

Державний вищий навчальний заклад
«Запорізький національний університет»
Міністерства освіти і науки України

Заснований
у 1997 р.

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого
засобу масової інформації
Серія КВ № 15436-4008 ПР
22 червня 2009 р.

Адреса редакції:
Україна, 69600,
м. Запоріжжя, МСП-41,
вул. Жуковського, 66

Телефон
для довідок:
(061) 289-12-10

Вісник

Запорізького національного університету

- Біологічні науки

№ 2, 2014

Запоріжжя 2014

Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки. – Запоріжжя: Запорізький національний університет, 2014. – №2. – 256 с.

Затверджено постановою президії ВАК України від 01.07.2010 №1-05/5 як наукове фахове видання в галузі «Біологічні науки», у якому можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук.

Рекомендовано до друку та поширення через мережу Internet вченою радою ЗНУ (протокол засідання № 4 від 25.11.2014 р.)

РЕДАКЦІЙНА РАДА:

Головний редактор – Омелянчик Л.О., доктор фармацевтичних наук, професор
Відповідальний редактор – Задорожня В.Ю., кандидат біологічних наук, ст. викладач

Редакційна колегія:

- | | |
|------------------------|---|
| Омелянчик Л.О. | - головний редактор,
доктор фармацевтичних наук, професор
(Запоріжжя, Україна) |
| Лях В.О. | - заступник головного редактора,
доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Бессонова В.П. | - доктор біологічних наук, професор
Дніпропетровський національний університет
(Дніпропетровськ, Україна) |
| Бовт В.Д. | - доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Бражко О.А. | - доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Гусейнов Маїр Алі огли | - доктор біологічних наук, головний науковий співробітник
Інститут зоології НАН Азербайджану
(Баку, Азербайджан) |
| Домніч В.І. | - доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Зачіняєв Я. В. | - доктор хімічних наук, доктор біологічних наук, професор
Російський державний педагогічний університет ім. А.І. Герцена
(Санкт-Петербург, Росія) |
| Колісник Н.В. | - доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Маліков М.В. | - доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Мицик Л.П. | - доктор біологічних наук, професор
Дніпропетровський національний університет
(Дніпропетровськ, Україна) |
| Проняєв О.А. | - доктор біологічних наук,
Російський державний аграрний заочний університет
(Балашиха, Росія). |
| Сарабєєв В.Л. | - кандидат біологічних наук, доцент
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Сибірна Н.О. | - доктор біологічних наук, професор
Львівський національний університет ім. І. Франка
(Львів, Україна) |
| Рильський О.Ф. | - доктор біологічних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Фролов О.К. | - доктор медичних наук, професор
Запорізький національний університет
(Запоріжжя, Україна) |
| Juan A. Balbuena | - doctor of biology, professor
Marine Zoology Unit Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology University of Valencia
(Valencia, Spain) |

ЗМІСТ

РОЗДІЛ I. ГЕНЕТИКА, ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА ПРИКЛАДНА БОТАНІКА

ЖУКОВ Б.С., СПІЩУК Г.І., ВОЛКОВА Н.Е.	
ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ y1 ГЕНА КУКУРУДЗИ	7
ЛЕВЧУК Г.М.	
ДИНАМІКА ЛЕКТИНОВОЇ АКТИВНОСТІ ХЛОРОПЛАСТІВ ХЛОРОФІЛЬНИХ МУТАНТІВ LINUM HUMILE MILL. ПРОТЯГОМ ОНТОГЕНЕЗУ	14
ПОЛЯКОВ В.А., ЛЯХ В.А.	
НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ ЦВЕТКА МЕЖВИДОВЫМИ ГИБРИДАМИ F ₁ ЛЬНА	24
ТОЦКИЙ И.В., ВИТКОВСКАЯ Ю.С., ЛЯХ В.А.	
ВЛИЯНИЕ МИКРОГАМЕТОФИТНОГО ОТБОРА У ГИБРИДОВ F ₁ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ СПОРОФИТНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ F ₂ К РАЗЛИЧНЫМ АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ	31
ЯРАНЦЕВА В.В., ЛЯХ В.А.	
ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАСТИДНОГО АППАРАТА ХЛОРОФИЛЬНЫХ МУТАНТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО	39

РОЗДІЛ II. ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ТВАРИН

ГАСЫМОВА Г.Х.	
НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ПО БИОЭКОЛОГИИ И РАСПРОСТРАНЕНИЮ ВОСТОЧНОЙ КВАКШИ (HYLA ORIENTALIS BEDRIAGA, 1890) В АЗЕРБАЙДЖАНЕ.....	47
ГОРЛОВ П.І., КОСТЮШИН В.А., СЮХІН В.Д., БЕЛАШКОВ І.Д.	
ХАРАКТЕРИСТИКА ОРНИТОЛОГІЧНОЇ СИТУАЦІЇ НА ОСТРОВІ БІРЮЧИЙ У СЕРПНІ 1995 ТА 2012 РОКІВ	54
ГУСЕЙНОВ М.А.	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕЗОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЗАРАЖЕННОСТИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ PELORHYLAH RIDIBUNDUS (PALLAS) ДЕВЕЧИНСКОГО ЛИМАНА КРОВЕПАРАЗИТАМИ В 1993 И 2002 ГОДАХ.....	77
ИСКЕНДЕРОВА Н.Г.	
ЭЙМЕРИИ (EIMERIIDA, COCCIDEA, APICOMPLEXA) ДОМАШНИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ.....	90
ПАЦЮК М.К.	
СЕЗОННІ ЗМІНИ У ВИДОВОМУ КОМПЛЕКСІ ГОЛИХ АМЕБ У р. КАМ'ЯНКА (м. ЖИТОМИР)	98
SAMEDOVA S.O., HASANOVA Zh. V.	
LEUCOCYTOZOONOSIS IN TURKEYS (MELEAGRIS GALLOPAVO)	107

РОЗДІЛ III. ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

GALKIN O.Yu., METALNIKOVA N.P., GORGO Yu.P.	
CURRENT STATE AND FUTURE TRENDS IN DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF POLIOMYELITIC VACCINES	113
GALKIN O.Yu., SOLOVJOVA V.F., METALNIKOVA N.P., DUGAN O.M., GORGO Yu.P.	
OBTAINING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN I _g G SUITABLE FOR USAGE IN HIGHLY SENSITIVE AND SPECIFIC IMMUNOASSAYS.....	120

ГОЛУБЕНКО А.В.

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНОВ ВЫСОКОЙ КВАЛИФИКАЦИИ..... 129

ESHCHENKO Ju.V., BOVT V.D., OMEL'JIANCHIK V.N., GROMENKO H.A., SHATOVSKY J.O.

THE CHANGE OF BIOMETALS CONTENT (Cu, Mg, Zn) IN BLOOD AND SEMEN AND THEIR RELATIONSHIP TO THE FERTILITY OF MEN, WHO WERE CONTAMINATED BY ANTHROPOGENIC AIR POLLUTION..... 138

KOVALYOVA A.V.

MODULATED ELECTRIC CURRENT INFLUENCE ON ORGANISM FUNCTIONAL CONDITION AT TRAINED AND UNTRAINED YOUNG MEN..... 145

КУЧКОВСЬКИЙ О.М.

ІНТРАВІТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІН ВМІСТУ ЦИНКУ В КЛІТИНАХ ГІПОКАМПУ, ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ДІЇ СТРЕС-ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ..... 154

МИХАЛЕВИЧ О. М.

КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ЕЕГ-ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ ОЦІНКИ ОСОБЛИВОСТЕЙ БІОЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В СТАНІ СПОКОЮ В БЛИЗНЯТ ТА ОДНООСІБНО НАРОДЖЕНИХ..... 163

ОМЕЛЬЯНЧИК В.Н., НОВОСАД Н.В., КОЛЕСНИК Н.В.

ПАРАМЕТРЫ СУТОЧНЫХ РИТМОВ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С РАЗНЫМИ ФАЗАМИ АКТИВНОСТИ..... 171

ФРОЛОВ А. К., ЛИТВИНЕНКО Р. А.

КЛЕТОЧНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ РЕАКЦИИ NERUDO VERBANA (CARENA, 1820) В ПОСТТРОФИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ..... 176

ЧИНКІН А.А.

СТАН ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ У ДІТЕЙ У ВІЦІ ВІД 4 ДО 7 РОКІВ ЗАЛЕЖНО ВІД МОТОРНОЇ АСИМЕТРІЇ..... 189

ШВЕЦЬ В.М.

ФЕРМЕНТАТИВНІ СИСТЕМИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КАТАБОЛІЗМУ ЕНДОГЕННИХ АЛЬДЕГІДІВ У СЕРЦІ ПРИ ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕСІ..... 202

РОЗДІЛ IV. ЕКОЛОГІЯ ТА ОХОРОНА ПРИРОДИ**КРУПЕЇ К.С., РИЛЬСЬКИЙ О.Ф.**

ВПЛИВ АНІОНІВ СОЛЕЙ ЦИНКУ ТА МІДІ НА ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНУ ЗДАТНІСТЬ ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН..... 218

РОЗДІЛ V. БІООРГАНІЧНА ХІМІЯ ТА БАР**BRAZHKO O.O.**

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 4-THIOQUINOLINES (REVIEW)..... 225

ЛАШКО Н.П., ГАСАНОВА Т.А.

ЗВ'ЯЗУВАННЯ АРОМАТОУТВОРЮЮЧИХ РЕЧОВИН ПРОСТИМИ ТА НАПОВНЕНИМИ ДРАГЛЯМИ ЖЕЛАТИНУ..... 236

ЛАШКО Н.П., ТАРАН А.С.

ДИНАМІКА ЗМІН ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ЧАЇ ПРИ ЙОГО ЗБЕРІГАННІ..... 244

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ СТАТЕЙ У “ВІСНИК ЗАПОРІЗЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ” ЗА ФАХОМ “БІОЛОГІЧНІ НАУКИ”..... 252

CONTENCE

SECTION I. GENETICS, PLANT PHYSIOLOGY AND APPLIED BOTANY

ZHUKOV B.S., SLISHUK G.I., VOLKOVA N.E.	
<i>PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MAIZE $y1$ GENE</i>	7
LEVCHUK H.M.	
<i>DINAMIKS OF CHLOROPLASTS LECTIN ACTIVITY IN CHLOROPHYLL MUTANTS OF LINUM HUMILE MILL. DURING ONTOGENESIS</i>	14
POLYAKOV V.A., LYAKH V.A.	
<i>INHERITANCE OF FLOWER TRAITS BY INTERSPECIFIC F_1 FLAX HYBRIDS</i>	24
TOTSKY I.V., VITKOVSKA YU.S., LYAKH V.A.	
<i>INFLUENCE OF MICROGAMETOPHYTIC SELECTION IN F_1 SUNFLOWER HYBRIDS FOR RESISTANCE OF SPOROPHYTIC F_2 POPULATIONS TO DIFFERENT ABIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS</i>	31
YARANTSEVA V.V., LYAKH V.A.	
<i>CHARACTERISTIC PLASTID APPARATUS CHLOROPHYLL MUTANTS OF OIL FLAX</i>	39

SECTION II. ZOOLOGY AND ANIMAL ECOLOGY

GASIMOVA G.H.	
<i>SOME DATA ON THE BIOECOLOGY AND DISTRIBUTION OF HYLA ORIENTALIS BEDRIAGA, 1890 IN AZERBAIJAN</i>	47
GORLOV P.I., KOSTIUSHYN V.A., SIOKHIN V.D., BELASHKOV I.D.	
<i>CHARACTERISTIC OF ORNITHOLOGICAL SITUATION ON BIRYUCHII ISLAND IN AUGUST 1995 AND 2012</i>	54
GUSEINOV M.A.	
<i>COMPARATIVE ANALYSES OF SEASONAL FLUCTUATION OF DEVECHI FIRTH FROG PELOPHYLAX RIDIBUNDUS (PALLAS) INFECTION WITH BLOOD PARASITES IN 1993 AND 2002 AGES</i>	77
ISKENDEROVA N.Q.	
<i>EIMERIA (EIMERIIDA, COCCIDEA, APICOMPLEXA) OF FARM RUMINANTS IN AZERBAIJAN</i>	90
PATSYUK M.K.	
<i>SEASONAL CHANGES IN NAKED AMOEBAE SPECIES COMPLEX IN THE RIVER KAMYANKA (ZHYTOMYR CITY)</i>	98
SAMEDOVA S.O., HASANOVA Zh.V.	
<i>LEUCOCYTOZONOSIS IN TURKEYS (MELEAGRIS GALLOPAVO)</i>	107

SECTION III. HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY

GALKIN O.Yu., METALNIKOVA N.P., GORGO Yu.P.	
<i>CURRENT STATE AND FUTURE TRENDS IN DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF POLIOMYELITIC VACCINES</i>	113
GALKIN O.Yu., SOLOVJOVA V.F., METALNIKOVA N.P., DUGAN O.M., GORGO Yu.P.	
<i>OBTAINING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN IgG SUITABLE FOR USAGE IN HIGHLY SENSITIVE AND SPECIFIC IMMUNOASSAYS</i>	120

GOLUBENKO A.V.

POSSIBLE WAYS TO CORRECT THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN ORGANISM OF HIGH QUALIFICATION SPORTSWOMEN..... 129

ESHCHENKO Ju.V., BOVT V.D., OMEL'JIANCHIK V.N., GROMENKO H.A., SHATOVSKY J.O.

THE CHANGE OF BIOMETALS CONTENT (Cu, Mg, Zn) IN BLOOD AND SEMEN AND THEIR RELATIONSHIP TO THE FERTILITY OF MEN, WHO WERE CONTAMINATED BY ANTHROPOGENIC AIR POLLUTION..... 138

KOVALYOVA A.V.

MODULATED ELECTRIC CURRENT INFLUENCE ON ORGANISM FUNCTIONAL CONDITION AT TRAINED AND UNTRAINED YOUNG MEN 145

KUCHKOVSKY O.M.

INTRAVITAL RESEARCH OF ZINC CONTENT CHANGE IN THE CELLS OF HIPPOCAMP, PANCREAS AND SMALL INTESTINE UNDER THE INFLUENCE OF DIFFERENT ORIGIN STRESS-FACTORS 154

MIKHALYEVICH O.M.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF EEG INDICATORS FOR EVALUATION OF CHARACTERISTICS OF THE BIO-ELECTRICAL BRAIN ACTIVITY IN REST-STATE IN TWIN BIRTHS AND ALONE 163

OMELYANCHIK V.N., NOVOSAD N.V., KOLESNIK N.V.

CHARACTERISTICS CIRCADIAN RHYTHM OF BUTYRYLCHOLINESTERASE AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE LIVER OF ANIMALS WITH DIFFERENT PHASES ACTIVITY..... 171

FROLOV A. K., LITVINENKO R. A.

CELLULAR AND TISSUE REACTIONS OF HIRUDO VERBANA (CARENA, 1820) IN THE POSTTROPIC PROCESSES..... 176

CHINKIN A.A.

CONDITION OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL PROPERTIES AT CHILDREN IN THE AGE RANGE FROM 4 TILL 7 YEARS OLD DEPENDING ON MOTOR ASYMMETRY 189

SHVETS' V.M.

THE ENZYMATIC SYSTEMS OF ENDOGENOUS ALDEHYDES INTERCELLULAR CATABOLISM IN THE HEART UNDER OXIDATIVE STRESS..... 202

SECTION IV. ECOLOGY AND CONSERVANCY**KRUPEY K.S., RYLSKY A.F.**

INFLUENCE OF ANIONS OF SALTS OF ZINC AND COPPER ON THE PIGMENT SYNTHESIZING ABILITY OF YEASTS CELLS..... 218

SECTION V. BIOLOGICAL CHEMISTRY AND BIOACTIVE SUBSTANCES (BAS)**BRAZHKO O.O.**

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 4-THIOQUINOLINES (REVIEW)..... 225

LASHKO N.P., HASANOVA T.A.

FASTENING OF SUBSTANCES WHAT CREATE AN FLAVOUR BY SIMPLE AND GAP-FILLING GALANTINES OF GELATIN 236

LASHKO N.P., TARAN A.S.

DYNAMIC PATTERN OF THE CONTENTS OF PHENOL COMPOUNDS IN TEA UPON STORAGE 244

REQUIREMENTS FOR THE ARTICLES TO THE "VISNYK OF ZAPORIZHZHYA STATE UNIVERSITY" ON SPECIALITY BIOLOGICAL SCIENCES.....252

РОЗДІЛ І. ГЕНЕТИКА, ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА ПРИКЛАДНА БОТАНІКА

УДК 633.15 : 577.151 : 577.212

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ *y1* ГЕНА КУКУРУДЗИ

Жуков Б.С., Сліщук Г.І., Волкова Н.Е.

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства
та сортовивчення НААН України*

65036, Україна, Одеса, Овідіопольська дорога, 3

vanbjorn@gmail.com

За допомогою методів філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей досліджено ген *y1* злакових та встановлено, що розподіл кластерів збігається з систематичним розподілом таксонів. Встановлений D коефіцієнт Таджими демонструє нейтральний диверсифікуючий характер еволюції *y1* гена. За результатами аналізу сили відбору окремих амінокислотних залишків встановлено 19 важливих позицій, у яких кількість синонімічних замін перевищує кількість несинонімічних, що свідчить про їх суттєву роль для функціонування ферменту фітоїнсинтази.

Ключові слова: філогенетика, кукурудза, ген y1, екзон, інтрон, поліморфізм, селекція.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *y1* ГЕНА КУКУРУЗЫ

Жуков Б.С., Слищук Г.И., Волкова Н.Э.

*Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения НААН Украины
65036, Украина, Одесса, Овидиопольская дорога, 3*

vanbjorn@gmail.com

С помощью методов филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей исследован ген *y1* злаковых и установлено, что распределение кластеров совпадает с систематическим распределением таксонов. Установленный D коэффициент Таджими демонстрирует нейтральный диверсифицирующий характер эволюции *y1* гена. По результатам анализа силы отбора отдельных аминокислотных остатков установлены 19 важных позиций, в которых количество синонимичных замен превышает количество несинонимичных, что свидетельствует об их существенной роли для функционирования фермента фитоинсинтазы.

Ключевые слова: филогенетика, кукуруза, ген y1, экзон, интрон, полиморфизм, селекция.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MAIZE *y1* GENE

Zhukov B.S., Shishuk G.I., Volkova N.E.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar investigation

65036, Ukraine, Odessa, Ovidiopolskaya doroga Str., 3

vanbjorn@gmail.com

First important step in carotene biosynthesis pathway is geranylgeranyl pyrophosphate to phytoene conversion via phytoene synthase enzyme. Phytoene synthase-coding gene in maize genome was designated as *y1*. Phylogenetic dendrogram was reconstructed as a result of 92 *y1* gene nucleotide sequences global alignment. The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. Samples were divided into two clusters. Panicoideae, Pooideae, and Bombusodae clades representatives have formed cluster I, while as Oryzodae subfamily have formed cluster II. Maize formed I cluster with other Panicoideae clade representatives, such as tripsacum (*Tripsacum spp.*), Job's Tears (*Coix lacryma*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and foxtail millet (*Setaria italica*). Pooideae subfamily, as well as Bombusodae formed separate branches within cluster I. Cluster allocation generally corresponds to systematic one. Maize *y1* gene neutrality of evolution evaluation was conducted using Tajima D criteria. Tajima D negative value, which equals -0,036137, indicates this gene neutral evolution pattern, and

consequently its diversifying pattern. Due to the fact that maize is domesticated plant, this indicates that artificial selection was not centered on one or another allele of this gene.

For maize *y1* intraspecific polymorphism investigation 53 pre-mRNA, 53 mature mRNA *y1* gene samples, obtained via in silico splicing nucleotide alignment was conducted.

Maize *y1* pre-mRNA phylogenetic dendrogram contains large amount of separate subclusters, their allocation indicates that vast majority of polymorphic sites in *y1* gene belong to intronic regions and doesn't interfere with enzyme function. Large amount of subclusters within maize *y1* gene mature mRNA phylogenetic dendrogram, which indicates that there is large amount of lesser polymorphisms within exons. Samples FJ971190 and FJ971191 formed separate cluster, which indicates polymorphism within exons.

Maximum Likelihood analysis of natural selection codon-by-codon was performed. So, within 412 investigated codons only 26 were nonzero selection rate. For these aminoacid residues, which $dN - dS$ evaluated to be negative (codons 33, 38, 54, 56, 59, 61, 104, 161, 184, 241, 250, 265, 270, 272, 291, 308, 339, 341, 376), it can be argued that number of synonymous substitutions exceeds the number nonsynonymous ones by these sites, which indicates that these sites are critical for phytoene synthase enzyme.

For these sites, were $dN - dS$ was positive (codons: 47, 52, 53, 199, 201, 256, 343), it can be assumed that there was diversifying selection by these sites.

Thereby, as a result of phylogenetic analysis it was concluded that cereals distribution by *y1* gene generally corresponds to their common systematic taxon distribution and to «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III». As a result of maize pre-mRNA and mature mRNA nucleotide alignment it was shown that majority of *y1* gene polymorphism is within intronic regions and doesn't influence enzyme function. Large amount of lesser substitutions were detected within *y1* gene exons.

Maximum Likelihood analysis of natural selection codon-by-codon is concluded that 26 codons were under non-neutral selection. Within only 19 among them amount of synonymous substitutions exceeds non-synonymous ones, which indicates their importance for phytoene synthase functioning.

Obtained results could become strong scientific basis for *y1* gene molecular-genetic analysis, which could led to Marker assisted selection technique. Molecular genetics approaches combination with traditional breeding ones may enhance maize lines creation efficiency.

Keywords: phylogenetics, Zea mays L., gene y1, exon, intron, polymorphism, breeding.

ВСТУП

Кукурудза (*Zea mays* L.) є однією з найважливіших злакових культур для більшості країн світу, в тому числі для народного господарства України. Зерно кукурудзи містить велику кількість нутрієнтів, воно є надійним джерелом олії, борошна, крупи, крохмалю, етилового спирту, декстрину, глюкози, вітаміну А та інших речовин [1]. Окрім цього, кукурудза характеризується значним природним різноманіттям складу каротиноїдів, у тому числі попередника вітаміну А – β -каротину, але містить їх у дуже низькій концентрації (у середньому 0,13-2,70 нмоль/г) [2]. Тому актуальним є вивчення генів, що кодують ферменти каротиногенезу в зерні кукурудзи.

Ген *y1* кукурудзи, що кодує фітоїнсинтазу (phytoene synthase), – перший фермент у циклі каротиногенезу – локалізовано у довгому плечі хромосоми 6. До його структури входить 6 екзонів та 5 інтронів.

Фітоїнсинтаза каталізує двоступеневу реакцію, під час якої конденсуються дві молекули гераніл-гераніл пірофосфата (geranylgeranyl pyrophosphate) для утворення фітоїну (phytoene) через префітоїнпірофосфат (prephytoene pyrophosphate). Але сам фітоїн рідко накопичується в рослинах, у подальших етапах біосинтезу каротиноїдів він повністю перетворюється в лікопін [4].

Алелі гена *y1* пов'язані з концентрацією каротина в ендоспермі насіння, що фенотипово виражається в кольорі, якій стає менш насиченим або зовсім білим. Для кукурудзи це проявляється білим або блідо-жовтим ендоспермом [3].

Різні "дикі типи" алелів гена *y1* відрізняються інсерціями мобільних елементів у промотор, поліаденіновими додатковими регіонами та довгими тандемними повторами нуклеотидів ССА, без помітного впливу на функцію гена. Домінантний "дикий тип" *Y1* алеля проявляється у високому рівні експресії в ембріоні та ендоспермі [5].

Мета нашої роботи полягала у філогенетичному дослідженні поліморфізму *u1* гена у злакових та кукурудзи зокрема.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджували 92 нуклеотидні послідовності гена *u1* злакових, із них 53 нуклеотидні послідовності кукурудзи, отримані з бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information). Пошук нуклеотидних послідовностей гена *u1* проводили локальним вирівнюванням за алгоритмом Сміта-Вотермана за допомогою он-лайн програми “blastn” [6]. Глобальне понуклеотидне та покодонне вирівнювання послідовностей проводили за алгоритмом Нідлмана-Вунша [7] з використанням програм MEGA5.2 та UGENE за алгоритмом ClustalW та ClustalW (Codons) [8].

Філогенетичний аналіз проводили з використанням пакета MEGA5.2 [9]. Дослідження нейтральності еволюції проводили за D-критерієм Тадзими [10]. Конструювання філогенетичних дендрограм проводили за методом UPGMA [11], еволюційні дистанції розраховані з використанням Maximum Composite Likelihood (MCL) методу, критерієм достовірності слугував bootstrep test [12]. Масштаб дендрограми такий, що довжина гілок пропорційна еволюційним дистанціям, згідно зі шкалою під дендрограмою [13]. Співвідношення синонімічних та несинонімічних замін аналізували за допомогою функції тестування відбору за окремими кодонами програми MEGA5.2.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті глобального вирівнювання 92 нуклеотидних послідовностей гена *u1* реконструйовано філогенетичну дендрограму (рис. 1).

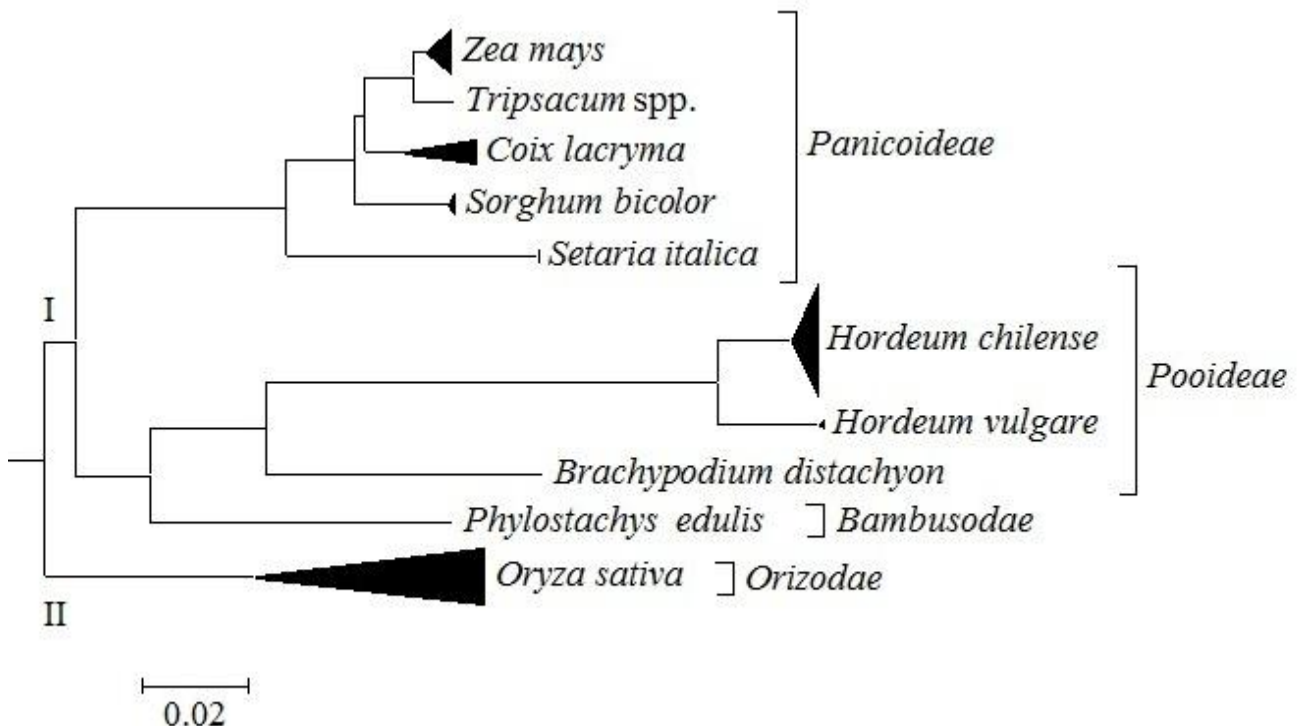


Рис. 1. Філогенетична дендрограма злаків, що отримана за результатами глобального вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *u1*. Трикутниками відмічена кількість проаналізованих зразків

Бутстреп-консенсусне дерево сформовано з 500 повторів. Гілки, що відтворювалися менш ніж у 50 % повторностей, видалено. Зразки розподілилися у два кластери. До кластеру I увійшли представники класу *Pooideae*, *Panicoideae* та *Bombusodae*, до кластеру II увійшли представники лише однієї класу *Oryzodae*. Кукурудза увійшла в один субкластер з іншими представниками класу *Panicoideae*, такими як трипсакум (*Tripsacum* spp.), бусенник звичайний (*Coix lacrima*), сорго (*Sorghum bicolor*) та мого (Setaria italica). Представники *Pooideae* та *Bombusodae* утворили окремий субкластер у кластері I. Розподіл кластерів збігається з систематичним розподілом таксонів An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III [14].

Проводили визначення нейтральності еволюції *y1* гена в кукурудзі з використанням критерію Тадзими. Негативне значення, що дорівнює -0,036137, свідчить про нейтральний характер еволюції цього гена та, як наслідок, про диверсифікуючий характер. У зв'язку з тим, що кукурудза є окультуреною рослиною, це свідчить про те, що штучний відбір не був сконцентрований на тому або іншому варіанті цього гена.

