростання вмісту ДК в 2,4 рази та МДА більш ніж в 3 рази відповідно. Відбувається збільшення активності синтезу NO індукційною NO-синтазою, що на фоні підвищення вмісту нітрат-аніону говорить про розвиток нітрозативного стресу на фоні окисного. Також за дії ішемії-реперфузії значно (у 5,5 рази) відбувається зниження активності конститутивного синтезу NO, що свідчить про зменшення генерації NO шляхом de novo при окисній деградації L-аргініну.

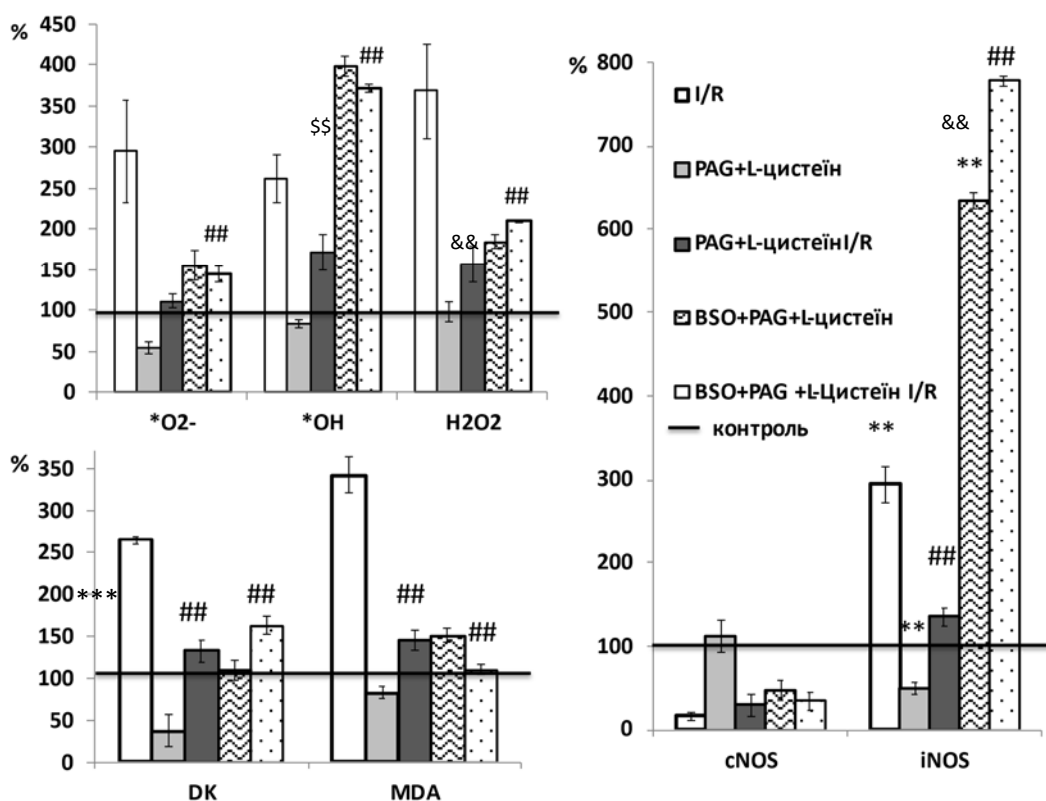


Рис. 2. Вплив інгібування синтезу H_2S та GSH на показники окисного стресу та рівень H_2S у тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії. Дані переведено у відсотки відносно показників контрольної групи (* – достовірність щодо значень у контрольній групі, # – достовірність відносно значень у групі з моделюванням ішемії-реперфузії (I/R), \$ – достовірність відносно значень у групі PAG+L-цистеїну I/R)

Наші результати свідчать про розвиток індукованого ішемією-реперфузією окисного та нітрозативного стресу внаслідок підвищення генерації утворення $\cdot\text{OH}$ - і $\text{O}_2^{\cdot-}$ радикалів, підвищення індукційного і реутилізаційного синтезу NO та синтезу H_2S на тлі значного зменшення конститутивного синтезу NO.

В умовах інгібування синтезу H_2S екзогенний та/або ендогенний L-цистеїн може стати доступнішим для синтезу глутатіону. Завдяки цьому процесу співвідношення між окисненою та відновленою формами глутатіону повинно змінюватися, збільшуючи рівні відновленого глутатіону. Це може активувати антиоксидантний захист і

сприяти відновленню конститутивного синтезу NO та спряженню cNOS [2]. Активність cNOS була підвищена у групі з попереднім введенням PAG+L-цистеїну, що, імовірно, сприяло підтримці рівня NO навіть у реперфузійний період (рис. 2). У ході цього процесу не відбувається збільшення активності iNOS, значно знижується активність нітратредуктази й аргінази II, а також спостерігається нормалізація рівнів метаболітів оксиду азоту – підвищення NO₂- та зниження пулів NO₃-. Важливо зазначити, що NO, який виробляється cNOS, інгібує відкриття МРТР [18], що надзвичайно важливо в умовах ішемії-реперфузії. Таким чином, механізми кардіопротекції, опосередкованої PAG+L-цистеїном полягали в ефективному зниженні генерації АФК і збереженні синтезу NO шляхом пригнічення нітрозативного стресу й інгібування роз'єднання cNOS, індукованого ішемією-реперфузією. Водночас, попереднє введення інгібітора синтезу глутатіону BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект комбінації PAG+L-цистеїн (рис. 2).

Ішемія-реперфузійний слід час введення L-цистеїну на фоні інгібування обох шляхів його метаболізму супроводжувалася розвитком окисного стресу на рівні з показниками контрольної ішемії-реперфузії міокарда. Дещо меншою була лише кількість пероксиду водню, на рівні із групою з уведенням лише PAG+L-цистеїну (рис. 2). Вміст пероксиду водню й активність супероксид-аніон радикала, на фоні введення BSO+PAG+L-цистеїн, досягли значень реперфузійного періоду групи без застосування хімічних речовин. При цьому значно зростає активність гідроксильного *ОН-радикала, який значною мірою утворюється NO-залежним (через утворення і розпад пероксинітритної кислоти) шляхом. У цьому процесі активність cNOS стала близькою до значень, зареєстрованих під час реперфузії сердець тварин, яким не робили жодних уведень, а рівень активності iNOS зріс у 2,5 і 3 рази до і після ішемії відповідно. Це свідчить про порушення de novo синтезу NO конститутивними NOS і може бути причиною розвитку реперфузійної контрактури міокарда. Цікаво, що достовірно зросли рівні H₂S у тканинах серця і до, і після ішемії. Вірогідно, це пов'язано з тим, що присутність доданого екзогенного L-цистеїну стимулювала синтез H₂S мітохондріальними ферментами, але ця кількість була недостатньою для забезпечення кардіопротекторного ефекту.

Висновки.

1) Кардіопротекторний ефект введення L-цистеїну на тлі блокади синтезу H₂S характеризувався активним попередженням розвитку окисного стресу і ПОЛ, стимуляцією активності cNOS та інгібуванням надлишкового індукційного і реутилізаційного синтезу NO в реперфузійний період.

2) Зростає присутність LMNT, що опосередковано свідчить про зростання кількості глутатіону та біодоступності NO. Отже, L-цистеїн, що не метаболізується в H₂S, перетворюється на глутатіон.

3) Попереднє введення BSO відміняє антиоксидантний ефект введення PAG+L-цистеїну, нівелює ефект останнього як скавенджера АФК, регулятора МРТР і стимулятора активності синтезу NO конститутивними NOS.

Список використаної літератури

1. Avkiran M. Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects / M. Avkiran, M. S. Marber // *J Am Coll Cardiol.* – 2002. – Vol. 39. – № 5. – P. 747–53.
2. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function / C.-A. Chen, T.-Y. Wang, S. Varadharaj et al. // *Nature.* – 2010. – Vol. 468. – № 7327. – P. 1115–8.

3. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress / H. Y. Chung, B. S. Baek, S. H. Song et al. // *Age (Omaha).* – 1997. – Vol. 20. – № 3. – P. 127–40.

4. Conte D. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage / D. Conte, S. Narindrasorasak, B. Sarkar // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – № 9. – P. 5125–30.

5. Modulation of hydrogen sulfide synthesis improve heart function and endothelium-dependent vasorelaxation in diabetes / N. Dorofeyeva, Iu. Korkach, O. Kutsyk, V. Sagach // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2020? doi: 10.1139/cjpp-2020-0302. Online ahead of print.

6. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Dröge // *Physiological Reviews.* – 2002. – Vol. 82. – № 1. – P. 47–95.

7. Myocardial ischemia reperfusion injury – from basic science to clinical bedside / A. Frank, M. Bonney, S. Bonney et al. // *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* – 2012. – Vol. 16. – № 3. – P. 123–32.

8. Gavrilo V. B. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts / V. B. Gavrilo, A. R. Gavrilo, N. F. Khmara // *Lab Delo.* – 1988. – 1. 2. – P. 60–4.

9. Granger D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury / D. N. Granger // *Am J Physiol.* – 1988. – Vol. 255. – № 6. – P. 1269–1275.

10. Huwiler M. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system / M. Huwiler, H. Kohler // *Eur J Biochem.* – 1984. – Vol. 141. – № 1. – P. 69–74.

11. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies / L. Kennedy, J. K. Sandhu, M. E. Harper, M. Cuperlovic-Culic // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 1429.

12. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension / U. Landmesser, S. Dikalov, S. R. Price et al. // *J Clin Invest.* – 2003. – Vol. 111. – № 8. – P. 1201–9.

13. The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger is essential for Ca²⁺ homeostasis and viability / N. S. Luongo, J. P. Lambert, P. Gross et al. // *NATURE.* – 2017. – Vol. 545. – № 7652. – P. 93–7.

14. Padgett C. M. Cellular responses to nitric oxide. Role of protein S-thiolation/de thiolation / C. M. Padgett, A. R. Whorton // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 358. – № 2. – P. 232–242.

15. Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion / V. F. Sagach, T. V. Shimanskaya, Y. V. Goshovska, R. A. Dobrovol'ska // *IJPP.* <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1,7628674d286b73a0,18d18afe1258f5d1.html>

16. Salter M. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases / M. Salter, R. G. Knowles, S. Moncada // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 291. – № 1. – P. 145–9.

17. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential / Y. Shen, Z. Shen Z, S. Luo et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015. – Article ID: 925167.

18. No-dependent modulation of the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening under ischemia-reperfusion of the isolated heart / T. V. Shimanskaia, F. V. Dobrovol'skiĭ, G. L. Vavilova et al. // *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* – 2009. – Vol. 95. – № 1. – P. 28–37.

19. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide / A. Svenson // *Analytical Biochemistry.* – 1980. – Vol. 107. – № 1. – P. 51–5.

References (Scopus)

1. Avkiran M, Marber MS. Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(5):747–53. PMID: 11869836.

2. Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes LA, Hermann C, Hassan Talukder MA, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 2010;468(7327):1115–8. doi: 10.1038/nature09599

3. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, et al. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age.* 1997;20(3):127–40.

4. Conte D, Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *J Biol Chem.* 1996;271(9):5125–30. PMID: 8617792

5. Dorofeyeva N. Modulation of hydrogen sulfide synthesis improve heart function and endothelium-dependent vasorelaxation in diabetes / Dorofeyeva N, Korkach Iu, Kutsyk O, Sagach V. // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2020. doi: 10.1139/cjpp-2020-0302. Online ahead of print.

6. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews.* 2002;82(1):47–95. PMID: 11773609.

7. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury – from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16(3):123–32. PMID: 22368166

8. Gavrilo V B, Gavrilo A R, Khmara N F. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo.* 1988;(2):60–4.

9. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):H1269-1275.

10. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *Eur J Biochem.* 1984;141(1):69–74.

11. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules.* 2020;10(10):1429. PMID: PMC7600400.

12. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 15, Квітень 2003;111(8):1201–9. PMID: 12697739

13. Luongo TS, Lambert JP, Gross P, Nwokedi M, Lombardi AA, Shanmughapriya S, et al. The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger is essential for Ca²⁺ homeostasis and viability. *NATURE.* 2017;545(7652):93–7.

14. Padgett C. M. Cellular responses to nitric oxide. Role of protein S-thiolation/de thiolation / C. M. Padgett, A. R. Whorton // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;358(2):232–242.

15. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV, Dobrovolska RA. Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion. *IJPP.* 2014;5(3). PMID: 24175471

16. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991;291(1):145–9.

17. Shen Y, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu YZ. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:925167. PMID: 26078822

18. Shimanskaia TV, Dobrovolskii FV, vavilova GL, Strutinskaya NA, Rudyk EV, Sagach VF. [No-dependent modulation of the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening under ischemia-reperfusion of the isolated heart]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2009;95(1):28–37.

19. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Analytical Biochemistry.* 1980;107(1):51–5.

Надійшла до редколегії 06.01.2021
Отримано виправлений варіант 03.01.2021
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021
Received a revised version on 03.01.2021
Signed in the press on 03.01.2021

Р. Федичкина, асп., Ю. Коркач, канд. биол. наук, И. Охай, асп.,
Ю. Гошовская, канд. биол. наук., В. Сагач, д-р мед. наук
Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

ВПЛИВНЯНЕ МОДЕЛЮВАННЯ СИНТЕЗА СЕРОВОДОРОДА І ГЛУТАТІОНА НА ОКСИДІТЕЛЬНО-НІТРОЗАТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МІОКАРДА В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗИЇ

Поддержание окислительно-восстановительного баланса является необходимым условием для обеспечения нормального метаболизма клеток сердца. Реперфузионные нарушения функции сердца сопровождаются взрывообразным образованием АФК, повреждением структуры ДНК и клеточных мембран, нарушением функций белков, развитием мышечной контрактуры и т. д. Показано кардиопротекторное влияние сероводорода (H₂S), предшественником синтеза которого является аминокислота L-цистеин. Кроме того, L-цистеин – одна из трех аминокислот, образующих антиоксидант глутатион (GSH). Целью нашей работы было исследовать влияние моделирования синтеза GSH и H₂S на окислительно-нитрозативный метаболизм тканей сердца в условиях ишемии-реперфузии (I/R). Ингибитор синтеза H₂S пропаргилглицин (PAG), ингибитор синтеза GSH буютионинсульфоксимин (BSO) и L-цистеин вводили крысам внутривенно. Использовали метод ретроградной перфузии коронарных сосудов изолированного сердца, моделировали I/R. В тканях сердца крыс до и после ишемии определяли скорость генерации АФК, содержание продуктов перекисидного окисления липидов, активность NO синтезирующих ферментов. Результаты показали, что эффектом комбинации PAG+L-цистеин являлось сохранение функции сердца в реперфузионный период без ухудшения сократительной активности, предупреждение образования АФК как перед ишемией, так и в период реперфузии, сохранение sNOS и подавление iNOS активности. Добавление BSO к PAG + L-цистеину значительно снижало эффективность комбинации и отменяло кардиопротекторный эффект. Генерация O₂ и OH увеличивалась, активность индуцибельной NO-синтазы возрастала в 3,5 раза по сравнению с группой с введением комбинации PAG + L-цистеин. Введение комбинации PAG + L-цистеин в условия моделирования ишемии-реперфузии подавляло образование АФК и сохраняло активность конститутивной NOS, обеспечивая стабильную продукцию оксида азота. Предварительное введение BSO полностью отменяло антиоксидантный эффект введения PAG + L-цистеина за счет снижения биодоступности глутатиона.

Ключевые слова: сердце, активные формы кислорода, ишемия-реперфузия, глутатион, сероводород.

R. Fedichkina, PhD Student, Yu. Korkach, PhD, I. Okhai, PhD Student,
Yu. Goshovska, PhD, V. Sagach, Dr Hab.
Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF MODULATION OF HYDROGEN SULFUR AND GLUTATHIONE SYNTHESIS ON OXIDATIVE AND NITROSATIVE METABOLISM UNDER MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION

Redox balance maintaining is a prerequisite for normal cardiomyocytes metabolism. Reperfusion injury of the heart is characterized by an explosive increase in ROS generation, cell membranes damage, dysfunction of proteins, the development of muscle contracture etc. It was shown that the hydrogen sulfide (H₂S) and the precursor of its synthesis the amino acid L-cysteine provided cardioprotective effect against ischemia-reperfusion. In addition, L-cysteine is one of amino acids that form an antioxidant glutathione (GSH). The aim of our work was to investigate the effect of GSH and H₂S synthesis modulation on the oxidative and nitrosative stress in cardiac tissues under conditions of ischemia-reperfusion. The H₂S synthesis inhibitor propargylglycine (PAG), the GSH synthesis inhibitor butionine sulfoxime (BSO) and L-cysteine were administered intraperitoneally. Next, ischemia-reperfusion of the Langendorff isolated rat heart was performed. In the tissues of rat's hearts, before and after ischemia, we determined the rate of ROS generation, content of POL products, the activity of NO synthesizing enzymes. Results of our study showed that pretreatment with PAG + L-cysteine combination prevented heart function disturbances, ROS formation, increased low molecular weight nitrosothiols content, preserved the activity of constitutive NOS and inhibited the activity of inducible NOS in the pre-ischemic period as well as in the period of reperfusion. Pretreatment with BSO in PAG + L-cysteine group significantly reduced the effectiveness of the combination and abolished cardioprotective effect. Generation of superoxide and hydroxyl anions was increased, activity of inducible NO-synthase was 3.5-fold increased comparing with PAG + L-cysteine pretreated group. Pretreatment with PAG + L-cysteine combination inhibited the formation of ROS and preserved the activity of constitutive NOS, thus providing stable production of NO. Pretreatment with BSO completely abolished an antioxidant effect of PAG + L-cysteine decreasing bioavailability of glutathione.