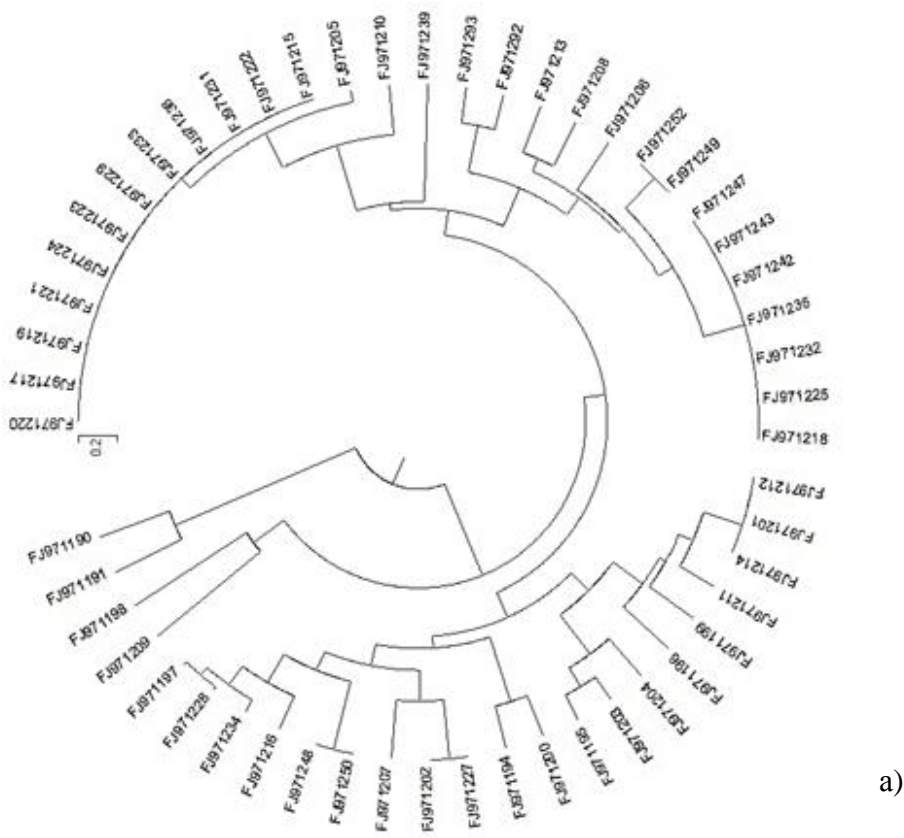
Для вивчення внутрішньовидового поліморфізму кукурудзі за геном *y1* проведено вирівнювання та аналіз 53 зразків про-мРНК та 53 зразків зрілої мРНК, отриманої при проведенні *in silico* сплайсінгу та вирівнювання зразків про-мРНК (рис. 2).

Філогенетична дендрограма зразків про-мРНК *y1* гена кукурудзі (рис. 2а) містить велику кількість кластерів, розподіл яких свідчить про те, що більша частина поліморфізму в гені *y1* приходить на регіони інтронів та не впливає на функцію ферменту. Присутність великої кількості субкластерів у дендрограмі зрілої мРНК *y1* гена кукурудзі (рис. 2б) та різниця між дистанціями у дендрограмах про-мРНК та мРНК демонструє наявність поліморфізму в екзонній структурі гена *y1*. Окремим кластером в обох дендрограмах виділилися зразки FJ971190 та FJ971191, для яких встановлено зсув рамки зчитування.

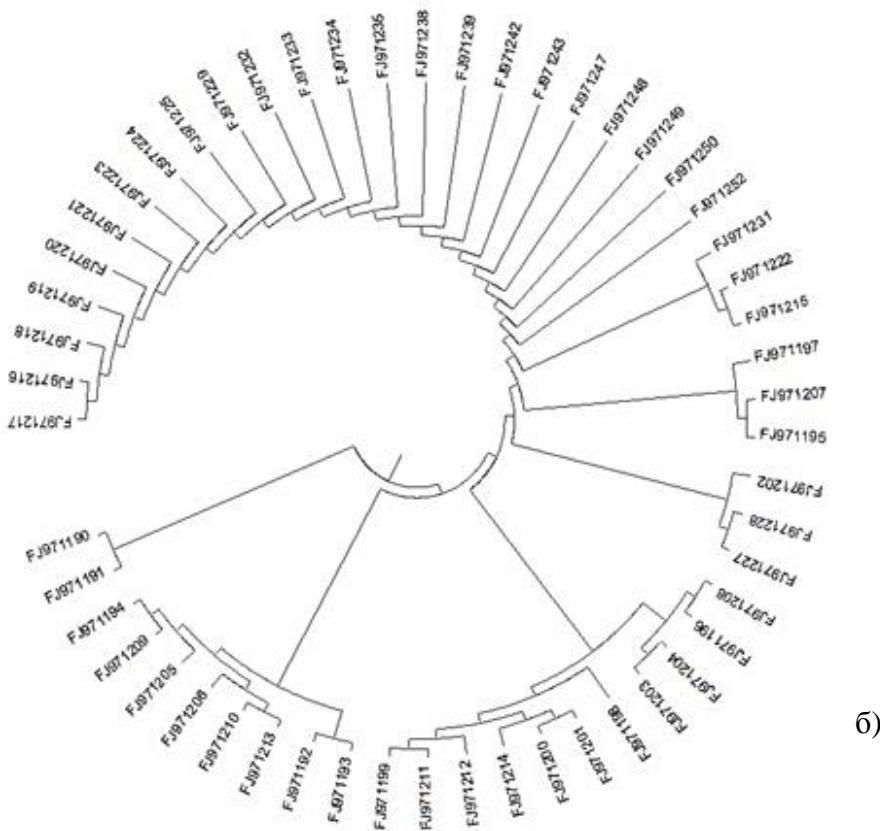
Також проводили вивчення сили відбору щодо окремих триплетів, що кодують амінокислоти (табл. 1). Так, серед 412 досліджуваних триплетів лише для 26 значення сили відбору відмінне від нуля. Для тих амінокислотних залишків, для яких значення сили відбору мало негативні показники (кодони: 33, 38, 54, 56, 59, 61, 104, 161, 184, 241, 250, 265, 270, 272, 291, 308, 339, 341, 376), можна стверджувати, що за цими позиціями кількість синонімічних замін перевищує кількість несинонімічних, що може свідчити про те, що саме ці позиції є критичними для функціонування ферменту фітоїнсинтази.

Для позицій, для яких характерне позитивне значення (кодони: 47, 52, 53, 199, 201, 256, 343), можна припустити, що відбір був спрямований на підвищення різноманіття.

Fu Z. зі співавторами [15] проведено філогенетичний аналіз родини генів *PSy1* (*y1*) при дослідженні їх різноманіття та еволюції. Встановлено відповідність наших результатів щодо розподілу кластерів на дендрограмі та негативного значення D-коефіцієнта Тадзими.



a)



b)

Рис. 2. Філогенетичний аналіз уІ гена кукурудзи: а) вирівнювання про-мРНК, б) вирівнювання зрілої мРНК

Таблиця 1– Сила відбору за амінокислотами, що складають фермент фітоїнсинтази

Кодони	Триплети	Сила відбору
33	ACG	-108,92
38	GCG	-54,46
47	CTT	25,92
52	TGG	12,67
53	GAG	11,47
54	GCT	-27,23
56	CGT	-54,46
59	CCC	-27,23
61	GTC	-54,46
104	AGG	-36,91
161	CTT	-27,23
184	CTG	-21,42
199	GAT	10,01
201	ATC	11,39
241	GCT	-27,23
250	CCT	-54,46
256	ACC	54,46
265	GTA	-81,69
270	TTG	-78,12
272	CTG	-65,45
291	AGA	-36,47
308	GAT	-100,49
339	GAG	-71,52
341	GGG	-27,23
343	AAT	13,56
376	ACG	-27,23

Отримані результати будуть використані для проведення молекулярно-генетичного дослідження поліморфізму *u1* гена за допомогою ПЛР *in vitro*, що дозволить у перспективі створити систему молекулярних маркерів алельного стану *u1* гена. Поєднання добору за молекулярними маркерами (Marker assisted selection) з прийомами традиційної селекції підвищить ефективність створення вихідного матеріалу кукурудзи з певним вмістом каротиноїдів у зерні.

ВИСНОВКИ

Філогенетична дендрограма гена *u1* кукурудзи та інших злакових рослин демонструє те, що розподіл кластерів за *u1* геном у злакових збігається з загальноприйнятим систематичним розподілом таксонів за «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III».

Дендрограми про-мРНК та зрілої мРНК *u1* гена кукурудзи свідчать про наявність поліморфізму як у інтронній, так і в екзонній структурі, але більша частина поліморфізму у гені *u1* виявлена саме в інтронах та не впливає на функцію ферменту.

Значення D коефіцієнта Тадзими демонструє нейтральний диверсифікуючий характер еволюції гена, що говорить про те, що штучний відбір не був направлений на певні варіанти.

Аналіз сили відбору окремих амінокислотних залишків виявив, що з 412 триплетів лише 26 піддавалися відбору. Серед них лише у 19 позицій кількість синонімічних змін перевищує кількість несинонімічних, що свідчить про їх важливість для функціонування ферменту фітоїнсинтази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Батурина А. К. Химический состав и энергетическая ценность пищевых продуктов: [справочник] / А. К. Батурина. – СПб.: Профессия, 2006. – 245 с.
2. Nestel P. Biofortification of Staple Food Crops / P. Nestel, H. Bouis, J. Meenakshi [et al.] // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 1064–1067.
3. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Электронный ресурс] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. Gallagher C. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (*Poaceae*) / C. Gallagher, P. Matthews, F. Li // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135. – P. 1776–1783.
5. Brent B. The *yc1* Gene of Maize Codes for Phytoene Synthase / B. Brent, S. Phillip, J. Diane // Genetics. – 1996. – Vol. 143 (1). – P. 479–488.
6. Smith S. Identification of Common Molecular Subsequences / S. Smith, M. Waterman // Journal of Molecular Biology. – 1981. – Vol. 147. – P. 195–197.
7. Needleman S. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S. Needleman, C. Wunsch // J. Mol. Biol. – 1970. – Vol. 48 (3). – P. 443–453.
8. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // UGENE team Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 1166–1167.
9. Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, N. Peterson // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
10. Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism / F. Tajima // Genetics. – 1989. – Vol. 123. – P. 585–595.
11. Sneath P. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification / P. Sneath, R. Sokal // Systematic. – 1973. – Vol. 24 (2). – P. 263–268.
12. Tamura K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030–11035.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
14. Bremer B. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III / B. Bremer, K. Bremer, M. Chase // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2009. – Vol. 161 (2). – P. 105–121.
15. Fu Z. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSy1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species / Z. Fu, J. Yan, Y. Zheng [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – P. 709–720.

REFERENCE

1. Baturina A. K. Khimicheskii sostav i energeticheskaya tsennost pishchevikh produktov: [spravochnik] / A. K. Baturina. – Sankt-Peterburg: Professiya, 2006. – 245 s.
2. Nestel P. Biofortification of Staple Food Crops / P. Nestel, H. Bouis, J. Meenakshi [et al.] // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 1064–1067.
3. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Электронный ресурс] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. Gallagher C. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (*Poaceae*) / C. Gallagher, P. Matthews, F. Li // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135. – P. 1776–1783.
5. Brent B. The *yc1* Gene of Maize Codes for Phytoene Synthase / B. Brent, S. Phillip, J. Diane // Genetics. – 1996. – Vol. 143 (1). – P. 479–488.

6. Smith S. Identification of Common Molecular Subsequences / S. Smith, M. Waterman // Journal of Molecular Biology. – 1981. – Vol. 147. – P. 195–197.
7. Needleman S. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S. Needleman, C. Wunsch // J. Mol. Biol. – 1970. – Vol. 48 (3). – P. 443–453.
8. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // UGENE team Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 1166–1167.
9. Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, N. Peterson // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
10. Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism / F. Tajima // Genetics. – 1989. – Vol. 123. – P. 585–595.
11. Sneath P. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification / P. Sneath, R. Sokal // Systematic. – 1973. – Vol. 24 (2). – P. 263–268.
12. Tamura K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030–11035.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
14. Bremer B. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III / B. Bremer, K. Bremer, M. Chase // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2009. – Vol. 161 (2). – P. 105–121.
15. Fu Z. Nucleotide diversity and molecular evolution of the PSy1 gene in Zea mays compared to some other grass species / Z. Fu, J. Yan, Y. Zheng [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – P. 709–720.

УДК 582.751.42 : 681.151

ДИНАМІКА ЛЕКТИНОВОЇ АКТИВНОСТІ ХЛОРОПЛАСТІВ ХЛОРОФІЛЬНИХ МУТАНТІВ *LINUM HUMILE* MILL. ПРОТЯГОМ ОНТОГЕНЕЗУ

Левчук Г.М.

*Запорізький національний університет,
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

anna.levchuck@yandex.ua

На чотирьох мутантних лініях льону олійного з різним морфологічним проявом хлорофільної недостатності був проаналізований рівень лектинової активності двох типів хлоропластів протягом онтогенезу. Встановлено, що в мутантного зразка з рівномірним проявом хлорофільної недостатності (М-28) рівень лектинової активності обох типів хлоропластів є вищим у порівнянні з контролем протягом усього онтогенезу. У хлорофільних мутантів з частковим проявом хлорофільної недостатності (М-80, М-81 та М-84) на початкових етапах онтогенезу лектинова активність значно нижча за контрольний варіант, а на стадії цвітіння – достовірно збільшується в дрібних хлоропластах, а у великих достовірно від контролю не відрізняється.

Ключові слова: Linum humile Mill, хлорофільна недостатність, лектинова активність, хлоропласти, лектин-пігментний комплекс.

ДИНАМИКА ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРОПЛАСТОВ ХЛОРОФИЛЛЬНЫХ МУТАНТОВ *LINUM HUMILE* MILL. НА ПРОТЯЖЕНИИ ОНТОГЕНЕЗА

Левчук А.Н.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

anna.levchuck@yandex.ua

На четырех мутантных линиях льна масличного с различным морфологическим проявлением хлорофилльной недостаточности был проанализирован уровень лектиновой активности двух типов хлоропластов в течение онтогенеза. Установлено, что у мутантного образца с равномерным проявлением хлорофилльной недостаточности (М-28) уровень лектиновой активности обоих типов

хлоропластов выше по сравнению с контролем в течение всего онтогенеза. У хлорофильных мутантов с частичным проявлением хлорофильной недостаточности (М-80, М-81 и М-84) на начальных этапах онтогенеза лектиновая активность значительно ниже контрольного варианта, а на стадии цветения – достоверно увеличивается в мелких хлоропластах, а у крупных достоверно от контроля не отличается.

Ключевые слова: *Linum humile Mill.*, хлорофильная недостаточность, лектиновая активность, хлоропласты, лектин-пигментный комплекс.

DINAMIKS OF CHLOROPLASTS LECTIN ACTIVITY IN CHLOROPHYLL MUTANTS OF *LINUM HUMILE* MILL. DURING ONTOGENESIS

Levchuk H.M.

Zaporizhzhya National University
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Street, 66
anna.levchuck@yandex.ua

The study of photosynthesis and attempts to manage the photosynthetic activity of green plants is more than two centuries, and still is one of the most important questions of modern plant physiology. For many years, for such special studies to use mutant plants with chlorophyll deficient. Significant changes in the composition and the ratio of these pigments in plants lead to physiological first, and then to morphological changes, because the intensity of photosynthesis in most chlorophyll-deficient mutants significantly lower than in green plants. However, at present identified and mutants with well-developed structure of chloroplasts and high performance, which concluded with a possible impact on improving plant productivity by affecting the chloroplasts.

Significant changes in the ratio of pigments and lead to physiological ones, and then to morphological changes. These changes are associated with the color of plants and can be seen in the mutants with chlorophyll deficient. Therefore chlorophyll-deficient mutants of higher plants for many years have used for the study of photosynthesis. Interesting object for such studies is linseed mutants received as a result experimental mutagenesis: M-80, M-84, M-28 and M-81.

From the literature it is known that lectins are involved in photosynthesis. They form pigment-lectin complex with pigments in which the pigments catching light energy and lectins by taking it, change its conformation, which leads to a change in carbohydrate specificity. Modified lectins are able to bind dissolved in the stroma thylakoids Calvin cycle enzymes. This hypothesis was proposed Aleksidze. For it the lectins is the link between light and dark phases of photosynthesis.

Linseed (*Linum humile* Mill.) is the extremely plastic crop. It is widely cultivated in Europe, Asia, North and South America, Australia and even North Africa. And everywhere he has a high potential productivity. Obviously this is due to the efficient work of the photosynthetic apparatus. However, especially his performances in this culture have been insufficiently studied.

When using induced mutagenesis in a number of genotypes of linseed we had been allocated a series of mutations with different types of negative chlorophyll deficient. However, some of chlorophyll mutants were highly and even varieties such as Golden variety.

The aim of this study was to determine the lectin activity dynamics of leaves chloroplasts during ontogeny in linseed Cyan, Antares and K-7487 varieties, and their chlorophyll-deficient mutant lines: M-80, M-84, M-81 and M-28. The objects of study were 4 lines of chlorophyll-deficient (M-80, M-81, M-84 and M-28) and 2 genotypes outgoing – Cyan and K-7487.

Linseed plants were grown in the field conditions. Chloroplasts were isolated from leaves at different stages of development by fractional centrifugation. In chlorophyll-deficient mutants of group 1 (M-80, M-81 and M-84) in the early stages of development ("herring bone" and budding stage) analyzed leaves of different colors: upper leaves for the M-80 and the middle leaves for M-81 and M-84.

Lectins from tylakoyid membranes by standard methods with some modifications were extracted. Activities of lectins were determined by hemagglutination assay with 2% suspension of rabbit erythrocytes, given protein concentration. Protein concentration was determined spectrophotometrically by the method of Warburg-Christian. In the analysis of lectin activity was expressed as the reciprocal of - carbon lectin activity and expressed as (mg / ml)⁻¹. Statistical analysis was performed by standard methods.

We have chosen chlorophyll mutants were obtained from different initial genotypes and consists of the following groups: group of Cyan - mutant line M-80, M-81 and M-84 and K-7487 - mutant line M-28.

These mutants for evenness of chlorophyll deficient can be classified into 2 groups. The first group included plants, which chlorophyll deficient is part of the leaves, and the transition to the generative stages of ontogeny plants gradually flourish – a line of M-80, M-81 and M-84. The second group is separated by a line of M-28, chlorophyll deficient which is evenly distributed throughout the plant and changed color persists throughout ontogeny. An interesting feature of these designs is the fact that the mutant lines with varying degrees of depression plants. Thus, according to this index chlorophyll-

deficient studied mutants can be arranged in the following series of the most oppressed in the least: M-81 – M-84 – M-80 – M-28.

In earlier study was shown that mesophyllous of leaves in linseed contains two types of cells: chloroplasts with small and large, are likely to perform different functions in the process of photosynthesis. Studies Aleksidze, it was shown that lectins membranes of chloroplasts involved in the process. In this regard, we have assumed that lectins can optimize the performance of chloroplast pigment apparatus defective chlorophyll mutants.

We analyzed changes in lectin activity of both types of chloroplasts during ontogeny in chlorophyll mutants and output varieties. The study included consecutive stages of development, for which there is a change in color of plants: stairs, "herring bone", budding and flowering stages.

From the results table shows that in most cases chlorophyll mutants of cyan the lectin activity in both types of chloroplasts was significantly reduced compared to the initial variety Cyan. Exceptions are only small chloroplasts at the stage of flowering, when these mutants flourish and chlorophyll deficient almost disappears. In chlorophyll mutant M-28 on the contrary the lectin activity throughout ontogeny in both types of chloroplasts was significantly increased.

Due to these results and the fact that this mutant line M-28 was more productive than the original sample, despite the obvious chlorophyll deficient, we believe that lectins of tylakoyid membrane to contribute to this. Others chlorophyll mutants during ontogeny is depressed and productivity are significantly lower than the original genotype.

An analysis revealed that levels of lectin activity in tylakoyid membranes during ontogeny changes: highest lectin activity with chloroplasts at an early stage of development – the stage stairs, the value of which is almost 10 times the value at other stages of ontogeny.

However, these changes are different in various types of chloroplasts. Thus, the lectin activity of small chloroplasts of Cyan (M-80, M-81, M-84 and Cyan) decreases rapidly at the stage of "tree", and in the later stages (budding and flowering) gradually increases, but does not reach the initial level stage stairs. In plants of K-7487 (M-28 and K-7487) lectin activity of small chloroplasts in the transition to the stage of "herring bone" is greatly reduced in the budding stage – increases, and the transition to flowering stage – returns to the level of "herring bone"

Evolution of lectin activity in large chloroplasts also primarily depends on the genotype and its most important are at an early stage of ontogeny – the stage stairs. Thus, lectin activity in samples of Cyan on stage "herring bone" does not change, and in the future (for budding and flowering stages) is significantly reduced. Exceptions are only large chloroplasts mutant line M-84, which has lectin activity on the stage of "tree" significantly reduced, compared to the stage stairs. In samples of K-7487 – during the transition to the stage of "tree" lectin activity of large chloroplasts significantly reduced, and in the later stages – does not change.

The distribution of activity between the two types of chloroplasts during development took place as follows: at the initial stage of ontogeny (step ladder) greater lectin activity with small chloroplasts, in the later stages – the stage of "herring bone" and budding – most lectin activity with large chloroplasts, and the various stages of bloom chloroplast types have approximately the same level of lectin activity. Moreover, this distribution lectin activity showed no dependence on the genotype: it is observed in chlorophyll mutants and in the original genotypes.

As can be seen from the data in step ladder much higher lectin activity characterized by small chloroplasts compared to large. On stage, the "tree" in all studied genotypes significantly higher lectin activity is characterized by the large fraction of chloroplasts. Vividly can be demonstrated genotypes of Cyan, where the contribution of small chloroplasts is less than 10% of the total lectin activity of tylakoyid membranes.

At the stage of budding lectin activity also dominated by large chloroplasts, but contribute to the overall small chloroplasts is much larger than ascending early stage "tree." Thus, the contribution of small chloroplasts in most studied genotypes increased to 30-40%, but still lectin activity of large chloroplasts stay at a higher level.

In the transition to the stage of flax plants flowering lectin activity of small chloroplasts in chlorophyll mutants in contrast to earlier stages of development mainly increased compared with baseline genotypes. This trend can be observed in all studied lines.

So, summing up, we can say that lectins are involved in photosynthesis of chlorophyll mutants linseed, especially chlorophyll mutants, which lack a chlorophyll in whole plant and its intensity does not decrease during ontogeny – the line M-28. The special role of lectins in photosynthesis should be given, in our opinion, the lectin in line M-28, due to the fact that the level of lectin activity in its chloroplasts (both types) increases greatly compared with the original K-7487 throughout ontogeny. In addition, the mutant line M-28 with a single research was granted the status of a variety ("Gold"), due to the fact that it has better productivity and oil content compared with the original model, and with a sort of standard in Ukraine – "Pivdenna nich."

In mutants of cyan in the early stages of ontogeny lectin activity significantly decreased in both types of chloroplasts, and the flowering stage, when these mutants almost disappears morphological manifestation

chlorophyll deficient significantly increases the activity of chloroplast small in comparison with the original model. We believe that because of that suppressed the early stages of plant development lines M-80, M-81 and M-84 still survive and knotted seeds, but have thus far lower productivity. At the same time, as we have previously found mesophyllous chlorophyll leaves of these mutants have altered plastid apparatus relative initial variety Cyan and respect each other and we believe that these plant genotypes more (especially before flowering) can exist and it is for photosynthetic the score of chloroplasts, and starting from the stage of flowering, in the process also involved lectins.

Thus, we have found that lectins are involved in photosynthesis chlorophyll mutants, but their contribution depends on the type chlorophyll deficient. He expressed most clearly in line M-28, where we believe it lectin causes not only the existence of the genotype, but also improve important traits such as productive oil content with baseline genotype and grade standards.

Key words: Linum humile Mill, chlorophyll deficient, lectin activity, chloroplast, lectin-pigment complex.

ВСТУП

Найважливішим процесом у житті рослини є фотосинтез, завдяки якому вона накопичує органічну масу з води та вуглекислого газу під дією сонячного світла. Здатність рослини до фотосинтезу та його інтенсивність, насамперед, залежить від пігментного складу: хлорофілів «а», «b», а також каротиноїдів. Вміст хлорофілів у листках становить зазвичай 0,6 – 1,2 % від їхньої сухої маси і залежить як від виду рослин, так і від умов їх вирощування (рівень освітлення, температура, забезпеченість елементами мінерального живлення) [1].

Вивчення процесів фотосинтезу та намагання керувати фотосинтетичною діяльністю зелених рослин триває понад два сторіччя, але і досі є одним з найважливіших питань сучасної фізіології рослин. Протягом багатьох років для проведення таких спеціальних досліджень використовують рослини мутантної природи з хлорофільною недостатністю [2]. Значні зміни в складі та співвідношенні пігментів у таких рослин призводять спочатку до фізіологічних, а згодом і до морфологічних змін, тому інтенсивність фотосинтезу в більшості хлорофільних мутантів значно нижча, ніж у зелених рослин [3, 4]. Однак на теперішній час виділені і мутанти з добре розвинутою структурою хлоропластів і високою продуктивністю, що дає підстави зробити висновок про можливий вплив на підвищення продуктивності рослин шляхом впливу на хлоропласти [5]

Різний ступінь стимулювання або інгібування окремих груп пігментів призводить до зміни співвідношення їх в рослині і, внаслідок цього, – до зміни кольору цієї рослини. Залежно від того, яка форма хлорофілу («а» чи «b») змінюється, посилюється синьо-зелене, жовте або зелене забарвлення. При значному чи повному інгібуванні зелених пігментів забарвлення тканини буде визначатися вмістом жовтих пігментів або антоціанів [1].

Значні зміни в складі та співвідношенні пігментів призводять спочатку до фізіологічних, а згодом і до морфологічних змін. Ці зміни пов'язані із забарвленням рослин і їх можна спостерігати на прикладі мутантів з хлорофільною недостатністю. Саме тому хлорофільні мутанти вищих рослин протягом багатьох років використовуються для вивчення процесів фотосинтезу. Цікавим об'єктом для проведення таких досліджень є мутанти льону, отримані в результаті експериментального мутагенезу: M-80, M-81, M-84 та M-28 [6, 7].

Відомо, що лектини беруть безпосередню участь у процесі фотосинтезу. Вони утворюють з пігментами пігмент-лектиновий комплекс, у якому пігменти уловлюють світлову енергію, а лектини, сприйнявши її, змінюють свою конформацію, що призводить до зміни вуглеводної специфічності. Змінені лектини здатні зв'язати розчинені в стромі тілакоїду ферменти циклу Кальвіна. Така гіпотеза була запропонована Алексидзе Г.Я. [8]. За нею лектини – єдина ланка між світловою та темною стадіями фотосинтезу.

Льон олійний (*Linum humile* Mill.) є виключно пластичною культурою. Його широко культивують у Європі, Азії, Північній і Південній Америці, Австралії і навіть в Північній Африці [9, 10]. І скрізь він відрізняється високим потенціалом продуктивності. Очевидно, це пов'язане з ефективною роботою фотосинтетичного апарату. Однак особливості його функціонування в цієї культури вивчені недостатньо.

При використанні індукованого мутагенезу в ряду генотипів льону олійного нами була виділена серія мутацій з різними типами мінус-хлорофільних змін [6, 7]. При цьому деякі з хлорофільних мутантів високопродуктивні і навіть стали сортами, наприклад, сорт Золотистий [11].

Мета цієї роботи – встановити динаміку лектинової активності хлоропластів листя льону олійного сортозразків Циан, Антарес та К-7487, а також їхніх мутантних ліній: М-80, М-84, М-81 та М-28 протягом онтогенезу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були 4 лінії з хлорофільною недостатністю (М-80, М-81, М-84 та М-28) та 2 вихідні генотипи – Циан та К-7487.

Мутантна лінія М-80 отримана при опроміненні насіння сорту Циан дозою 400 Гр. Сім'ядольне листя світло-жовте, у процесі розвитку рослина зеленіє, однак його забарвлення відрізняється від нормального зеленого. До стадії бутонізації верхня частина рослини має блідо-жовте забарвлення, а нижня – світло-зелене. На пізніших стадіях розвитку (цвітіння та стиглість) уся рослина має світло-зелене забарвлення. Рослини доживають до кінця вегетації, зберігаючи ознаки пригніченості. Насіннева продуктивність низька. Мутація віднесена до типу *viridis*.

Мутантна лінія М-81 отримана з сорту Циан при опроміненні дозою 400 Гр. Рослини цієї лінії мають характерне біле-жовте забарвлення. Протягом росту яскраво-жовта пігментація стає тьмяною та рослини доживають до кінця вегетації, зберігаючи ознаки сильної пригніченості. На стадії бутонізації верхня частина рослини має яскраве-жовте забарвлення листя, у середній частині листя стають більш тьмяними та зеленіють в області провідних пучків, а в нижній – мають світло-зелене забарвлення. Насіннева продуктивність рослин низька. Мутація віднесена до типу *xantha*.

Рослини мутантної лінії М-84 отримані при опроміненні дозою 700 Гр., насіння сорту Циан. Мають характерне брудно-жовте забарвлення листя. На стадії бутонізації верхня та нижня частини рослин мають світло-зелене забарвлення, а середня – хлорофільне. На пізніших стадіях розвитку (цвітіння та стиглість) уся рослина має світло-зелене забарвлення. Рослини доживають до кінця вегетації, зберігаючи ознаки пригніченості. Насіннева продуктивність низька. Мутація віднесена до типу *xanthoviridis*.

Мутантна лінія М-28 отримана при опроміненні насіння сортозразка К-7487 дозою 700 Гр. Рослини мають характерне жовто-світло-зелене забарвлення листя, майже рівномірне по всій рослині. Така хлорофільна недостатність зберігається майже не зміненою протягом усього онтогенезу. Цей мутантний зразок завдяки підвищеній продуктивності та олійності в порівнянні з контролем та сортом-стандартом, незважаючи на хлорофільну недостатність, у подальшому став сортом «Золотистий».