Keywords: heart, reactive oxygen species, ischemia-reperfusion, glutathione, H₂S.

УДК 577.352.5
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.48-53

M. Chernykh, Ph.D student, I. Zyma, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PECULIARITIES OF INFORMATION TRANSFER WITHIN FUNCTIONAL CORTICAL NETWORKS DURING EMOTIONAL FACE PERCEPTION

Aim: The research aimed to study and model the emotion-related activity of functional networks within the human brain cortex using power spectrum density and detrended phase transfer entropy methods. Attention was focused on revealing alterations in cognitive mechanisms, caused by presentation of neutral human faces as rare stimuli among faces with either negative or positive expression. **Methods:** EEG-data was recorded during the perception and processing of neutral human facial expressions, presented among positive and negative faces in two series of images, alongside with resting state with open and closed eyes, which was further analyzed using power spectrum density and detrended phase transfer entropy methods. **Results:** Specific EEG-bands (θ and β) were chosen for the analysis based on their prominent role in memory- and emotion-related mechanisms. The topography of the spectral power density corresponded to the generally accepted ideas describing perception and visual stimuli processing mechanisms. The phase transfer entropy method was not sufficient to analyze resting state data. The results of the analysis performed using the phase transfer entropy method revealed the problems of neutral faces differentiation when presented in a positive emotional context. Simultaneously, enhanced processes of motivational coding and self-reflection were observed during the presentation of neutral faces in a negative emotional context. These results corresponded with the data obtained in our previous ERP-based study. **Conclusions:** Phase transfer entropy and spectral power density have demonstrated their effectiveness in analyzing the mechanisms of emotional visual stimuli processing mediated in different cortical areas.

Keywords: EEG; Emotion; Facial expression; Functional network.

Introduction. Human facial expressions are complex multi-dimensional visual stimuli, which provide the brain with a wide range of characteristics to process. The current study focused on the activity in θ and β bands of EEG data, as θ - and β - band oscillations directly reflect such cognitive processes as retrieval and actualization of memory [1], emotional excitement and other consciousness-driven processes [2]. Thus, changes in power spectrum density in these bands were measured, and effective connectivity was modeled using phase transfer entropy (phase TE).

There is a hypothesis that the brain has an internal model of the external world, which functions under Bayesian system principles while processing sensory input so that experience-modified response is elicited [3]. In our previously conducted ERP study, we have revealed that the stimuli' valence, which creates the emotional context for the target neutral expressions, affects perception. This effect is signified in the increase of attention level and memory processes [4]. To reveal and quantify "causal" or directional inter-areal phase-phase interactions during emotion perception, a new information theory-based approach of phase transfer entropy (phase TE) was used, as phase synchronization of neuronal-based oscillations has been suggested to determine the coordination and integration of anatomically distributed information processing [5].

Phase synchronization and amplitude correlations are functionally independent phenomena [6] and reveal different neural network functioning aspects. Besides, the importance of phase-derived information in neuronal processes is highlighted by studies showing that phase-based grouping can encode more information than the amplitude-based one in both visual and auditory [7] processing. This marks the oscillatory phase as a reflection of neuronal synchronization and a robust information transmitter between neural ensembles. The phase-derived information flow from one cortical region to another cannot be estimated using phase synchrony metrics [8], which, by their nature, are not able to reveal spatial orientation.

Phase transfer entropy (phase TE) [9] is a reformulation of the Wiener principle within the framework of information theory (IT) [10]. Like Granger's causality, TE assesses whether the past of the original and target time series affects predicting the target time series's future.

Contrariwise, phase TE compares conditional probabilities using the Kulbak-Leibler divergence. If signal X triggers the signal Y, then the probability density of the future Y, due to its past, must be different from the probability density of the future Y due to the past of both X and Y. Besides, unlike Granger's causality (and dynamic causal modeling), the phase TE is model-free as it does not carry any assumptions about the signal structure.

Phase TE can be a good indicator for analyzing phase-based connections and detecting directional interactions in broadband MEG / EEG sensor and source signals. However, the calculation of phase TE for individual tests requires a large amount of continuous data, which can be problematic in the case of a temporary task-related connection. The method can also be used for continuous data analysis with the help of several techniques of state space reconstruction.

This research aimed to study and model the effect of positive and negative faces on the perception and processing of target neutral faces. To do so, we focused our attention on determining the spectral power density and establishing causal relationships within θ - and β -bands, which play a unique role in human cognitive activity. Theta oscillations generated in the limbic system are considered the "emotional" band of the human brain. Thus, this activity reflects the cognitive component of the emotional reaction [11]. Besides, according to modern ideas, the increase of θ -activity in the anterior cortical areas can be assessed as a marker of enhanced activation, accompanied by inner attention and positive emotional experience [12]. Slow θ -oscillations are associated with memory-related processes and awareness, while high-frequency θ -oscillations reflect cognitive activity's emotional background. At the same time, β -band today is mainly associated with various aspects of brain function, from simple sensory responses (visual, auditory, somatosensory, etc.) to higher cognitive functions such as sensory memory, mechanisms of visual attention regulation, movement, emotional states, and execution of cognitive or creative tasks [13].

Materials and methods. Forty students of Taras Shevchenko National University of Kyiv (21 females, aged 18-24, mean=21) were presented with two series of images,

during which EEG was recorded. Data was also obtained during resting state with both closed and open eyes. The image demonstration procedure and recording of the cerebral cortex's induced activity were performed using the software and hardware complex "Neurocom" (KhAI Medica, Kharkiv, Ukraine) according to a specially created template. Electrodes were applied to the scalp following the international "10-20%" system.

Stimuli were selected from the International Affective Pictures System (IAPS) [14]. In the stimulation program, positive (average values of emotional valence: $M = 6.94$, $SD = 1.42$ to $M = 8.03$, $SD = 1.13$) and negative (average values of emotional valence $M = 4.22$, $SD = 1.64$ to $M = 5.84$, $SD = 1.62$) emotional faces were chosen as frequent stimuli. Rare stimuli included neutral emotional faces with valence varied from $M = 4.22$, $SD = 1.64$ to $M = 5.84$, $SD = 1.62$.

Emotional stimuli were shown in an arbitrary pattern in which the likelihood of a rare stimulus ($n=100$) appearance was 30%. θ and β bands were subdivided as follows: θ -1 (4.1, 5.8) Hz, θ -2 (5.9, 7.4) Hz, β -1 (13, 19.9) Hz, β -2 (20, 30) Hz. For the subbands selected, power spectrum density analysis was conducted, which was then displayed in the topographical maps of activation. PTE method was applied to reveal the effective cortical neural networks involved in stimuli processing.

Transfer entropy (TE) is an information-theoretical measure that follows from the theory of information exchange to estimate conditional transition probabilities between two paired processes that develop over time.

The dPTE coefficient for the two cortical areas was calculated as the sum of the values of the PTE coefficients in both directions

$$dPTE = \frac{PTE_{xy}}{PTE_{xy} + PTE_{yx}}$$

The values of the dPTE criterion vary within [-0.5: 0.5]. The criterion was implemented based on the Brainstorm software package.

In order to compare the phase transfer entropy method to the existing methods of a quantitative assessment of human brain activity during cognitive activation, the spectral power density was calculated based on the fast Fourier transformation. This characteristic is the de facto standard measure of the strength of oscillation activity, which has been widely used in the study of cortical activity. Each EEG channel's spectral power density in each frequency band during each trial was calculated using the Welch period method [15]. The obtained values in the corresponding frequency range were normalized relative to the maximum value for emotional load and background, after which a map of the topographic distribution of the corresponding values was plotted on the scalp surface.

Results and discussion. The nature of the distribution of power spectrum density during resting state with both closed and open eyes can be described according to the

general framework of the human brain's functioning in the absence of an urgent external task, brought out by the action of so-called default neural networks. Namely: increased power in θ 1 and θ 2 subbands in frontal ($55.7 \mu V^2 / Hz$ and $54.6 \mu V^2 / Hz$, respectively), occipital ($55.3 \mu V^2 / Hz$ with eyes closed and $53.1 \mu V^2 / Hz$ with eyes open in θ 1; $54.8 \mu V^2 / Hz$ with eyes closed and $53.4 \mu V^2 / Hz$ with eyes open in θ 2 eyes) and parieto-central areas (maximum values up to $55.8 \mu V^2 / Hz$ in θ 1 and $54.8 \mu V^2 / Hz$ in θ 2) reflected the processes associated with memory, emotional manifestations, passive scanning of information (Fig. 1).

At the same time, the resting-state oscillations in β -band were characterized by a somewhat different topographic distribution: increased power of β 1-oscillations was concentrated in the occipital regions of the cortex during the trial with closed eyes. However, eyes opening caused the spread of generalized activation around the cortex, thus covering not only occipital (up to $48.6 \mu V^2 / Hz$) but also parietal, central, and frontal areas of the cortex (maximum values registered for frontal areas – $48.4 \mu V^2 / Hz$), with right-hemisphere lateralization in temporal regions (up to $48.5 \mu V^2 / Hz$ in the temporal area of the right hemisphere). As for the β 2 frequency subband, the distribution of the increased oscillatory power in the occipital (up to $44.3 \mu V^2 / Hz$), parietal (up to $43 \mu V^2 / Hz$), and frontal (up to $44.3 \mu V^2 / Hz$) areas of the cortex during resting state with closed eyes narrowed to the frontal regions (up to $44.1 \mu V^2 / Hz$) after opening the eyes (Fig. 1).

Therefore, the resulting picture can be explained using existing literature data on these subbands' properties: traditionally, β 1-subband is associated with external attention, cognition per se, while β 2-oscillations are considered to reflect internal awareness, maintaining the status quo of brain activity. That is why topographic maps obtained in different resting-state trials can be juxtaposed with each other.

It is also worth noting that the obtained topographic maps of activation-related changes in power generally corresponded to the widely accepted visual stimuli processing framework. Namely: high-power foci in the prefrontal and fronto-central regions of the cortex in θ 1 (up to $61 \mu V^2 / Hz$), θ 2 (up to $62.7 \mu V^2 / Hz$) and β 2 (up to $50.7 \mu V^2 / Hz$) subbands, were accompanied with high values of oscillation power in the frontal, central, parietal and right-hemisphere occipital regions (values ranged from $48.2 \mu V^2 / Hz$ to $60 \mu V^2 / Hz$) in β 1-subband (Fig. 1).

Concerning the results obtained by the detrended phase transfer entropy analysis in the processing of resting-state records with both closed and open eyes, it should be noted that the values of dPTE in such conditions were close to zero. This fact once again confirms the hypothesis of this method's effectiveness for analyzing only the states associated with cognitive activity. The connections formed within functional neural networks are shown in Fig.2 ($dPTE \geq 0.2$).

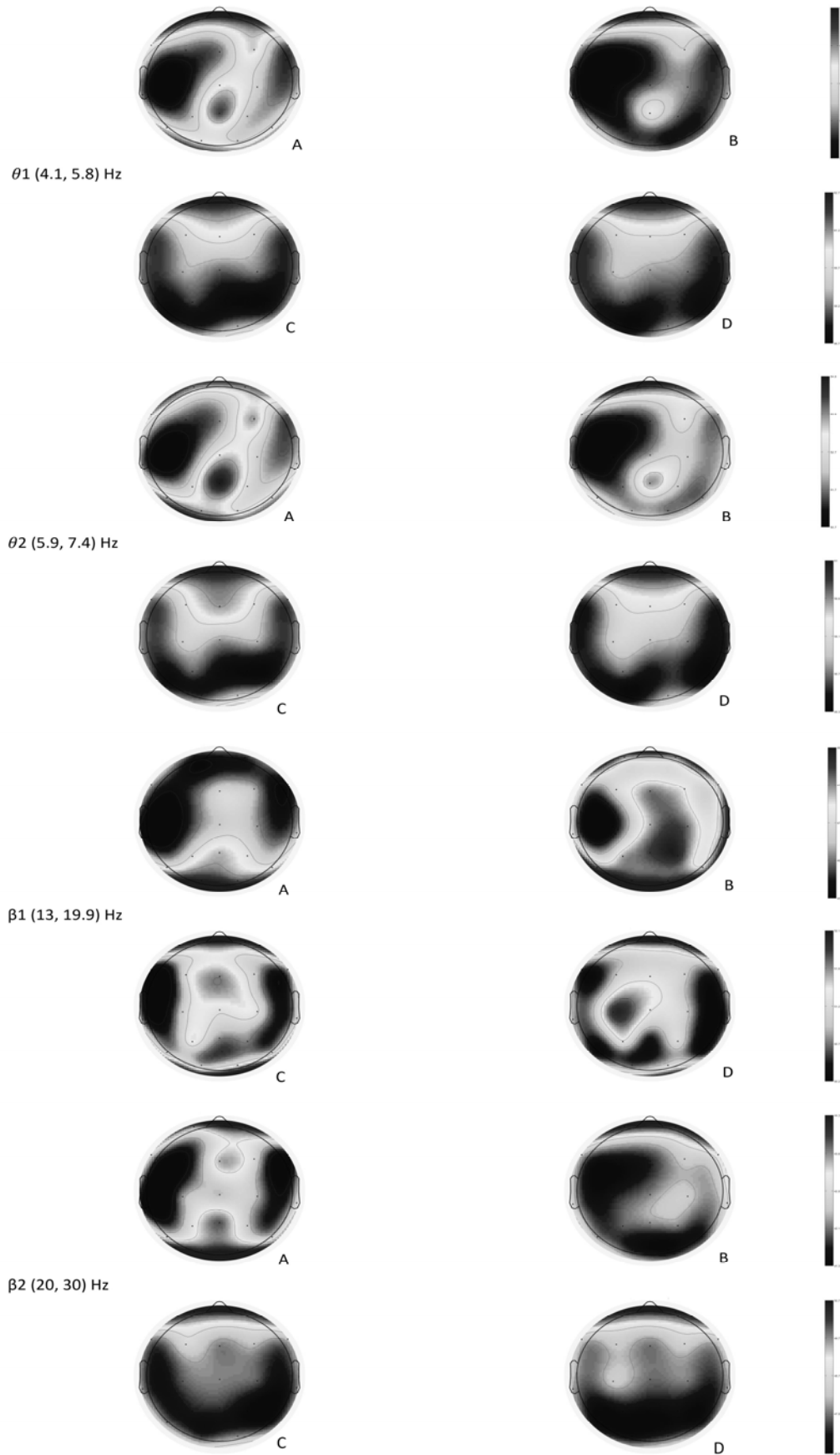


Fig. 1. Topographical distribution of the activation changes in the spectral power density:
A – resting with closed eyes; B- resting state with open eyes; C – demonstration of neutral stimuli in a positive context;
D – demonstration of neutral stimuli in a negative context