Рослини льону вирощувалися в польових умовах. Хлоропласти з листя виділяли шляхом фракційного центрифугування на різних стадіях розвитку. У хлорофільних мутантів 1 групи (М-80, М-81 та М-84) на ранніх стадіях розвитку («ялинка» та бутонізація) аналізувалося листя зі зміненим забарвленням: верхнє для ліній М-80 та М-81 та середнє для лінії М-84.

Лектини з тилакоїдних мембран екстрагували стандартними методами [12] з деякими модифікаціями. Активність лектинів визначали за допомогою реакції гемаглютинації з 2% суспензією еритроцитів кроля [13, 14] з урахуванням концентрації білка. Концентрацію білка визначали спектрофотометричним методом Варбурга-Крістіана [15]. При аналізі лектинову активність виражали як обернену величину – коефіцієнт лектинової активності та виражали у $(\text{мкг/мл})^{-1}$. Статистичну обробку проводили за стандартними методиками [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Обрані нами хлорофільні мутанти отримані з різних вихідних генотипів і складають такі групи: група Циану – мутантні лінії М-80, М-81 та М-84 та група К-7487 – мутантна лінія М-28.

Ці мутанти за рівномірністю хлорофільної недостатності можна розділити на 2 групи. До першої групи віднесено рослини, у яких хлорофільну недостатність має частина листя, а при переході до генеративних стадій онтогенезу рослини поступово зеленіють – це лінії М-80, М-81 та М-84. У другу групу відокремлено лінію М-28, хлорофільна недостатність якої рівномірно розподілена по всій рослині та змінене забарвлення зберігається протягом усього онтогенезу. Цікавою особливістю цих зразків є той факт, що мутантні лінії мають різний ступінь пригніченості рослин. Так, за цим показником досліджувані хлорофільні мутанти можна розташувати в ряд від найбільш до найменш пригнічених: М-81 – М-84 – М-80 – М-28.

У попередніх роботах нами було показано, що мезофіл листя льону олійного містить два типи клітин: із дрібними хлоропластами та з великими, які, ймовірно, виконують різні функції в процесі фотосинтезу [17, 18]. У дослідженнях Г.Я. Алексидзе [8], було показано, що і лектини мембран хлоропластів беруть участь у цьому процесі. У зв'язку з цим, нами було зроблене припущення, що лектини хлоропластів можуть оптимізувати роботу неповноцінного пігментного апарату хлорофільних мутантів.

Нами були проаналізовані зміни лектинової активності обох типів хлоропластів протягом онтогенезу в хлорофільних мутантах та вихідних сортах. У дослідження були включені послідовні стадії розвитку, протягом яких спостерігається зміна забарвлення рослин: стадія сходів, «ялинки», бутонізації та цвітіння (табл. 1).

Таблиця 1 – Динаміка лектинової активності в різних типах хлоропластів листя льону олійного протягом онтогенезу, (мкг/мл)⁻¹

Стадія онтогенезу	Тип хлоропластів	Генотип льону					
		Циан	М-80	М-81	М-84	К-7487	М-28
сходи	дрібні	2,21± 0,218	1,00± 0,024##	0,61± 0,036##	1,03± 0,036##	2,20± 0,086	2,68± 0,087**
	великі	1,43± 0,054	0,82± 0,059##	0,51± 0,039###	0,95± 0,076##	1,77± 0,084	2,22± 0,075*
«ялінка»	дрібні	0,14± 0,013	0,09± 0,005#	0,06± 0,002#	0,09± 0,002#	0,22± 0,018	0,39± 0,020**
	великі	1,39± 0,047	0,27± 0,043###	0,53± 0,170#	0,22± 0,006###	0,47± 0,026	0,52± 0,023**
бутонізація	дрібні	0,34± 0,011	0,23± 0,005##	0,12± 0,002###	0,26± 0,035#	0,28± 0,002	1,01± 0,041***
	великі	0,61± 0,039	0,34± 0,028##	0,42± 0,033#	0,37± 0,015##	0,43± 0,016	5,21± 0,034***
цвітіння	дрібні	0,21± 0,016	0,37± 0,029**	0,28± 0,022*	0,33± 0,013**	0,39± 0,018	0,49± 0,029*
	великі	0,52± 0,041	0,27± 0,009##	0,17± 0,010##	0,25± 0,013##	0,29± 0,011	0,55± 0,046**

Примітка: *, **, *** (#, ##, ###) – відмінності від вихідного генотипу суттєві при P < 0,05; 0,01; 0,001 відповідно; # – достовірне зниження; * – достовірне підвищення.

Із результатів таблиці видно, що в більшості випадків у хлорофільних мутантів групи Циану лектинова активність в обох типах хлоропластів достовірно зменшується в порівнянні з

вихідним сортом Циан. Виняток складають лише дрібні хлоропласти на стадії цвітіння, коли ці мутанти зеленіють, і хлорофільна недостатність майже зникає. У хлорофільного мутанта М-28, навпаки, лектинова активність протягом усього онтогенезу в обох типах хлоропластів достовірно збільшується (табл. 1).

Враховуючи отримані результати та той факт, що саме мутантна лінія М-28 виявилася більш продуктивною, ніж вихідний зразок, незважаючи на явну хлорофільну недостатність, ми вважаємо, що саме лектини тилакоїдних мембран цьому сприяють. Інші ж хлорофільні мутанти протягом онтогенезу є пригніченими та мають продуктивність значно нижчу за вихідний генотип.

У результаті аналізу було виявлено, що рівень лектинової активності тилакоїдних мембран протягом онтогенезу змінюється: найвищу лектинову активність мають хлоропласти на початковому етапі розвитку – стадії сходів, значення якої майже в 10 разів перевищує значення на інших етапах онтогенезу (рис. 1).

Однак ці зміни розрізняються в різних типах хлоропластів. Так, лектинова активність дрібних хлоропластів рослин групи Циану (М-80, М-81, М-84 та Циан) різко знижується на стадії «ялинки», а на пізніших стадіях (бутонізації та цвітіння) поступово підвищується, але не досягає вихідного рівня стадії сходів. У рослин групи К-7487 (М-28 та К-7487) лектинова активність дрібних хлоропластів при переході на стадію «ялинки» значно знижується, на стадію бутонізації – підвищується, а при переході на стадію цвітіння – повертається на рівень «ялинки» (рис. 1, а).

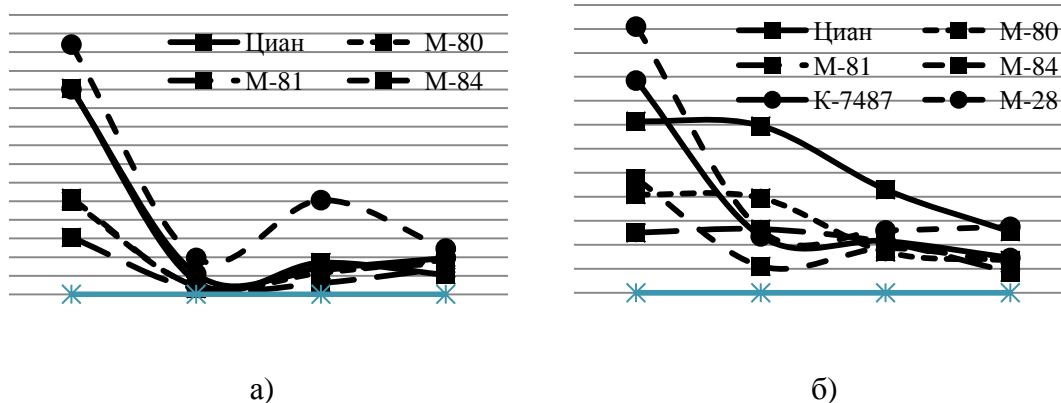


Рис.1 Динаміка лектинової активності різних типів хлоропластів хлорофільних мутантів льону олійного та їх вихідних генотипів протягом онтогенезу: а) дрібні хлоропласти; б) великі хлоропласти

Динаміка змін лектинової активності у великих хлоропластів також в перш чергу залежить від генотипу і найбільше своє значення мають на початковому етапі онтогенезу – стадії сходів. Так, лектинова активність у зразків групи Циану на стадії «ялинки» майже не змінюється, а у подальшому (на стадіях бутонізації та цвітіння) суттєво знижується. Виняток складають лише великі хлоропласти мутантної лінії М-84, у якої лектинова активність на стадії «ялинки» суттєво знижується порівняно зі стадією сходів. У зразків групи К-7487 – при переході на стадію «ялинки» лектинова активність великих хлоропластів суттєво знижується, а на пізніших стадіях – майже не змінюється (рис 1, б).

Розподіл активності між двома типами хлоропластів протягом розвитку відбувався так (рис. 2): на початковому етапі онтогенезу (стадія сходів) більшу лектинову активність мають дрібні хлоропласти, на пізніших стадіях – стадії «ялинки» та бутонізації – більшу лектинову активність мають великі хлоропласти, а на стадії цвітіння різні типи хлоропластів мають приблизно однаковий рівень лектинової активності. Причому такий розподіл лектинової активності не виявив залежності від генотипу: він спостерігається і в хлорофільних мутантах, і у вихідних генотипах.

Як видно з представлених даних (рис. 2, а), на стадії сходів значно вищою лектиною активністю характеризуються дрібні хлоропласти в порівнянні з великими. На стадії ж «ялинки» у всіх досліджених генотипів значно вищою лектиною активністю характеризується фракція великих хлоропластів. Особливо яскраво це можна продемонструвати на прикладі генотипів групи Циану (рис. 2 б), де вклад дрібних хлоропластів складає менше 10 % від загальної лектинової активності тилакоїдних мембран.

На стадії бутонізації також переважає лектинова активність у великих хлоропластах, але внесок в загальний рівень дрібних хлоропластів є значно суттєвішим у порівнянні з більш ранньою стадією «ялинки». Так, внесок дрібних хлоропластів у більшості досліджуваних генотипів підвищується до 30-40 % (рис. 2 в), однак лектинова активність великих хлоропластів залишається на більш високому рівні.

При переході рослин льону до стадії цвітіння лектинова активність дрібних хлоропластів у хлорофільних мутантів на відміну від більш ранніх стадій розвитку переважно збільшується (рис. 2 г) у порівнянні з вихідними генотипами. Таку тенденцію ми можемо спостерігати у всіх досліджуваних ліній.

Підсумовуючи отримані дані, можна сказати, що лектини беруть участь у процесі фотосинтезу хлорофільних мутантів льону олійного, особливо це стосується хлорофільних мутантів, у яких хлорофільну недостатність має уся рослина та її інтенсивність не зменшується протягом онтогенезу – лінія М-28. Особливу роль лектинам у процесі фотосинтезу слід відвести, на нашу думку, лектинам у лінії М-28, у зв'язку з тим, що рівень лектинової активності в його хлоропластах (обох типах) збільшується значною мірою у порівнянні з вихідним К-7487 протягом усього онтогенезу. Крім того, мутантній лінії М-28, єдиній з досліджених, був наданий статус сорту («Золотистий»), у зв'язку з тим, що вона має вищу продуктивність та олійність у порівнянні з вихідним зразком, а також з сортом стандартом на території України – Південна ніч.

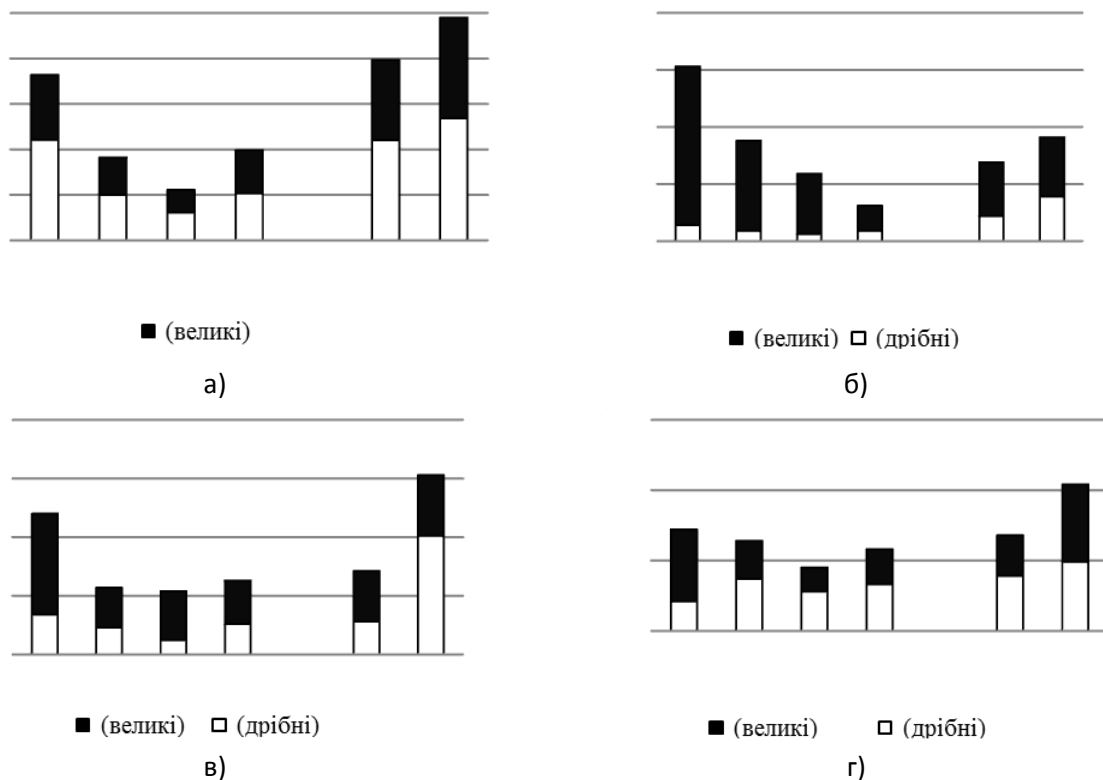


Рис. 2 Лектинова активність різних типів хлоропластів в мезофілі хлорофільних мутантів льону олійного та їх вихідних генотипів протягом онтогенезу: а) на стадія сходів; б) на стадії «ялинки»; в) на стадії бутонізації; г) на стадії цвітіння.

У мутантів групи Циану на початкових стадіях онтогенезу лектинова активність значно знижувалася у обох типах хлоропластів, а на стадії цвітінні, коли в цих мутантах майже зникає морфологічний прояв хлорофільної недостатності, значно збільшується активність дрібних хлоропластів у порівнянні з вихідним зразком. Ми вважаємо, що саме завдяки цьому пригнічені на початкових етапах розвитку рослини ліній М-80, М-81 та М-84 все ж таки виживають та зав'язують насіння, але мають при цьому значно нижчу продуктивність. Як нами було раніше встановлено [17], мезофіл хлорофільного листя цих мутантів має змінений пластидний апарат відносно вихідного сорту Циан, а також відносно один одного і ми вважаємо, що рослини цих генотипів більшою мірою (особливо до цвітіння) здатні існувати та фотосинтезувати саме за рахунок змінених хлоропластів, а починаючи зі стадії цвітіння, у цьому процесі беруть участь також і лектини.

Отже, нами було встановлено, що лектини беруть безпосередню участь у процесі фотосинтезу хлорофільних мутантів, однак їхній вклад залежить від типу хлорофільної недостатності. Найяскравіше він виражений у лінії М-28, де, на нашу думку, саме лектин зумовлює не тільки існування цього генотипу, а й підвищення таких важливих ознак, як продуктивність та олійність порівняно з вихідним генотипом, а також сортом-стандартом.

Надалі планується дослідити рівень лектинової активності в інших хлорофільних мутантах, а також дослідити динаміку лектинової активності не тільки в хлорофіл-дефіцитних частинах мутантних рослин льону, а й у зеленій частині цих рослин. Крім того, планується дослідити динаміку активності головного ферменту циклу Кальвіна – рибулозобифосфаткарбоксілази у листі мутантних рослин у порівнянні з зеленими рослинами льону.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що активність лектинів хлоропластів хлорофільних мутантів змінюється в порівнянні з контролем, а рівень цих змін залежить від типу хлорофільної недостатності.
2. Встановлено, що в мутантного зразка з рівномірним проявом хлорофільної недостатності (М-28) рівень лектинової активності обох типів хлоропластів є вищим у порівнянні з контролем протягом усього онтогенезу.
3. Виявлено, що в хлорофільних мутантах з частковим проявом хлорофільної недостатності (М-80, М-81 та М-84) на початкових етапах онтогенезу лектинова активність значно нижча за контрольний варіант, а на стадії цвітіння – достовірно збільшується в дрібних хлоропластах, а у великих достовірно від контролю не відрізняється.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алехина Н.Д. Физиология растений / Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. – М. : «Академия», 2005. – 640 с.
2. Гостимский С.А. Цитогенетический анализ хлорофильных мутантов гороха / С.А. Гостимский // Теория химического мутагенеза. – М. : Наука, 1971. – С. 64-69.
3. Гостимский С.А. Характеристика фотосинтетического аппарата жизнеспособных хлорофильных мутантов гороха / С.А. Гостимский, Т.Е. Кренделева, Г.П. Кухарский, Н.В. Низовская, Г.А. Храмова // Физиология растений. – 1991. – Т. 38, № 1. – С. 31-37.
4. Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация хлоропластов у мутанта *xantha-702* хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. / В.Г. Ладыгин, Г.А. Семёнова, И.Д. Шегай // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 7. – С. 537-553.
5. Ладыгин В.Г. Фотосинтез и продукционный процесс / Ладыгин В.Г., Тагеева С.В., Семенова Г.А. – М., 1988. – С.252-257.
6. Лях В.А. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L.: [каталог] / Лях В.А., Мищенко Л.Ю., Полякова И.А. – Запорожье, 2003. – 60 с.

7. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур: / Лях В.А., Полякова И.А., Сорока А.И. – Запорожье : ЗНУ, 2009. – 266 с.
8. Алексидзе Г.Я. Модель организации на мембране тилакоидов комплекса ферментов цикла Кальвина с участием лектина фотосистемы I / Г.Я. Алексидзе, А.И. Литвинов, Э.И. Выскребенцева // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 1. – С. 155-159.
9. Кутузова С.Н. Генетика льна / С.Н. Кутузова // Генетика культурных растений. – 1998. – С. 6-52.
10. Лях В.А. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологические пути работы с ними / В.А. Лях, А.И. Сорока. – Запорожье : ЗНУ, 2008. – 182 с. – (монография)
11. Лях В.О. А.с. 05131, Украина. Сорт льону олійного Золотистий / В.О. Лях, Л.Ю. Міщенко, І.О. Полякова. – № 03094002. Занесений до реєстру сортів України в 2005 р.
12. Комарова Э.М. Активность лектиноподобных белков клеточных стенок и внешних мембран органелл и их связь с эндогенными лигандами в проростках озимой пшеницы при холодной адаптации / Э.М. Комарова, Э.И. Выскребенцева, Т.И. Трунова // Физиология растений. – 2003. – Т.50, № 4. – С. 511-516.
13. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / Володимир Олександрович Антонюк. – Львів, 2005. – 554 с.
14. Луцик М.Д. Лектины / Луцик М.Д., Панасюк В.М., Луцик А.Д. – Львов : Вища школа, 1981. – 156 с.
15. Handbook of biochemistry / [Dosen R., Eliot D., Eliot U., Jons K.]. – М., 1991. – 464 p.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия / Лакин Г.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.
17. Полякова И.А. Сравнительная морфология хлорофилльных мутантов льна масличного и их пластидного аппарата / И.А. Полякова, А.Н. Левчук, В.В. Яранцева, В.А. Лях // Актуальні питання біології, екології та хімії: електронне наукове видання [Електронний ресурс] / Запорізький національний університет. – 2011. – Т. 3, № 1 – С.66-74.
18. Левчук А.Н. Особенности морфологии пластидного аппарата хлорофилльных мутантов льна масличного / А.Н. Левчук, И.А. Полякова, Е.Н. Войтович, В.А. Лях // Физиология и биохимия культурных растений – 2012. – Т.44, № 3. – С. 232-239.

REFERENCE

1. Alehina N.D. Fiziologija rastenij / N.D. Alehina, Ju.V. Balnokin, V.F. Gavrilenko i dr. [pod red. Ermakova I.P.] – М.: Izdatel'skij centr «Akademija», 2005. – 640 s.
2. Gostimskij S.A. Citogeneticheskij analiz hlorofil'nyh mutantov goroha / S.A. Gostimskij // Teorija himicheskogo mutageneza. – М.: Nauka, 1971. – S.64-69.
3. Gostimskij S.A. Harakteristika fotosinteticheskogo apparata zhiznesposobnyh hlorofil'nyh mutantov goroha / S.A. Gostimskij, T.E. Krendeleva, G.P. Kuharskij, N.V. Nizovskaja, G.A. Hramova // Fiziologija rastenij. – 1991. – t. 38 (1). – S. 31-37.
4. Ladygin V.G. Strukturno-funcional'naja organizacija hloroplastov u mutanta xantha-702 hlochatnika *Gossypium hirsutum* L. / V.G. Ladygin, G. A. Semjonova, I.D. Shegaj // Citologija. – 2006. – Т. 48, № 7. – S. 537-553.
5. Ladygin V.G. Fotosintez i produkcijnyj process / V.G. Ladygin, S.V. Tageeva, G.A. Semenova. – М., 1988. – S.252-257.
6. Ljah V.A. Geneticheskaja kollekcija vida *Linum usitatissimum* L. / V.A. Ljah, L.Ju. Mishhenko, I.A. Poljakova (katalog). – Zaporozh'e, 2003. – 60 s.

7. Ljah V.A. Inducirovannyj mutagenез maslichnyh kul'tur / V.A. Ljah, I.A. Poljakova, A.I. Soroka. – Zaporozh'e: ZNU, 2009. – 266 s.
8. Aleksidze G.Ja., Litvinov A.I., Vyskrebenceva Je.I. Model' organizacii na membrane tilakoidov kompleksa fermentov cikla Kal'vina s uchastiem lektina fotosistemy I / G.Ja. Aleksidze, A.I. Litvinov, Je.I. Vyskrebenceva // Fiziologija rastenij – 2002. – T. 49, № 1. – S. 155-159.
9. Kutuzova S.N. Genetika l'na / S.N. Kutuzova // Genetika kul'turnyh rastenij. – Sankt-Peterburg, 1998. – S. 6-52.
10. Ljah V.A. Botanicheskie i citogeneticheskie osobennosti vidov roda *Linum* i bioteknologicheskie puti raboty s nimi (monografija) / V.A. Ljah, A.I. Soroka. – Zaporozh'e: ZNU, 2008. – 182 s.
11. Ljah V.O. A.s. 05131, Ukraina. Sort l'onu olijnogo Zolotistij / V.O. Ljah, L.Ju. Mishhenko, I.O. Poljakova. – № 03094002. Zanesenij do reestru sortiv Ukraïni v 2005 r.
12. Komarova Je.M. Aktivnost' lektinopodobnyh belkov kletocnyh stenok i vneshnih membran organell i ih svjaz' s jendogennymi ligandami v prorostkah ozimoj pshenicy pri holodovoj adaptacii / Je.M. Komarova, Je.I. Vyskrebenceva, T.I. Trunova // Fiziologija rastenij. 2003. T.50, № 4. S. 511 – 516.
13. Antonjuk V.O. Lektini ta ih sirovinni dzherela / V.O. Antonjuk. – L'viv. – 2005. – 554 s.
14. Lucik M.D. Lektiny / M.D. Lucik, V.M. Panasjuk. A.D. Lucik. – L'vov: Vishha shkola, 1981. – 156 s.
15. Doson R. Handbook of biochemistry / R. Doson, D. Eliot, U. Eliot, K. Jons. – M., 1991. – 464 p.
16. Lakin G.F. Biometrija / G.F. Lakin – M.: Vysshaja shkola, 1990. – 351 s.
17. Poljakova I.A. Sravnitel'naja morfologija hlorofill'nyh mutantov l'na maslichnogo i ih plastidnogo apparat / I.A. Poljakova, A.N. Levchuk, V.V. Jaranceva, V.A. Ljah // Aktual'ni pitannja biologii, ekologii ta himii: elektronne naukovе vidannja [elektronnij resurs] / Zaporiz'kij nacional'nij universitet. – 2011. – T. 3, № 1 – S.66-74.
18. Levchuk A.N. Osobennosti morfologii plastidnogo apparata hlorofill'nyh mutantov l'na maslichnogo / A.N. Levchuk, I.A. Poljakova, E.N. Vojtovich, V.A. Ljah // Fiziologija i biohimija kul'turnyh rastenij – 2012. – T.44, № 3. – S. 232-239.

УДК 633.854.54: 631.524.7

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ ЦВЕТКА МЕЖВИДОВЫМИ ГИБРИДАМИ F₁ ЛЬНА

Поляков В.А.,¹ Лях В.А.

*Институт масличных культур НААН
70417, Украина, Запорожский район, Запорожская область,
пос. Солнечный, ул. Институтская, 1
¹Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

eradan_90@mail.ru

В статье представлены результаты изучения наследования признаков цветка межвидовыми гибридами льна, полученными от скрещивания белоцветкового сорта Золотистый с однолетними дикими видами с n=15 *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum* и *L. crepitans*. Установлено, что голубая окраска венчика доминирует над белой у гибрида с участием *L. angustifolium*, и является более насыщенной при вовлечении в скрещивания *L. bienne*, *L. hispanicum* и *L. crepitans*. У всех межвидовых гибридов доминировали голубая окраска пыльников, наличие окраски у жилок основания лепестка венчика и открытая форма венчика. У гибрида с участием *L. hispanicum* полная степень раскрытия цветка доминирует над полусвернутой, тогда как у гибрида F₁ комбинации скрещивания Золотистый x *L. crepitans* полусвернутость цветка доминирует над его открытостью. Во всех комбинациях скрещивания цветков гибридных растений по диаметру был существенно меньше культурного родителя и ближе к дикой родительской форме.

Ключевые слова: *L. humile*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum*, *L. crepitans*, межвидовые гибриды,

наследование, окраска цветка, форма цветка, диаметр цветка

УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК КВІТКИ МІЖВИДОВИМИ ГІБРИДАМИ F₁ ЛЬОНУ

Поляков В.О., ¹Лях В.О.

Институт олійних культур

70417, Україна, Запорізький район, Запорізька область, сел. Сонячне, вул. Інститутська, 1

¹Запорізький національний університет

69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

eradan_90@mail.ru

У статті представлені результати вивчення успадкування ознак квітки міжвидовими гібридами льону, отриманими від схрещування білоквіткового сорту Золотистий з однорічними дикими видами з $n = 15$ *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum* і *L. crepitans*. Встановлено, що блакитне забарвлення віночка домінує над білим у гібрида за участю *L. angustifolium*, і є більш насиченим при залученні в схрещування *L. bienne*, *L. hispanicum* і *L. crepitans*. У всіх міжвидових гібридів домінували блакитне забарвлення пиляків, наявність забарвлення у жилок основи пелюстки віночка і відкрита форма віночка. У гібрида за участю *L. hispanicum* повний ступінь розкриття квітки домінує над напівзгорнутою, тоді як у гібрида F₁ комбінації схрещування Золотистий x *L. crepitans* напівзгорнутість квітки домінує над її відкритістю. У всіх комбінаціях схрещування квітка гібридних рослин за діаметром була істотно меншою за культурну форму і ближче до дикої батьківської форми.

Ключові слова: *L. humile*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum*, *L. crepitans*, міжвидові гібриди, успадкування, забарвлення квітки, форма квітки, діаметр квітки.

INHERITANCE OF FLOWER TRAITS BY INTERSPECIFIC F₁ FLAX HYBRIDS

Polyakov V.A., ¹Lyakh V.A.

Institute of Oilseed Crop

70417, Ukraine, Zaporizhzhya distr., Zaporizhzhya reg, vil. Sonyachne, Instytutska Street 1,

¹Zaporizhzhya National University

69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Street 66

eradan_90@mail.ru

Intraspecific hybridization for a long time remained the main method of creating original material for flax breeding. However reserves of intraspecific recombinant variability have been gradually exhausting. According to Zhuchenko, there are six types of genetic resources, the key of which is wild relatives of cultured crops. Adding them to hybridization is one of the ways to increase genetic diversity.

According to many researchers, fundamentally new genotypes can be gained with interspecific hybridization through introgression of the novel gene complexes. It is important to note that as a result of interspecific crosses a wide range of variability could be formed, that can be distilled into new species, or donors of economically viable traits. This may increase the adaptive potential of cultivated flax, and its ability to survive and reproduce. However, the number of papers on the subject of interspecific hybridization of flax is extremely small.

A. Jhala et al in a review article noted the success of the interspecific hybridization of flax by a number of researchers. In particular, nine combinations were described, giving fertile offspring in $n = 15$ species. E. g., crosses between *L. angustifolium*, *L. corymbiferum*, *L. africanum*, *L. decumbens* and *L. usitatissimum* have been successful, at least in one direction with seed germination of F₁ hybrid plants at 80-90% level. Also successful crosses were observed between $n = 9$ flax species, such as *L. alpinum*, *L. altaicum*, *L. austriacum*, *L. julicum*, *L. narbonense* and *L. perenne*. A. Seetharam previously described successful crosses for cultivated flax *Linum usitatissimum* with a number of wild species.

We have started an in-depth study of the four annual $n = 15$ wild species among the closest relatives of cultivated flax, which, according to Yuzepchuk, belong to same section *Protolinum* [4]. The aim of this work was to study the inheritance of a series of qualitative and quantitative traits of the flower in the first generation of interspecific hybrids.

We used accessions of $n = 15$ wild annual species of flax *Linum angustifolium* Huds, *L. bienne* Mill., *L. hispanicum* Mill. and *L. crepitans* Dum. as well as *L. humile* Mill. (Zolotystyi variety) from the collection of the Laboratory for flax breeding at the Institute of Oilseed Crops NAAS.

Following traits were studied: petal coloration, petal veins and anther coloration; flower opening, shape and diameter.

Calculations of the degree of dominance of the 'flower diameter' trait in the first hybrid generation were carried out according to the formula by G.M Beil i R.E. Atkins.

Only flower has a fairly wide range of variation in color and shape that allows using these traits as markers. Creating varieties possessing clear marker traits greatly helps to get rid of unwanted impurities.

As pointed out by many authors, the vast majority of commercial varieties of flax have blue flower petals that complicates breeding process, as well as it reduces the efficiency of seed farming. Therefore, we gave priority to studying of color characteristics of the petals and other parts of the flower.

According to our results, the most saturated coloration of corolla goes to species *L. crepitans* and *L. angustifolium* (blue), while the *L. bienne* corolla is slightly lighter (light blue), and *L. hispanicum* has the lightest (pale blue) color. When wild annual species were crossed with white flower cultivated flax we found that the majority of hybrids had had color intensification in corolla. In combination Zolotystyi x *L. angustifolium* blue color of corolla dominated over white color of the parent form. Hybrid combinations Zolotystyi x *L. bienne*, Zolotystyi x *L. hispanicum* and Zolotystyi x *L. crepitans* have corolla coloration that is more intense than the parent forms.

Blue color of anthers and the presence of coloration in the petal veins were dominant traits. Despite the absence of colored veins in Zolotystyi var., all F₁ hybrids possessed coloration in veins at the base of the petal. Previously, other researchers found that cream coloration of anthers was inherited as a monogenic recessive trait. This was consistent with our findings. In all F₁ hybrids anthers had blue coloration.

Another trait that we studied, was 'the degree of opening of the flower'. In accordance with the VIR classifier, this trait has three manifestations: open, partially folded and folded. Among the studied wild species *L. angustifolium* and *L. bienne*, as well as the cultured form, were assigned to the open type, and species *L. hispanicum* and *L. crepitans* to partially folded.

Only in *L. hispanicum* the shape of the flower was described as a bell-shaped, in contrast to the remaining open-flower wild species and Zolotystyi variety. In Zolotystyi x *L. hispanicum* hybrid open shape of the flower completely dominated the bell-shaped.

Studying the size of the flower, it was found that among all the studied annual wild flower largest diameter belongs to *L. crepitans* (17,2 mm), followed by *L. angustifolium* (15,8 mm) and *L. bienne* (14,2 mm), and the smallest flower to *L. hispanicum* (12,0 mm). Flower diameter of cultured parent Zolotystyi variety was 21,0 mm, which is significantly larger than the wild flowers.

Analysis of inheritance of this trait suggests that the F₁ generation of interspecific hybrids showed negative or intermediate dominance or complete negative dominance (degree of dominance ranged from -0,16 to -1). In all combinations diameter of the flower was significantly smaller than Zolotystyi parent form and closer to the wild parent. And in combination with *L. crepitans* flower size was almost equal to that of the wild species.

During the field studies, we have observed that petals of wild annual species fall off earlier than those of cultural genotypes and interspecific hybrids. Of all the studied wild species flowers of *L. hispanicum* and its hybrids crumbled before the others. Also it was noted that in cloudy weather wild species flowers bloom faster and give more pollen compared to the cultivated flax.

We established that blue color of the corolla dominates over white color for the F₁ hybrid Zolotystyi x *L. angustifolium* and coloration is richer in F₁ hybrids for combinations Zolotystyi x *L. bienne*, Zolotystyi x *L. hispanicum* and Zolotystyi x *L. crepitans*. In all of the obtained interspecific hybrids blue color of anthers, presence of coloration in the petal veins and open form of corolla were dominant traits. Study revealed that in interspecific F₁ hybrid with *L. hispanicum* full degree of flower opening dominates over being partially folded, whereas in the F₁ hybrid Zolotystyi x *L. crepitans* partial foldedness of the flower dominates over its openness. When studying inheritance of flower size we found that hybrid plants of all cross combinations had flower diameter that was significantly smaller than cultured flax and closer to the wild parent form. In F₁ combinations Zolotystyi x *L. bienne*, Zolotystyi x *L. hispanicum* and Zolotystyi x *L. angustifolium* we observed negative intermediate dominance. F₁ hybrid Zolotystyi x *L. crepitans* the size of the wild species flower was completely dominant.

Key words: *L. humile*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum*, *L. crepitans*, interspecific hybrids, inheritance, flower coloration, flower shape, flower diameter.

ВВЕДЕНИЕ

Внутривидовая гибридизация на протяжении долгого времени оставалась главным методом создания исходного материала в селекции льна и благодаря ей создано большое количество сортов. Однако резервы внутривидовой рекомбинантной изменчивости постепенно исчерпываются. По мнению А.А. Жученко, существует шесть разновидностей генетических ресурсов, ключевой из которых являются дикие родичи сельскохозяйственных культур [1]. Одним из путей расширения генетического разнообразия может стать их привлечение в гибридизацию.

По мнению многих исследователей, именно при межвидовой гибридизации благодаря интрогрессии новых комплексов генов можно получить принципиально новые генотипы. Важно отметить, что в результате межвидовых скрещиваний образуется более широкий спектр изменчивости, среди которой можно выделить новые видовые формы, а также

доноры хозяйственно-ценных признаков. Это может повысить адаптивный потенциал культурного льна, то есть его способность к выживанию и воспроизведению [1]. Однако работ по проведению межвидовой гибридизации льна крайне мало.

А. Jhala с соавторами в обзорной статье отмечали успешное проведение межвидовой гибридизации льна рядом исследователей [2]. В частности, были описаны девять комбинаций скрещивания, дающих плодовитое потомство среди видов с $n=15$. Так, скрещивания между видами *L. africanum*, *L. angustifolium*, *L. corymbiferum*, *L. decumbens* и *L. usitatissimum* были успешными, как минимум, в одном направлении со всхожестью семян гибридных растений F_1 на уровне 80-90%. Также успешные скрещивания отмечались в группе видов льна с $n=9$. Среди них были задействованы *L. alpinum*, *L. altaicum*, *L. austriacum*, *L. julicum*, *L. narbonense* и *L. perenne*. Ранее А. Seetharam описывал успешные скрещивания культурного льна *Linum usitatissimum* с рядом диких видов [3].

Нами начато углубленное изучение четырех однолетних диких видов с $n=15$ из числа ближайших родственников культурного льна, которые, согласно известному систематике С. Юзепчуку, относятся к одной секции *Protolinum* [4]. Целью данной работы было изучение наследования ряда качественных и количественных признаков цветка у полученных в процессе исследований межвидовых гибридов первого поколения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала использовали образцы диких однолетних видов льна *Linum angustifolium* Huds, *L. bienne* Mill., *L. hispanicum* Mill. и *L. crepitans* Dum. ($n=15$), а также линейный материал *L. humile* Mill. (сорт Золотистый) из коллекции лаборатории селекции льна Института масличных культур НААН.

Гибридные растения были получены при использовании методики ручной кастрации в фазу окрашенного конуса бутона с последующим опылением свежесобранной пылью в тот же день. Растения F_1 выращивали в открытом грунте в полевых условиях.

Изучение образцов проводили по признакам цветка: окраска лепестков, жилки лепестков и пыльников; степень раскрытия, форма и диаметр цветка.

Расчет степени доминирования признака «диаметр цветка» в первом поколении гибридов проводили по формуле G. M. Veil и R. E. Atkins:

$$h_p = \frac{F_1 - MP}{P - MP},$$

где F_1 – среднее арифметическое признака для гибридов первого поколения,

MP – среднее арифметическое признаков обоих родительских форм,

P – среднее арифметическое родительской формы с большим уровнем признака.

Полученные данные интерпретировали следующим образом: $0 < h_p < |1|$ – промежуточное доминирование (полудоминирование), $h_p > |1|$ – сверхдоминирование признака, $h_p = |1|$ – полное доминирование, то есть проявление признака у потомства соответствует уровню признака одной из родительских форм [5].

Математическую обработку проводили по общепринятым методикам статистической обработки экспериментальных данных [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По большинству морфологических признаков культурные генотипы льна мало различаются. И только цветок имеет достаточно широкий диапазон изменчивости по окраске и форме, что

позволяет использовать данные признаки как маркерные [7]. Создание сортов, обладающих четкими маркерными признаками, значительно облегчает ведение семеноводства, так как позволяет в значительной степени избавляться от нежелательных примесей [8].

Как указывают многие авторы [9,10,11], подавляющее большинство коммерческих сортов льна имеет голубые лепестки цветка, что осложняет отдельные этапы селекционного процесса, в частности, при гибридизации и отборе ценных рекомбинантных форм, а также снижает эффективность семеноводства. Поэтому изучению признаков окраски лепестков и других элементов цветка нами уделено первоочередное внимание (табл.1).

Таблица 1 – Проявление качественных признаков цветка у межвидовых гибридов льна и их родительских форм

Генотип	Окраска			Степень раскрытия цветка	Форма цветка
	лепестков	жилок лепестков	пыльников		
Золотистый	Белая	–	Кремовая	Открытая	Открытая
<i>L. angustifolium</i>	Голубая	+*	Голубая	Открытая	Открытая
F ₁ Золотистый x <i>L. angustifolium</i>	Голубая	+	Голубая	Открытая	Открытая
<i>L. hispanicum</i>	Бледно-голубая	+	Голубая	Полусвернутая	Колокольчатая
F ₁ Золотистый x <i>L. hispanicum</i>	Голубая	+	Голубая	Открытая	Открытая
<i>L. bienne</i>	Светло-голубая	+	Голубая	Открытая	Открытая
F ₁ Золотистый x <i>L. bienne</i>	Голубая	+	Голубая	Открытая	Открытая
<i>L. crepitans</i>	Голубая	+	Голубая	Полусвернутая	Открытая
F ₁ Золотистый x <i>L. crepitans</i>	Синяя	+	Голубая	Полусвернутая	Открытая

Примечания: *+ – наличие окраски

Согласно нашим результатам, наиболее насыщенную окраску венчика имеют цветки видов *L. crepitans* и *L. angustifolium*, тогда как лепестки венчика *L. bienne* немного светлее (светло-голубые), а *L. hispanicum* имеет самую светлую (бледно-голубую) окраску. При скрещивании диких однолетних видов с белоцветковой линией культурного льна установлено, что у большинства гибридов наблюдается усиление окраски венчика. В комбинации Золотистый x *L. angustifolium* голубая окраска венчика льна доминирует над белой окраской культурной родительской формы. У гибридов комбинаций скрещивания Золотистый x *L. bienne*, Золотистый x *L. hispanicum* и Золотистый x *L. crepitans* окраска венчика является более насыщенной, чем окраска родительских форм.

Голубой цвет пыльников и наличие окраски у жилок лепестков оказались доминантными признаками. Как видно из таблицы 1, несмотря на отсутствие окрашенных жилок у сорта Золотистый, у всех гибридов F₁ отмечено наличие окраски жилок основания лепестка венчика. Ранее другими исследователями было установлено, что кремовая окраска пыльников наследуется моногенно и рецессивно [9, 12]. Это согласуется с нашими исследованиями. Во всех полученных нами гибридах F₁ пыльники имели голубую окраску.

Еще одним признаком, по которому проводилось изучение, была «степень раскрытия цветка». В соответствии с классификатором ВИР, этот признак имеет три проявления: открытая, полусвернутая и свернутая [13]. Среди исследованных нами диких видов *L. angustifolium* и *L. Bienne*, как и культурный вид, были отнесены к открытому типу, а виды *L. hispanicum* и *L. crepitans* к полусвернутому. Вместе с тем, два последних вида в этом плане

не однотипны. По нашим наблюдениям, *L. hispanicum* имеет более раскрытый цветок нежели *L. crepitans*. У межвидового гибрида F₁ с участием *L. hispanicum* доминировал признак культурного вида, тогда как в F₁ Золотистый x *L. crepitans* отмечена полусвернутая степень раскрытия цветка, присущая дикому виду.

Что касается формы цветка, то лишь у *L. hispanicum* она была охарактеризована как колокольчатая в отличие от открытой у остальных диких видов и сорта Золотистый. У гибрида Золотистый x *L. hispanicum* открытая форма цветка полностью доминировала над колокольчатой.

Таблица 2 – Степень доминирования признака «диаметр цветка» у межвидовых гибридов льна

Генотип	Диаметр, мм	Степень доминирования
Золотистый	21,0 ± 0,36	
<i>L. angustifolium</i>	15,8 ± 0,44***	
F ₁ Золотистый x <i>L. angustifolium</i>	17,1 ± 0,57***	-0,18
<i>L. hispanicum</i>	12,0 ± 0,20***	
F ₁ Золотистый x <i>L. hispanicum</i>	15,5 ± 0,37*** ###	-0,5
<i>L. bienne</i>	14,3 ± 0,40***	
F ₁ Золотистый x <i>L. bienne</i>	17,1 ± 0,59*** ##	-0,16
<i>L. crepitans</i>	17,2 ± 0,48***	
F ₁ Золотистый x <i>L. crepitans</i>	17,2 ± 0,75**	-1

Примечание: **, *** – отличия от сорта Золотистый существенны при P < 0,01 и 0,001 соответственно; ##, ### – отличия от дикого родителя существенны при P < 0,01 и 0,001 соответственно

При изучении размера цветка было установлено, что среди всех исследуемых однолетних диких видов наибольшим диаметром цветка отличается *L. crepitans* (17,2 мм), за ним следуют *L. angustifolium* (15,8 мм) и *L. bienne* (14,2 мм), а самый мелкий цветок – у *L. hispanicum* (12,0 мм). Диаметр цветка культурного родителя сорта Золотистый составлял 21,0 мм, что существенно больше размера цветков диких видов.

Анализ наследования данного признака свидетельствует, что в поколении F₁ межвидовых гибридов наблюдается либо отрицательное промежуточное доминирование либо отрицательное полное доминирование (степень доминирования составляла от -0,16 до -1). Во всех комбинациях цветок по диаметру был существенно меньше культурного родителя и ближе к дикой родительской форме. А в комбинации с *L. crepitans* размер цветка был практически равен дикому виду.

При проведении полевых исследований нами было замечено, что у диких однолетних видов лепестки опадают раньше, чем у культурного генотипа и межвидовых гибридов. Из всех изучаемых диких видов, цветки *L. hispanicum* и его гибрида осыпались раньше остальных. Отмечено также, что в пасмурную погоду цветки диких видов быстрее распускаются и пылят в сравнении с культурным образцом.

В дальнейшем нами планируется изучение гибридного поколения F₂ с целью выделения новых и нужных маркерных признаков для селекционного процесса и ведения семеноводства.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что голубая окраска венчика льна доминирует над белой у гибрида F₁ Золотистый x *L. angustifolium* и является более насыщенной у гибридов F₁ комбинаций скрещивания Золотистый x *L. bienne*, Золотистый x *L. hispanicum* и Золотистый x *L. crepitans*.

2. У всех полученных межвидовых гибридов доминировали голубая окраска пыльников, наличие окраски у жилок в основании лепестка венчика и открытая форма венчика.
3. Выявлено, что у межвидового гибрида F₁ с участием *L. hispanicum* полная степень раскрытия цветка доминирует над полусвернутой, тогда как у гибрида F₁ комбинации скрещивания Золотистый х *L. crepitans* полусвернутость цветка доминирует над его открытостью.
4. При изучении наследования размера цветка установлено, что во всех комбинациях скрещивания цветков гибридных растений по диаметру был существенно меньше культурного родителя и ближе к дикой родительской форме. В растениях F₁ генотипов Золотистый х *L. bienne*, Золотистый х *L. hispanicum* и Золотистый х *L. angustifolium* наблюдается отрицательное промежуточное доминирование. У гибрида F₁ Золотистый х *L. crepitans* полностью доминирует размер цветка дикого вида

ЛИТЕРАТУРА

1. Жученко А.А. Адаптивная стратегия устойчивого развития сельского хозяйства России в XXI. Теория и практика: в 2 т. / А.А. Жученко – М. : Агрорус, 2009-2011. – Т. I. – 816 с.
2. Jhala A.J. Potential hybridization of flax with weedy and wild relatives: an avenue for movement of engineered genes? / A.J. Jhala, L.M. Hall, J.C. Hall // Crop Science. – 2008. – Vol. 48, № 3. – P. 825-840.
3. Seetharam A. Interspecific hybridization in *Linum* / A. Seetharam // Euphytica. – 1972. – Vol. 21, issue 3. – P. 489-495
4. Юзепчук С. В. Льновые – *Linaceae* / С. В. Юзепчук; [под ред. Б. К. Шишкина] // Флора СССР. – Л., 1949. – Т.14. – С. 92–145.
5. Beil G. M. Inheritance of quantitative characters in grain sorghum / G. M. Beil, R. E. Atkins // Jowa J. Sci. – 1965. – Vol. 39, №3. – P. 345–358.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф.Лакин – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Мищенко Л.Ю. Новый тип белой окраски венчика у *Linum usitatissimum* L. / Л.Ю. Мищенко, В.А. Лях // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя. – 2002. – Вип. 4. – С. 15-19.
8. Ягло М.Н. Маркерные признаки льна / М.Н. Ягло // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя. – 2007. – Вип. 4. – С. 86-91.
9. Кутузова С. Н. Генетика льна / С.Н. Кутузова // Генетика культурных растений. – СПб, 1998. – С.6-52.
10. Лях В. А. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* L. и биотехнологические пути работы с ними / В. А. Лях, А. И. Сорока. – Запорожье : ЗНУ, 2008. – 182 с.
11. Лях В.А. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum*L. (каталог) / В.А. Лях, Л.Ю. Мищенко, И.А. Полякова. – Запорожье, 2003. – 60 с.
12. Мищенко Л.Ю. Наследование розовой окраски венчика и кремовой окраски пыльников у *L. usitatissimum* / Л.Ю. Мищенко, В.А. Лях // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – Запоріжжя. – 2001. – Вип. 4. – С. 15-19.
13. Широкий унифицированный классификатор СЭВ вида *Linum usitalissimum* / [состав. Р. Рыкова]. – Л. : Всесоюзный НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, 1987. – 24 с.

REFERENCES

1. Zhuchenko A.A. Adaptivnaya strategiya ustojchivogo razvitiya sel'skogo xozyajstva Rossii v XXI. Teoriya i praktika. V dvux tomax / A.A. Zhuchenko – M. : Agrorus. – 2009-2011. – T. I. – 816 s.
2. Jhala A.J. Potential hybridization of flax with weedy and wild relatives: an avenue for movement of engineered genes? / A.J. Jhala, L.M. Hall, J.C. Hall // Crop Science. – 2008. – Vol. 48, № 3. – P. 825-840.
3. Seetharam A. Interspecific hybridization in Linum / A. Seetharam // Euphytica, Vol. 21, issue 3 – 1972. – S. 489-495
4. Yuzepchuk S. V. L'novy'e – Linaceae / S. V. Yuzepchuk; [Pod red. B. K. Shishkina] // Flora SSSR. – L., 1949. – T.14. – S. 92–145.
5. Beil G. M. Inheritance of quantitative characters in grain sorghum / G. M. Beil, R. E. Atkins // Jowa J. Sci. – 1965. – Vol. 39, №3. – S. 345–358.
6. Lakin G. F. Biometriya / G.F. Lakin. – M. : Vy'sshaya shkola, 1990. – 352 s.
7. Mishhenko L.Yu. Novy'j tip belo'j okraski venchika u Linum usitatissimum L. / L.Yu. Mishhenko, V.A. Lyax // Naukovo-texnichnij byuleten' Institutu olijnih kul'tur UAAN. – Zaporizhzhya. – 2002. – Vip. 4. – S. 15-19
8. Yaglo M.N. Markerny'e priznaki l'na / M.N. Yaglo // Naukovo-texnichnij byuleten' Institutu olijnih kul'tur UAAN. – Zaporizhzhya. – 2007. – Vip. 4. – S. 86-91
9. Kutuzova S. N. Genetika l'na / S.N. Kutuzova // Genetika kul'turnix rastenij. – Sankt-Peterburg, 1998. – S. 6-52.
10. Lyax V. A. Botanicheskie i citogeneticheskie osobennosti vidov roda Linum L. i biotexnologicheskie puti raboty' s nimi / V. A. Lyax, A. I. Soroka. – Zaporozh'e: ZNU, 2008. – 182 s.
11. Lyax V.A. Geneticheskaya kollekcija vida Linum usitatissimumL. (katalog) / V.A. Lyax, L.Yu. Mishhenko, I.A. Polyakova. – Zaporozh'e: Zaporizhzhya. – 2003. – 60 s.
12. Mishhenko L.Yu. Nasledovanie rozovoj okraski venchika i kremovoj okraski py'l'nikov u L. usitatissimum / L.Yu. Mishhenko, V.A. Lyakh // Naukovo-texnichnij byuleten' Institutu olijnih kul'tur UAAN. – Zaporizhzhya. – 2001. – Vip. 4. – S. 15-19
13. Shirokij unificirovanny'j klassifikator SE'V vida Linum usitalissimum / [sostav. R. Ry'kova]. – L. : Vsesoyuzny'j NII rastenievodstva im. N.I. Vavilova, 1987. – 24 s.

УДК 635.854.78:631.5:581.1

ВЛИЯНИЕ МИКРОГАМЕТОФИТНОГО ОТБОРА У ГИБРИДОВ F_1 ПОДСОЛНЕЧНИКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ СПОРОФИТНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ F_2 К РАЗЛИЧНЫМ АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Тоцкий И.В., Витковская Ю.С., Лях В.А.

*Запорожский национальный университет,
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

igor.totsky@gmail.com

В данной работе было изучено влияние выдерживания пыльцы гибридов F_1 подсолнечника при пониженной температуре и её прогревания на холодоустойчивость, жаростойкость и засухоустойчивость спорофитной популяции F_2 соответственно. Холодоустойчивость оценивали путём проращивания семян при пониженной температуре. Жаростойкость устанавливали полевой всхожести прогретых семян. Засухоустойчивость определяли по проценту прорастания семян на растворе сахарозы. Проведение гаметофитного отбора увеличило холодоустойчивость, жаростойкость и засухоустойчивость спорофитных популяций F_2 .

Ключевые слова: подсолнечник, гибрид F_1 , спорофитная популяция F_2 , пыльцевой отбор, холодоустойчивость, жаростойкость, засухоустойчивость.

**ВПЛИВ МІКРОГАМЕТОФІТНОГО ДОБОРУ У ГІБРИДІВ F₁ СОНЯШНИКА
НА СТІЙКІСТЬ СПОРОФІТНИХ ПОПУЛЯЦІЙ F₂ ДО РІЗНИХ АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ
ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА**

Тоцький І.В., Вітковська Ю.С., Лях В.О.
Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66
igor.totsky@gmail.com

У цій роботі було вивчено вплив витримування пилку гібридів F₁ соняшника при зниженій температурі та його прогрівання на холодостійкість, жаростійкість та посухостійкість спорофітної популяції F₂ відповідно. Холодостійкість оцінювали шляхом пророщування насіння при зниженій температурі. Жаростійкість встановлювали за польовою схожістю прогрітого насіння. Посухостійкість визначали за процентом проростання насіння на розчині цукрози. Проведення гаметофітного добору збільшило холодостійкість, жаростійкість та посухостійкість спорофітних популяцій F₂.

Ключові слова: соняшник, гібрид F₁, спорофітна популяція F₂, пилковий добір, холодостійкість, жаростійкість, посухостійкість.

**INFLUENCE OF MICROGAMETOPHYTIC SELECTION IN F₁ SUNFLOWER HYBRIDS
FOR RESISTANCE OF SPOROPHYTIC F₂ POPULATIONS TO DIFFERENT
ABIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS**

Totsky I.V., Vitkovska Yu.S., Lyakh V.A.
Zaporizhzhya national university
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Street, 66
igor.totsky@gmail.com

In the southern regions of Ukraine sunflower is exposed to heat and dry growing conditions, which significantly reduce its productivity and make it impossible to realize the full potential of productivity. Sunflower growing in the northern regions of Ukraine and in more high latitudes of other countries is unprofitable due to low temperatures, which also significantly reduce yields. Thus, breeding for resistance to environmental factors is an important task in the development of sunflower.

Sunflower is a thermophilic plant. The optimum temperature for growth and development is 25-27°C, the seeds start to germinate at 5-10°C, the seedlings can withstand short freezing about minus 5-6°C. Requirements for heat during periods of rapid growth and flowering until maturity (July-September) are particularly high. The optimum temperature for photosynthesis is 25°C. Sunflower is mesophyte. However, it should be noted that the plant is very sensitive to moisture. Well developed crops consume from 500 to 600 mm of water during the growing season, and the minimum water requirement is the 350-400 mm of rainfall. The plants are especially sensitive to moisture during the formation of buds before blooming. However, sunflower has the relatively drought resistance due to well developed root system that effectively uses the water resources of soil, including the water resources that were accumulated during the winter.

The breeding for increase of the heat resistance and drought tolerance in sunflower is known, but the similar studies for increase of the cold resistance are not almost realized. Basically, sunflower breeding is performed by traditional methods and the object of selection is the sporophytic generation of the life cycle plant. However, selection for resistance to environmental factors is possible in the gametophytic stage of the life cycle.

Researches on the application of gametophytic selection in sunflower breeding are not almost conducted. However, in other crops, this method has been successfully used. The effective pollen selection for cold and heat resistance was carried out in tomato, maize and plants of the *Phaeonopsis* genus. Also gametophytic selection was successfully performed for drought tolerance in such crops as flax, castor and sorghum.

The aim of this study was to determine the effectiveness of gametophytic selection in F₁ hybrids of sunflower to increase the resistance of sporophytic F₂ populations to various abiotic environmental factors.

Material of research was the F₁ sunflower hybrid of “dichotomous venation” × “*xantha*” cross combination. The parental lines of this hybrid were contrasting in the heat, drought and cold tolerance. “*Xantha*” and “dichotomous venation” lines were obtained by experimental mutagenesis. “Dichotomous venation” mutant has the changed venation of the leaf. The plant is characterized by a dense network of fanshaped veins, while the original line has the reticulate venation that is normal for sunflower. Mutant trait is easily identified at the second pair of true leaves stage.

The hybrid of the first generation was obtained by forced pollination. Maternal plants were previously emasculated.

The pollen mixture of several inflorescences of F_1 hybrid was stored in parchment packages in a refrigerator at $3\pm 1^\circ\text{C}$ during 7 days to perform the gametophytic selection for cold resistance. Evaluation of pollen viability after storing at low temperature showed the significant decrease in this parameter compared to the control. Then the previously emasculated hybrid plants were pollinated with the stored at low temperature pollen. The plants pollinated with the fresh pollen were used as the control.

Evaluation of F_2 sporophytic populations for cold resistance was performed by seed germination at low temperature. Seeds were treated with the 1% KMnO_4 solution during 10 minutes for preventing the mold development. The seeds were placed in Petri dishes on the filter paper. 25 seeds were placed in each Petri dish. The Petri dishes heated at 150°C during 1 hour for sterilization. 10 ml previously boiled during 5 minutes distilled water were poured in each Petri dish. 250 thousand units of nystatin and 2 ml of Previkur per 1 liter were added in the distilled water. Closed Petri dishes were placed in a refrigerator at $5\pm 1^\circ\text{C}$ temperature. The percentage of germinated seeds was counted after 7 days of germination.

Gametophytic selection for heat- and drought resistance was carried out by heating of pollen. Part of the fresh pollen in a layer of 1-3 mm height in the open parchment packages placed in the air bath oven and heated at the temperature of $60\pm 2^\circ\text{C}$ during 1 and 3 hours. The pollen significantly reduced the viability after heating. Fresh pollen was used for pollination in the control.

Seeds were heated at the temperature of $60\pm 2^\circ\text{C}$ during 15 minutes in a water bath to estimate the effect of pollen heating on the heat resistance of F_2 populations. Then seeds were sown in the field. Survived plants were counted during the flowering.

Drought resistance of F_2 populations after gametophytic selection was determined by seed germination on sucrose solution. Seeds were treated for a period of 10 minutes with the 1% KMnO_4 solution for preventing the mold growth. The seeds were placed in Petri dishes on the filter paper. 25 seeds were placed in each Petri dish. The Petri dishes heated at 150°C during 1 hour for sterilization. 10 ml of 15% sucrose solution were poured in each Petri dish. Nystatin (250 thousand units per 1 liter) and Previkur (2 ml per 1 liter) were added in the sucrose solution. The percentage of seed germination was counted in 4 days.

The significance of difference was evaluated using Student's t test.

The percentage of germinated seeds, obtained with the using the stored at low temperature pollen, was compared with the percentage of germinated seeds, obtained after the pollination with the fresh pollen, at the low temperature conditions in a refrigerator to determine the influence of the gametophytic selection on the cold resistance of segregation F_2 populations.

Storage of the F_1 hybrid pollen at low temperature increased germination of F_2 seeds during their germination at low temperature to 87,7% compared with the control where this parameter was 73,7%. This indicates that the gametophytic selection was effective and increased the cold resistance of the experimental sporophytic F_2 population compared with the control.

The effectiveness of the gametophytic selection for heat resistance was determined by comparison of the number of survived plants after heating of F_2 seeds, obtained by using the gametophytic selection, and the number of survived plants after heating of F_2 seeds, obtained after pollination with the fresh pollen.

As the result of the heating of F_1 hybrid pollen during 1 hour, the number of survived plants of F_2 population after seeds storage in a water bath at the high temperature was increased 22,9% compared with the control where F_1 hybrids were pollinated with the fresh pollen. Similar results were obtained after pollination of F_1 hybrids with the pollen heated during 3 hours. In this case, the number of survived plants in experimental F_2 population after heating of the seeds was more than 3,5 times higher than in control. It should also be noted that the number of survived plants after seed heating was significantly higher when the pollen heated during 1 hour instead 3 hours was used for pollination. But this difference was 5,8%. All results show the increase of the number of the heat resistant genotypes in the F_2 population, obtained with the use of gametophytic selection.