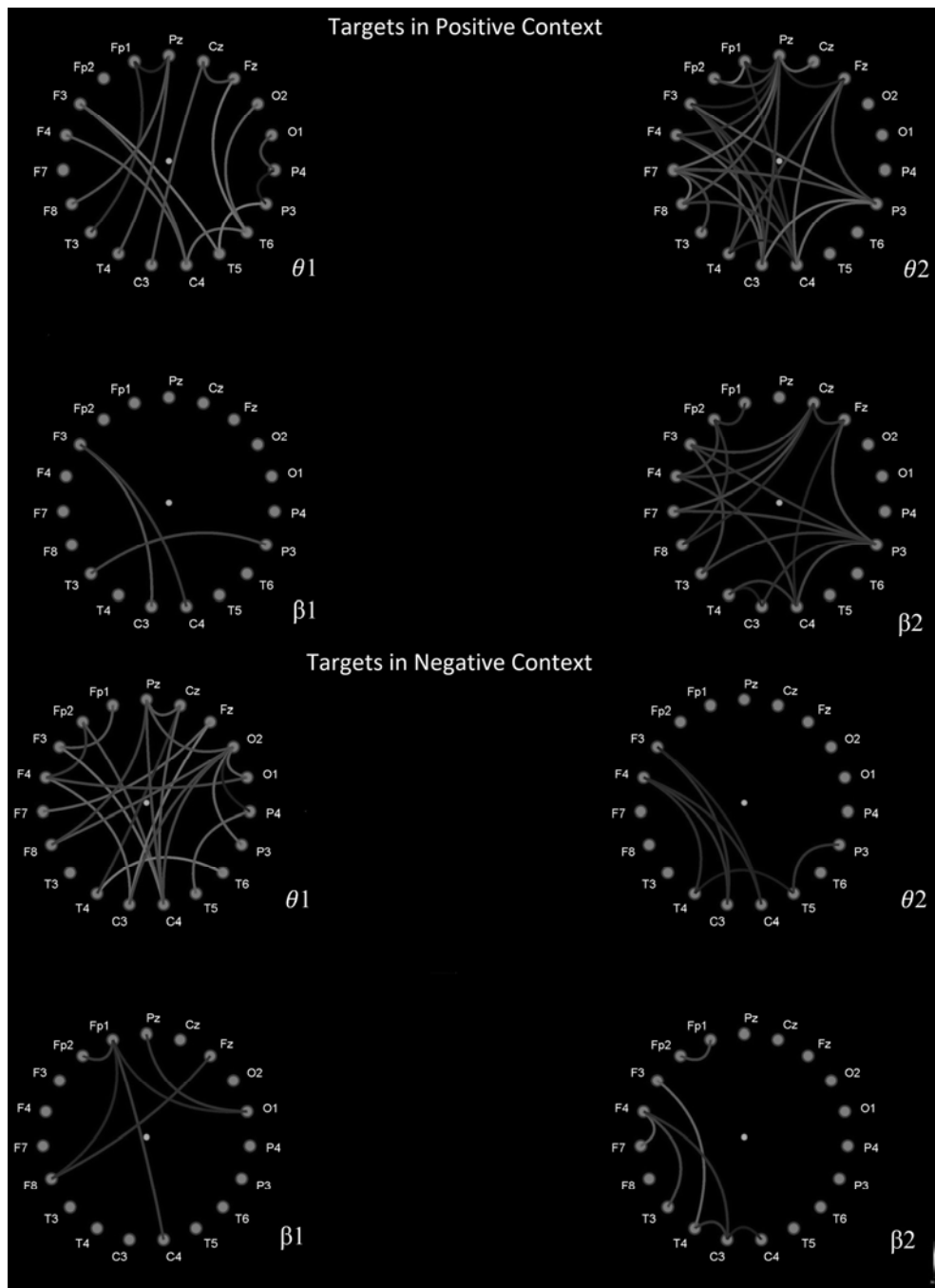


Fig. 2. Distribution of functional causal connections during neutral stimuli demonstration in an emotional context

The topography of PSD activation changes corresponded with prevailing views on visual stimuli perception and processing mechanisms. In both θ 1- and θ 2-subbands, extensive networks of effective connections during the processing of neutral faces in a positive emotional context were formed. However, in θ 1-subband, it was generalized when in θ 2-subband prominent activation nodes were formed in frontal, central, and parietal cortical areas in both hemispheres. As for neutral stimuli in a negative context, well-established nodes of activation in the left parietal and the cortex's central regions in θ 2-subband were observed (Fig.2).

No stable network was observed for high-frequency oscillations in both trials, which corresponds with the concept of it as a marker of inward-directed attention. Simultaneously, in β 1-subband, a more comprehensive network of causal connections with loci in parietal, frontal, and central regions

was observed for target stimuli in positive context perception compared to the negative context.

Results obtained with phase TE during resting states with both closed and open eyes were generally close to zero, which supports the view that this analysis method is suitable for mapping brain networks associated with a specific cognitive task. However, utterly different connectivity patterns ($C \geq 0.2$, $p \leq 0.05$) were observed during stimuli demonstration, and they correlated well with the results of our ERP study [4].

Activation loci formed in θ 2-subband (Fig.2) reflected memory retrieval processes, implicit encoding, differentiation, and integration of emotionally salient sensory information for positive context [16] and reflective mind notion and motivational significance encoding for negative context [17]. The endogenous self-referential processing of the CMS (cortical midline) has been related to an intrinsic

virtual models generation, through which the brain forms an inferential knowledge about the structure of the environment. Moreover, well-pronounced connections among parietal regions of the cortex may manifest ongoing estimation of the person's social status depicted [18], which correlates with ERP late posterior negativity (1000 ms) in parietal areas, manifesting semantic component of stimuli perception. Differentiation problems (interference) and attention modulation were displayed through a vast network of connections in the β 1-subband when neutral stimuli were presented in a positive context [19].

Conclusions. In sum, phase TE and PSD demonstrated their effectiveness in analyzing emotional visual stimuli processing mechanisms mediated by disparate cortical areas. Consequently, PSD distribution corresponded with conventional views on visual stimuli perception and processing mechanisms. Withal, phase TE demonstrated no efficiency in resting-state data analysis. Phase TE revealed difficulties in neutral faces differentiation in a positive emotional context, alongside. Moreover, increased self-reflection and motivational encoding were observed when neutral faces were presented in a negative emotional context.

Acknowledgments. We express our gratitude to the colleagues from the ESC "Institute of Biology and Medicine" who provided insight and expertise that greatly assisted the research.

References

- Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes / E. Başar, C. Başar-Eroglu, S. Karakaş et al. // *International Journal of Psychophysiology*. – 2001. – Vol. 39. – № 2-3. – P. 241–248, doi: 10.1016/S0167-8760(00)00145-8.
- Identical event-related potentials to target and frequent stimuli of visual oddball task recorded by intracerebral electrodes / M. Kukleta, M. Brázdil, R. Roman et al. // *Clinical Neurophysiology*. – 2003. – Vol. 114. – № 7. – P. 1292–1297, doi: 10.1016/S1388-2457(03)00108-1.
- Vuilleumier P. Distributed and interactive brain mechanisms during emotion face perception: Evidence from functional neuroimaging / P. Vuilleumier, G. Pourtois // *Neuropsychologia*. – Vol. 14. – P. 153–167, doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.06.003.
- Черних М. Вплив поточного контексту, створеного сприйняттям емоційно забарвлених виразів облич, на цільове пред'явлення нейтральних зорових образів / М. Черних, І. Зима // *Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. – 2018. – Т. 1, В. – 24. – С. 46.
- Pastötter B. Distinct slow and fast cortical theta dynamics in episodic memory retrieval / B. Pastötter, K. Bäuml // *NeuroImage*. – 2014. – Vol. 94. – P. 155–161, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.03.002.
- TRENTOOL: a Matlab open-source toolbox to analyse information flow in time series data with transfer entropy / M. Lindner, R. Vicente, V. Priesemann et al. // *BMC Neuroscience*. – 2011. – Vol. 12. – P. 119, doi: 10.1186/1471-2202-12-119.
- Friston K. J. Functional and Effective Connectivity: A Review / K. J. Friston // *Brain Connectivity*. – 2011. – Vol. 1. – P. 13–36, doi: https://doi.org/10.1089/brain.2011.0008.
- Schreiber T. Measuring information transfer / T. Schreiber // *Physiological Review Letters*. – 2000. – Vol. 85. – P. 461–464, doi: https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.85.461.
- Kraskov A. Estimating mutual information / A. Kraskov, H. Stögbauer, P. Grassberger // *Physical Review E*. – 2004. – Vol. 69. – P. 1–16, doi: https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.066138.
- Jensen O. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations / O. Jensen, L. L. Colgin // *Trends in Cognitive Science*. – 2007. – Vol. 11. – № 7. – P. 267–269, doi: 10.1016/j.tics.2007.05.003.
- Theta and gamma oscillations predict encoding and retrieval of declarative memory / D. Osipova, A. Takashima, R. Oostenveld et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 28. – P. 7523–7531.
- Özgören M. Beta in simple and complex cognitive processes / M. Özgören, A. Oniz // *International Journal of Psychophysiology*. – 2008. – Vol. 69. – № 3. – P. 192.
- Stam C. J. Use of non-linear EEG measures to characterize EEG changes during mental activity / C. J. Stam, T. C. A. M. Van Woerkom, W. S. Pritchard // *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. – 1996. – Vol. 99. – № 3. – P. 214–224.
- Lang P. International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings / P. Lang. – M. ; L. : The Center for Research in Psychophysiology, University of Florida, Gainesville, FL, 1999.
- Welch J. Cortical coordination dynamics and cognition / J. Welch // *Trends in cognitive sciences*. – 2001. – Vol. 5. – № 1. – P. 26–36.
- Balconi M. Subliminal and supraliminal processing of facial expression of emotions: brain oscillation in the left/right frontal area / M. Balconi, C. Ferrari // *Brain Science*. – 2012. – Vol. 2. – P. 85–100, doi: 10.3390/brainsci2020085.
- Similarities and differences in perceiving threat from dynamic faces and bodies. An fMRI study / M. E. Kret, S. Pichon, J. Grèzes et al. // *NeuroImage*. – 2011. – Vol. 54. – P. 1755–1762, doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.08.012.
- Selective attention modulates high-frequency activity in the face-processing network / K. Müsch, C. M. Hamamé, M. Perrone-Bertolotti et al. // *Cortex*. – Vol. 60. – P. 34–51. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2014.06.006.
- Paulmann S. Valence, arousal and task effects in emotional prosody processing / S. Paulmann, M. Bleichner, S. A. Kotz // *Frontiers of Psychology*. – Vol. 4. – P. 345, doi: 10.3389/fpsyg.2013.00345.

References (Scopus)

- Başar E, Başar-Eroglu C, Karakaş S, Schürmann M. Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes. *Int Journ of Psychophys*. 2001; 39(2-3):241-248. DOI:10.1016/S0167-8760(00)00145-8.
- Kukleta M, Brázdil M, Roman R, Jurák P. Identical event-related potentials to target and frequent stimuli of visual oddball task recorded by intracerebral electrodes. *Clin Neurophys*. 2003;114(7):1292-1297. DOI:10.1016/S1388-2457(03)00108-1.
- Vuilleumier P, Pourtois G. Distributed and interactive brain mechanisms during emotion face perception: Evidence from functional neuroimaging. *Neuropsychologia*. 2006;14:153-167. DOI: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.06.003.
- Черних М, Зима І. Вплив поточного контексту, створеного сприйняттям емоційно забарвлених виразів облич, на цільове пред'явлення нейтральних зорових образів. *Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2018;1(24):46.
- Pastötter B, Bäuml KT. Distinct slow and fast cortical theta dynamics in episodic memory retrieval. *NeuroIm*. 2014; 94:155-161. DOI:10.1016/j.neuroimage.2014.03.002.
- Lindner M, Vicente R, Priesemann V, Wibral M. TRENTOOL: a Matlab open-source toolbox to analyse information flow in time series data with transfer entropy. *BMC Neurosci*. 2011;12: 119. DOI: 10.1186/1471-2202-12-119.
- Friston KJ. Functional and Effective Connectivity: A Review. *Brain Conn*. 2011; 1:13-36. DOI: https://doi.org/10.1089/brain.2011.0008.
- Schreiber T. Measuring information transfer. *Phys Rev Lett*. 2000;85:461-464. DOI:https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.85.461.
- Kraskov A, Stögbauer H, Grassberger P. Estimating mutual information. *Phys Rev E*. 2004;69:1-16. DOI:https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.066138.
- Jensen O, and Colgin LL. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends Cogn Sci*. 2007; 11(7):267-269. DOI:10.1016/j.tics.2007.05.003.
- Osipova D, Takashima A, Oostenveld R, Fernández G, Maris E, Jensen O. Theta and gamma oscillations predict encoding and retrieval of declarative memory. *Journ of Neurosci*. 2006; 26(28):7523-7531.
- Özgören M, Oniz A. Beta in simple and complex cognitive processes. *Intern Journ Psychophys*. 2008;69(3):192.
- Stam CJ, Van Woerkom TCAM, Pritchard WS. Use of non-linear EEG measures to characterize EEG changes during mental activity. *Electroenceph Clin Neurophys*. 1996; 99(3):214-224.
- Lang P. International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings. The Center for Research in Psychophysiology, University of Florida, Gainesville, FL; 1999.
- Welch J. Cortical coordination dynamics and cognition. *Trends Cogn Sci*. 2001;5(1): 26-36.
- Balconi, M, Ferrari C. Subliminal and supraliminal processing of facial expression of emotions: brain oscillation in the left/right frontal area. *Brain Sci*. 2012;2:85-100. DOI: 10.3390/brainsci2020085.
- Kret ME, Pichon S, Grèzes J, de Gelder B. Similarities and differences in perceiving threat from dynamic faces and bodies. An fMRI study. *Neuroim*. 2011; 54:1755-1762. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2010.08.012.
- Müsch K, Hamamé C M, Perrone-Bertolotti M, Minotti L, Kahane P, Engel AK. Selective attention modulates high-frequency activity in the face-processing network. *Cortex*. 2014; 60: 34-51. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2014.06.006
- Paulmann S, Bleichner M, Kotz SA. Valence, arousal and task effects in emotional prosody processing. *Front Psychol*. 2013;4:345. DOI: 10.3389/fpsyg.2013.00345.

Надійшла до редколегії 06.01.2021
Отримано виправлений варіант 03.01.2021
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021
Received a revised version on 03.01.2021
Signed in the press on 03.01.2021

М. Черних, асп., І. Зима, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕДАЧІ ІНФОРМАЦІЇ У ФУНКЦІОНАЛЬНИХ МЕРЕЖАХ КОРИ ПІД ЧАС СПРИЙНЯТТЯ НЕЙТРАЛЬНИХ ОБЛИЧ В УМОВАХ ЕМОЦІЙНОГО ВПЛИВУ

Дослідження спрямоване на вивчення та моделювання емоційної активності функціональних мереж у корі головного мозку людини з використанням методів щільності спектра потужності (PSD) і детрендової ентропії фазового перенесення (PTE). Увагу зосереджено на виявленні змін у когнітивних механізмах, спричинених поданням нейтральних людських обличчя як рідкісних стимулів серед зображень обличчя із негативним чи позитивним забарвленням. Дані ЕЕГ реєстрували під час сприйняття й оброблення зображень нейтральної міміки людини, представленої серед позитивних і негативних обличчя у двох серіях зображень, що було проаналізовано за допомогою методів щільності спектра потужності та детрендової ентропії фазового перенесення. Також зареєстровано і проаналізовано активність кори головного мозку у стані спокою з відкритими та закритими очима. Для аналізу обрано окремі ЕЕГ-діапазони (θ та β) на основі їх значень у когнітивних механізмах. Топографія спектральної щільності потужності відповідала загальноприйнятій ідеї, що описують механізми сприйняття й оброблення зорових подразників. Метод ентропії фазового перенесення не був ефективним для аналізу стану спокою. Результати аналізу, проведеного за допомогою методу ентропії фазового перенесення, виявили проблеми диференціації нейтральних обличчя, коли вони представлені в позитивному емоційному контексті. Під час презентації нейтральних обличчя в негативному емоційному контексті спостерігалися посилені процеси мотиваційного кодування та саморефлексії. Висновки: ентропія фазового перенесення та спектральна щільність потужності продемонстрували свою ефективність у аналізі механізмів оброблення емоційних зорових подразників, опосередкованих у різних зонах кори.

Ключові слова: ЕЕГ; емоції; вираз обличчя; функціональна мережа.

М. Черных, асп., И. Зима, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ В ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СЕТЯХ КОРЫ ВО ВРЕМЯ ВОСПРИЯТИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИЦ В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ВЛИЯНИЯ

Исследование направлено на изучение и моделирование эмоциональной активности функциональных сетей в коре головного мозга человека с использованием методов плотности спектра мощности и детрендовой энтропии фазового переноса. Внимание было сосредоточено на выявлении изменений в когнитивных механизмах, вызванных представлением нейтральных человеческих лиц как редких стимулов среди изображений лиц с отрицательной или положительной окраской. Методы: данные регистрировали при восприятии и обработке изображений нейтральной мимики человека, представленной среди эмоциональных лиц в двух сериях изображений, и проанализировали с помощью методов плотности спектра мощности и детрендовой энтропии фазового переноса. Также зарегистрированы и проанализированы активность коры мозга в состоянии покоя с открытыми и закрытыми глазами. Результаты: для анализа были выбраны отдельные ЭЭГ-диапазоны (θ и β) на основании их роли для когнитивных механизмов. Топография спектральной плотности мощности отвечала общепринятым идеям, описывающим механизмы восприятия и обработки зрительных раздражителей. Метод энтропии фазового переноса не был эффективным для анализа состояния покоя. Результаты анализа, проведенного методом энтропии фазового переноса, обнаружили проблемы дифференциации нейтральных лиц, когда они представлены в положительном эмоциональном контексте. Во время презентации нейтральных лиц в негативном эмоциональном контексте наблюдались усиленные процессы мотивационного кодирования и саморефлексии. Выводы: энтропия фазового переноса и спектральная плотность мощности продемонстрировали свою эффективность в анализе механизмов обработки эмоциональных зрительных раздражителей, опосредованных в различных зонах коры.