Influence of pollen selection on drought tolerance of sporophytic F_2 populations was studied by comparison the germination of F_2 seeds, obtained after pollination with the heated pollen, and F_2 seeds, obtained after pollination with the fresh pollen, during the germination on sucrose solution.

Heating of F_1 hybrids pollen influenced not only on the heat resistance, but also on the drought resistance of F_2 sporophytes. This is indicated by the significant increase of germination of F_2 seeds, obtained after pollination of F_1 hybrid with the using of heated during 1 hour pollen, when the germination took place on sucrose solution compared to the control where F_1 hybrid was pollinated with the fresh pollen. In the experimental population this index was 56,3%, while it was only 9% in the control. These data indicate the significant increase of the drought resistance of F_2 population after gametophytic selection.

As follows from the obtained data, pollen heating increased not only the heat resistance, but also the drought tolerance. There is also another method of gametophytic selection for drought tolerance, which was effective. In this case the polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) solution, which is an osmotically active substance, is putting on the stigma of the parent plant. Therefore, this solution is the selective barrier for pollen. Using of such selection technique was successful in sorghum.

Perspective of this study is the obtaining of the lines and varieties of sunflower, which are resistant to the various environmental factors. The results of the investigation showed that the gametophytic selection

techniques for cold and heat resistance are the effective methods and can be applied in breeding programs to accelerate the creation of the valuable sunflower genotypes.

Key words: sunflower, F₁ hybrid, F₂ sporophytic populations, pollen selection, cold resistance, heat resistance, drought tolerance.

ВВЕДЕНИЕ

В южных регионах Украины подсолнечник постоянно подвергается воздействию жары и засухи, что значительно снижает его продуктивность и не даёт возможности полностью реализовать потенциал урожайности [1]. Выращивание подсолнечника в северных регионах Украины и других государств невыгодно из-за воздействия низких температур, которые также значительно снижают урожайность [2]. Таким образом, проведение отбора на устойчивость к абиотическим факторам среды является важной задачей в селекции подсолнечника.

Подсолнечник является теплолюбивым растением. Оптимальная температура для роста и развития составляет 25-27°C, семена начинают прорастать при 5-10°C, всходы могут переносить кратковременные заморозки до минус 5-6° С. Особенно высоки требования к теплу в периоды бурного роста и цветения вплоть до созревания (июль-сентябрь). Оптимальная температура для фотосинтеза – 25°C. По отношению к влаге подсолнечник является мезофитом. Вместе с тем растение очень требовательно к влаге. Хорошо развитые посевы за вегетационный период потребляют от 500 до 600 мм воды, а минимальная потребность в воде удовлетворяется при 350-400 мм осадков. Особенно требовательны к влаге растения во время образования бутонов до цветения. Однако подсолнечник проявляет относительную засухоустойчивость благодаря мощной корневой системе, дающей ему возможность эффективно использовать водные ресурсы почвы, в том числе и накопившиеся в зимний период [3].

Если селекционные работы по увеличению жаростойкости и засухоустойчивости подсолнечника ведутся, то аналогичные исследования по увеличению холодостойкости практически не реализуются [4]. В основном, селекция подсолнечника ведётся традиционными методами и объектом отбора является спорофитное поколение в жизненном цикле растения. Вместе с тем, существует возможность проведения селекции на устойчивость к абиотическим факторам среды и на гаметофитном этапе жизненного цикла.

Исследования по применению гаметофитного отбора у подсолнечника практически не проводятся. Однако у других культур этот метод уже успешно используется. Так, эффективная пыльцевая селекция и на холодостойкость, и на жаростойкость была осуществлена у томата [5], кукурузы [6] и растений рода *Phaleonopsis* [7]. Также успешно проведён гаметофитный отбор на засухоустойчивость у таких культур, как лён, клещевина [8], сорго [9].

Целью данного исследования было определение эффективности применения гаметофитного отбора у гибридов F₁ подсолнечника для увеличения устойчивости спорофитных популяций F₂ к различным абиотическим факторам внешней среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования был гибрид F₁ комбинации скрещивания «дихотомическое жилкование» × «*xantha*», родительские линии которого были контрастными по жаростойкости, засухо- и холодоустойчивости.

Линии «*xantha*» и «дихотомическое жилкование» получены путём экспериментального мутагенеза. Мутант «дихотомическое жилкование» имеет изменённое жилкование листа. Растение характеризуется густой сетью веерообразно расположенных жилок, в то время как исходная линия имеет обычное для подсолнечника сетчатое жилкование. Мутантный признак хорошо идентифицируется уже на стадии второй пары настоящих листьев [10].

Гибрид первого поколения получали с помощью принудительного переопыления. У материнских растений заранее проводилась кастрация.

Для проведения гаметофитного отбора на холодостойкость пыльцевую смесь нескольких соцветий гибрида F_1 в пергаментных пакетиках выдерживали в холодильнике при температуре $3\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 суток. Определение жизнеспособности пыльцы после её хранения при пониженной температуре показало значительное снижение данного показателя по сравнению с контролем. Хранившейся при пониженной температуре пыльцой опыляли ранее кастрированные гибридные растения. В качестве контроля использовали растения, опылённые свежесобранной пыльцой.

Оценку спорофитных популяций F_2 на холодостойкость проводили путём проращивания семян при пониженной температуре. Семена обрабатывали в течение 10 минут 1%-м раствором KMnO_4 для предотвращения развития плесени. Затем семена раскладывали по 25 штук на фильтровальную бумагу в чашки Петри, предварительно прогретые для стерилизации при 150°C в течение 1 часа. В каждую чашку Петри наливали по 10 мл предварительно прокипячённой в течение 5 минут дистиллированной воды, в которую были добавлены нистатин (250 тыс. ед. на 1 литр) и Превикур (2 мл на 1 литр). Закрытые чашки помещали в холодильник с температурой $5\pm 1^\circ\text{C}$. Через 7 суток подсчитывали процент проросших семян [11].

Гаметофитный отбор на жаро- и засухоустойчивость проводили путем прогревания пыльцы. Часть свежесобранной пыльцы слоем 1-3 мм в открытых пергаментных пакетиках помещали в термостат и прогревали в двух режимах при температуре $60\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1-го и 3-х часов. После прогревания пыльца значительно снижала свою жизнеспособность. В контроле для опыления использовали свежесобранную пыльцу.

Для оценки влияния прогревания пыльцы на жаростойкость популяций F_2 семена подвергали прогреванию при температуре $60\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 15 минут в водяной бане [11]. Затем их высевали в поле. В период цветения проводили учёт выживших растений.

Засухоустойчивость популяций F_2 после проведения гаметофитного отбора определяли путём проращивания семян на растворе сахарозы. Семена обрабатывали в течение 10 минут 1%-м раствором KMnO_4 для предотвращения развития плесени. Затем раскладывали по 25 штук на фильтровальную бумагу в чашки Петри, предварительно прогретые для стерилизации при 150°C в течение 1 часа. В каждую чашку Петри наливали по 10 мл 15%-ного раствора сахарозы, в который были добавлены нистатин (250 тыс. ед. на 1 литр) и Превикур (2 мл на 1 литр). Через 4 суток подсчитывали процент проросших семян [11].

Существенность отличий оценивали с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения влияния гаметофитного отбора на холодоустойчивость расщепляющихся популяций F_2 сравнивали процент прорастания семян, полученных с использованием выдержанной при пониженной температуре пыльцы, и процент прорастания семян, полученных после опыления растений свежесобранной пыльцой, в условиях пониженной температуры в холодильнике (таблица).

Таблица – Влияние гаметофитного отбора у гибрида подсолнечника F_1 комбинации скрещивания «дихотомическое жилкование» × «*xantha*» на устойчивость спорофитной популяции F_2 к абиотическим факторам внешней среды

Обработка пыльцы	Оценка популяции F ₂	Семена F ₂		Процент прорастания, %
		всего	проросло	
Гаметофитный отбор на холодоустойчивость				
Свежесобранная пыльца	Проращивание семян при температуре 3°C в течение 7 суток	365	269	73,7±2.30
Хранение пыльцы при 3°C в течение 7 суток		415	364	87,7±1.61*
Гаметофитный отбор на жаростойкость				
Свежесобранная пыльца	Полевая всхожесть после прогревания семян в водяной бане при 60°C в течение 15 минут	864	56	6,5±0,84
Прогревание пыльцы при 60°C в течение 1 часа		827	243	29,4±1,58*
Прогревание пыльцы при 60°C в течение 3 часов		543	128	23,6±1,82* [#]
Гаметофитный отбор на засухоустойчивость				
Свежесобранная пыльца	Проращивание семян на 15%-м растворе сахарозы в течение 4 суток	480	43	9,0±1,31
Прогревание пыльцы при 60°C в течение 1 часа		806	454	56,3±1,75*

Примечание: * – отличия от контроля существенны при $p \leq 0,001$; # – отличия между опытными вариантами существенны при $p \leq 0,05$.

Выдерживание пыльцы гибридов F₁ при пониженной температуре увеличило всхожесть семян F₂ во время их проращивания в условиях низких температур до 87,7%, по сравнению с контролем, где данный показатель составлял 73,7%. Это свидетельствует о том, что проведение гаметофитного отбора было эффективным и увеличило холодоустойчивость опытной спорофитной популяции F₂ по сравнению с контролем.

Эффективность гаметофитного отбора на жаростойкость определяли при сравнении выживаемости растений после прогревания семян F₂, полученных с использованием гаметофитного отбора, и выживаемости растений после прогревания семян F₂, полученных от опыления свежесобранной пыльцой (таблица).

Результатом прогревания пыльцы гибрида F₁ в течение 1 часа было увеличение выживаемости растений популяции F₂ после выдерживания семян в водяной бане при повышенной температуре на 22,9% по сравнению с контролем, где гибриды F₁ опыляли свежесобранной пыльцой. Сходный результат наблюдался и при опылении гибридов F₁ пыльцой, прогретой в течение 3 часов. В данном случае выживаемость растений опытной популяции F₂ после прогревания семян была более чем в 3,5 раза выше, чем в контроле. Также следует отметить, что выживаемость растений после прогревания семян была значимо выше, если для опыления использовали пыльцу, прогретую в течение 1 часа, а не 3 часов, хоть эта разница и составляла 5,8%. Все полученные результаты указывают на увеличение количества жаростойких генотипов в популяции F₂, полученной при использовании гаметофитного отбора.

Влияние пыльцевого отбора на засухоустойчивость популяций спорофитов F₂ было изучено путём сравнения всхожести семян F₂, полученных после опыления прогретой пыльцой, и семян F₂, полученных после опыления свежесобранной пыльцой, при проращивании на растворе сахарозы (таблица).

Прогревание пыльцы гибридов F_1 влияло не только на жаростойкость, но и на засухоустойчивость спорофитов F_2 . На это указывает значительное увеличение прорастания семян F_2 , полученных в результате опыления гибрида F_1 прогретой в течение 1 часа пыльцой, при проращивании на растворе сахарозы по сравнению с контрольным вариантом, где опыление гибрида F_1 производили свежесобранной пыльцой. В опытном варианте данный показатель достигал 56,3%, в то время как в контроле он составлял лишь 9%. Приведенные данные указывают на значительное увеличение засухоустойчивости популяции F_2 после проведения гаметофитного отбора.

Как следует из полученных данных, прогревание пыльцы привело не только к увеличению жаростойкости, но и засухоустойчивости. Существует также другая методика проведения гаметофитного отбора на засухоустойчивость, которая показала свою эффективность. Её особенностью является то, что на рыльце материнского растения наносится раствор полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ 6000), который является осмотически активным веществом и, следовательно, является селективным барьером для пыльцы. Использование такой техники отбора было успешным у сорго [9]. В дальнейшем планируется проведение гаметофитного отбора на засухоустойчивость у подсолнечника с использованием представленной методики.

Перспективой дальнейшего исследования является получение устойчивых к различным факторам внешней среды линий и сортов подсолнечника. Результаты исследования показали, что методика гаметофитного отбора является эффективной и может применяться в селекционных программах для ускорения создания ценных генотипов подсолнечника.

ВЫВОДЫ

1. Опыление выдержанной в течение 7 суток при пониженной ($3\pm 1^\circ\text{C}$) температуре пыльцой гибридов F_1 по сравнению с опылением свежесобранной пыльцой увеличивает холодоустойчивость спорофитных популяций F_2 , на что указывает лучшее прорастание семян при пониженной температуре.
2. Прогревание пыльцы гибридов F_1 при температуре $60\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1-го и 3-х часов перед опылением значительно увеличивает жаростойкость спорофитных популяций F_2 по сравнению с популяциями, полученными после опыления свежесобранной пыльцой. Об этом свидетельствует более высокая всхожесть прогретых семян в полевых условиях.
3. Опыление прогретой при температуре $60\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1-го часа пыльцой гибридов F_1 значительно увеличивает засухоустойчивость спорофитных популяций F_2 по сравнению с контрольными популяциями, полученными после опыления свежесобранной пыльцой. Подтверждением этого является лучшее прорастание семян на растворе сахарозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Onemli F. Response to drought of some wild species of Helianthus at seedling growth stage / F. Onemli, T. Gucer // Helia. – 2010. – V. 33, №. 53. – P. 45–54.
2. Гончаров С.В. Селекция линий и гибридов подсолнечника на скороспелость / С.В. Гончаров // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2011. – №2 (148-149). – С. 27-30.
3. Яровые масличные культуры / [Шпаар Д., Адам Л., Гтнапп Х. и др.]; под общ. ред. В.А. Щербакова. – Минск : ФУАинформ, 1999. – 283 с.
4. Skoric D. Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses / D.Skoric // HELIA. – 2009. – V. 32, №. 50. – P. 1-16.
5. Методы гаметной и зиготной селекции томатов / [Кравченко А.Н., Лях В.А., Тодераш Л.Г. и др.]. – Кишинёв : Штиинца, 1988. – 152 с.

6. Лях В.А. Эффективность микрогаметофитного отбора на устойчивость кукурузы к температурному фактору / В.А. Лях, А.И. Сорока // Сельхоз. биол. – 1993. – № 3. – С.38-44.
7. Blischak Leslie A. Gametophytic selection for thermotolerance in *Phalaenopsis* / Leslie A. Blischak. – Virginia. Blacksburg : Virginia Polytechnic Institute & State University, 2005. – 73 p.
8. Методы отбора ценных генотипов на уровне пыльцы / [Лях В.А., Сорока А.И., Мищенко Л.Ю. и др.] – Запорожье : ИМК УААН, 2000. – 48 с.
9. Patil B.S. Effect of pollen selection for moisture stress tolerance on progeny performance in sorghum /Patil B.S., Ravikumar R.L., Salimath P.M. // Journal of Food, Agriculture & Environment. – 2006. – V. 4, №.1. – P. 201-204.
10. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур / Лях В.А., Полякова И.А., Сорока А.И. – Запорожье : ЗНУ, 2009. – 266 с.
11. Практикум по росту и устойчивости растений: учеб. пособ. / [Полевой В.В., Чиркова Т.В., Лутова Л.А. и др.; под ред. В.В. Полевого, Т.В. Чирковой]. – СПб. : С.-Петербур. ун-т, 2001. – 212 с.

REFERENCES

1. Onemli F. Response to drought of some wild species of Helianthus at seedling growth stage / F. Onemli, T. Gucer // Helia. – 2010. – V. 33, №. 53. – P. 45–54.
2. Goncharov S.V. Seleksiya liniy i gibridov podsolnechnika na skorospelost / S.V. Goncharov // Maslichnie kulturi. Nauchno-technicheskiy bulletin Vserossiyskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnich kultur. – 2011. – №2 (148-149). – S. 27-30.
3. Yarovie maslichnie kulturi / [Shpaar D., Adam L., Gtnapp X. i dr.]; pod obsch. red. V.A. Scherbacova. – Minsk : FUAinform, 1999. – 283 s.
4. Skoric D. Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses / D. Skoric // HELIA. – 2009. – V. 32, №. 50. – P. 1-16.
5. Metodi gametnoy i zigotnoy seleksii tomatov / [Kravchenko A.N., Lyach V.A., Toderash L.G. i dr.]. – Kishinev : Shtiintsa, 1988. – 152 s.
6. Lyach V.A. Effektivnost mikrogametofitnogo otbora na ustoychivost kukuruzy k temperaturnomu faktoru / V.A. Lyach, A.I. Soroka // Selskochozyaistvennaya biologiya. – 1993. – № 3. – S.38-44.
7. Blischak Leslie A. Gametophytic selection for thermotolerance in *Phalaenopsis* / Leslie A. Blischak. – Virginia. Blacksburg : Virginia Polytechnic Institute & State University, 2005. – 73 p.
8. Metodi otbora tsennich genotipov na urovne piltsi / [Lyach V.A., Soroka A.I., Mischenko L.Yu. i dr.] – Zaporozhye : IMK UAAN, 2000. – 48 s.
9. Patil B.S. Effect of pollen selection for moisture stress tolerance on progeny performance in *Sorghum* / Patil B.S., Ravikumar R.L., Salimath P.M. // Journal of Food, Agriculture & Environment. – 2006. – V. 4, №.1. – P. 201-204.
10. Lyakh V.A. Inducirovanniy mutagenez maslichnich kultur / Lyakh V.A., Polyakova I.A., Soroka A.I. – Zaporozhye : ZNU, 2009. – 266 s.
11. Praktikum po rostu i ustoychivosti rasteniy: ucheb. posob. / [Polevoy V.V., Chirkova T.V., Lutova L.A. i dr.]; pod red. V.V. Polevogo, T.V. Chirkovoy. – SPb. : S.-Peterb. un-t, 2001. – 212 s.

УДК 582.751.42:581.456:633.854.54

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАСТИДНОГО АППАРАТА ХЛОРОФИЛЛЬНЫХ МУТАНТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Яранцева В.В., Лях В.А.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

VIKA.yaran@mail.ru

Изучена морфология пластидного аппарата мутантов льна масличного (*Linum humile* Mill.) с разным типом хлорофилльной недостаточности – *viridis*, *xantha* и *xantho-viridis* в сравнении с исходным сортом Циан. Выявлено, что хлорофилльные мутанты льна имеют измененный пластидный аппарат. Изменение линейных размеров и производных показателей (площади сечения и объема) хлоропластов зависит от типа мутации. Мутант типа *xantha* имеет цилиндрическую форму хлоропластов.

Ключевые слова: Linum humile Mill., хлорофилльный мутант, viridis, xantha, xanthoviridis, хлоропласт, морфология.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАСТИДНОГО АППАРАТУ ХЛОРОФІЛЬНИХ МУТАНТІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО

Яранцева В.В., Лях В.А.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

VIKA.yaran@mail.ru

Вивчена морфологія пластидного апарату мутантів льону олійного (*Linum humile* Mill.) з різним типом хлорофільних недостатності – *viridis*, *xantha* і *xantho-viridis* у порівнянні з вихідним сортом Циан. Виявлено, що хлорофільні мутанти льону мають змінений пластидний апарат. Зміна лінійних розмірів та похідних показників (площі перерізу та об'єму) хлоропластів залежить від типу мутації. Мутант типу *xantha* має циліндроподібну форму хлоропластів.

Ключові слова: Linum humile Mill., хлорофільний мутант, viridis, xantha, xanthoviridis, хлоропласт, морфологія.

CHARACTERISTIC PLASTID APPARATUS CHLOROPHYLL MUTANTS OF OIL FLAX

Yarantseva V.V., Lyakh V.A.

*Zaporizhzhya national university
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Street 6*

VIKA.yaran@mail.ru

Flax is important of technical and oilcrop in the world. Linseed oil is used in food, medicine, manufacturing oil-based paints, varnishes, linoleum, etc. The variety of areas of cultivation and uses of this crop required of the creation of various flax varieties with high photosynthetic activity for great yield formation.

Photosynthesis is an important process which ensures the growth and development of plants. The ability of plants to photosynthesize and its intensity depends primarily on the pigment composition, structural features of the photosynthetic apparatus, environmental factors, mineral nutrition, and others. The main organ of photosynthesis in higher plants is the leaf, and the features of its structure provide autotrophic type of food which is characteristic for the plant body. Chloroplasts with the contained pigments are the basic structural and functional unit of the photosynthetic apparatus.

For many years, the chlorophyll mutants that have significant morphological changes in color of plants are a convenient model for studying the processes of photosynthesis and structures that take a direct part in it. The intensity of photosynthesis in chlorophyll mutants is about 10 times lower than the rate of photosynthesis in green plants. Mutants flax produced in the course of research on experimental mutagenesis are very interesting subject for the study of physiological and biochemical aspects of photosynthesis.

The aim of this study was to investigate the differences in the structure of the plastid apparatus in mutants with different types of chlorophyll deficiency.

As a material, the variety Tsian and received at its base through induced mutagenesis mutant lines M-80, M-81 and M-84, characterized by different types of chlorophyll deficiency were used.

Tsian is a variety of linseed. The plant is green, medium-leaved, leaves are broadly lanceolate.

Mutant line M-80 was obtained by irradiating the seeds of variety Tsian using the dose of 400 Gy. Cotyledon leaves are light yellow, with the growth of the plant it is green, but its color is different from the normal green. This chlorophyll change applies to *viridis* type.

Mutant line M-81 was isolated from a variety Tsian by irradiation dose of 400 Gy. Plants of this line have a characteristic white-yellow color. With the growth bright yellow pigmentation fades and the plants before the end of the growing season, have the traits of severe depression. Mutation is related to the type of *xantha*.

Plants of the mutant line M-84, obtained by irradiation dose of 700 Gy, have a distinctive dirty-yellow color of the leaves. Mutation is related to the type of *xantho-viridis*.

To study the plastid morphology, the selected leaves were fixed in a Temper mixture containing 0.2% of copper chloride, 0.2% of copper nitrate, and 1% of phenol, which allows to keep the coloring of the chloroplasts. Then the leaves were waxed, cross-sections were prepared using MPS-2 rotary microtome and dewaxing was conducted. For this, glass tvilh glued cross sections were washed in three changes of xylol, two changes of 100% alcohol, a change of 75% alcohol, a 50% alcohol and three changes of distilled water. The time of each treatment was about 2 – 3 minutes. Then the sections were put into glycerol and covered with cover glasses. The resultant preparations were photographed using XS-3330 microscope trinocular and MA88-500 eyepiece cameras at magnification of $\times 640$ and $\times 1600$ times. The dimensions of chloroplasts were measured by standard methods using the ocular micrometer. To characterize the plastid apparatus cross-sectional area and volume of chloroplasts was calculated using the procedure of A.T. Mokronosov.

The results were processed using standard methods of mathematical statistics.

Mutant lines M-80, M-81 and M-84 are characterized by different expression of negative chlorophyll changes – *viridis*, *xantha* and *xantho-viridis*, respectively. By the time of the study (at the stage of «Horring bone») the plants both had chlorophyll part and green part. In this case, the localization of chlorophyll area (upper, middle or lower part) on the plant depended on the type of mutation. As control the variety Tsian with normal green color of leaves was used.

As seen from Table 1, the chloroplasts of mutant lines in both length and width, in the most cases were significantly different from variety Tsian. There was a decrease in their linear dimensions.

Chlorophyll mutants of linseed were also characterized changes by the in the shape of chloroplasts. Thus, chloroplasts of mutant M-81 (*xantha*) were much narrower than the control. On the basis of the ratio of length and width chloroplast in the mutant M-81 it was found that its chloroplasts have the shape of the cylinder. The chloroplasts in mutant M-84 (*xantho-viridis*) size were not significantly different from the control, but had a spindle-like shape (Figure 2). The chloroplasts of the mutant M-80 (*viridis*) by the shape does not differ from the control, but have a smaller size.

The cross-sectional area and volume of chloroplasts was also calculated. As seen in Figure 3, cross-sectional area of chloroplasts most reduced in the mutant M-80 (1.7 times). Mutant M-81 is characterized by the maximum decreasing in volume of the chloroplasts among the mutants (2.4-fold). It should be noted that the mutant M-84 is characterized by the smallest reduction of cross-sectional area and volume of chloroplasts – 1.3 and 1.5 times, respectively.

It was revealed that the chlorophyll mutants of linseed have a modified plastid apparatus. Change in linear dimensions of chloroplasts depends on the type of mutation. The mutants *xantha* and *xantho-viridis* types change the shape of the chloroplasts. The mutant of *xantha* type has chloroplasts of cylinder-like shape. The mutant of *xantho-viridis* type is characterized by the lowest changes of indirect parameters of chloroplasts.

Key words: *Linum humile* Mill., chlorophyll mutant, *viridis*, *xantha*, *xanthoviridis*, chloroplast, morphology.

ВВЕДЕНИЕ

Лен – важная в мире техническая и масличная культура. Льняное масло используется в питании, медицине, производстве масляных красок, олифы, линолеума и т.д. Многообразие зон выращивания и направлений использования культуры обуславливает необходимость создания различных сортов льна с высокими показателями фотосинтетической активности для формирования большого урожая [1, 2].

Фотосинтез является важнейшим процессом в обеспечении роста и развития растений. Способность растений к фотосинтезу и его интенсивность зависят прежде всего от пигментного состава, особенностей строения фотосинтетического аппарата, экологических факторов, минерального питания и др. Во время эволюции у растений сформировались специфические структуры, обеспечивающие процессы фотосинтеза, приводящие в конечном итоге к связыванию углекислоты, выделению кислорода и синтезу сахаров. Главным органом фотосинтеза у высших растений является лист, а особенности его строения

обеспечивают автотрофный тип питания, характерный для растительного организма. Хлоропласты с содержащимися в них пигментами являются основной структурно-функциональной единицей фотосинтетического аппарата [3-5].

В течение многих лет удобной моделью для изучения процессов фотосинтеза и структур, которые принимают в нём непосредственное участие, являются хлорофилльные мутанты, которые имеют значительные морфологические изменения окраски растений. Установлено, что интенсивность фотосинтеза у хлорофилльных мутантов приблизительно в 10 раз ниже интенсивности фотосинтеза зеленых растений. Интересным объектом для изучения физиолого-биохимических аспектов фотосинтеза являются мутанты льна, полученные в ходе исследований по экспериментальному мутагенезу [6].

При использовании индуцированного мутагенеза у ряда генотипов льна масличного (*Linum humile* Mill.) нами была выделена серия мутаций с различными типами минус-хлорофилльных изменений. Данные мутации имеют различное морфологическое проявление на одних и тех же стадиях развития [7, 8].

Целью настоящей работы было выявить различия в строении пластидного аппарата у мутантов с разным типом хлорофилльной недостаточности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала использовали линейный сорт льна масличного Циан и полученные на его основе с помощью индуцированного мутагенеза мутантные линии М-80, М-81 и М-84, характеризующиеся разным типом хлорофилльной недостаточности.

Циан – сорт льна масличного, межеумок. Растение зеленое, средне-облиственное, листья широко-ланцетные, лепестки венчика, пыльники и жилки голубые, поверхность лепестков гладкая, цветок открытый. Имеет высокое содержание масла. Сорт широко и весьма успешно культивируют в разных климатических зонах, что указывает на исключительную пластичность культуры.

Мутантная линия М-80 получена при облучении семян сорта Циан дозой 400 Гр. Семядольные листья светло-желтые, по мере роста растение зеленеет, однако его окраска отличается от нормальной зеленой. На стадии «елочки» верхняя часть растения имеет светло-желтую окраску, а нижняя – светло-зеленую. Данное хлорофилльное изменение относится к типу *viridis* (рис.1 б).

Мутантная линия М-81 выделена из сорта Циан при облучении дозой 400 Гр. Растения данной линии имеют характерную бело-желтую окраску. По мере роста ярко-желтая пигментация тускнеет и растения доживают до конца вегетации, сохраняя признаки сильной угнетенности и отставания в росте. На стадии «елочки» верхняя часть растения имеет ярко-жёлтую окраску листьев, в средней части листья становятся более тусклыми и зеленеют в области проводящих пучков, а в нижней – имеют светло-зелёную окраску. Мутант сохраняет такую характеристику при любых погодных условиях. Семенная продуктивность растений низкая. Мутация отнесена к типу *xantha* (рис.1 в).

Растения мутантной линии М-84, полученные при облучении дозой 700 Гр, имеют характерную грязно-желтую окраску листьев. На стадии «елочки» верхняя и нижняя части растений имеют светло-зелёную окраску, а средняя – хлорофилльную. Растения доживают до конца вегетации, сохраняя признаки угнетенности. Семенная продуктивность низкая. Мутация отнесена к типу *xantho-viridis* (рис.1 г) [8].



а)



б)



в)



г)

Рис. 1. Мутантные линии льна масличного с разным типом хлорофилльной недостаточности: а) сорт Циан (контроль), б) М-80, в) М-81, г) М-84.

Для исследования морфологии пластид отобранные листья фиксировали в смеси Темпера, содержащей 0,2 % хлорида меди, 0,2 % нитрата меди и 1 % фенола [10, 12], которая позволяет сохранить окраску хлоропластов. Затем листья парафинировали, из них готовили поперечные срезы на ротационном микротоме МПС-2 и проводили их депарафинирование. Для этого стекла с наклеенными срезами промывали в трёх сменах ксилола, двух сменах 100 % спирта, одной смене 75 % спирта, одной 50 % спирта и трёх сменах дистиллированной воды. Время нахождения в каждой среде – 2...3 минуты. Далее срезы заключали в глицерин и накрывали покровными стеклами [11]. Полученные препараты фотографировали при помощи тринокулярного микроскопа XS-3330 и окулярной камеры МА88-500 при увеличении $\times 640$ и $\times 1600$ раз. Размеры хлоропластов измеряли стандартными методами при помощи окуляр-микрометра [13]. Для характеристики пластидного аппарата рассчитывали площадь сечения и объем хлоропластов, используя методику А.Т. Мокроносова [14]. Результаты обрабатывали, используя методы стандартной математической статистики [15].

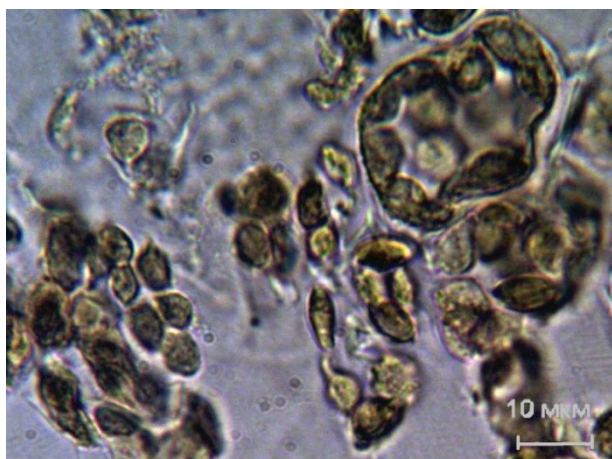
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Мутантные линии М-80, М-81 и М-84 характеризуются различным проявлением минус-хлорофилльных изменений – *viridis*, *xantha* и *xantho-viridis*, соответственно. К моменту исследования (на стадии «елочки») они имели как хлорофилльную часть, так и близкую к нормальной. При этом локализация хлорофилльного участка (верхняя, средняя или нижняя часть) на растении зависела от типа мутации. Контролем служил сорт Циан с нормальной зелёной окраской листьев (рис.1 а).

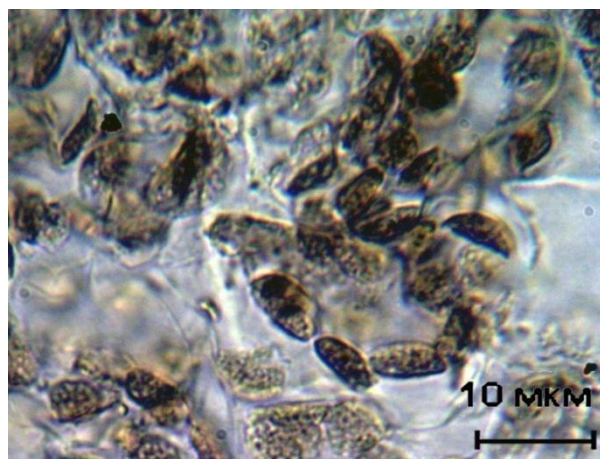
Хлорофилльные мутанты с измененными морфологическими и физиологическими признаками характеризуются изменениями в строении их пластидного аппарата. При изучении строения мезофилла листьев, нами выявлены изменения морфологии таких фотосинтетических структур клетки как хлоропласты (рис.2).

Как видно из таблицы 1, хлоропласты мутантной линии М-80 как по длине, так и по ширине, существенно отличались от сорта Циан. При этом наблюдалось уменьшение линейных размеров хлоропластов. У мутанта М-81 (*xantha*) хлоропласты были намного уже, чем у контроля, по показателю длины хлоропластов, существенных отличий не обнаружено. Хлоропласты мутантного образца М-84 по линейным показателям хлоропластов не отличались от сорта Циан.

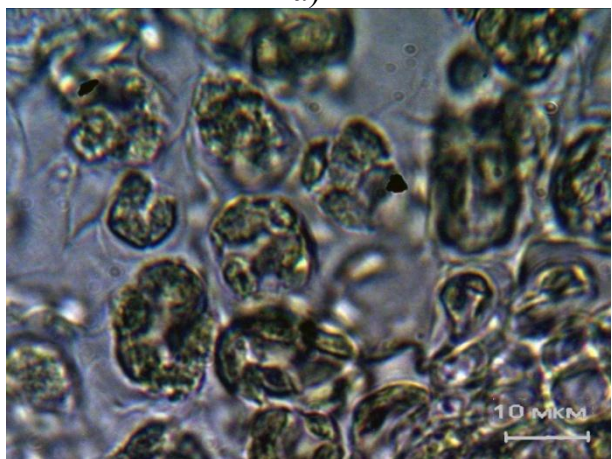
Хлорофилльные мутанты льна масличного характеризовались также изменением формы хлоропластов. На основе соотношения длины и ширины хлоропластов мутанта М-81 было выявлено, что его хлоропласты имеют цилиндрическую форму [14]. У мутанта М-84 (*xantho-viridis*) хлоропласты имели веретенообразную форму (рис.2). У мутанта М-80 (*viridis*) хлоропласты по форме не отличались от контроля.



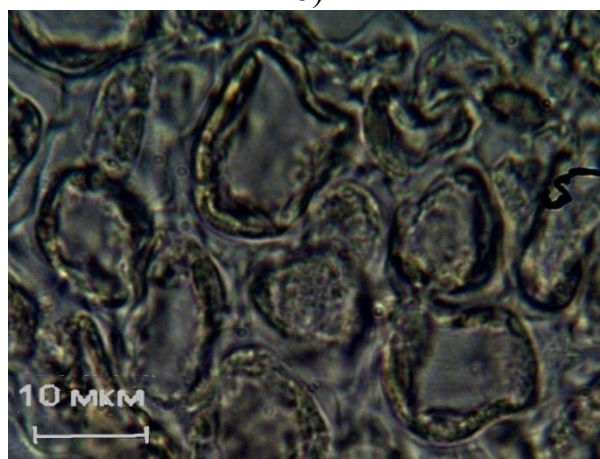
а)



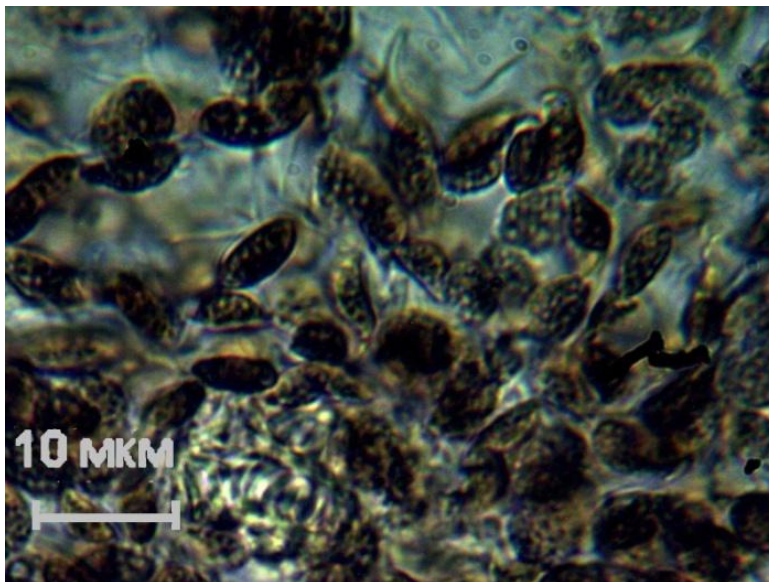
б)



в)



г)



д)

Рис. 2. Морфология пластид хлорофильных частей мутантных линий льна масличного: а) Циан (верхняя часть); б) Циан (средняя часть); в) М-80; г) М-81; д) М-84.

Таблица 1 – Линейные размеры хлоропластов хлорофильных частей мутантных линий льна масличного

Генотип	Длина хлоропластов, мкм	Ширина хлоропластов, мкм	Форма хлоропластов
Циан (верх)	4,3±0,21	2,5±0,24	хлоропласты эллипсо-подобной формы
Циан (средняя часть)	4,9±0,26	2,8±0,19	хлоропласты эллипсо-подобной формы
М-80	3,2±0,13***	1,9±0,11*	хлоропласты эллипсо-подобной формы
М-81	4,3±0,39	1,3±0,15***	хлоропласты цилиндрической формы
М-84	4,1±0,31	2,4±0,18	хлоропласты веретено-подобной формы

Примечание: *, **, *** – отличия от контроля существенны при $P < 0,05; 0,01; 0,001$.

В связи с тем, что было выявлено не только изменение размеров хлоропластов, но их формы, нами были рассчитаны показатели площади сечения и объема хлоропластов. Как видно из рисунка 3, площадь сечения хлоропластов в наибольшей степени изменяется у мутанта М-80 (в 1,7 раз). Мутант М-81 характеризуется максимальным снижением объема хлоропластов среди мутантов (в 2,4 раза). Следует отметить, что мутант М-84 характеризуется наименьшим снижением площади сечения и объема хлоропластов – в 1,3 и 1,5 раз соответственно.

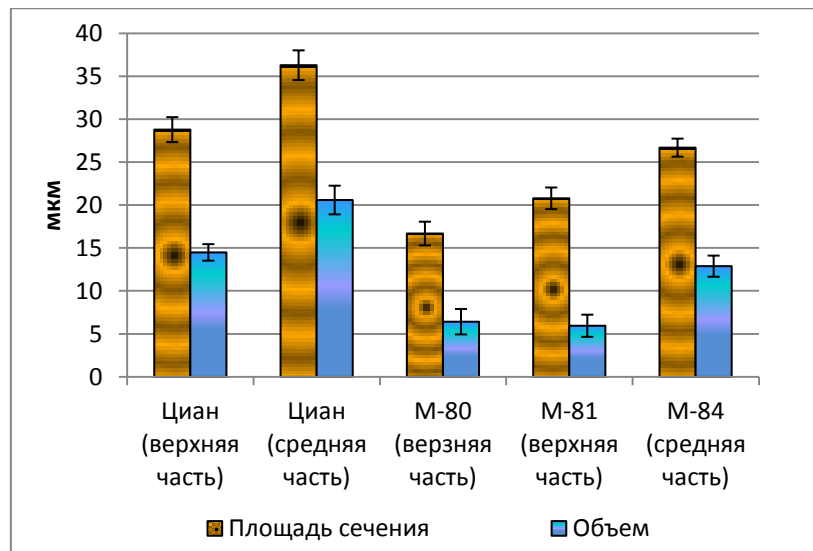


Рис. 3. Площадь сечения и объем хлоропластов хлорофилльных частей мутантных линий льна масличного.

Перспективой дальнейшего исследования является углубление представлений о анатомо-морфологических особенностях строения фотосинтетического аппарата мутантов льна масличного разным типом хлорофилльной недостаточности, установление связи этих параметров с продуктивностью растений, что позволит более детально изучить процесс фотосинтеза.

ВЫВОДЫ

Выявлено, что хлорофилльные мутанты льна масличного имеют измененный пластидный аппарат. Изменение линейных размеров хлоропластов зависит от типа мутации. Мутанты типа *xantha* и *xantho-viridis* изменяют форму хлоропластов. Мутант типа *xantha* имеет хлоропласты цилиндрической формы, в отличие от эллипсоподобной у исходного сорта. Мутант типа *xantho-viridis* характеризуется наименьшими изменениями производных параметров хлоропластов.

ЛІТЕРАТУРА

1. Живетин В. В. Масличный лен и его комплексное использование / В. В. Живетин, Л. Н. Гинзбург. – М. : Урожай, 2000. – 90 с.
2. Гаврилюк М. М. Олійні культури в Україні / М. М. Гаврилюк, В. Н. Салатенко, А. В. Чехов; [за ред. А. В. Чехова]. – К. : Основа, 2007. – 416 с.
3. Гостимский С.А. Цитогенетический анализ хлорофилльных мутантов гороха / С.А. Гостимский // Теория химического мутагенеза. – М. : Наука, 1971. – С. 64-69.
4. Ладыгин В.Г. Фотосинтез и продукционный процесс / В.Г. Ладыгин, С.В. Тагеева, Г.А. Семенова – М. : Агропромиздат, 1988. – 348 с.
5. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений / С.М. Кочубей. – К. : Альтерпрес, 2001. – 204 с.
6. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур / В.А. Лях, И.А. Полякова, А.И. Сорока. – Запорожье: ЗНУ, 2009. – 266 с.
7. Лях В. А. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологические пути работы с ними: монография / В. А. Лях, А. И. Сорока. – Запорожье: ЗНУ, 2008. – 182 с.
8. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L.: каталог / [сост. Лях В.А., Мищенко Л.Ю., Полякова И.А.]. – Запорожье, 2003. – 60 с.

9. Досон Р. Справочник биохимика / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.; [пер с англ. В.Л. Друца, О.Н. Королёв]. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
10. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / [Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др.]. – М. : МГУ, 2004 – 312 с.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
12. Мокроносов А.Т. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезируемых тканей и органов / А.Т. Мокроносов, Р.А. Борзенкова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1978. – Вып. 3. – С. 119-133.
13. Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений: руководство к лабораторным занятиям большого спецпрактикума по физиологии и биохимии растений / [сост. Р.А. Борзенкова, Е.В. Храмцова]. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2006. – 27 с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Лакин Г.Ф. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.

REFERENCES

1. Zhivetin V.V. Maslichnyj len i ego kompleksnoe ispolzovanie / V. V. Zhivetin, L.N. Ginzburg. – М. : Urozhaj, 2000. – 90 s.
2. Gavrilyuk M. M. Olijni kulturi v Ukraïni / M. M. Gavrilyuk, V. N. Salatenko, A.V. Chexov; [za red. A. V. Chexova]. – К.: Osnova, 2007. – 416 s.
3. Gostimskij S.A. Citogeneticheskij analiz xlorofilnyx mutantov goroxa / S.A. Gostimskij // Teoriya ximicheskogo mutageneza. – М.: Nauka, 1971. – S. 64-69.
4. Ladygin V.G. Fotosintez i produkcionnyj process / V.G. Ladygin, S.V. Tageeva, G.A. Semenova – М. : Agropromizdat, 1988. – 348 с.
5. Kochubej S.M. Organizaciya fotosinteticheskogo apparata vysshix rastenij / S.M. Kochubej. – К.: Alterpres, 2001. – 204 s.
6. Lyax V.A. Inducirovannyj mutagenez maslichnyx kultur / V.A. Lyax, I.A. Polyakova, A.I. Soroka – Zaporozhe: ZNU, 2009. – 266 s.
7. Lyax V. A. Botanicheskie i citogeneticheskie osobennosti vidov roda *Linum* i biotexnologicheske puti raboty s nimi: monografiya / V. A. Lyax, A. I. Soroka. – Zaporozhe: ZNU, 2008. – 182 s.
8. Geneticheskaya kollekcija vida *Linum usitatissimum* L.: katalog / [sost. Lyax V.A., Mishhenko L.Yu., Polyakova I.A.]. – Zaporozhe, 2003. – 60 s.
9. Doson R. Spravochnik bioximika / Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K.; [per s angl. V.L. Druca, O.N Korolyov]. – М.: Mir, 1991. – 544 s.
10. Spravochnik po botanicheskoj mикротехнике. Osnovy i metody / [Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G. i dr..]. – М.: MGU, 2004 – 312 s.
11. Pausheva Z.P. Praktikum po citologii rastenij / Z.P Pausheva. – М.: Agropromizdat, 1988. – 271 s.
12. Mokronosov A.T. Metodika kolichestvennoj ocenki struktury i funkcionalnoj aktivnosti fotosinteziruemyx tkanej i organov / A.T. Mokronosov, R.A. Borzenkova // Tr. po prikladnoj botanike, genetike i selekcii. – 1978 – Vyp. 3. – S. 119-133.
13. Opredelenie mezostrukturnyx karakteristik fotosinteticheskogo apparata rastenij: rukovodstvo k laboratornym zanyatiyam bolshogo specpraktikuma po fiziologii i bioximii rastenij / [sost. R.A. Borzenkova, E.V. Xramcova]. – Ekaterinburg: Izdatelstvo Uralskogo universiteta, 2006. – 27 s.
14. Lakin G.F. Biometriya / Lakin G.F. – М.: Vysshaya shkola, 1990. – 351 s.

РОЗДІЛ II. ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ТВАРИН

УДК 597.6/.9-14,9-15

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ПО БИОЭКОЛОГИИ И РАСПРОСТРАНЕНИЮ ВОСТОЧНОЙ КВАКШИ (*HYLA ORIENTALIS* BEDRIAGA, 1890) В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Гасимова Г.Х.

Институт зоологии НАН Азербайджана
AZ 1073, Азербайджан, Баку, ул. А.Аббасзаде, проезд 1128, квартал 504

gqasimova@mail.ru

В результате исследований было выяснено, что *Hyla orientalis* (Bedriaga, 1890) предпочитает обитать в биотопах с преобладанием ясеня (*Alnus barbata*), ежевики (*Rubus sp.*), и папоротника (*Dryopteris Adans*). В характерных биотопах численность квакши насчитывает 25–60 особей на один гектар. Размножение проходит в водоемах с жесткостью воды рН=6,48–7,60. Во время наблюдений метаморфоза были выявлены специфические особенности биологии головастиков.

Ключевые слова: восточная квакша, биоэкология, распространение, Азербайджан.

ДЕЯКІ ВІДОМОСТІ З БІОЕКОЛОГІЯ ТА ПОШИРЕННЯ СХІДНОЇ КВАКШІ (*HYLA ORIENTALIS* BEDRIAGA, 1890) В АЗЕРБАЙДЖАНІ

Гасимова Г.Х.

Институт Зоологии НАН Азербайджану
AZ 1073, Азербайджан, Баку, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504

gqasimova@mail.ru

У результаті досліджень було з'ясовано, що *Hyla orientalis* (Bedriaga, 1890) воліє мешкати в биотопах із переважанням ясеня (*Alnus barbata*), ожини (*Rubus sp.*) та папороті (*Dryopteris Adans*). У характерних біотопах чисельність квакші налічує 25-60 особин на один гектар. Розмноження проходить у водоймах із жорсткістю води рН = 6,48-7,60. Під час спостережень метаморфоза були виявлені специфічні особливості біології пуголовків.

Ключові слова: східна квакша, біоекологія, поширення, Азербайджан.

SOME DATA ON THE BIOECOLOGY AND DISTRIBUTION OF *HYLA ORIENTALIS* BEDRIAGA, 1890 IN AZERBAIJAN

Gasimova G.H.

Institute of Zoology, NAS of Azerbaijan
AZ 1073, Azerbaijan, Baku, Pass. 1128, block 504

gqasimova@mail.ru

Common tree frog *Hyla arborea* (Linnaeus, 1758), common in Europe from the south of Sweden, south of Lithuania through Belarus and southern Russia to the Mediterranean and from the Atlantic coast to the Middle East. However, according to the latest researches conducted on the species genome, populations of *H. arborea* from different regions of Europe divided into several types. While in the east of the area is likely to inhabit *Hyla orientalis* (Bedriaga, 1890). Based on these data we can say that the species distributed in Azerbaijan is *H. orientalis*. And in the southeastern part of Azerbaijan spread new subspecies *H. orientalis gumilevskii* Litvinchuk et al., 2006.

We can note that the taxonomic status of this species in the territory of Azerbaijan need to be studied. Main purpose of this research is to study biology, ecology, distribution of *H. orientalis* and state of the population in the northeastern territories of Azerbaijan.

The material for this work were collections of common tree frog held during 2007-2014 in the territory of Balakan, Zagatala, Gakh, Oguz and Guba regions of Azerbaijan.

Census was held visually during the breeding season (April-May) in permanent and temporary forest ponds. The acidity of the water was determined by means of the microprocessor 211 (pH)-meters, and coordinates of different populations using the device GPS Garmin eTrex.

The species was registered in the north-western and north-eastern regions of Azerbaijan: Balakan, Zagatala, Oghuz, Gakh and Guba districts.

According to literary data the species is found out in the western regions of the republic, too. Results of studying the habitats of the common tree frog in the Sheki-Zaqatala region showed that the species is widely distributed in the broad-leaved and mixed forests. Our studies show that in the Sheki-Zagatala zone of Azerbaijan the common tree frog lives in deciduous and mixed forests. On the territory of Zagatala and Balakan regions in dense forests with a predominance of alder (*Alnus barbata*), blackberry (*Rubus* sp.) and fern (*Dryopteris Adans.*) population density of the species reaches 40-60 individuals per hectare, whereas in more sparse forests of Oguz district it is lower - 25-30, and in the forests of Gakh and Guba districts 20-25 individuals per hectare. This census of population conducted in the habitats typical for common frog in the period of its greatest activity. Reproduction of common tree frog and intensity of its development depending on environmental factors was studied in 3 spots of registration areas.

The least tailless amphibians in Azerbaijan belong to genus *Hyla*. Common tree frog is also from this genus. On computer program of STATISTICA StatSoft 10 the morphometric measurements of 24 individuals were carried out according to 8 features and 4 indices. According to results of measurement: L=32,0-46,2 mm (in literature L=26,4-53mm), D.p.= 3,2-4,9mm, C.int.= 1,2-2,9mm, NL=1,6-3,4mm.

As a result of researches it was revealed that *Hyla orientalis* (Bedriaga, 1890) prefers biotops rich in alder (*Alnus barbata*), blackberry (*Rubus* sp.) and fern (*Dryopteris Adans.*). The number of individuals per hectare is changed between 25 and 60 in typical biotops. Breeding occurs in permanent and temporary forest ponds when the air temperature is 19-35°C, the water temperature is 12-22°C and pH= 6,48-7,60. After mating, the females lay eggs lumps on a distance of 3-5 cm apart at a depth of 20-70 cm in the river dams and in other stagnant waters.

In the studied reservoirs the vegetation is represented mainly by species *Fontinalis* sp. The development of tadpoles of sympatric species *Pseudepidalea variabilis* and *Pelophylax ridibundus* is also observed in the same reservoir.

The tadpoles collected in nature and metamorphose was studied in captivity. Metamorphosis lasts 55-75 days depending on temperature and food factor. It was studied the change of length of the body and the tail per days and the results are presented in graphic. Specific features were revealed in tadpoles during study of their development in the laboratory. Unlike common tree frog tadpoles there is found a light green pear-shaped spot on their backs. According to this spot the species can be determined in the early stage of metamorphosis.

Key words: oriental tree frog, bioecology, distribution, Azerbaijan.

ВВЕДЕНИЕ

В результате молекулярно-генетического анализа и филогеографических исследований представителей рода *Hyla* было выяснено, что ареал *Hyla arborea* не включает территорию Азербайджана. Дело в том, что особи, отмеченные ранее в Азербайджане как *Hyla arborea*, относятся к генетически близкому виду *Hyla orientalis* [1].

Территорию распространения *Hyla orientalis* можно разбить на 2 группы: Кавказо-Каспийскую (обитающую на Кавказе и Южном побережье Каспия) и Западно-Турецкую [2,3]. В целом вид распространен в юго-восточной Европе, западной Анатолии, северном Иране (прикаспийской части) и на Кавказе, включая Азербайджан [4]. В Азербайджане он встречается в северо-восточных, юго-восточных и западных районах (табл.1).

Отмеченная в Лекоранской области Азербайджана популяция вида *Hyla savignyi* очень близка к *Hyla orientalis*, в настоящее время в связи с генетическими отличиями обоих видов выделена в новый подвид – квакша Гумилевского (*Hyla orientalis gumilevskii Litvinchuk et al., 2006*) [5]. Следует отметить, что таксономический статус этого подвида требует дополнительных исследований.

Цель настоящей работы – изучение распространения, биологии, экологии и общего состояния популяции восточной квакши в северо-восточной части Азербайджана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для настоящей работы послужили сборы и наблюдения за особями восточной квакши, проведенные в период 2007 – 2014 гг. на территории Белоканского, Закаतालского, Гахского, Огузского и Губинского районов Азербайджана. Учет численности проводился визуальным методом в период размножения (апрель-май) в постоянных и временных лесных

водоемах, двигаясь вдоль трансекты. В сухих биотопах (август-сентябрь) учет проводился по приблизительному подсчету голосов. При подготовке статьи также использовался материал, хранящийся в коллекции Института зоологии НАН Азербайджана, собранный в Агджабединском и Губинском районах Азербайджана. Были проведены морфометрические измерения 26 особей. Измерялись следующие параметры: **L** – длина тела, **F** – длина бедра, **T** – длина голени, **D.p.** – длина внутреннего пальца задней конечности, **C.int.** – наибольшая длина пяточного бугра внутреннего пальца задней конечности, **EAD** – расстояние между передними углами глаз, **EPD** – расстояние между задними углами глаз, **NL** – расстояние от носового отверстия до верхней губы, а также некоторые индексы.

Для сбора головастиков использовалась мелкоячеистая сеть. Морфометрические измерения, в соответствии с общепринятой методикой проводились с помощью штангенциркуля со шкалой деления 0,1 мм. Полученные данные обрабатывались с использованием программы STATISTICA StatSoft 10.

Во время исследования измерялась глубина и определялся растительный состав изучаемых водоемов. Кроме этого, измерялась температура воды и воздуха, а также кислотность воды (рН). Кислотность воды определялась с помощью 211 микропроцессорного (рН) –метра, а координаты локализации различных популяций – с помощью прибора GPS Garmin eTrex. Метаморфоз собранных головастиков изучался в лабораторных акватеррариумах в условиях, максимально приближенных к естественным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В статьях по герпетофауне Азербайджана сведения по биологии, морфологии и местам обитания *Hyla orientalis* скудны и фрагментарны.

Квакши являются самыми маленькими бесхвостыми амфибиями в фауне Азербайджана. Размеры изученной популяции восточной квакши варьируют в пределах 32,0-46,2 мм (табл. 2), а согласно литературным данным – от 26,4 до 53 мм. Окраска верхней части тела в зависимости от субстрата может меняться от зеленой до светло-серой и темно-коричневой. Брюшная часть желтоватая. У самцов вследствие наличия резонаторного мешка горловая область сравнительно темная. Начиная от носовых отверстий по поверхности глаза и барабанных перепонок, проходит черная полоса с белым окаймлением. Эта полоса, по бокам протягиваясь до конца тела, делит его на спинную и брюшную части. В паховой области имеется линия в виде петли, что является отличительным признаком вида (рис.1). У подвида *Hyla orientalis gumilevskii* такой петлевидный рисунок отсутствует. Как и у всех древесных лягушек, на кончиках пальцев находятся дисковидные присоски.



Рис. 1. Половозрелая особь *Hyla orientalis* Гахский район, село Лякид (Фото: Т.М.Искендеров).

Таблица 1 – Точки находок *Hyla orientalis* на территории Азербайджана (отмеченные нами)

№	Район (локалитет)	Широта	Долгота	Высота	Дата
1	Белоканского р-н, Пошбина	N41°46'53"	E46°19'59"	338	30.07.2013
2	Белоканского р-н, Катех	N41°41'58"	E46°35'00"	536	14.06.2012
3	Закатальского р-н, Мацех	N41°40'43"	E46°34'39"	255	16.06.2012
4	Закатальского р-н, «Беш булаг»	N41°40'62"	E46°27'94"	256	25.06.2013
5	Огузский р-н, Даймадара	N40°56'14"	E47°34'16"	398	03.05.2012
6	Гахскогор-н, Лякид	N41°41'31"	E46°27'50"	600	15.06.2007
7	Губинского р-н, Разалар	N41°13'29"	E48°41'35"	453	09.05.2014

Восточная квакша предпочитает густые леса, изредка встречается на опушках леса и порой заходит в субальпийский пояс. Самая высокая точка распространения в Азербайджане была отмечена в Кедабекском районе на высоте 2200 м над уровнем моря [6]. Наши исследования показывают, что в Шеки-Закатальской зоне Азербайджана восточная квакша обитает в широколиственных и смешанных лесах. На территории Закатальского и Белоканского районов в густых лесах с преобладанием ольхи (*Alnus barbata*), ежевики (*Rubus sp.*) и папоротника (*Dryopteris Adans.*). Плотность популяции достигает 40-60 особей на гектар, тогда как в более разреженных лесах Огузского района она ниже – 25-30 особей, а в лесах Гахского и Губинского района 20-25 особей на гектар. Данный учет численности популяций восточной квакши проводился в типичных биотопах ее обитания в период наибольшей активности. Согласно нашим наблюдениям, а также литературным данным данный вид активен с начала марта по ноябрь. В литературе отмечается их основная суточная активность в сумеречное и ночное время, однако по нашим наблюдениям активные крики квакши были отмечены и в дневное время суток [7]. Брачные трели регистрировались вплоть до второй декады сентября при благоприятной погоде.

Таблица 2 – Морфометрические параметры (индексы) восточной квакши

Параметры	♂♂ + ♀♀					
	n	M	Min	Max	SE	SD
L	26	39,64	32,00	46,20	3,33	0,65
F	26	20,17	16,50	23,60	1,56	0,30
T	26	19,04	16,30	21,20	1,22	0,24
D.p.	26	4,08	3,20	4,90	0,43	0,09
C.int.	26	1,80	1,20	2,90	0,56	0,11
EAD	26	7,15	5,70	7,90	0,57	0,11
EPD	26	11,31	8,40	12,90	1,03	0,20
NL	26	2,57	1,60	3,40	0,50	0,10
L/T	26	2,06	1,80	2,30	0,13	0,03
F/T	26	1,21	0,90	4,80	0,74	0,15
T/C.int.	26	11,48	5,80	15,70	3,01	0,59
D.p./C.int.	26	2,48	1,30	3,60	0,65	0,13

Примечания: некоторые внешние морфологические параметры *Hyla orientalis*: (n–число исследованных особей, M–средняя арифметическая, Min–минимум, Max–максимум, SE–стандартная ошибка средней, SD–стандартное отклонение).

Размножение начинается с первой декады апреля. Самцы появляются в водоемах раньше самок. Спаривание в основном происходит на суше, хотя в некоторых случаях может быть и

в водоемах. Самки после откладки икры сразу покидают водоемы, а самцы в течение некоторого времени остаются там.

Согласно литературным данным, готовящиеся к спариванию самцы делятся на 3 группы. К первой относятся самцы, которые издают брачные крики, находясь в водоеме. Ко второй – самцы, которые поют, залезая на листья деревьев и кустарников. Наконец, в третью группу входят самцы, которые вообще не поют в брачный период. Их называют сателлитами [8]. Амплексус бывает в виде подмышечной формы. После спаривания самки откладывают комки икринок на расстоянии 3-5 см друг от друга на глубине 20-70 см в запрудах рек и в других водоемах со стоячей водой (рис.2). Во время высыхания временных водоемов икра способна противостоять высыханию в течение длительного периода.