Ключевые слова: ЭЭГ; эмоции; выражение лица; функциональная сеть.

УДК 582.284.5:579.222
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.53-60

L. Regeda, Ph.D stud., N. Bisko, Prof., G. Al-Maali, Ph.D.
M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF *PHOLIOTA* SPP. (STROPHARIACEAE, BASIDIOMYCOTA) MYCELIAL BIOMASS ON SEED GERMINATION AND SEEDLINGS GROWTH OF *LEPIDIUM SATIVUM* L. AND *CUCUMIS SATIVUS* L.

Basidiomycetes represent a very diverse group of eukaryotic organisms in terms physiological parameters. Some organisms such as plants or fungi release certain secondary metabolites, which can affect the organisms around them. Some of the substances released by mushrooms could have effects on the growth and further development of nearby plants. Studies of fungi and their biologically active components have grown significantly, with the aim of potential introduction to various biotechnological processes. The allelopathic effect of *Pholiota* species has been investigated in this study. Mycelial biomass of seven screened *Pholiota* species were tested to study cucumber (*Cucumis sativus* L.) and lettuce (*Lepidium sativum* L.) seed germination and the sprouting growth. The results of our experiment showed that the biomass of the species of the genus *Pholiota* did not affect the germination of seeds of both plant species. 100% seed germination was recorded in both control and experimental samples. The addition of mycelial biomass of the *Pholiota* species led to a suppressive allelopathic effect, which affects seed germination, the length of the studied plant (both shoots and roots), as well as changes the morphology of the roots (pubescence, changes in lateral roots). The inhibitory effect on sprouting length was 8,6%-87,1% in the case of *C. sativus* and 42,2%-91,8% if specify for *L. sativum* in dependence on *Pholiota* species. Allelopathic properties of *Pholiota subochracea*, where sprouting growth ratio did not exceed 12.9%, compared to the control group, should be noted. This result suggests that *Pholiota* mushrooms have a significant regulatory effect on lettuce and cucumber sprouting growth. The given results suggest that the studied species may play a significant role in relationships within ecosystems.

Keywords: mushroom allelopathy, *Pholiota*, sandwich method bioassay.

Introduction. Allelopathy includes all types of chemical interactions among plants and microorganisms. Allelochemicals influence patterns in features that affecting the vegetation communities, seed germination and the sprouting growth, plant defence nutrient chelation, prevent nutrient uptake of target plants and regulation of soil biota in ways that affect decomposition and soil fertility [5, 8, 18, 22].

Weeds account for not more than 1% of the total plant species on the earth, nevertheless they cause great problems to humankind by interfering in food production, health, economic stability, and welfare [20]. Moreover, as far as it is known, 255 weeds from 92 crops have become stable to 163 herbicides all over the world [9]. That is why the weed control issues demand new ways of solving.

The use of natural products that can serve as natural herbicides is a promising direction because of their greater safety for humans and environment [14]. The phenomenon of allelopathy was studied in terms of plant interaction [6, 8, 12], less often in relation to other organisms [15, 17, 21]. Data on allelopathic interactions of fungi have recently emerged, nonetheless, there are still a lot of wild mushrooms, whose activity have not been described well, including *Pholiota* species [17, 21].

But there are no data about allelopathic influence of cultured mushroom mycelia. Besides, mushrooms are known as an excellent source of nutrients inclusive of macronutrients and bioactive compounds [11, 23, 25], however, there is still insufficient information on their allelopathic properties in relation to other organisms.

The purpose of this study was the necessity for a broader study of the allelopathic properties of *Pholiota* genus, namely seven species from the IBK Mushroom Culture Collection. According to the system proposed in the ninth

edition of Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, species of the genus *Pholiota* belong to the family Strophariaceae, Basidiomycota of the kingdom Fungi [13]. World diversity is unknown, but the approximate number of species of the genus *Pholiota* (Fr.) P. Kumm. – about 200–300 species, 25 of them are reported in Ukraine [4, 27]. Most species of this genus are saprotrophs, which are active wood-destroying organisms. Most species are inedible due to bitter pulp, some species are edible, poisonous are absent. *Pholiota nameko*, *Pholiota adiposa* – cultivated on an industrial scale in Southeast Asia as valuable edible mushrooms [7, 19].

Materials and methods. Seven strains of seven *Pholiota* species from the IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of the Ukraine were investigated [2] (Table 1) as well as standardized seeds of the model plants *Lepidium sativum* L. and *Cucumis sativus* L.

Table 1. List of the studied *Pholiota* species and strains

Species	IBK strain
<i>Pholiota adiposa</i> (Batsch) P. Kumm.	2169
<i>Pholiota alnicola</i> (Fr.) Singer (syn. <i>Flammula alnicola</i> (Fr.) P. Kumm.)	2406
<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. Kumm.	2605
<i>Pholiota limonella</i> (Peck) Sacc.	2335
<i>Pholiota nameko</i> (T. Ito) S. Ito & S. Imai	2154
<i>Pholiota squarrosa</i> (Oeder) P. Kumm.	2010
<i>Pholiota subochracea</i> (A.H. Sm.) A.H. Sm. & Hesler	2535

Mushroom cultures were grown on glucose peptone yeast (GPY) liquid media; g/l: glucose – 25.0; peptone – 3.0; yeast extract – 3.0; MgSO₄ × 7 H₂O – 0.25. The medium was sterilized using an autoclave (1 Atm.) Strains grown on GPY medium with agar-agar (20 g/l) was used as inoculum. Mycelial discs with a diameter of 5 mm were cut with a sterile steel tube at a distance of 8–10 mm from the edge of the active growth of the colony and placed in flasks (volume of 500 ml) with GPY media (200 ml). The mycelia were incubated at a temperature of 26±0,1 °C for 21 days. The biomass was washed with distilled water and dried at 60 °C, which was subsequently used in its native form.

To determine the effect of mycelial biomass used a modified technique – sandwich method bioassay [17]. Dry biomass (0.1 g) was ground to a powdery state and left under UV radiation for 2 hours to obtain sterility. Agar medium without nutrients and trace elements was used as a substrate, SA: agar-agar – 10 g/l, water – 1 l. Dry mycelial biomass was applied in an even layer in a Petri dish (d=85 mm), which was covered with 8 ml of SA and left to solidify completely, then another 8 ml of medium was added on top and left to solidify this media again. Then 10 seeds of *L. sativum* or *C. sativus* were decomposed on the surface of the agar medium at equal distances. The seeds were not subjected to additional processing before the experiment and no stratification was performed Petri dishes with SA without addition of mycelial biomass were used as control. Studies of allelopathic activity were carry out in a thermostat at a temperature of 26 ± 0.1 °C. Each experiment was conduct in triplicate.

On the 3rd day, the number of germinated seeds was recorded and the radicle and hypocotyl of the plant were measured. During the analysis of the data paid attention to the following parameters: the length of the root, its pubescence, the development of lateral roots, the length of the shoot, the total length of the plant. Morphometric measurements were performed using the program AxioVision 4.8.2.

The percentage of the radicle and hypocotyl growth ratio of the lettuce and cucumber sproutings was calculated for each sample compared with the control by the following formula: Growth ratio (%) = 100 × (average of sample length/average of control length) [17]. Inhibitory effect was calculated as a mathematical difference between 100% and the value of growth ratio. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

Results. Allelopathic interactions involved growth inhibition in both *L. sativum* and *C. sativus* species (Fig. 1–8). A comparison was performed to study the level of increase or decrease in growth ratio, root and shoot length for both species.

Cucumis sativus

The total percentage of *C. sativus* seed germination with the addition of *Pholiota* biomass was 100% compared to the control group. As a result of the experiment, there was a detection of growth inhibition of both roots and shoots of cucumber sproutings due to *Pholiota* biomass exposure (Fig. 1–4).

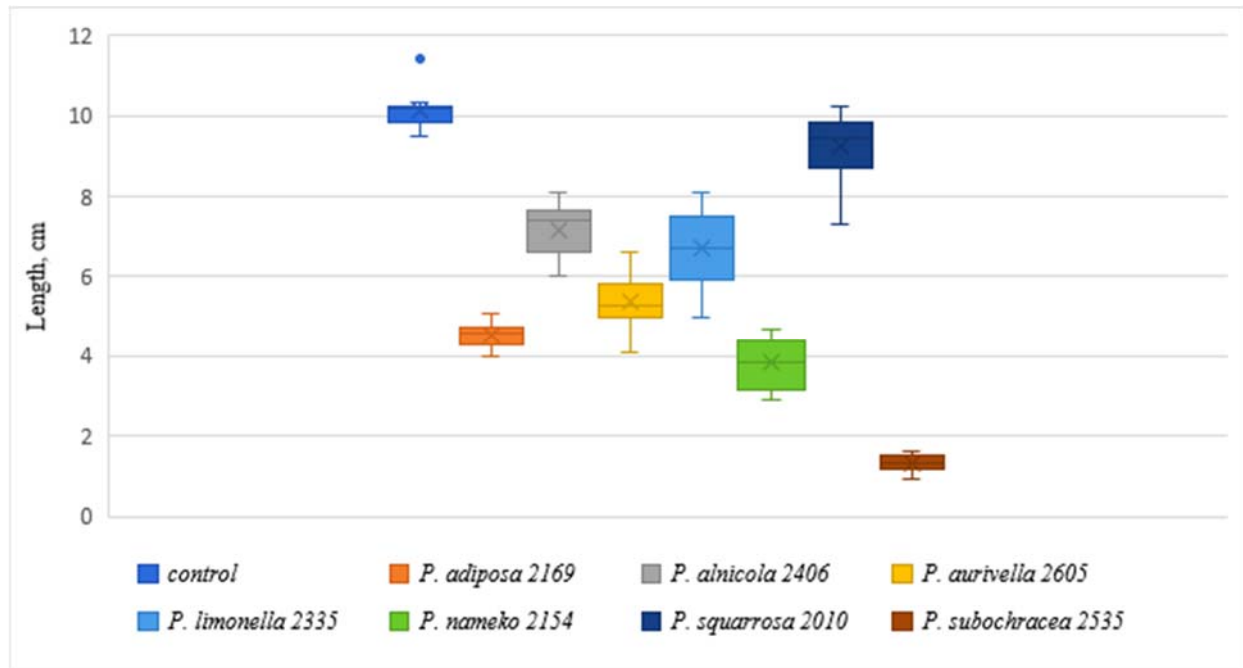


Fig. 1. Influence of *Pholiota* species biomass on *C. sativus* sprouts

As can be seen from Fig. 1 the allelopathic inhibition of *Pholiota* species biomass was recorded in all cases compared with control samples. The addition of *Pholiota* mycelia led to suppression of *C. sativus* sprouting growth.

P. subochracea, *P. nameko* and *P. adiposa* biomass have the most negative effect on seed growth, unlike *P. squarrosa*, which has almost no effect on growth (Fig. 2).



Fig. 2. *Cucumis sativus* sproutings (control) (A); with the addition of *Pholiota squarrosa* 2010 biomass (B) and *Pholiota subochracea* 2535 biomass (C); 3 days of germination, stroke length 1 cm

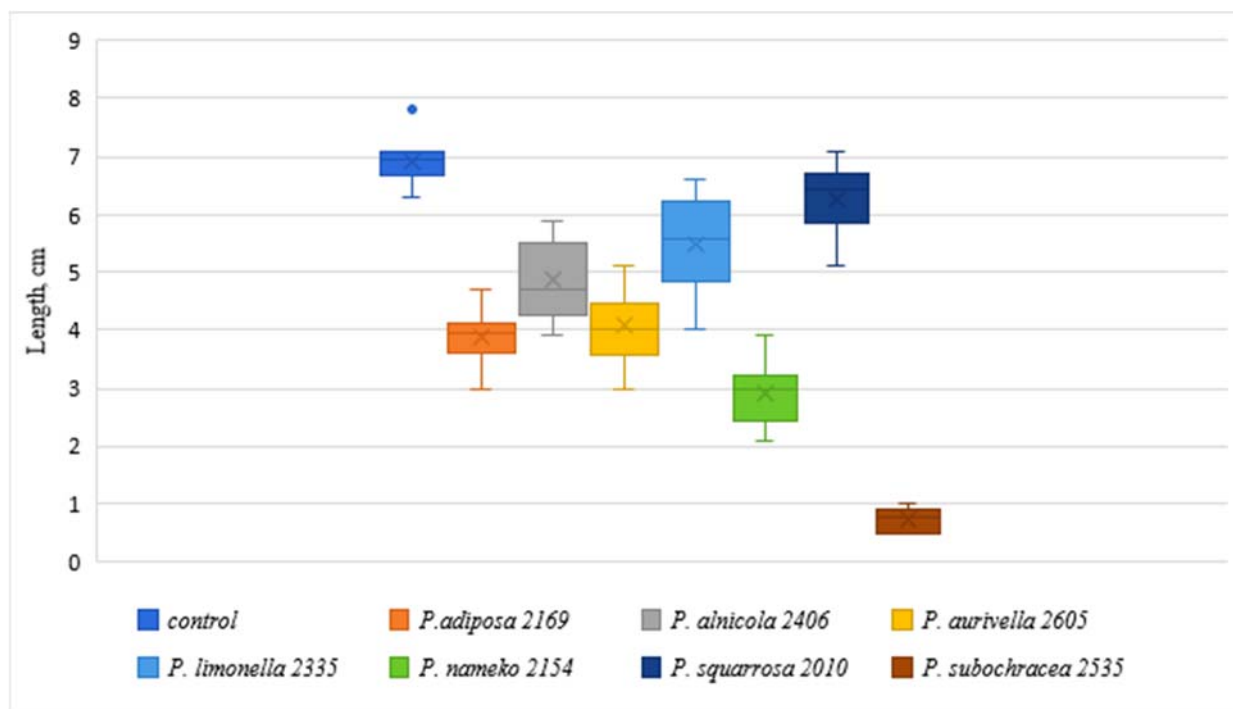


Fig. 3. Influence of *Pholiota* species biomass on the length of *C. sativus* roots

To examine the effect on the seed germination of *C. sativus* by *Pholiota* species a comparison was performed on root growth ratio (Fig. 3). Addition of *P. squarrosa* mycelia led to the least inhibition of *C. sativus* root growth, the average value of root length in this case decreased by 9,6% compared to the control group. Moreover, we did not record any morphological changes in the nature of pubescence or the number of lateral roots (Fig. 2A, 2B). In contrast to the previous case, exposure of *P. subochracea*

biomass on cucumber seeds, the seed germination ratio is only 10,4%. In addition, significant changes were recorded in the appearance of the sprouting – almost no pubescence and significant differences in the number and length of additional roots (Fig. 2C). For other *Pholiota* species, the roots growth ratio ranges from 42,1% (*P. nameko*) to 79,3% (*P. limonella*) (Fig. 3). Changes in pubescence were also recorded compared to control samples for such species as *P. adiposa*, *P. aurivella* and *P. limonella*.