В исследованных водоемах растительность была представлена в основном видом *Fontinalis sp.* Следует отметить, что в водоемах наряду со свежееотложенной икрой встречались также и головастики того же вида. В зависимости от температуры воды головастики вылуплялись из икринок через 8-14 дней после откладки икры. Икринки имеют грушевидную форму и темно-зеленый цвет. Плавательная перепонка (хвоста) начинается в верхней части тела, недалеко от глаз. Кончик хвоста заострен.

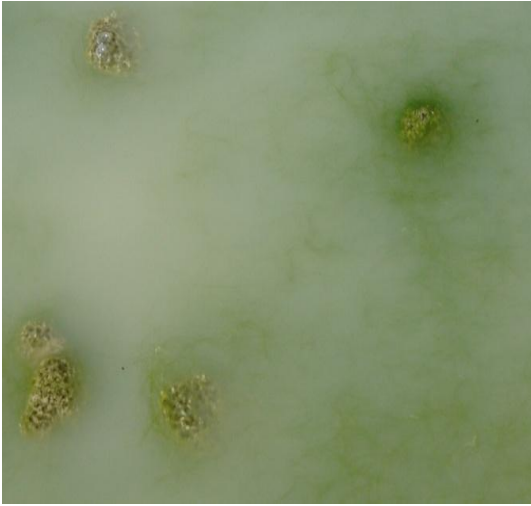
В отличие от малоазиатской квакши у головастиков восточной квакши имеется четкий грушевидный зеленый узор на спинной части тела (рис.3). Зубная формула соответствует 1:1+1/3 (рис.4). В брюшной части из-под кожного покрова четко просматривается кишечник. Метаморфоз длится 55-75 дней. Было прослежено развитие головастиков в водоемах около с. Мацех Закатальского района (рН=6,48) с низким уровнем антропогенного воздействия, а также в водоемах с. Пошбина Белоканского района (рН=7,30) с высоким загрязнением бытовыми отходами (табл.3). Также наблюдалось развитие головастиков симпатрических видов *Pseudopidalea variabilis* и *Pelophylax ridibundus*.

Таблица 3 – Некоторые показатели условий среды размножения *Hyla orientalis* в разных местностях

Показатель	Белоканский р-н (Катех)	Закатальский р-н (Мацех)	Огузский р-н (Даймадара)
Температура воздуха, °С	21°С	19°С	35°С
Температура воды, °С	14°С	12°С	22°С
рН	7,30	6,48	7,60

Прослежено развитие головастиков в лабораторных условиях (рис.5). Следует отметить, что характерным признаком данного вида является превосходство длины хвоста над длиной тела у головастиков, вылупившихся из икринок. В течение первых 18-20 дней наблюдался быстрый темп развития.

Несмотря на стабильность температуры, но в связи с недостаточным питанием к 30-36-му дню наблюдалось лишь незначительное увеличение тела и хвоста. Начиная с 36-го дня, у головастиков началось уменьшение размеров хвоста. На 55-й день начали появляться признаки задних конечностей. На 62-й день стали проявляться признаки передних конечностей и одновременно резкое уменьшение длины хвоста. На 70-75-й день у завершивших метаморфоз особей в течение 2-3 дней в области соединения тела и остатка хвостовой части бросается в глаза избыток пигментов, придающих темный цвет этой части (рис.6).

Рис. 2. Икра *Hyla orientalis*Рис. 3. Головастики *Hyla orientalis*Рис. 4. Ротовой аппарат головастика *Hyla orientalis*

Полностью завершившие развитие личинки ведут пелагический образ жизни. Половой зрелости они достигают на 3-4 год жизни. Максимальная продолжительность жизни отмечалась до 12 лет. Годовалые особи поедаются *P. ridibundus*, а половозрелые – различными пресмыкающимися и некоторыми птицами. Наблюдалось поедание икринок личинками (каннибализм). Также погибшие головастики поедаются живыми сородичами.

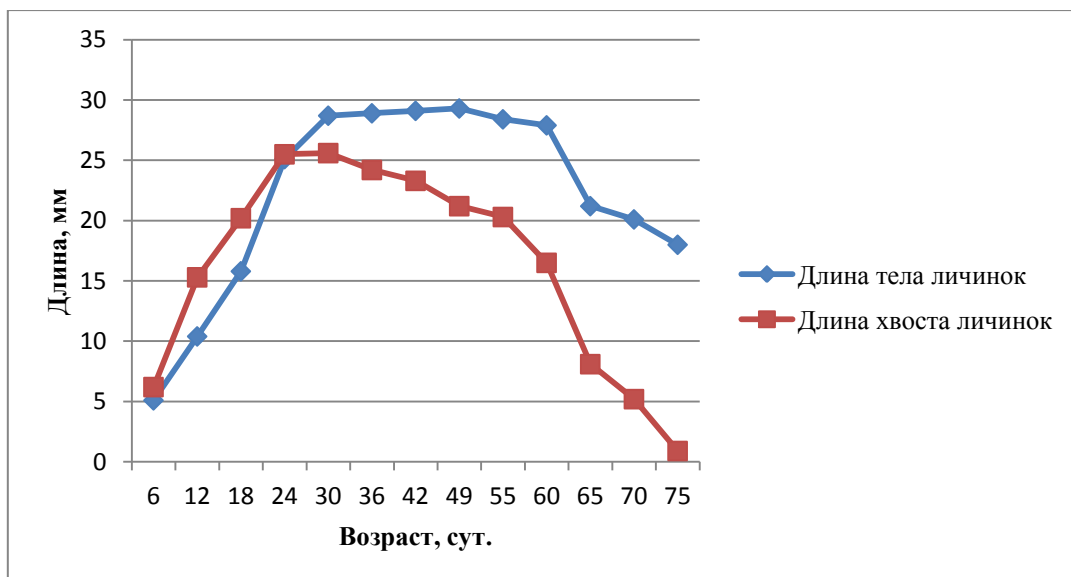
Рис.5. Изменение длины тела и хвоста у головастиков *Hyla orientalis* в процессе метаморфоза



Рис.6. Особь *Hyla orientalis*, достигшая половой зрелости

Перспективы дальнейшего исследования – детальное изучение биологии и экологии восточной квакши в Азербайджане. Информация о северо-восточной популяции в будущем может быть использована для сравнительного изучения других популяций.

ВЫВОДЫ

1. В годы с благоприятными температурными условиями (2012) пение самцов *Hyla orientalis* наблюдалось вплоть до начала сентября, что указывает на то, что период размножения у данного вида может длиться с апреля по сентябрь.
2. Наружный грушевидный узор, появляющийся на теле головастиков *Hyla orientalis* в начальной стадии их развития, является видоспецифичным признаком.
3. В лабораторных условиях установлена роль температурного и трофического факторов на развитие головастиков восточной квакши.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гасымова Г.Х. Современная систематика амфибий Азербайджана / Г.Х. Гасымова, Ф.Р. Ганиев // АМЕА Zoologiya institutunun əsərləri. XXIX cild – Bakı: Elm. – 2011. – С. 358-362.
2. Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a newspecies / V. Gvoždík, J. Moravec, C. Klütsch, P. Kotlík // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2010. – Vol. 55. – P. 1167-1176.
3. Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. / [Stöck M., Dubey S., Klütsch C. et al] // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2008. – Vol. 49. – P. 1019-1024.
4. Gül S. Patterns of distribution of tree frogs in Turkey based on molecular data. / S. Gül, B. Kutrup, N. Özdemir // Amphibia-Reptilia. 2012. – Vol. 33, №1. – P. 95-103.
5. Allozyme and genome size variation in tree frogs from the Caucasus, with description of a new subspecies *hyla arborea gumienskii*, from the Talysh mountains. / S.N. Litvinchuk, L.J. Borkin, J.M. Rosanov, D.V. Skorinov // Russian Journal of Herpetology. – 2006. – Vol. 13. № 3. – P. 187-206.
6. Велиева З.Д. Экология квакши шелковникова в биоценозах юго-востока Азерб.ССР / З.Д. Велиева // Ученые записки. – 1978. – №4. – С. 38-39.
7. Алекперов А.М. Земноводные и пресмыкающиеся Азербайджана / А.М. Алекперов. – Баку: Элм. – 1978. – 264 с.
8. Писанец Е.М. Амфибии Украины / Е.М. Писанец. – К.: Зоологический музей ННПМ НАН Украины. – 2007. – 310 с.

REFERENCES

1. Gasyмова G.H. *Sovremennaja sistematika amfibij Azerbajdzhana* / G.H. Gasyмова, F.R. Ganiev // *AMEA Zoologiya institutunun əsərləri. XXIX cild – Bakı: Elm. – 2011. – S. 358-362.*
2. Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (Hyla, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a newspecies. / V. Gvoždík, J. Moravec, C. Klütsch, P. Kotlík. // *Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2010. – Vol. 55. – P. 1167-1176.*
3. Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the Hylaarborea group. / [Stöck M., Dubey S., Klütsch C. et al] // *Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2008. – Vol.49. – P. 1019-1024.*
4. Gül S. Patterns of distribution of tree frogs in Turkey based on molecular data. / S.Gül, B.Kutrup, N.Özdemir // *Amphibia-Reptilia. 2012. – Vol. 33, №1. – P. 95-103.*
5. Allozyme and genome size variation in tree frogs from the Caucasus, with description of a new subspecies *hylaarboreagumilevskii*, from the talysh mountains. / S.N. Litvinchuk, L.J. Borkin, J.M. Rosanov, D.V. Skorinov // *Russian Journal of Herpetology. – 2006. – Vol. 13. № 3. – P. 187-206.*
6. Velieva Z.D. *Jekologija kvakshi shelkovnikova v biocenozah jugo-vostoka Azerb.SSR* / Z.D. Velieva // *Uchennie zapiski im.S.M.Kirova. – 1978. – №4. – S. 38-39.*
7. Alekperov A.M. *Zemnovodnye i presmykajushiesja Azerbajdzhana.* / A.M. Alekperov. – Baku: Jelm. – 1978. – 264 s.
8. Pisanec E.M. *Amfibii Ukrainy* / E.M. Pisanec. – Kiev: Zoologicheskij muzej NNPM NAN Ukrainy. – 2007. – 310 s.

УДК 598.2

ХАРАКТЕРИСТИКА ОРНИТОЛОГІЧНОЇ СИТУАЦІЇ НА ОСТРОВІ БІРЮЧИЙ У СЕРПНІ 1995 ТА 2012 РОКІВ

Горлов П.І., ¹Костюшин В.А., Сіохін В.Д., Белашков І.Д.

*НДІ Біорізноманіття наземних та водних екосистем півдня України
Мелітопольський державний педагогічний університет ім. Богдана Хмельницького
72312, Україна, Запорізька обл., Мелітополь, вул. Леніна, 20*

¹*Інститут зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України
01601, Україна, Київ, вул.Б.Хмельницького, 15*

petro-gorlov@mail.ru; kost@izan.kiev.ua

У статті наведені результати обліків птахів, проведені на найбільш цінних ділянках о-ва Бірючий (Азовське море) у серпні 1995 та 2012 роках. Усього зареєстровано 90 видів птахів, які належать до 14 рядів. У 1995 році видове різноманіття птахів було нижчим, ніж у 2012 році – 57 та 77 видів відповідно. Загальна чисельність птахів у 1995 році склала 14461 ос., а у 2012 році – 19392 ос. У 1995 році відмічено 245 ос. 6 видів, а у 2012 році – 69 ос. 12 видів, яких занесено до Червоної книги України.

Ключові слова: Азовське море, о-в Бірючий, орнітофауна

ХАРАКТЕРИСТИКА ОРНИТОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ НА ОСТРОВЕ БИРЮЧИЙ В АВГУСТЕ 1995 И 2012 ГОДОВ

Горлов П.И., ¹Костюшин В.А., Сихин В.Д., Белашков И.Д.

*НИИ Биоразнообразия наземных и водных экосистем юга Украины
Мелитопольский государственный педагогический университет им. Богдана Хмельницкого
72312, Украина, Запорожская обл., Мелитополь, ул. Ленина, 20*

¹*Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины
01601, Украина Киев, ул.Б.Хмельницкого, 15*

petro-gorlov@mail.ru; kost@izan.kiev.ua

В статье приводятся результаты учетов птиц, проведенные на наиболее ценных участках о-ва Бирючий (Азовское море) в августе 1995 и 2012 гг. Всего зарегистрировано 90 видов птиц, принадлежащих к 14 отрядам. В августе 1995 г. видовое разнообразие птиц было ниже, чем

в 2012 г. – 57 и 77 видов, соответственно. Общая численность учтенных птиц в 1995 г. составила 14461 ос., а в 2012 – 19392 ос. В 1995 г. было отмечено 245 ос. 6 видов, а в 2012 г. – 69 ос. 12 видов, которые внесены в Красную книгу Украины.

Ключевые слова: Азовское море, о-в Бирючий, орнитофауна

CHARACTERISTIC OF ORNITHOLOGICAL SITUATION ON BIRYUCHII ISLAND IN AUGUST 1995 AND 2012

Gorlov P.I., ¹Kostiushyn V.A., Siokhin V.D., Belashkov I.D.

*Research Institute of Biodiversity of terrestrial and aquatic ecosystems of Ukraine
Melitopol State Pedagogical University the Bohdan Khmelnytsky
72312, Ukraine, Zaporizhs'ka oblast, Melitopol, Lenina str., 20*

¹*Institute of zoology NAS Ukraine
10601, Ukraine, Kiev, B.Khmel'nitskogo str., 15*

petro-gorlov@mail.ru; kost@izan.kiev.ua

Bird counts on Biryuchii Island (Azov Sea) were conducted 9 - 10 August 1995 and 8 - 9 August 2012. In both cases were used combination of car and pedestrian counts: in 1995 – 65 km and 7 km, and in 2012 – 75 km and 10 km, respectively. Car counts have included number of stops at observation points to conduct bird counts using binoculars and telescopes. The area covered by counts in both years was about 70 % of the island total area.

The observations were made using binoculars 8-10x and telescope 20-60x. Mapping of the birds locations, location of observation points and counting routs was done using a GPS navigator.

During two bird counts on Biryuchii Island in total were found 33853 birds of 90 species: in Aug 1995 – 14,461 individuals of 57 species, in Aug 2012 – 19,392 individuals of 77 species. Taxonomically these birds belong to 14 orders. In 1995 the most numerous were Anseriformes (8524 individuals or 58,9% of the total number of birds), in 2012 the most numerous was Charadriiformes (13550 individuals or 69,9%). Species diversity of these groups in both years was relatively stable: Anseriformes – 12 species in 1995, 11 in 2012; Charadriiformes – 25 and 28 species, respectively.

The most numerous bird species in 1995 were *Anas platyrhynchos* – 3826 (26,46 %), *Aythya ferina* – 3002 (20,76 %), *Tringa totanus* – 1463 (10,12 %), *Fulica atra* – 1315 (9,09 %), *Larus ridibundus* – 996 (6,89%), *Anser anser* – 620 (4,29%), *Tadorna ferruginea* – 520 (3,60%), *Podiceps cristatus* – 481 (3,33%), *Cygnus olor* – 429 (2,97%), *Aythya fuligula* – 246 (1,70%), *Sterna hirundo* – 239 (1,65 %), *Anas querquedula* – 219 (1,51%).

In 2012 a composition of the most numerous species was partly different: *Larus ridibundus* – 9058 (46,71%), *Aythya ferina* – 2446 (12,61%), *Larus genei* – 1482 (7,64%), *Thalasseus sandvicensis* – 1230 (6,34%), *Anas platyrhynchos* – 743 (3,83%), *Podiceps cristatus* – 657 (3,39%), *Tringa totanus* – 577 (2,98%), *Chlidonias leucopterus* – 450 (2,32%), *Anas querquedula* – 414 (2,13%), *Fulica atra* – 337 (1,74%), *Cygnus olor* – 323 (1,67%), *Larus cachinnans* – 261 (1,35%), *Gelochelidon nilotica* – 254 (1,31%), *Phalacrocorax carbo* – 253 (1,30%).

Comparison of species diversity recorded in 1995 and 2012 demonstrate that 44 species were the same for both years, and composed 99.2% and 87.6% of the total bird numbers, respectively.

Differences in species composition and number of the birds are determined by different reasons. For example, sharp decrease in number of *Anas platyrhynchos* possibly related to aridization of climate, which leads to decreasing the area of the bitopes favorable for breeding of this species. Decreasing abundance of this species is typical for the whole Azov-Black sea region of Ukraine. In total about 10 species of waterbirds in 2012 had very low numbers that related to very dry conditions of this season and, due to this, extinction of many small wetlands on Biryuchii Island. It is also worth to mention strong decreasing in number *Anser anser* during last decade or even bigger period. Reason of this is not clear, but such tendency is typical for South Ukraine. High number of some gulls (*Larus genei*, *Larus ridibundus*) and terns (*Thalasseus sandvicensis*, *Gelochelidon nilotica*) is not a result of changes in land use or conservation regime of Biryuchii island, but related with post breeding local movements of birds and beginning of migratory season for some species.

In general, number of 55 bird species (61% of all species recorded in 1995 and 2012) were stable, 23 species (25,6%) decreased their number, and 6 (6,7 %) – increased it. The rest 6 species were recorded only in 2012.

In 1995 were recorded 245 individuals of 6 bird species included in Red Data Book of Ukraine. The most common were *Charadrius alexandrinus* (131 birds) and *Haematopus ostralegus* (77 birds). In 2012, it was counted 69 birds of 12 protected species. The most common among them was *Haematopus ostralegus* (27 birds).

Based on obtained data, Vershinskii Liman, Olen' Liman and Yamkivs'kiy Liman were recognized as key areas for protected species on Biryuchii Island.

Key words: Azov-Sea, Biryuchii Island, avifauna

ВСТУП

Водно-болотні угіддя і в Україні, і у світі зазнають значного негативного антропогенного впливу – забудова, забруднення, фактор неспокою, мисливство тощо. До цього в останні десятиріччя додався вплив змін клімату. Тому вивчення змін чисельності водно-болотних птахів є одним із сучасних пріоритетів світової орнітології та охорони птахів. Невід’ємною частиною останньої є такі практичні заходи, як створення заповідних об’єктів та внесення видів, які перебувають під загрозою, до міжнародних «червоних» списків і національних «червоних» книг. Зрозуміло також, що оцінка сучасного стану видів тваринного світу, а також ефективності природоохоронних заходів неможливі без проведення моніторингу біоти.

Зважаючи на наведене вище, ця публікація представляє результати досліджень орнітофауни частини Азово-Сиваського національного парку – о. Бірючий, який, крім суходолу, включає низку локальних водно-болотних угідь та узбережжя акваторії Азовського моря, а також Утлюцький лиман. Хоча ця територія має статус національного парку, моніторинг її біорізноманіття ще не набув належного рівня. Тому ця публікація є суттєвим внеском у вивчення орнітофауни національного парку і формування основи для комплексного орнітологічного моніторингу в ньому. Будучи одним з об’єктів природно-заповідного фонду Азово-Чорноморського регіону України, які відповідно до законодавства країни мають вести моніторингові роботи, Азово-Сиваський національний природний парк може стати важливою частиною загальнодержавної системи моніторингу біорізноманіття і міжнародних програм моніторингу водно-болотних птахів. Слід зауважити, що о. Бірючий має трансконтинентальне значення як важливе місце перебування птахів під час сезонних міграцій. Крім цього, моніторинг стану орнітофауни о. Бірючий є дуже важливим для оцінки його екологічного стану та ефективності природоохоронних заходів, які виконуються в національному парку.

В основі цієї публікації матеріали найбільш повних серпневих орнітологічних спостережень, проведених у 1995 та у 2012 роках. Обліки, проведені до початку сезону полювання, відображають стан орнітокомплексів на цій території в післягніздовий період та на початку формування осінніх передміграційних скупчень. Такі дані є найбільш інформативними для визначення видового складу, поширення птахів та їх чисельності, успіху розмноження в поточному році, а також деяких фенологічних аспектів річного циклу. Саме порівняння результатів серпневих обліків, між якими минуло 17 років, та пошук суттєвих відмінностей і є однією з важливих цілей наших досліджень. Іншою метою дослідження є закладення основ для подальшого моніторингу стану орнітофауни о-ва Бірючий, як складової частини Азово-Сиваського національного природного парку.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження орнітологічної ситуації на о. Бірючий були проведені 9-10 серпня 1995 року та 8-9 серпня 2012 року. В обох випадках використовували пішохідні та автомобільні методи обліку птахів. Загальна довжина автомобільного маршруту відповідно складала 65 та 75 км, а пішохідного – 7 та 10 км. Площа, охоплена обліками птахів, складала в обидва сезони не менше 70%, причому водно-болотні угіддя обстежені майже на 100%, суходіл – 50% (рис.1).

У водно-болотних угіддях облік проводився в межах спеціально виділених ділянок на піших та автомобільних маршрутах уздовж водойм із зупинками в місцях, з яких добре проглядалися відкриті акваторії, і оглядом їх за допомогою телескопа. Для максимально повного охоплення водойми поле огляду чергової ділянки акваторії перекривалося з попереднім.

Точкові обліки, тривалістю по 5-10 хвилин через кожні 250 - 400 м (залежно від складності біотопу), здійснювали переважно в деревно-чагарникових біотопах, штучних лісах, де візуальний облік птахів найчастіше є ускладненим.

У місяцях концентрації птахів робились тривалі зупинки, достатні для детального встановлення видового складу та чисельності скупчень птахів. Спостереження проводилися за допомогою біноклів 8-10х та телескопа 20-60х. Для визначення видової приналежності, статі, віку птахів, а також характеристики перехідних нарядів використовували визначник птахів Європи (Collins Bird guide/Second edition, 2009). Картування місць скупчень птахів та облікових маршрутів зроблені за допомогою GPS навігатора.

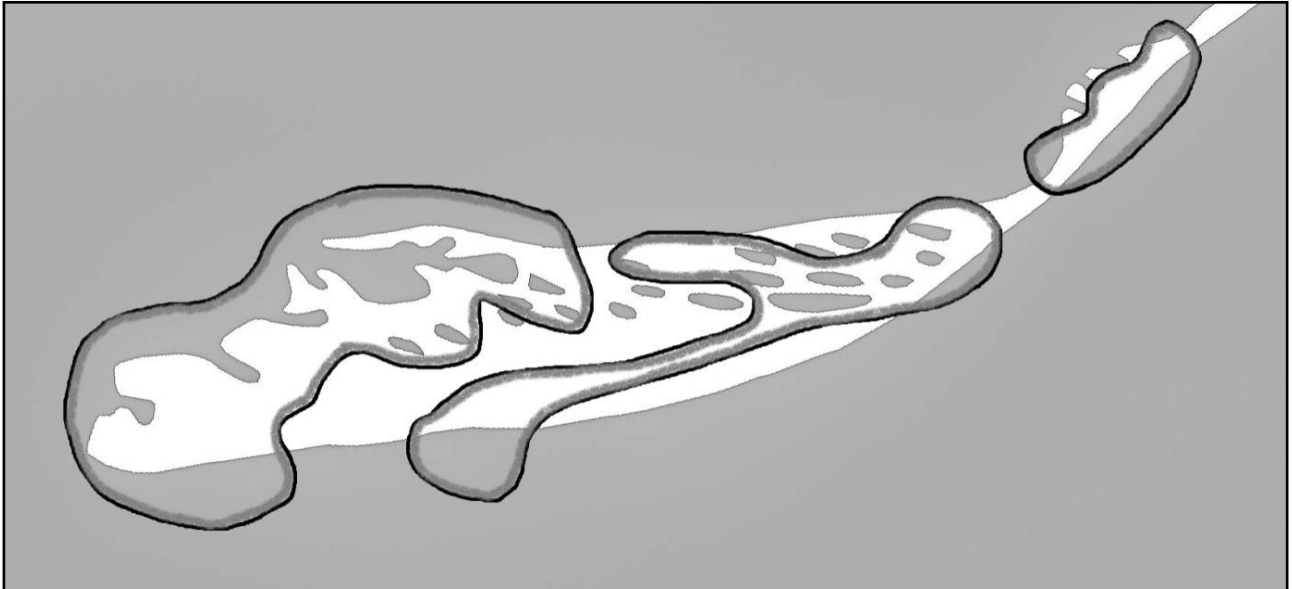


Рис. 1. Ділянки о. Бірючий, охоплені обліками птахів у 1995 та 2012 роках

результати та їх обговорення

1. ТАКСОНОМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОРНІТОКОМПЛЕКСІВ

На о. Бірючий у серпні за обидва періоди спостережень зареєстровано 90 видів птахів, які належать до 14 рядів (табл. 1). У 1995 році видове різноманіття було нижче, ніж у 2012 році – 57 та 77 видів відповідно (табл. 2 та 3). Загальна чисельність птахів у 1995 році склала 14461 ос., а у 2012 році – 19392 ос. Перелік видів, їх чисельність та розміщення на облікових ділянках відображають дані таблиць 2 та 3, а співвідношення таксонів по роках наведено на рис. 2 та 3.

Порівнюючи співвідношення таксонів у різні роки, бачимо чисельне домінування представників ряду гусеподібних у 1995 році (8524 ос., або 58,9% від загальної чисельності птахів). Натомість у 2012 році домінували види сивкоподібних птахів (13550 ос., або 69,9%). Видове різноманіття цих груп в обидва роки було доволі стабільним. Гусеподібні нараховували 12 (1995 рік) та 11 (2012 рік) видів, а сивкоподібні – 25 та 28 видів відповідно (табл. 1).

Склад видів птахів інших таксонів також є стабільним, а незначне коливання в кількості зареєстрованих видів у різні сезони пояснюється більш детальним обстеженням окремих біотопів. Така ситуація склалася з виявленням деяких представників горобцеподібних птахів (18 видів у 2012 році) через спеціальні спостереження в штучних лісових масивах та більш детальне обстеження суходолу.

Таблиця 1 – Таксономічна характеристика орнітокомплексу о. Бірючий за результатами спостережень 1995 та 2012 рр.

№	Ряд		Чисельність у 1995 році		Чисельність у 2012 році	
	Українська назва	Наукова назва	видів	птахів	видів	птахів
1	Пірникозоподібні	<i>Podicipediformes</i>	2	482	3	688
2	Пелеканоподібні	<i>Pelecaniformes</i>	1	7	1	253
3	Лелекоподібні	<i>Ciconiiformes</i>	5	251	3	118
4	Гусеподібні	<i>Anseriformes</i>	12	8524	11	4130
5	Соколоподібні	<i>Falconiformes</i>	2	4	5	14
6	Куроподібні	<i>Galliformes</i>	1	12	2	27
7	Журавлеподібні	<i>Gruiformes</i>	1	1315	1	337
8	Сивкоподібні	<i>Charadriiformes</i>	25	3852	28	13550
9	Голубоподібні	<i>Columbiformes</i>	-	-	2	4
10	Зозулеподібні	<i>Cuculiformes</i>	-	-	1	1
11	Ракшеподібні	<i>Coraciiformes</i>	-	-	1	1
12	Дрімлюгоподібні	<i>Caprimulgiformes</i>	1	3	-	-
13	Одудоподібні	<i>Upupiformes</i>	1	1	1	4
14	Горобцеподібні	<i>Passeriformes</i>	6	10	18	265
ВСЬОГО			57	14461	77	19392

Аналіз видового різноманіття виявив, що спільними для обох сезонів були 44 види, які в 1995 році увібрали в себе 99,2% від загальної чисельності птахів, а у 2012 році – 87,6%. Такі дані свідчать про повноту проведених обліків. У 1995 році не було відмічено 33 види, які зустрічались у 2012 році. У 2012 році були відсутні 13 видів птахів з тих, що було знайдено в 1995 році. Із цього переліку 23 види є звичайними (сорока, шпак звичайний, ворона сіра, жайворонки та ін.), тому є підстави вважати 67 видів ядром серпневого орнітологічного комплексу о-ва Бірючий.

Порівняння даних за два роки дало цікаву інформацію, пов'язану з загальними тенденціями поширення та чисельності птахів в регіоні. Так, у 2012 році на острові Бірючий спостерігали збільшення чисельності таких видів, як баклан великий, крячок чорнодзьобий та крячок рябодзьобий, а крячок світлокрилий та мартин тонкодзьобий з доволі високою чисельністю взагалі не були зареєстровані в 1995 році.