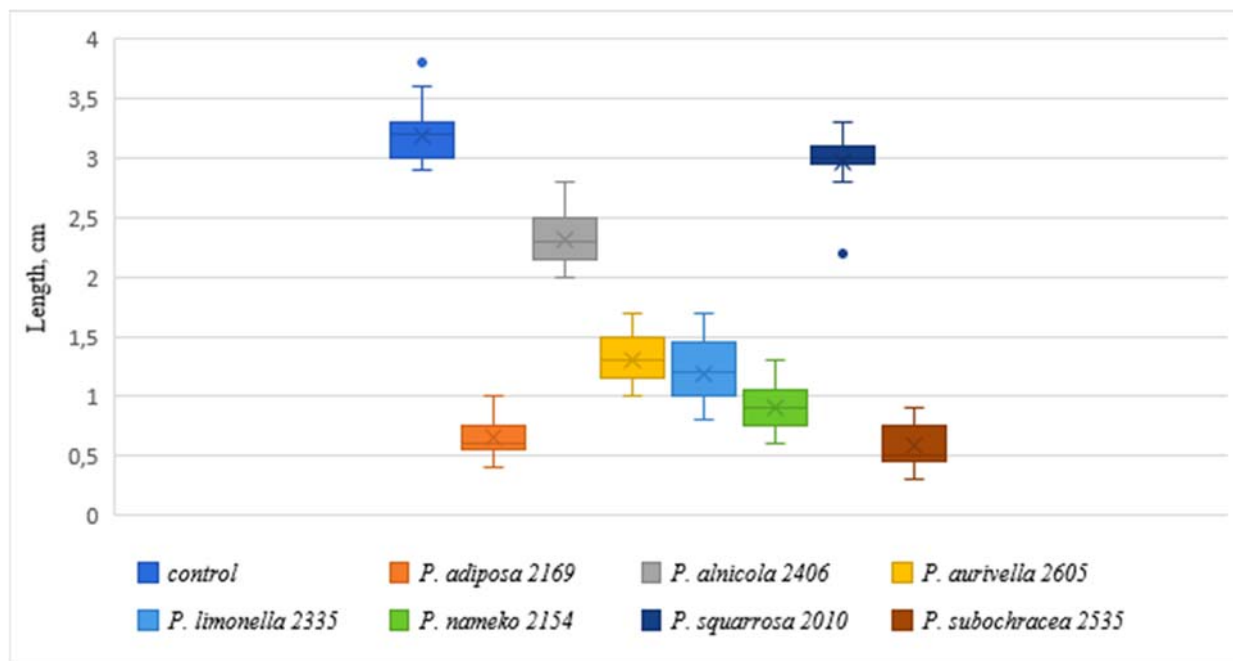


Fig. 4. Influence of *Pholiota* species biomass on the length of *C. sativus* shoots

As in the case of roots, the length of the shoot in the control experiment was greater than in experiments using *Pholiota* biomass, which indicates the inhibitory effect of mushroom species (Fig. 4). Maximum and minimum

shoot growth ratio as in the previous case were observed for *P. squarrosa* and *P. subochracea* and were 93,1% and 18,2%, respectively. There are no changes in case of the

shoot morphology in comparison with control samples were observed.

Lepidium sativum

The total percentage of *L. sativum* seed germination with the addition of *Pholiota* biomass was 100% compared to the

control group. Change in the length of the lettuce sproutings roots and shoots due to the effects of *Pholiota* species biomass shown in Fig. 5–8.

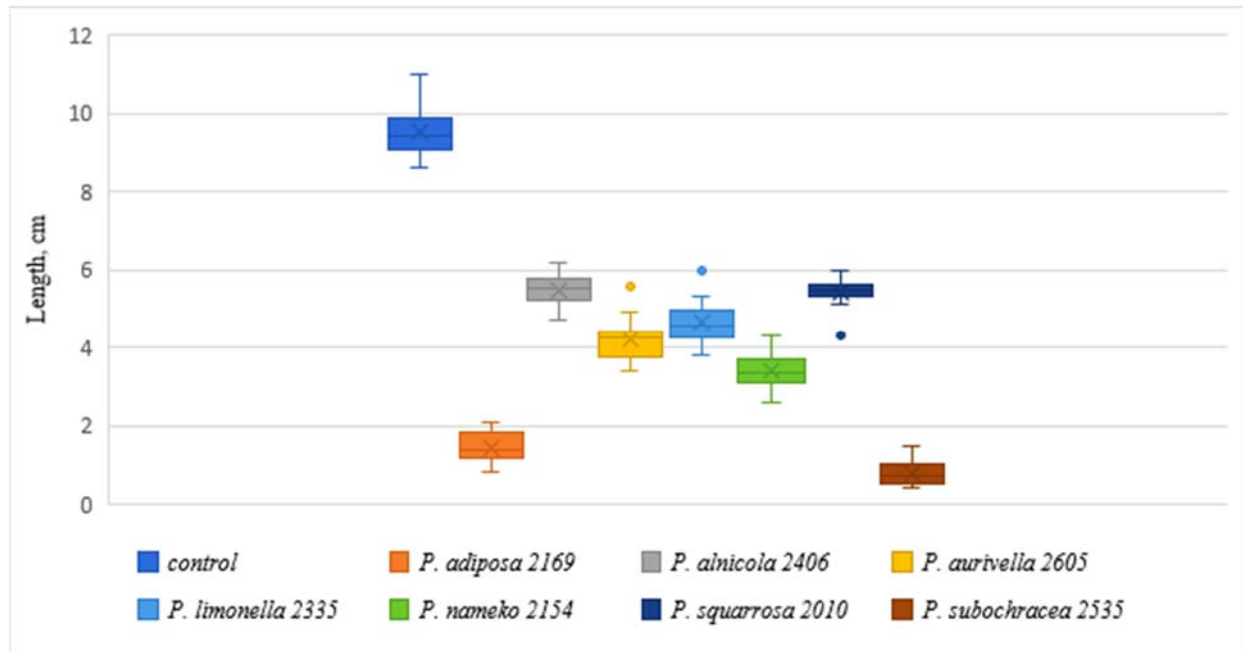


Fig. 5. Influence of *Pholiota* species biomass on *L. sativum* sprouts

The biomass of all species showed a significant allelopathic effect on the growth of *L. sativum* both roots and shoots, and consequently the plant as a whole (Fig. 5). The strongest inhibitory effect (91,8% and 84,85%) on sprout

growth was exerted by the biomass of a number of such species as *P. subochracea* and *P. adiposa* respectively (Fig. 6), while other showed decrease lettuce growth ratio by 42,8%-64,4% compared to the control group.



Fig. 6. *Lepidium sativum* sproutings (control) (A); with the addition *Pholiota adiposa* 2169 biomass (B) and *Pholiota subochracea* 2535 biomass (C); 3 days of germination, stroke length 1 cm

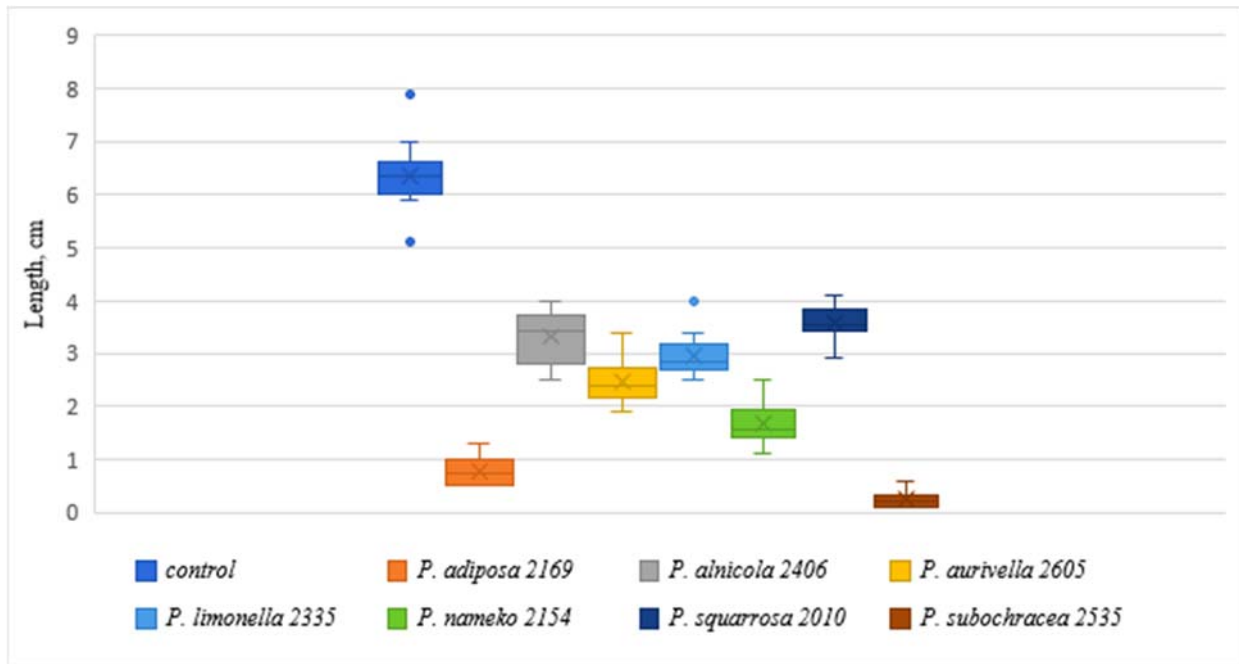


Fig. 7. Influence of biomass of *Pholiota* species on the length of *L. sativum* roots

Data in the diagram shown in Fig. 7 shows that in the case of adding *Pholiota* species biomass to lettuce seeds, roots growth is inhibited in all cases. The most noticeable allelopathic effect was exerted by two species – *P. adiposa* and *P. subochracea*, where the growth ratio were only 12,1% and 3,78%, in accordance. It is also worth noting the

reduction of root pubescence in all cases of *Pholiota* species biomass addition in comparison with control sproutings (Fig. 6). The highest roots growth ratio, and therefore the least depressant effect, was found for *P. alnicola* (52,1%) and *P. squarrosa* (56,4%) (Fig. 7).

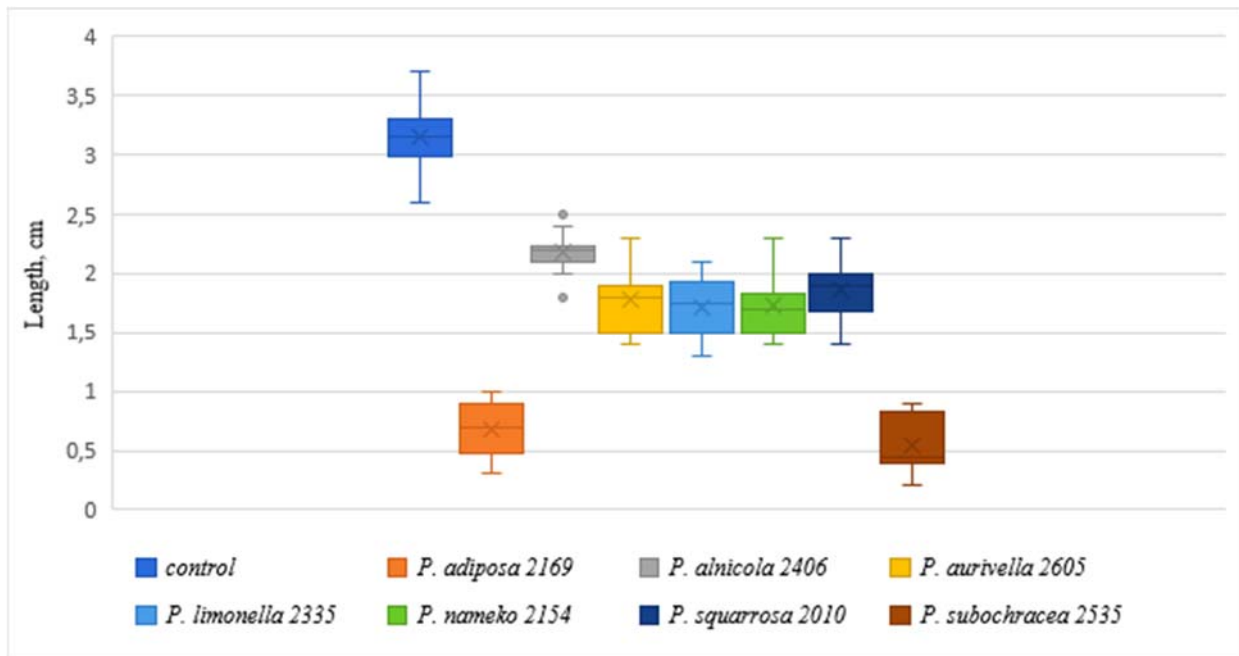


Fig. 8. Influence of *Pholiota* species biomass on the length of *L. sativum* shoots

Analyzing the data from Fig. 8, we can say that the greatest suppression of shoot growth was due to the addition of biomass of *Pholiota* species – *P. adiposa* and *P. subochracea*, where the growth ratio was 21,3% and 17,1%, in accordance. The least inhibitory effect was recorded for *P. alnicola*, where the shoots growth ratio was 69,2%. There are no changes in case of the morphology of

the shoot in comparison with control samples were observed (Fig. 6).

Discussions. Allelopathy is the chemical interaction between plants, including stimulatory as well as inhibitory influences [16]. In this study, we found that the adding *Pholiota* mycelial biomass has significant allelopathic effect

on the seed germination and growth of *Lepidium sativum* and *Cucumis sativus*.

Previous reports showed that mushroom fruiting bodies, including some of *Pholiota* species are potential for being allelopathic [17]. The strongest growth-inhibiting species belonged to *Mycenaceae*, *Cortinariaceae*, *Clavariaceae*, *Lyophyllaceae*, *Entolomataceae*, *Strophariaceae*, and *Tricholomataceae* of the phylum *Basidiomycota*. The fruiting bodies of two *Pholiota* species was taken to analyze the allelopathic effect – *P. spumosa* (Fr.) Singer and *P. terrestris* Overh. Moreover, *Pholiota spumosa* with some other species exhibited the highest levels of *Lactuca sativa* L. hypocotyl elongation inhibition – 25.1% [17]. In our work, the inhibitory activity of *Pholiota* species mycelia ranged from 87.1% (*P. subochracea*) to 8.6% (*P. squarrosa*) in the case of cucumber and 91.8% (*P. subochracea*) – 42.2% (*P. alnicola*) in case of lettuce seeds. In addition to the fact that we used other *Pholiota* species, the higher effect of allelopathic inhibition can be explained by the higher mushroom biomass samples than in research by Osivand et al. [17].

Ridwan with colleagues determined the structure of isolated compounds from *P. lubrica*, and then all compounds were subjected to the plant regulatory assay against the lettuce [21]. Comparing the existing data it is possible to draw a common conclusion about the inhibitory properties of *Pholiota* genus.

Brassicaceae have been used as model plant family to study the effects on induction of plant responses including defence traits, as they are characterized by the presence of a rather specific inducible defense system [24, 26]. Therefore, analyzing obtained data, we can conclude about the essential allelopathic effect of fungi of *Pholiota* genus on both – the traditionally model family *Brassicaceae* (*Lepidium sativum*) and the representative of other family like *Cucurbitaceae* (*Cucumis sativus*).

Besides the apparent inhibitory effect on sproutings, changes in root morphology depending on the *Pholiota* species were recorded. For sproutings of *L. sativum* and *C. sativus* there were changes in pubescence, compared with control samples, for cucumber were also noted changes in the size and number of lateral roots.

Conclusions. Influence of *Pholiota* species extracts on seed germination and the sprouting growth performance of *Lepidium sativum* and *Cucumis sativus* were investigated. Inhibitory allelopathic effect of mycelial biomass was observed for all parts of the sprouting – both root and shoot.

Significant allelopathic properties were found for *P. adiposa*, *P. nameko* and *P. subochracea* on *C. sativus* sprouts and for *P. adiposa*, *P. subochracea* on *L. sativum* sprouts, where inhibitory effect on both seedling sprouting species was more than 50%. It should be noted almost no inhibitory effect on *Cucumis sativus* with addition *P. squarrosa* mycelium (growth ratio was 91,39%). Should be specified, that there were cases when the inhibitory effect did not exceed 10% – with the addition of *Pholiota* biomass during germination of cucumber seeds, while for lettuce, this this figure ranges from 40 to 45%.

The results of this work show that the studied *Pholiota* species mycelia contains allelochemical compounds, that might be the potential candidates for future investigations for the development of herbicides based on its secondary metabolites and their allelopathic inhibitory effects.

References

1. Araya H. Allelopathy of mushrooms. In New Developments in Allelopathy Research; Price, J.E., Ed./ Y. Araya // Nova Publisher : New York, NY, USA, 2015. – 1–14.
2. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mushroom Culture Collection of the M. G. Kholodny Institute of Botany / N. Bisko,

M. Lomberg, O. Mykchaylova, N. Mytropolska // Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/dzdsqu> accessed via GBIF.org on 2020-10-26.

3. Non-Phenolic dicinnamamides from *Pholiota Spumosa*: Isolation, synthesis and antitumor activity / M. Clericuzio, S. Tabasso, J. A. Garbarino et al. // Eur. J. Org. Chem. – 2007, 70: 137–139.

4. Fungi of Nature Reserves and National Parks of Eastern Ukraine. Vol. 2 / I. O. Dudka, V. P. Heluta, T. V. Andrianova et al. – Kyiv : Aristej, 2009. – 428 p.

5. Einhellig F. A. Allelopathy: current status and future goals / F. A. Einhellig // Washington, DC: American Chemical, 1995.

6. Fujii Y. Overview of research on allelochemicals. Survey of Plant Natural Resources and isolation of allelochemicals in Monsoon Asia" under the 2009 NIAES International Symposium entitled "Challenges for Agro-Environmental Research in Monsoon Asia" W3-01, Tsukuba, JP., 2009.

7. Gizaw B. Cultivation and yield performance of *Pholiota nameko* on different agro industrial wastes / B. Gizaw // Academia Journal of Food Research, 2015, 3(3) : 32–42.

8. Inderjit Wardle D. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy / Wardle D. Inderjit, R. Karban, R. Callaway // Trends Ecol. Evolut., 2011, 26: 655–662.

9. Iqbal N. Weed control through allelopathic crop water extracts and S-metolachlor in cotton / N. Iqbal, A. Khaliq, Z. A. Cheema // Information Processing in Agriculture, 2020, 7(1): 165–172.

10. Jeon S. M. Growth Characteristics and Extracellular Enzyme Activities of *Pholiota* spp. Mycol. / S. M. Jeon, E. J. Wang, K. H. Ka // Rep. Proc., 2015, 27: 106.

11. Kalac P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review / P. Kalac // Food Chemistry, 2009, 113: 9–16.

12. Involvement of Allelopathy in Inhibition of Understory Growth in Red Pine Forests / H. Kato-Noguchi, F. Kimura, O. Ohno, K. Suenaga // Journal of Plant Physiology, 2017, 218: 66–73.

13. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Ninth Edition / P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David, J. A. Stalpers (Eds.). – 2001, Wallingford: CAB International. <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781845939335/>

14. Fell Upas Sits, the Hydra-Tree of Death, or the Phytotoxicity of Trees / V. G. Lebedev, K. V. Krutovsky, K. A. Shestibratov // Molecules, 2019, 24: 1636.

15. Lohmann M. Decomposers and root feeders interactively affect plant defence in *Sinapis alba* / M. Lohmann, S. Scheu, C. Müller // Oecologia, 2009, 160: 289–298.

16. Molisch H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie / H. Molisch. – Fischer, Jena, Germany, 1937.

17. Allelopathy of wild mushrooms – an important factor for assessing forest ecosystems in Japan / A. Osivand, H. Araya, K. Appiah, H. Mardani // Forests, 2018, 9(773): 1–15.

18. Panda A. Review on allelopathy: a natural way towards wild plant management / A. Panda, G. Mahalik // Indian Journal of Natural Sciences, 2020, 10(60): 23069–23075.

19. Pegler D. N. Useful fungi of the world: The Shiitake, Shimeji, Enokitake, and Nameko mushrooms / D. N. Pegler // Journal of Mycology, 2003, 17: 3–5.

20. Qasem J. R. Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects / J. R. Qasem, C. L. Foy // Journal of crop production, 2001, 4(2): 43–119.

21. A novel plant growth regulator from *Pholiota lubrica* / A. Y. Ridwan, R. Matoba, J. Wu et al. // Tetrahedron Letters, 2018, 59: 2559–2561.

22. Allelopathic effects of *Imperata Cylindrica* aqueous extract on the germination of *Cucumis Sativus* and *Lolium Perenne* / M. A. Salim, A. C. Linatoc, S. S. Jikan et al. // International Journal of Recent Technology and Engineering (IJRTE), 2020, 8(6): 2503–2508.

23. Srikrum A. Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand / A. Srikrum, S. Supavanich // Agriculture and Natural Resources, 2016, 50 (6): 432–436.

24. Travers-Martin N. Specificity of induction responses in a *Brassicaceae* and their effects on a specialist herbivore / N. Travers-Martin, C. Müller // Chem Ecol, 2007, 33: 1582–1597.

25. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China / X.-M. Wang, J. Zhang, L.-H. Wu et al. // Food Chemistry, 2014, 151: 279–285.

26. Effects of belowground biota on primary and secondary metabolites in *Brassica oleracea* / S. Wurst, R. Langel, S. Rodger, S. Scheu // Chemoecology, 2006, 16: 69–73.

27. Zerova M. Ya. Basidiomycetes / Eds M. Ya. Zerova, P. E. Sosin, G. L. Rozhenko // Handbook of Fungi of Ukraine. – Vol. 5, issue 2. – Kyiv : Naukova Dumka, 1979. – 323 p.

References (Scopus)

1. Araya H. Allelopathy of mushrooms. In New Developments in Allelopathy Research; Price, J.E., Ed.; Nova Publisher: New York, NY, USA, 2015, 1-14.
2. Bisko N, Lomberg M, Mykchaylova O, Mytropolska N. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/dzdsqu> accessed via GBIF.org on 2020-10-26.
3. Clericuzio M., Tabasso S., Garbarino J.A., Piovano M., Cardile V., Russo A., Vidari G. (). Non-Phenolic dicinnamamides from *Pholiota*

Spumosa: Isolation, synthesis and antitumour activity. *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 70: 137-139

4. Dudka I.O., Heluta V.P., Andrianova T.V., Hayova V.P., Tykhonenko Yu.Ya., Pryduik M.P., Holubtsova Yu.I., Krivomaz T.I., Dzhagan V.V., Leontyev D.V., Akulov O.Yu., Sivokon O.V. *Fungi of Nature Reserves and National Parks of Eastern Ukraine*, vol. 2. Kyiv: Aristei, 2009, 428 pp.

5. Einhellig F. A. Allelopathy: current status and future goals. Washington, DC: American Chemical, 1995

6. Fujii Y. Overview of research on allelochemicals. Survey of Plant Natural Resources and isolation of allelochemicals in Monsoon Asia" under the 2009 NIAES International Symposium entitled "Challenges for Agro-Environmental Research in Monsoon Asia" W3-01, Tsukuba, JP., 2009

7. Gizaw, B. Cultivation and yield performance of *Pholiota nameko* on different agro industrial wastes. *Academia Journal of Food Research*, 2015, 3(3), 32-42.

8. Inderjit, Wardle D, Karban R., Callaway R. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends Ecol. Evolut.* 2011, 26:655-662.

9. Iqbal N., Khaliq A., Cheema Z.A. Weed control through allelopathic crop water extracts and S-metolachlor in cotton. *Information Processing in Agriculture*, 2020, 7(1): 165-172

10. Jeon S.M., Wang E.J. Ka K.H. Growth Characteristics and Extracellular Enzyme Activities of *Pholiota* spp. *Mycol. Rep. Proc.*, 2015, 27:106

11. Kalac P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 2009, 113: 9-16

12. Kato-Noguchi H., Kimura F., Ohno O., Suenaga K. Involvement of Allelopathy in Inhibition of Understory Growth in Red Pine Forests. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 218: 66-73.

13. Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., Stalpers, J. A. (Eds.). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Ninth Edition*. 2001, Wallingford: CAB International.

14. Lebedev V.G, Krutovsky K.V., Shestibratov K.A. Fell Upas Sits, the Hydra-Tree of Death, or the Phytotoxicity of Trees. *Molecules*, 2019, 24: 1636.

15. Lohmann M., Scheu S., Müller C. Decomposers and root feeders interactively affect plant defence in *Sinapis alba*. *Oecologia*, 2009, 160: 289-298

16. Molisch H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer, Jena, Germany, 1937.

17. Osivand A., Araya H., Appiah K., Mardani H., Ishizaki T., Fujii Y. Allelopathy of wild mushrooms – an important factor for assessing forest ecosystems in Japan. *Forests*, 2018, 9(773): 1-15

18. Panda A., Mahalik G. Review on allelopathy: a natural way towards wild plant management. *Indian Journal of Natural Sciences*, 2020, 10(60): 23069-23075

19. Pegler, D.N. Useful fungi of the world: The Shitake, Shimeji, Enoki-take, and Nameko mushrooms. *Journal of Mycology*, 2003, 17, 3-5.

20. Qasem J. R., Foy C. L. Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects. *Journal of crop production*, 2001, 4(2): 43-119.

21. Ridwan A.Y, Matoba R, Wu J, Choi J-H, Hirai H, Kawagishi H. A novel plant growth regulator from *Pholiota lubrica*. *Tetrahedron Letters*, 2018, 59: 2559-2561.

22. Salim M.A., Linatoc A.C, Jikan S.S., Jamil S., Latif M.S. Allelopathic effects of *Imperata Cylindrica* aqueous extract on the germination of *Cucumis Sativus* and *Lolium Perenne*. *International Journal of Recent Technology and Engineering (IJRTE)*, 2020, 8(6): 2503-2508

23. Srikram A., Supapvanich S. Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. *Agriculture and Natural Resources.*, 2016, 50 (6): 432-436.

24. Travers-Martin N, Müller C. Specificity of induction responses in a Brassicaceae and their effects on a specialist herbivore. *Chem Ecol*, 2007, 33: 1582-1597

25. Wang X.-M., Zhang J, Wu L.-H., Zhao Y.-L., Li T., Li J.-Q., Wang Y.-Z., Liu H.-G. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry*, 2014, 151: 279-285

26. Wurst S, Langel R, Rodger S, Scheu S. Effects of belowground biota on primary and secondary metabolites in *Brassica oleracea*. *Chemoecology*, 2006, 16: 69-73

27. Zerova M.Ya. *Basidiomycetes*. In: *Handbook of Fungi of Ukraine*, vol. 5, issue 2. Eds M.Ya. Zerova, P.E. Sosin, G.L. Rozhenko. Kyiv: Naukova Dumka, 1979, 323 pp.

Надійшла до редколегії 06.01.2021
Отримано виправлений варіант 03.01.2021
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021
Received a revised version on 03.01.2021
Signed in the press on 03.01.2021

Л. Регада, асп., Н. Бисько, проф., Г. Аль-Маали, канд. біол. наук
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

ВПЛИВ МІЦЕЛІЮ *PHOLIOTA* SPP. (*STROPHARIACEAE*, *BASIDIOMYCOTA*) НА СХОЖІСТЬ НАСІННЯ Й РІСТ *LEPIDIUM SATIVUM* L. ТА *CUCUMIS SATIVUS* L.

Basidiomycetes є вельми розмаїтою групою еукаріотичних організмів за фізіологічними параметрами. Деякі організми, такі як рослини або гриби, здатні виділяти певні вторинні метаболіти, які можуть впливати на оточуючі організми. Нині кількість досліджень грибів та їхніх біологічно активних компонентів значно збільшилася у зв'язку з потенційним упровадженням у різні біотехнологічні процеси. Деякі речовини, що виділяються грибами, можуть впливати на ріст і подальший розвиток рослин, що є поруч. У цьому дослідженні вивчено алопатичну дію представників роду *Pholiota*. Біомаса грибів семи досліджуваних видів роду *Pholiota* обрана для вивчення впливу на проростання насіння озіркіє (*Cucumis sativus* L.) та салату (*Lepidium sativum* L.). Результати нашого експерименту показали, що біомаса видів роду *Pholiota* не впливала на схожість насіння обох видів рослин. Стовідсоткову схожість насіння фіксували як у контрольних, так і в експериментальних зразках. Додавання вегетативного міцелію видів *Pholiota* spp. призвело до пригнічуючого алопатичного ефекту, який впливає і на проростання насіння, і на довжину досліджуваної рослини (пагонів і коріння), а також змінює морфологію коренів (опушення, зміни бічних коренів). Інгибіуючий ефект на довжину проростків становив 8,6%–87,1% у випадку *C. sativus* та 42,2%–91,8% для *L. sativum* залежно від видів роду *Pholiota*, що використовувалися. Слід відмітити алопатичні властивості *Pholiota subochracea*, де коефіцієнт росту проростків не перевищує 12,9% порівняно з контрольною групою. Цей результат свідчить про те, що представники роду *Pholiota* мають значний регулятивний вплив на ріст салату й озіркіє. Наведені результати дають можливість припустити, що досліджені види можуть відігравати значну роль у взаємовідносинах усередині екосистем.

Ключові слова: алопатія грибів, *Pholiota*, сандвич-метод біодосліджень.

Л. Регада, асп., Н. Бисько, проф., Г. Аль-Маали, канд. біол. наук
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ МИЦЕЛИЯ *PHOLIOTA* SPP. (*STROPHARIACEAE*, *BASIDIOMYCOTA*) НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН И РОСТ *LEPIDIUM SATIVUM* L. И *CUCUMIS SATIVUS* L.

Basidiomycetes представляют весьма разнообразную группу эукариотических организмов по физиологическим параметрам. Некоторые организмы, такие как растения или грибы, способны выделять определенные вторичные метаболиты, которые могут влиять на окружающие организмы. Количество исследований грибов и их биологически активных компонентов значительно выросло в связи с возможностью потенциального внедрения в различные биотехнологические процессы. Некоторые вещества, выделяемые грибами, могут влиять на рост и дальнейшее развитие растений, находящихся рядом. В этом исследовании изучено аллопатическое действие представителей рода *Pholiota*. Биомасса грибов семи исследуемых видов рода *Pholiota* была выбрана для изучения влияния на прорастание семян огурцов (*Cucumis sativus* L.) и салата (*Lepidium sativum* L.). Результаты нашего эксперимента показали, что биомасса видов рода *Pholiota* не влияла на всхожесть семян обоих видов растений. Стопроцентную всхожесть семян фиксировали как в контрольных, так и в экспериментальных образцах. Добавление вегетативного мицелия видов *Pholiota* spp. привело к подавляющему аллопатическому эффекту, который влиял и на прорастание семян, и на длину исследуемого растения (побегов и корней), а также менял морфологию корней (опушение, изменения боковых корней). Ингибирующий эффект на длину проростков составлял 8,6%–87,1% в случае *C. sativus* и 42,2%–91,8% для *L. sativum* в зависимости от используемых видов рода *Pholiota*. Следует отметить аллопатические свойства *Pholiota subochracea*, где коэффициент роста проростков не превышал 12,9% по сравнению с контрольной группой. Этот результат свидетельствует о том, что представители рода *Pholiota* имеют значительное регулятивное влияние на рост салата и огурцов. Приведенные результаты позволяют предположить, что исследованным видам может принадлежать значительная роль во взаимоотношениях внутри экосистем.

Ключевые слова: аллопатия грибов, *Pholiota*, сандвич-метод биоисследований.

УДК 632.3;579.64

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.61–66

А. Пастошук, асп., М. Коваленко, асист., Л. Сківка, д-р біол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНТИОКСИДАНТНІ РЕАКЦІЇ ПРОРОСТКІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ВПЛИВУ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* ТА ЇХНІХ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *IN VITRO*

Pseudomonas syringae є найпоширенішою фітопатогенною бактерією з великою кількістю рослин-мішеней, до яких входять важливі зернові культури, зокрема пшениця. Одним з основних збудників бактеріальних хвороб пшениці є *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens*. У деяких країнах втрати врожаю пшениці, спричинені цією фітопатогенною бактерією, сягають 50 %. Таксономія *P. Syringae* включає нині більше 50 патоварів із різним ступенем адаптації до ураження пшениці. Одним із таких патоварів є *Pseudomonas syringae* рв. *coronafaciens*. *P. syringae* рв. *coronafaciens* не є адаптованим патогеном для пшениці. Однак ураження цим патогеном багатьох сільськогосподарських культур, зокрема і пшениці, привертає увагу дослідників і фахівців агропромислового комплексу. Дослідження механізмів стійкості пшениці до ураження адаптованими та неадаптованими патоварами *P. syringae* представляє значний інтерес, як з погляду поглибленого вивчення збудника, так і в перспективі селекції стійких до бактеріальних хвороб сортів цієї стратегічно важливої для України зернової культури. Метою роботи стало порівняльне оцінювання антиоксидантних реакцій проростків пшениці різних сортів за умов обробки зернівок фітопатогенними бактеріями *P. Syringae* різних патоварів та їхніми ліпополісахаридами. Установлено, що генерація АФК, як механізм імунного захисту рослини проти фітопатогенних псевдомонад, однаковою мірою активується у випадку експозиції адаптованим і неадаптованим патогеном і меншою мірою – у випадку обробки ЛПС обох патогенів. Обробка зернівок чутливого до фітопатогенних псевдомонад сорту Фаворитка адаптованим патоваром спричиняє різку активацію ферментів антиоксидантного захисту, експозиція неадаптованим патоваром – різке накопичення проліну. Таким чином, чутливість проростків пшениці до фітопатогенних адаптованих і неадаптованих псевдомонад значною мірою залежить від збалансованого функціонування системи антиоксидантного захисту. У сукупності ці дані засвідчують перспективність оксидативного метаболізму клітин пшениці як мішені для селекції сортів, стійких до фітопатогенних бактерій.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae*, пшениця, антиоксидантна система.

Вступ. У літературі описано понад 200 видів бактерій, які здатні уражувати рослини [1]. Ці бактерії належать до 32 родів. Серед видів фітопатогенних бактерій найбільш розповсюдженими та шкідливими є представники роду *Pseudomonas*, зокрема вид *P. syringae*, до якого нині віднесено більше, ніж 50 патоварів [2]. На зернових культурах паразитують такі патовари: *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens* (збудник базального бактеріозу), *Pseudomonas syringae* рв. *coronafaciens* (збудник ореольного опіку), *Pseudomonas syringae* рв. *Syringae* (збудник бактеріального опіку), які зменшують урожай на 40 %, а в роки епіфотії – більш, ніж на 70 % [3]. Одним з основних збудників бактеріальних хвороб пшениці є *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens*. У деяких країнах втрати врожаю пшениці, спричинені цією фітопатогенною бактерією, сягають 50 % [4]. *Pseudomonas syringae* рв. *coronafaciens* – один з найменш досліджених збудників бактеріозів зернових культур – згідно з літературними даними останніх років пропонується класифікувати як новий вид фітопатогенних псевдомонад *Pseudomonas coronafaciens*, спектр рослин-хазяїв якого, зокрема й серед таких стратегічних сільськогосподарських культур, як пшениця, потребує оновленого поглибленого вивчення [5].

Контакт рослини з фітопатогенною бактерією спричиняє активацію захисних імунних реакцій. Захист рослини від патогенних мікроорганізмів включає три лінії: фізичні бар'єри, імунні реакції, індуковані молекулярними патернами (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) патогенів, такими як ліпополісахарид (ЛПС), флагелін тощо (PAMP-triggered immunity, PTI), та імунні реакції, індуковані ефекторними білками патогенів (effector-triggered immunity, ETI). Розвиток цих реакцій відбувається не послідовно, а одночасно і паралельно із залученням багатьох спільних транскрипційних факторів та ефекторних молекул [6, 7]. Алгоритм розвитку захисних реакцій рослини залежить від багатьох зовнішніх чинників, таких як абіотичні стресори (осмотичний, температурний тощо), та природи патогенного організму: адаптований до рослини-хазяїна (hostpathogen, HP) або неадаптований (non-hostpathogen, NHP). Особливий інтерес для вивчення викликає формування стійкості рослини до неадаптованих або "нехазяйських" патогенів (non-

hostresistance, NHR) порівняно зі стійкістю до адаптованих шкочочинних мікроорганізмів (hostresistance, HR), як нова мішень для селекції стійких сортів сільськогосподарських культур. Селекція рослин для стійкості до хвороб має вирішальне значення для підтримки світового виробництва сільськогосподарських культур. Протягом десятиліть селекціонери та дослідники широко використовували гени стійкості рослин-господарів (R-гени) для розвитку стійких до хвороб сортів. Однак загальна нестабільність R-генів у культурних сортах під впливом різноманітних популяцій патогенів зумовлює необхідність пошуку стабільніших засобів стійкості. Як альтернатива, стійкість до "нехазяйських" патогенів визнана найдовговічнішою формою стійкості до широкого спектра потенційних патогенів у рослинах [8, 9].

Як у випадку HR, так і у випадку NHR каскад захисних реакцій після розпізнавання PAMP активує рецепторні кінази, генерацію активних форм кисню (АФК), приплив кальцію, активацію мітогенактивованих протеїнкіназ, активацію транскрипції генів ефекторних молекул тощо [10, 11]. АФК відіграють важливу роль сигнальних молекул у цих каскадах, а також мають потужний антибактеріальний потенціал. Проте, продуковані у великій кількості, вони здатні взаємодіяти з білками, ліпідами і ДНК, спричиняючи метаболічні розлади, деструкцію клітинних мембран і клітинну загибель. Захист рослини від деструктивної дії АФК забезпечують ферменти антиоксидантного захисту. Збалансована взаємодія АФК і системи антиоксидантного захисту є одним із важливих елементів NHR [12].

У попередніх дослідженнях ми виявили, що обробка зернівок різних сортів озимої пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції, внесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, клітинами *Pseudomonas syringae* та їхніми ЛПС по-різному впливає на їхнє проростання та ріст кореня паростків [13]. Метою цієї роботи було порівняльне оцінювання антиоксидантних реакцій проростків пшениці різних сортів за умов обробки зернівок фітопатогенними бактеріями *Pseudomonas syringae* різних патоварів та їхніми ліпополісахаридами.

Матеріали і методи досліджень. У роботі досліджували фітотоксичну активність двох штамів фітопатогенних псевдомонад: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978: УКМ 8281 – виділений з уражених бактеріозом рослин жита; *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030 – виділений з уражених рослин вівса.

Штами отримано з колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАНУ. Для постановки дослідів використовували суспензію живих клітин збудника титром 10^9 КУО / мл і розчин ЛПС із концентрацією 5 мг/мл.

Для отримання препаратів ЛПС із клітин *P. syringae* бактерії культивували на картопляному агарі протягом 24 год при температурі 28 °С. Бактеріальну масу змивали 0,85% розчином NaCl й осаджували центрифугуванням (6000 g, 15 хв). ЛПС екстрагували із сирої бактеріальної маси двічі 0,85% розчином NaCl при постійному

перемішуванні на магнітній мішалці за температури 4 °С протягом 4–5 год. На кожні 10 г клітин використовували 100 мл розчину NaCl. Екстракти центрифугували (6000 g, 15 хв), діалізом дистильованою водою протягом доби і висушували ліофільно. Очищення водного 3 % розчину отриманих ліофільно висушених біополімерів проводили ультрацентрифугуванням протягом 4 годин при 100 000 g і температурі 4 °С. Повторно ліофільно висушений осад використовували як препарат ЛПС у подальших дослідях [14]. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, який було отримано нами для дослідження, мав хімічний склад, подібний до раніше досліджених ЛПС цього виду бактерій і містив 30 % вуглеводів, 28 % білків, 5 % нуклеїнових кислот та 2-кето-3-дезоксиктонову кислоту.

Для дослідження використовували 7-добові етиольовані проростки озимої пшениці (*Triticumaestivum* L.) сортів Подолянка, Діскус, Фаворитка (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика досліджуваних сортів пшениці

Назва сорту	Реєстрація в Україні	Рекомендована зона вирощування	Країна походження	Зимостійкість	Посухостійкість	Стійкість до захворювань	Стійкість до <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> (McCulloch)
Подолянка	2003	степ, лісостеп, полісся	Україна	висока	висока	середня	висока
Діскус	2009	лісостеп	Німеччина	висока	висока	висока	помірна
Фаворитка	2005	степ, лісостеп, полісся	Україна	висока	середня	висока	низька

Зернівки пшениці промивали водою протягом 15 хв, а потім стерильною дистильованою водою впродовж 15 хв із використанням орбітального струшувача і розкладали у чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір по 20 зернівок. Відсутність на поверхні зернівок екзофітної мікробіоти контролювали висівом зразків дистильованої води на поживні середовища загального призначення. У кожному варіанті дослідів використовували не менше 60 зернівок пшениці. У чашки Петрі вносили відповідно до варіанта дослідів 5 мл води (контроль), 5 мл суспензії клітин або 5 мл розчину ЛПС *P. syringae* різних патоварів.

Рівень перекисного окиснення ліпідів визначали за накопиченням реакційноздатних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) за методом Кумара та Ноулза [15] зі змінами. Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали методом Giannopolitis & Ries [16]. КАТ (КФ 1.11.1.6) визначали відповідно до методу, наведеного у роботі Aebi et al. [17]. Визначення вмісту білка проводили методом Бредфорда [18]. Вміст проліну у досліджуваних зразках визначали методом Bates et al. [19].

Одержані дані обробляли статистично за допомогою програми Microsoft Excel. Повторність усіх дослідів триразова, вірогідність різниці між середніми арифметичними значеннями показників визначали за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали вірогідними, якщо значення P було $\leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Проведені нами дослідження показали, що рівень окисного стресу у проростках пшениці, оброблених фітопатогенними бактеріями та їхніми ЛПС залежав від природи тригерного чинника (живі клітини чи ендотоксин), природи патогена (НР або

NHP) та сорту рослини (рис. 1). У всіх випадках обробка живими клітинами викликала виразніше посилення рівня TBARS, ніж обробка ЛПС. Це пояснюється полі- та монокомпонентною природою тригеру. У складі живих бактеріальних клітин, на додачу до ЛПС (монокомпонентного тригеру), присутня велика кількість молекулярних патернів, розпізнавання яких патерн-розпізнавальними структурами рослинних клітин здатне спричинити генерацію АФК [20]. Оксидативний стрес, викликаний NHP, було порівняно з таким, що спричинений обробкою адаптованим патогеном, незважаючи на існування механізмів інгібіторного впливу адаптованих патогенів на імунну реактивність рослини, у т. ч. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, для якого властива низка механізмів гальмування проявів захисних реакцій рослини-хазяїна [11].

Найменший прояв оксидативного стресу зареєстровано у сорту пшениці з мінімальною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад (Подолянка): статистично вірогідна різниця між концентрацією TBARS у дослідних і контрольних зразках рослинного матеріалу була відсутня. Найвищі показники оксидативного стресу спостерігалися у найчутливішого сорту Фаворитка з максимальним проявом за умов обробки живими клітинами фітопатогенних бактерій (концентрація TBARS, у середньому, в 1,7 рази перевищувала таку у контрольних зразках). Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо характеру паразитизму фітопатогенних псевдомонад. *Pseudomonas syringae* найчастіше характеризується як гемібіотрофний патоген. АФК сприяють поширенню такого патогена, викликаючи некротичну загибель клітин і прискорення розвитку симптомокомплексу в ураженій рослині [21, 22].

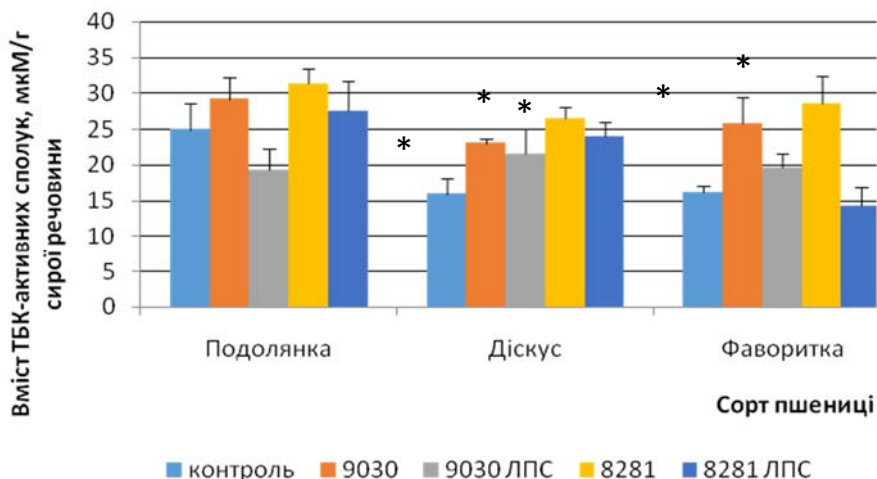


Рис. 1. Перекисне окиснення ліпідів у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітка: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978; УКМ 8281; * $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Цитотоксична дія АФК в умовах впливу патогенних мікроорганізмів балансується системою ензимів антиоксидантного захисту, важливими компонентами якого є СОД та КАТ. СОД каталізує дисмутацію супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню та пероксиду водню. Супероксидні радикали є джерелом утворення інших, зокрема й більш реакційноздатних АФК (пероксиду водню, пероксинітриту, гідроксильних, гідроксиперексидних радикалів, синглетного кисню). Оскільки специфічних ферментів для детоксикації пероксинітриту, гідроксильних радикалів і синглетного кисню не існує (завдяки здатності цих сполук активно окиснювати білкові молекули), виключна роль СОД в антиоксидантному захисті полягає у запобіганні їхньому утворенню [23]. Партнерським ензимом СОД у системі антиоксидантного захисту є КАТ, яка конвертує цитотоксичний пероксид водню, генерований за дії СОД, на воду. Зниження активності КАТ може супроводжуватися накопиченням пероксиду водню і посиленням його цитотоксичної дії [24]. Активність ензимів антиоксидантного захисту за умов обробки зернівок пшениці фітопатогенними псевдомонадами та їхніми ендотоксинами також значно варіювала

залежно від тригерного чинника, природи патогена та сорту пшениці. У тканинах проростків найстійкішого до патогена сорту Подолянка зареєстровано підвищення активності СОД за умов обробки клітинами обох патоварів та ЛПС адаптованого патогена (рис. 2). Обробка ЛПС неадапованого патогена супроводжувалася зниженням активності цього ферменту. Причому вірогідного підвищення активності КАТ не зареєстровано у тканинах проростків цього сорту в жодному варіанті дослідження (рис. 3). Для сорту з помірною стійкістю до патогена Діскус спостерігалось вірогідне підвищення активності СОД лише за обробки ЛПС обох патоварів, активність КАТ була вищою за контрольні значення у всіх варіантах дослідження. У тканинах найчутливішого сорту Фаворитка статистично вірогідне підвищення активності СОД і найвищий показник активності КАТ зареєстровано лише у відповідь на обробку ЛПС неадапованого патогена. Можна припустити, що однією з причин високої чутливості тканин проростків цього сорту є недостатньо ефективне функціонування системи антиоксидантного захисту.

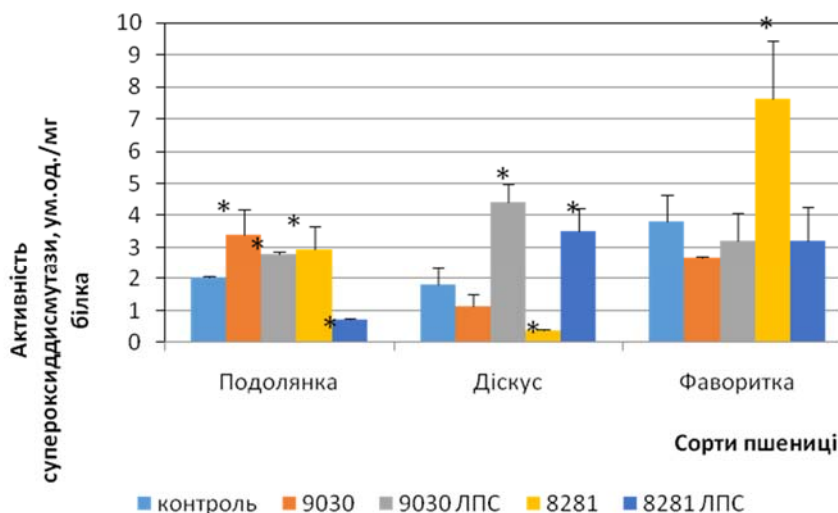


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітка: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978; УКМ 8281; * $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

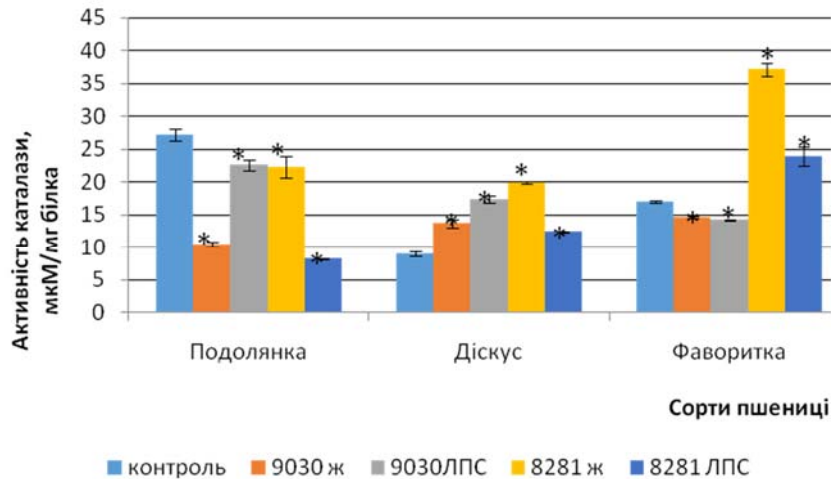


Рис. 3. Активність каталази у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітка: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978; УКМ 8281; * $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Додатково до оцінювання активності ферментів антиоксидантного захисту у роботі досліджували концентрацію проліну. Пролін є протеогенною амінокислотою і накопичується у рослинних тканинах як у стресових, так і в нестресових умовах. Недавні відкриття вказують на те, що пролін відіграє важливу роль у рості та диференціації рослин протягом їхнього життєвого циклу. Пролін є ключовим компонентом багатьох білків клітинної стінки, а також важливим регулятором рослинного метаболізму в умовах осмотичного стресу [25]. Останнім часом у літературі з'являються дані щодо участі проліну у захисті рослин від патогенів і регуляції редокс-потенціалу клітин. З одного боку, накопичення проліну у рослинній тканині може слугувати для нейтралізації АФК [26]. З іншого боку, накопичення проліну спричиняє інтенсифікацію його окиснення проліндегідрогеназою з утворенням АФК

[27]. За результатами наших досліджень найістотніше накопичення проліну у тканинах проростків пшениці всіх сортів спостерігалось у випадку обробки живими клітинами неадаптованого патогена (рис. 4), що узгоджується з літературними даними, згідно з якими взаємодія рослини з НР і ННР по-різному впливає на синтез і катаболізм проліну. У дослідях на модельній рослині *Arabidopsis* показано, що взаємодія з НР і розвиток інфекційного процесу супроводжуються зниженням вмісту проліну і посиленням експресії проліндегідрогенази та 1-пірролін-5-карбоксилатдегідрогенази. Натомість, обробка ННР, яка зазвичай не викликає розвитку захворювання за рахунок успішного знешкодження мікроорганізму чинниками імунного захисту рослини, спричиняє накопичення проліну з активацією експресії лише 1-пірролін-5-карбоксилатдегідрогенази [28, 29].

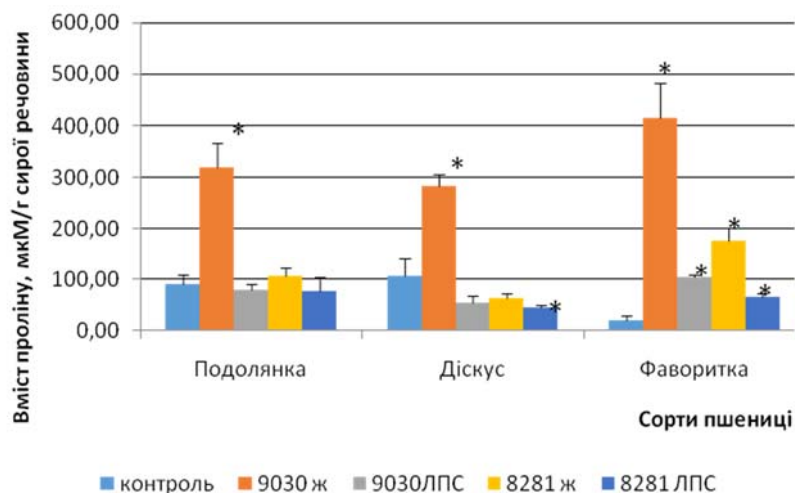


Рис. 4. Вміст вільного проліну у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітка: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978; УКМ 8281; * $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Також зазначимо, що лише у тканинах проростків пшениці найчутливішого до патогена сорту зареєстровано найнижчий рівень проліну у контролі і статистично

вірогідне накопичення проліну в усіх варіантах дослідження з максимальними значеннями за умов обробки живими клітинами обох патогенів, що найбільшою мірою викликала

перекисне окиснення ліпідів у рослинних тканинах. Це дає підставу припустити, що особливості метаболізму проліну можуть бути ще однією із причин підвищеної чутливості сорту Фаворитка до шкодочинної дії фітопатогенних псевдомонад, зокрема й за рахунок додаткової генерації цитотоксичних АФК.

Висновок. Генерація АФК як механізм імунного захисту рослини проти фітопатогенних псевдомонад однаковою мірою активується у випадку експозиції як адаптованим, так і неадаптованим патогеном, і меншою мірою – у випадку обробки ЛПС обох патогенів. Обробка зернівок чутливого до фітопатогенних псевдомонад сорту Фаворитка адаптованим патогеном спричиняє різку активацію ферментів антиоксидантного захисту, експозиція неадаптованим патогеном – різке накопичення проліну. Таким чином, чутливість проростків пшениці до фітопатогенних адаптованих і неадаптованих псевдомонад значною мірою залежить від збалансованого функціонування системи антиоксидантного захисту. У сукупності ці дані засвідчують перспективність оксидативного метаболізму клітин пшениці як мішені для селекції сортів, стійких до фітопатогенних бактерій.

Список використаної літератури

1. Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants: Monograph / R. I. Gvozdyak, L. A. Pasichnyk, L. M. Yakovleva et al. // K.: "RPE Interservis" Ltd. – 2011. – 58 p. In Ukrainian.
2. Xin X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X. F. Xin, B. Kvitko, S. Y. He // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – 16(5). – 316.
3. Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread / L. A. Pasichnik, V. F. Patyka, S. F. Khodos, T. S. Vinnichuk // *Mikrobiol. Zhur.* – 2012. – 74(4). – P. 37–44.
4. Valencia-Botín A. J. Are view of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat / Valencia-Botín A. J., Cisneros-Lopez N. E. // *Int. J. Agron.* – 2012. – 2012:692350.
5. *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae* / B. Dutta, R. Gitaitis, G. Agarwal et al. // *PloSone*. – 2018. – Vol. 13. – № 12. – e0208271.
6. Pai Li. The Life cycle of the Plant Immune System // Li Pai, Lu Yi-Ju, Huan Chen & Brad Day Critical // *Reviews in Plant Sciences*. – 2020; 39(1): 72-100.
7. Saijo Y. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses / Y. Saijo, E. P. Loo // *New Phytol.* – 2020. – Vol. 225. – № 1. – P. 87–104.
8. Delventhal R. A comparative analysis of nonhost resistance across the two Triticeae crop species wheat and barley / R. Delventhal, J. Rajaraman, F. Stefanato et al. // *BMC Plant Biol.* – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 232.
9. Li W. Exploiting Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops: From Molecular Dissection to Breeding / W. Li, Y. Deng, Y. Ning, Z. He, G. L. Wang // *Annu Rev Plant Biol.* – 2020. – 71. – P. 575–603.
10. From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition / X. Yu, B. Feng, P. He, L. Shan // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2017. – 55. – P. 109–137.
11. Phevine A, a small molecule that suppresses plant immune responses / E. M. O'Neill, T. S. Mucyn, J. B. Patteson et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2018. – Vol. 115. – № 41. – e9514-E9522.
12. Li L. Plant immune responses – from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens / L. Li, A. C. Harmon, S. Chen // *Plant Signal Behav.* – 2019. – Vol. 14. – № 5. – e1588667.
13. Effect of causal agent of basal bacteriosis on seed germination and root growth of different wheat varieties / A. Yu. Pastoshchuk, L. M. Skivka, L. M. Butsenko, V. P. Patyka // *Microbiology & Biotechnology*. – 2018. – Vol. 2. – № 42. – P. 39–48.
14. Zdorovenko G. M. *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides: Immuno chemical characteristics and structures as a basis for strain classification / G. M. Zdorovenko, E. L. Zdorovenko // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 79. – P. 47–57.
15. Kumar G. N. M. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radicals scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers / G. N. M. Kumar, N. R. Knowles // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 102. – P. 115–124.
16. Giannopolitis C. N. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants / C. N. Giannopolitis, S. K. Ries // *Plant Physiol.* – 1977. – Vol. 59. – P. 309–314.
17. Aeby H. Catalase in vitro / H. Aeby // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 121–126.
18. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

19. Bates L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates, R. P. Waldren, I. D. Teare // *Plant Soil*. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.
20. Abdul Malik N. A. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity / N. A. Abdul Malik, I. S. Kumar, K. Nadarajah // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 963.
21. Lindeberg M. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments / M. Lindeberg, S. Cunnac, A. Collmer // *Trends Microbiol.* – 2012. – Vol. 20. – № 4. – P. 199–208.
22. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum / M. T. Hulin, J. W. Mansfield, P. Brain et al. // *Plant Pathol.* – 2018. – Vol. 67. – № 5. – P. 1177–1193.
23. Baranenko V. V. Superoxidisynthase in plant cells / V. V. Baranenko // *Tsitologiya*. – 2006. – Vol. 48. – № 6. – P. 465–474.
24. Nowogórska A. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection / A. Nowogórska, J. Patykowski // *Acta Physiol. Plant*. – 2015. – Vol. 37. – P. 1725.
25. Kavi P. B. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny / Kavi P. B., Hima Kumari P., Sunita M. S., Sreenivasulu N. // *Front. Plant Sci.* – 2015. – V. 6. – 544
26. Meena M. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions / M. Meena, K. Divyanshu, S. Kumar et al. // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5. – № 12. – e02952.
27. Zeier J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways / J. Zeier // *Plant Cell Environ.* – 2013. – Vol. 36. – № 12. – P. 2085–2103.
28. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis* / G. Fabro, I. Kovács, V. Pavet et al. // *Molecular Plant-microbe Interactions*. MPMI. – 2004. – Vol. 17. – № 4. – P. 343–350.
29. The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation / K. Deuschle, D. Funck, G. Forlani et al. // *Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – № 12. – 3413–3425.

Reference (Scopus)

1. Gvozdyak R.I., Pasichnyk L.A., Yakovleva L. M. Et al. Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants: Monograph. – K.: "RPE Interservis" Ltd. – 2011. 58 p. In Ukrainian.
2. Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 2018; 16(5): 316.
3. Pasichnik L.A., Patyka V.F., Khodos S.F., Vinnichuk T.S. Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread. *Mikrobiol. Zhur.* 2012; 74(4): 37-44.
4. Valencia-Botín A.J., Cisneros-Lopez N.E. Are view of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *Int. J. Agron.* 2012; 2012:692350.
5. Dutta B., Gitaitis R., Agarwal G., Coutinho T., Langston D. *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. *PloSone*. 2018; 13(12): e0208271.
6. Pai Li, Yi-Ju Lu, Huan Chen & Brad Day The Life cycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2020; 39(1): 72-100.
7. Saijo Y, Loo P. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol.* 2020; 225(1): 87-104.
8. Delventhal R., Rajaraman J., Stefanato L., Rehman S., Aghnoum R., McGrann G., Bolger M., Usadel B., Hedley P., Boyd L., Niks R., Schweizer P., Schaffrath U. A comparative analysis of non host resistance across the two Triticeae crop species wheat and barley. *BMC Plant Biol.* 2017; 17(1): 232.
9. Li W., Deng Y., Ning Y., He Z., Wang G.L. Exploiting Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops: From Molecular Dissection to Breeding. *Annu Rev Plant Biol.* 2020; 71: 575-603.
10. Yu X., Feng B., He P., Shan L. From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2017; 55: 109–137.
11. O'Neill E.M., Mucyn T.S., Patteson J.B., Finkel O.M., Chung E.H., Baccie J.A., Massolo E., Schroeder F.C., Dangi J.L., Li B. Phevine A, a small molecule that suppresses plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(41): E9514-E9522.
12. Li L., Harmon A., Chen S. Plant immune responses – from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signal Behav.* 2019; 14(5): e1588667.
13. Pastoshchuk A.Yu., Skivka L.M., Butsenko L.M., Patyka V.P. Effect of causal agent of basal bacteriosis on seed germination and root growth of different wheat varieties. *Microbiology & Biotechnology*. 2018. 2(42): 39-48.
14. Zdorovenko G., Zdorovenko E. *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides: Immuno chemical characteristics and structures as a basis for strain classification. *Microbiology*. 2010. 79: 47–57.
15. Kumar G., Knowles N. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radicals scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol.* 1993; 102: 115–24.
16. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977; 59: 309–14.
17. Aeby H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121–6.
18. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
19. Bates L.S., Waldren R.P. & Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 1973; 39: 205–207.

20. Abdul Malik N.A., Kumar I.S., Nadarajah K. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):963.
21. Lindeberg M., Cunnac S., Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* 2012;20(4):199-208.
22. Hulin M., Mansfield J.W., Brain P., Xu X., Jackson R.W., Harrison R. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathol.* 2018;67(5):1177-1193.
23. Baranenko V. [Superoxidedismutase in plant cells]. *Tsitologia.* 2006;48(6):465-74.
24. Nowogórska A., Patykowski J. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection. *ActaPhysiol Plant.* 2015; 37, 1725.
25. Kavi Kishor P., Hima Kumari P., Sunita M., Sreenivasulu N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci.* 2015;6:544.
26. Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Zehra A., Shukla V., Yadav M., Upadhyay R. Regulation of L-proline biosynthesis, signal

transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon.* 2019;5(12):e02952.

27. Zeier J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.* 2013;36(12):2085-103.

28. Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-microbe Interactions* : MPMI. 2004;17(4):343-350.

29. Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B. The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell.* 2004;16(12):3413-25.

Надійшла до редколегії 06.01.2021
Отримано виправлений варіант 03.01.2021
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021
Received a revised version on 03.01.2021
Signed in the press on 03.01.2021

А. Пастощук, асп., М. Коваленко, асист., Л. Сківка, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНТИОКСИДАНТНЫЕ РЕАКЦИИ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗНЫХ СОРТОВ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВЛИЯНИЮ PSEUDOMONASSYRINGAE И ИХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ IN VITRO

Pseudomonas syringae является самой распространенной фитопатогенной бактерией с широким кругом растений-мишеней, в число которых входят важные зерновые культуры, в т. ч. пшеница. Одним из основных возбудителей бактериальных болезней пшеницы является *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В некоторых странах потери урожая пшеницы, вызванные этой фитопатогенной бактерией, достигают 50 %. Таксономия *P. syringae* включает на сегодняшний день более 50 патоваров с разной степенью адаптации к поражению пшеницы. Одним из таких патоваров является *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. *P. Syringa* pv. *coronafaciens* не является адаптированным патогеном для пшеницы. Однако, поражение этим патогеном широкого круга сельскохозяйственных культур, в т. ч. и пшеницы, привлекает внимание как исследователей, так и специалистов агропромышленного комплекса. Исследование механизмов устойчивости пшеницы к поражению адаптированными и неадаптированными патоварами *P. syringae* представляет значительный интерес и с точки зрения углубленного изучения возбудителя, и в перспективе селекции устойчивых к бактериальным болезням сортов этой стратегически важной для Украины зерновой культуры. Целью работы была сравнительная оценка антиоксидантных реакций проростков пшеницы различных сортов в условиях обработки зерновок фитопатогенными бактериями *P. syringae* различных патоваров и их липополисахаридами (ЛПС). Установлено, что генерация АФК, как механизм иммунной защиты растения против фитопатогенных псевдомонад, в равной степени активируется в случае экспозиции как адаптированным, так и неадаптированным патогеном и в меньшей степени – в случае обработки ЛПС обоих патогенов. Обработка зерновок чувствительного к фитопатогенным псевдомонадам сорта Фаворитка адаптированным патоваром вызывает резкую активацию ферментов антиоксидантной защиты, экспозиция неадаптированным патоваром – резкое накопление пролина. Таким образом, чувствительность проростков пшеницы у фитопатогенных адаптированных и неадаптированных псевдомонад в значительной степени зависит от сбалансированного функционирования системы антиоксидантной защиты. В совокупности эти данные свидетельствуют о перспективности оксидативного метаболизма клеток пшеницы как мишени для селекции сортов, устойчивых к фитопатогенным бактериям.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, пшеница, антиоксидантная система.

A. Pastoschuk, PhD Student, M. Kovalenko, Assist., L. Skivka, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANTIOXIDANT REACTIONS IN WINTER WHEAT SEEDLINGS OF DIFFERENT CULTIVARS, EXPOSED TO THE PSEUDOMONAS SYRINGAE AND ITS LIPOPOLYSACCHARIDES IN VITRO

Pseudomonas syringae is the most common phytopathogenic bacterium with a wide range of target plants, which include important cereals such as wheat. One of the main pathogens of bacterial diseases of wheat is *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In some countries, wheat yield losses caused by this phytopathogenic bacterium reach 50%. Currently, the taxonomy of *P. syringae* includes more than 50 pathovars with varying degrees of adaptation to wheat lesions. One of them is *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. *P. syringae* pv. *Coronafaciens* is non-host pathogen for wheat. However, the infection of a wide range of crops, including wheat, with this pathogen attracts the attention of both researchers and specialists of the agro-industrial complex. The study of the mechanisms of wheat resistance to host and non-host pathovars of *P. syringae* is of great interest, both in terms of in-depth study of the pathogen and in the perspective of selection of bacterial disease-resistant varieties of this strategically important grain crop for Ukraine. The aim of the study was to compare the antioxidant reactions of wheat seedlings of different winter wheat varieties under the grain exposition to *P. syringae* of different pathovars and their lipopolysaccharides (LPS). It was found that reactive oxygen species generation, as a mechanism of plant immune protection against phytopathogenic pseudomonads, is equally activated in the case of exposure to both host and non-host pathovars and to a lesser extent in the case of the exposure with LPS of both pathovars. In grains of Favoritka variety (most sensitive to phytopathogenic pseudomonads) exposed to host pathovar, significant activation of antioxidant enzymes was observed. Exposure to the non-host pathovar causes sharp proline accumulation. Thus, the sensitivity of wheat seedlings to phytopathogenic host and non-host pathovars of phytopathogenic pseudomonads largely depends on the balanced functioning of the antioxidant defense system. Taken together, these data indicate the wheat cell oxidative metabolism as a target for selection of varieties resistant to phytopathogenic bacteria.

Keywords: *Pseudomonas syringae*, wheat, antioxidant system.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 1 (84)

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 7,78. Наклад 300. Зам. № 221-10009.

Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 1.

Підписано до друку 15.02.21

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна

☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28

e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua

http: vpc.univ.kiev.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02