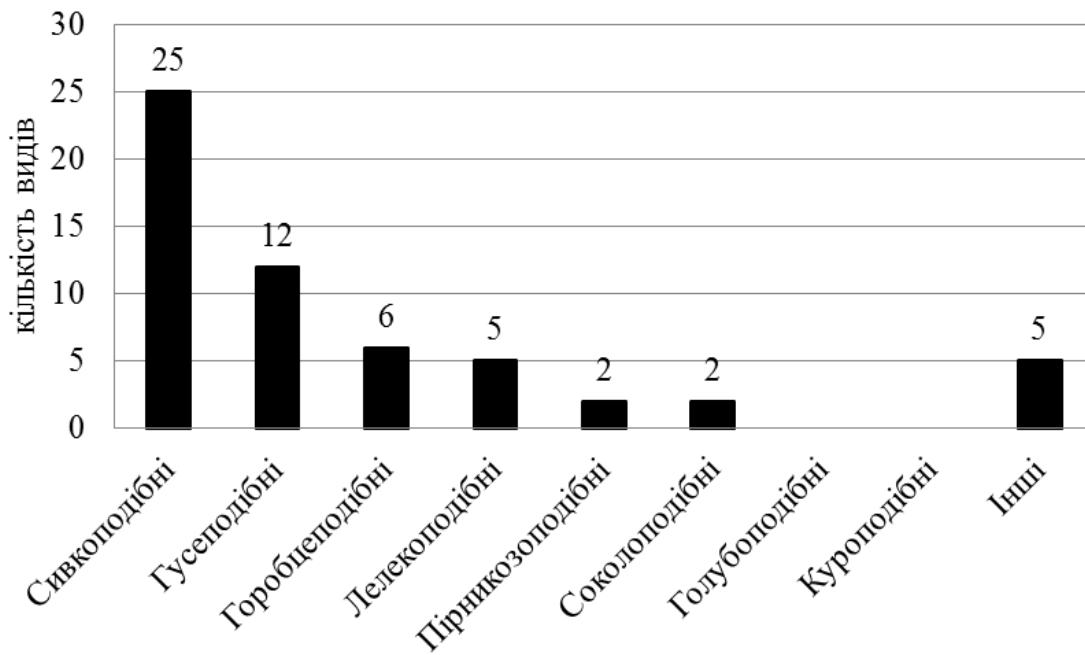


Рис. 2 Видове різноманіття таксономічних груп птахів на о. Бірючий у серпні 1995 року

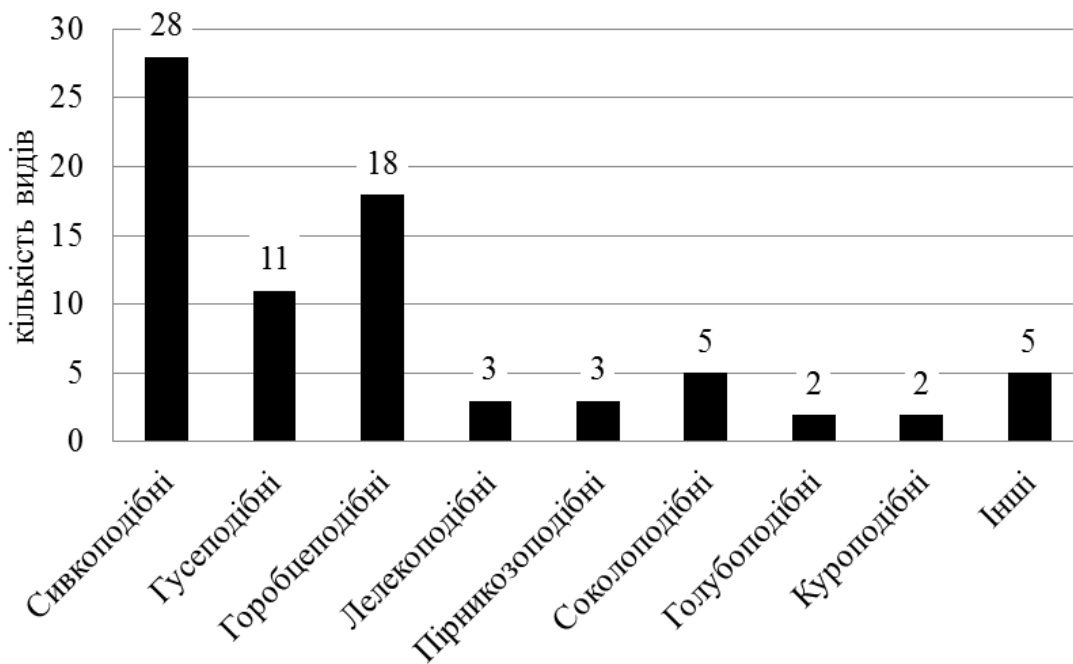


Рис. 3 Видове різноманіття таксономічних груп птахів на о. Бірючий у серпні 2012 року

Близько 10 видів птахів у 2012 році показали низьку чисельність через загальну посушливість сезону, яка призвела до зменшення площі біотопів їх існування. У деяких випадках такі біотопи взагалі зникли, наприклад, система вологих понижень (саги) в 14-17 та 25-28 кварталах. До таких видів належать чаплі, кулики, деякі види крячок та мартинів.

Викликає занепокоєння ситуація, яка склалася з чисельністю гуски сірої та зуйка морського. На тлі загального зниження чисельності цих видів у регіоні, на острові Бірючий у серпні 2012 року зареєстровано всього 4 гуски сірі та 7 зуйків морських (у 1995 р. – 620 ос. та 131 ос. відповідно). Очевидно, потрібні спеціальні заходи для підтримання стабільності популяцій цих видів (штучні домівки для гусей, обмеження рекреаційного навантаження в гніздовий період).

Найбільш чисельні види птахів за результатами обліків 1995 та 2012 представлені на рисунках 4 та 5.

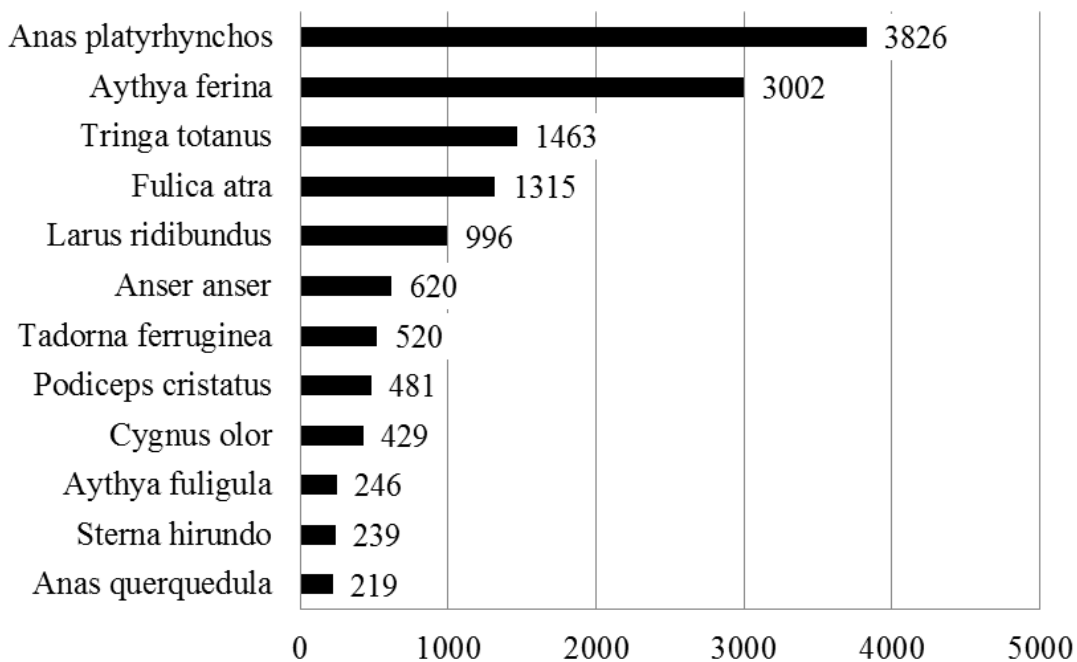


Рис. 4 Найбільш чисельні види птахів за результатами обліків 1995 року

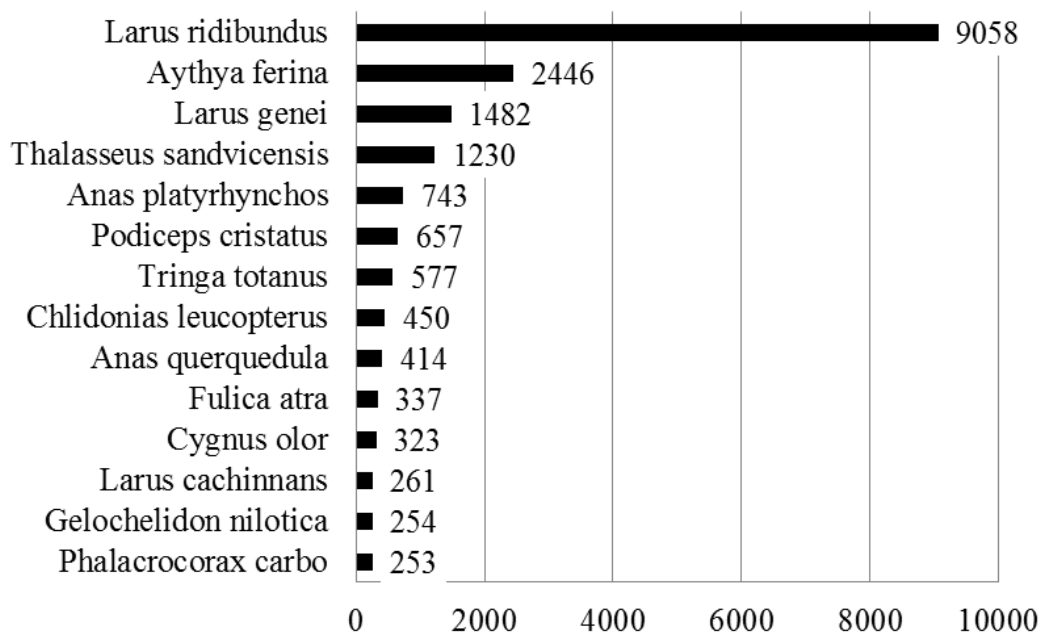


Рис. 5 Найбільш чисельні види птахів за результатами обліків 2012 року

Таблиця 2 – Результати обліків птахів на о. Бірючий 9-10 серпня 1995 року

№	Вид	Ділянки*																		Σ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	<i>Podiceps cristatus</i>			20			65	5	100	4		70		10	62	81	64			481
2	<i>Podiceps nigricollis</i>								1											1
3	<i>Phalacrocorax carbo</i>						1	2		4										7
4	<i>Nycticorax nycticorax</i>						2									1				3
5	<i>Egretta alba</i>		1	10			1	3	2		18	6	6			2				49
6	<i>Egretta garzetta</i>		13	3	2		1			1	46	6	6	4		6	1			89
7	<i>Ardea cinerea</i>	6	2	3			5		3		23	14	39			5	9			109
8	<i>Ardea purpurea</i>		1																	1
9	<i>Anser anser</i>						86			333	9	2	67		19	104				620
10	<i>Cygnus olor</i>	9					48	5	367											429
11	<i>Tadorna tadorna</i>						82									15	1			98
12	<i>Anas platyrhynchos</i>		8	103			144	30	1918	30	73			1000	100	311	109			3826
13	<i>Anas acuta</i>						1													1
14	<i>Anas clypeata</i>										2									2
15	<i>Anas strepera</i>						5													5
16	<i>Anas querquedula</i>			88	17		51		20	4				19		20				219
17	<i>Anas crecca</i>							12		56										68
18	<i>Aythya ferina</i>	194					705		300			1800				3				3002
19	<i>Aythya nyroca</i>											8								8
20	<i>Aythya fuligula</i>															184	62			246
21	<i>Circus aeruginosus</i>				1															1
22	<i>Falco tinnunculus</i>																		3	3
23	<i>Phasianus colchicus</i>																		12	12
24	<i>Fulica atra</i>							1	1000			54		250		10				1315
25	<i>Pluvialis squatarola</i>		1		1	23					5					3				33
26	<i>Pluvialis apricaria</i>		1																	1
27	<i>Charadrius alexandrinus</i>			92		4	3				26							6		131
28	<i>Calidris canutus</i>		2																	2
29	<i>Arenaria interpres</i>			4	1	6				8	4			2			8	6		39
30	<i>Haematopus ostralegus</i>					34					11					5	27			77
31	<i>Galinago galinago</i>														1					1

№	Вид	Ділянки*																		Σ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
32	<i>Actitis hypoleucos</i>			1				1		1						5			8	
33	<i>Tringa glareola</i>				1		15		2	7					9				34	
35	<i>Tringa nebularia</i>					1													1	
36	<i>Tringa totanus</i>	3	150	103	130	149	19		21	6	348			187	60	278		9	1463	
37	<i>Philomachus pugnax</i>						2			1					14				17	
38	<i>Phalaropus lobatus</i>						4			1									5	
39	<i>Calidris ferruginea</i>				52	199	8				121		70		70				520	
40	<i>Calidris alpina</i>				8						33		25		18	3			87	
41	<i>Numenius arquata</i>														6	1			7	
42	<i>Limosa limosa</i>														4				4	
43	<i>Larus minutus</i>												20						20	
44	<i>Larus ridibundus</i>					55				90	64			658	24	85	20		996	
45	<i>Larus cachinnans</i>	36		7						9					10	38	10		110	
46	<i>Chlidonias niger</i>						3									9			12	
47	<i>Gelochelidon nilotica</i>					3													3	
48	<i>Thalasseus sandvicensis</i>						1		12	12									25	
34	<i>Sterna hirundo</i>					94	1	90	12	3	5			32		2			239	
49	<i>Sterna albifrons</i>			1										16					17	
50	<i>Upupa epops</i>																	1	1	
51	<i>Caprimulgus europaeus</i>																	3	3	
52	<i>Luscinia sp.</i>																	2	2	
53	<i>Turdus philomelos</i>																	1	1	
54	<i>Sylvia communis</i>																	1	1	
55	<i>Lanius collurio</i>																	2	2	
56	<i>Lanius minor</i>																	3	3	
57	<i>Phylloscopus sp.</i>																	1	1	
Кількість видів		5	9	12	9	10	23	9	13	17	15	8	6	11	6	23	15	4	10	57
Загальна чисельність		248	179	435	213	568	1253	149	3758	570	788	1960	213	2198	266	1244	359	31	29	14461

Примітки: Ділянки*: 1 – озеро у кв. 1; 2 – затока на північному заході кв.7; 3 – берег на північному сході кв.5; 4 – пониззя в центральній частині кв.5; 5 – центральна частина кв.9; 6 – лиман Ямківський та озера у кв.24; 7 – лиман Мужичий; 8 – лиман Олень; 9 – коса о.Кругляк; 10 – пониззя на межі кв.13, 24, 23; 11 – затока лиману Ямківський (13 га) у кв.21; 12 – озеро (15 га) у кв.40; 13 – о.Качиний; 14 – протока у кв.49; 15 – лиман Вершинський; 16 – лиман Бухта; 17 – невеликий лиман біля маяка; 18 – Садки.

Таблиця 3 – Результати обліків птахів на о. Бірючий 8-9 серпня 2012 року

№	Назва виду	Ділянки *													Σ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	<i>Podiceps griseigena</i>		8						2			2			12
2	<i>Podiceps cristatus</i>	34	171		223	101			81		3	140	4		657
3	<i>Podiceps nigricollis</i>								5			14			19
4	<i>Phalacrocorax carbo</i>		11						6	82	154				253
5	<i>Egretta alba</i>		7			3	1		3	2					16
6	<i>Egretta garzetta</i>	2	5	9	2	14			2	3					37
7	<i>Ardea cinerea</i>		17	12	15	2	2		11	4	2				65
8	<i>Anser anser</i>			4											4
9	<i>Cygnus solus</i>		106		145	72									323
10	<i>Tadorna tadorna</i>				6	1									7
11	<i>Anas platyrhynchos</i>	7	236	13	16	7			392	72					743
12	<i>Anas clypeata</i>									16					16
13	<i>Anas strepera</i>		1						2						3
14	<i>Anas querquedula</i>		146	150					112			6			414
15	<i>Aythya ferina</i>	1	1920		288	193			44						2446
16	<i>Aythya nyroca</i>		11		2					3					16
17	<i>Aythya fuligula</i>								1						1
18	<i>Oxyura leucocephalus</i>		2												2
19	<i>Circus pygargus</i>									1					1
20	<i>Circus aeruginosus</i>			1	1					3					5
21	<i>Falco subbuteo</i>		1												1
22	<i>Falco vespertinus</i>										1				1
23	<i>Falco tinnunculus</i>		1	1							2			2	6
24	<i>Perdix perdix</i>														22
25	<i>Phasianus colchicus</i>	2	3												5
26	<i>Fulica atra</i>		90		200	47									337
27	<i>Pluvialis squatarola</i>				1				4	1					6

№	Назва виду	Ділянки *													Σ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
28	<i>Charadrius alexandrinus</i>								2		4		1		7
29	<i>Vanellus vanellus</i>				1										1
30	<i>Arenaria interpres</i>	15					2		12	3	15		6		53
31	<i>Recurvirostra avosetta</i>		2												2
32	<i>Haematopus ostralegus</i>					4		6	8	1	8				27
33	<i>Galinago galinago</i>			1											1
34	<i>Actitis hypoleucos</i>						1								1
35	<i>Tringa ochropus</i>								2	1					3
36	<i>Tringa glareola</i>					6		4							10
37	<i>Tringa nebularia</i>			26		1			6	2	1				36
38	<i>Tringa totanus</i>	1	280	55	5	15	17	120	76	8					577
39	<i>Philomachus pugnax</i>		1												1
40	<i>Calidris ferruginea</i>						2								2
41	<i>Calidris alpina</i>							30							30
42	<i>Numenius arquata</i>		1						4				3		7
43	<i>Numenius phaeopus</i>									1					1
44	<i>Limosa limosa</i>		4					1	10						15
45	<i>Larus ichthyaetus</i>								1						1
46	<i>Larus minutus</i>	1			2										3
47	<i>Larus ridibundus</i>	35	320		25	106			525	102	7400	25	520		9058
48	<i>Larus genei</i>				6	61			5	20	1300		90		1482
49	<i>Larus cachinnans</i>	34	20		14	8			22		125	2	36		261
50	<i>Chlidonias leucopterus</i>				150		21		97	117		20	45		450
51	<i>Gelochelidon nilotica</i>								254						254
52	<i>Hydroprogne caspia</i>				1										1
53	<i>Thalasseus sandvicensis</i>	1			3				2		900		324		1230
54	<i>Sterna hirundo</i>	13	1		16										30
55	<i>Columba palumbus</i>														2
56	<i>Streptopelia turtur</i>														2

№	Назва виду	Ділянки *													Σ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
57	<i>Cuculus canorus</i>														1
58	<i>Coracias garrulus</i>														1
59	<i>Upupa epops</i>														4
60	<i>Hirundo rustica</i>								130					80	210
61	<i>Galerida cristata</i>														1
62	<i>Melanocorypha calandra</i>														1
63	<i>Alauda arvensis</i>														2
64	<i>Motacilla flava</i>								1	10					11
65	<i>Motacilla alba</i>														1
66	<i>Lanius collurio</i>													1	1
67	<i>Lanius minor</i>													4	4
68	<i>Oriolus oriolus</i>														1
69	<i>Sturnus vulgaris</i>														14
70	<i>Pica pica</i>		1						1					2	4
71	<i>Corvus cornix</i>								2						2
72	<i>Corvus corax</i>		3						2						5
73	<i>Phylloscopus sp.</i>														1
74	<i>Muscicapa striata</i>													3	3
75	<i>Saxicola rubetra</i>														1
76	<i>Phoenicurus ochruros</i>													1	1
77	<i>Carduelis carduelis</i>														2
78	<i>Anatidae spp.</i>				130			25							155
Кількість видів		12	27	10	22	16	7	6	33	20	13	7	9	7	77
Загальна чисельність		146	3369	272	1252	641	46	186	1827	452	9915	209	1029	93	19392

Примітки: – номери ділянок відповідають маршрутній точці GPS-трека (див. рис. 7).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНИХ ПРЕДСТАВНИКІВ ДОМІНУЮЧИХ ТАКСОНІВ

Місця зустрічей видів птахів з основних таксономічних груп у 1995 році відображає рис. 6, а у 2012 році – рисунки 8-10. Пункти спостережень у 2012 році показані на рис. 7.

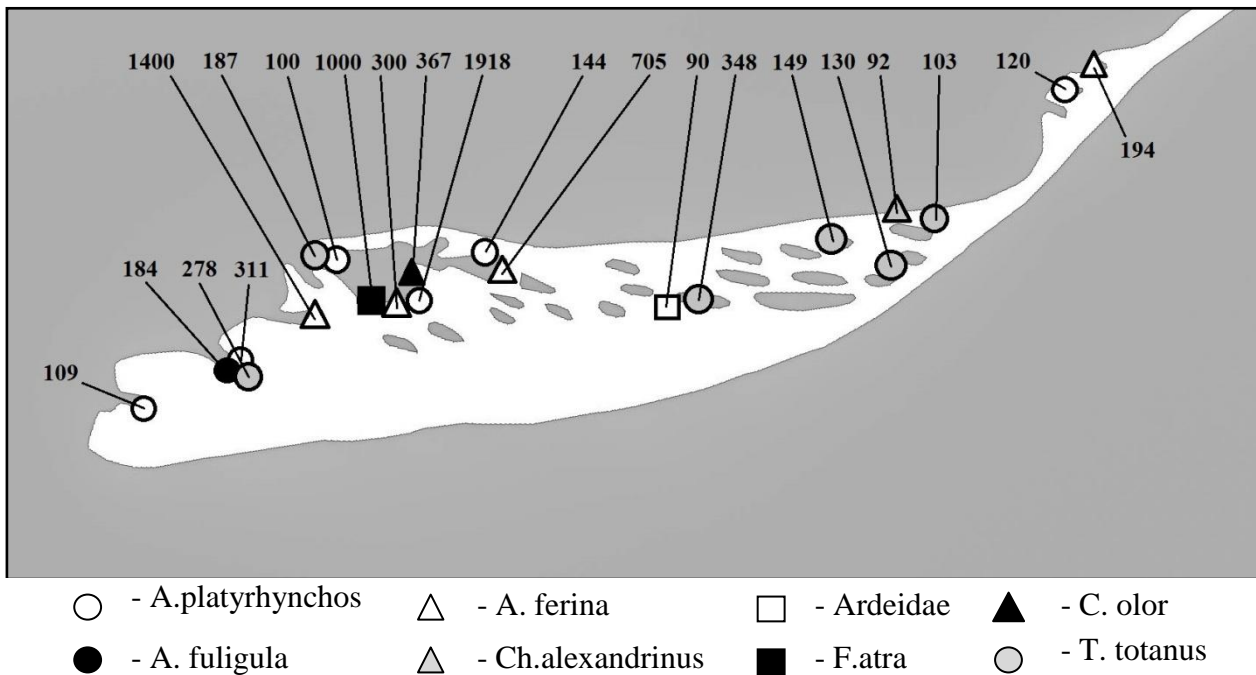


Рис. 6 Місця основних скупчень домінуючих представників орнітофауни о. Бірючий у серпні 1995 року

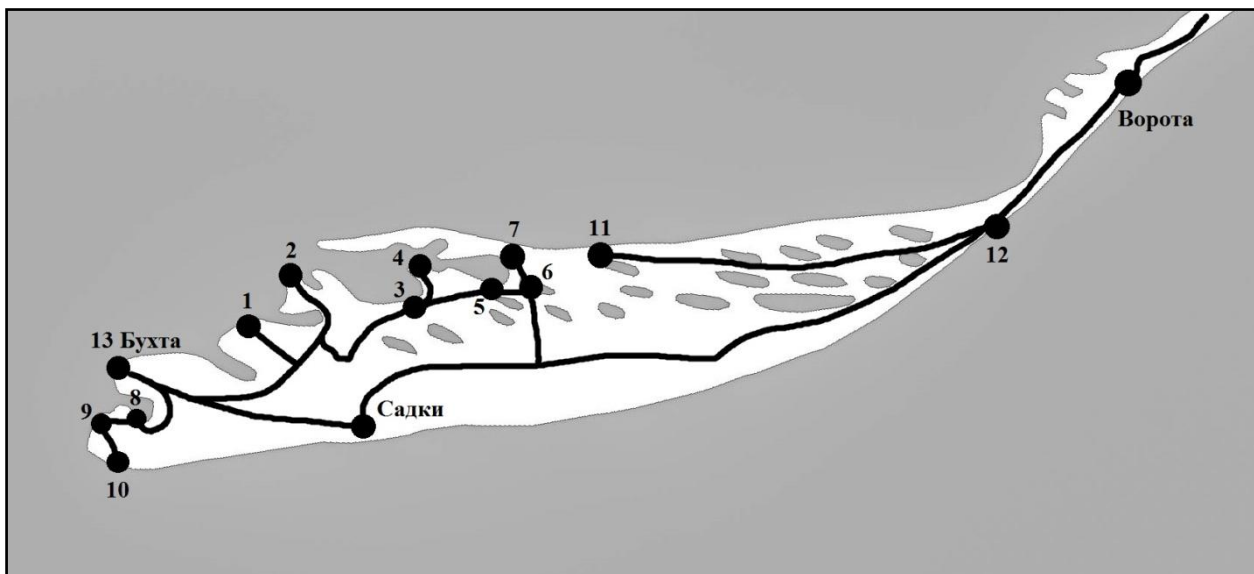


Рис. 7 Пункти спостережень птахів (маршрутні точки GPS-трека) під час обліків 8-9.08.2012 року

Ряд Пірникозоподібні (*Podicipediformes*)

Норець великий (*Podiceps cristatus*) є типовим представником орнітокомплексів всього Азовського узбережжя. У порівнянні між роками, його чисельність доволі стабільна (481 ос. у 1995 р., та 657 ос. – у 2012 р.). Великих скупчень у серпні не утворює, дисперсно перебуваючи на мілководних акваторіях навколо о. Бірючий.

Ряд Пелеканоподібні (*Pelecaniformes*)

Баклан великий (*Phalacrocorax carbo*) за останні роки збільшив чисельність у регіоні. Основними колоніальними поселеннями виду на прилеглих територіях є коса Обіточна (Приморський район Запорізької області), де його чисельність в останні 5 років зросла до 70 000 ос. Імовірно, частина птахів може потрапляти на о. Бірючий з поселень на Центральному та Східному Сиваші. Якщо в 1995 році на острові зустрічалися всього 7 ос. (1, 2 та 4 птаха), то у 2012 році загальна чисельність виду склала 253 ос., з яких 2 зграї нараховували 154 та 82 ос. Проведення моніторингових досліджень й надалі є вкрай важливим для попередження можливого закріплення виду на гніздуванні і на островах, і на деревах, що ми спостерігаємо в деяких поселеннях. Наслідки такого гніздування негативні, через знищення дерев, трав'яного покриву та збіднення видового різноманіття птахів навколо колоній.

Ряд Лелекоподібні (*Ciconiiformes*)

У 2012 році в порівнянні з результатами обліків у 1995 році спостерігається зниження більш як у два рази трьох основних видів чапель – чаплі білої великої (*Egretta alba*) з 49 ос. в 1995 році до 16 ос. у 2012 році, чаплі білої малої (*Egretta garzetta*) з 89 ос. до 37 ос., та чаплі сірої (*Ardea cinerea*)- з 109 ос. до 65 ос., відповідно.

Ряд Гусеподібні (*Anseriformes*)

Лебідь-шипун (*Cygnus olor*) виявляє динамічну поведінку під час сезону розмноження, займаючи всі придатні біотопи, навіть поблизу населених пунктів. Саме тому чисельність виду в регіоні стабільна, і серпневі обліки в обидва роки виявили майже однакову чисельність лебедів (429 ос. в 1995 році та 323 ос. у 2012 році).

В останні роки з підвищенням аридності клімату зменшилась площа біотопів, придатних для гніздування крижня (*Anas platyrhynchos*), і як наслідок – зниження чисельності виду в регіоні. У 1995 році було зареєстровано 3826 ос., з яких у 2 скупченнях тримались 1918 ос. (лиман Олень) та 1000 ос. (о. Качиний). У 2012 році на лимані Олень зареєстровано 392 крижні із 743. Схожа картина спостерігається по всьому Азовському узбережжю (Утлюкський та Молочний лимани, коси Обіточна та Бердянська). Для стабілізації чисельності крижня необхідне впровадження біотехнічних заходів для створення умов у період гніздування.

Чирок-тріскунець (*Anas querquedula*) у серпні є звичайним видом усього регіону і має стабільну чисельність. На о. Бірючий вид концентрується невеликими групами (від десятків до сотень) на всіх крупних лиманах. У 1995 році спостерігали 219 ос. (від 4 до 88 ос. в зграї), а у 2012 році – 414 ос. (від 6 до 150 ос.).

Попелюх (*Aythya ferina*) також має стабільну чисельність. Цікаво, що в обидва роки попелюх був зареєстрований на 3 основних лиманах – Олень, Ямківський, Вершинський. Основним місцем концентрації птахів був лиман Олень. У 1995 році тут тримались 2100 ос. (або 70% від загальної чисельності виду), а у 2012 році – 2208 ос. (90,3%).

Гуска сіра (*Anser anser*) в регіоні скоротила чисельність в основних місцях гніздування, а в більшості другорядних гніздових поселеннях – зникла. Така тенденція характерна не лише для всього Азово-Чорноморського регіону, а й для відомих поселень виду в Дніпропетровській (ріки Самара, Орель) та Харківській (р. Сіверський Донець) областях. У 1995 році було зафіксовано 620 сірих гусей, з яких скупчення в 333 ос. трималось поблизу о. Качиний решта – на лиманах Ямківський та Вершинський. У 2012 році лише 4 птаха перебували в південній частині лиману Олень. Для цього виду також розроблені та з успіхом впроваджуються біотехнічні технології підтримання його чисельності, які можливо застосувати до Бірючанського гніздового угруповання.

Ряд Журавлеподібні (*Gruiformes*)

Лиска (*Fulica atra*) є типовим представником більшості водно-болотних угідь регіону. Обліки 1995 року виявили 1315 ос., з яких 1250 ос. (або 95%) перебували в межах лиману Олень та о.Качиний. У 2012 році всього зареєстровано 337 птахів, з яких 290 ос.(86%) також були на лимані Олень, а ще 47 ос. спостерігали на сусідньому лимані Ямківській. Відсутність птахів в обидва сезони на інших водоймах меншого розміру свідчить про утворення передміграційних скупчень, під час виникнення яких птахи концентруються на традиційних для них місцях. Говорити про суттєве зниження чисельності виду важко через складність виявлення птахів, частка яких ховається в очереті. Тим не менш, чотириразове зменшення чисельності порівняно з 1995 роком дає підстави більш детально вивчати стан цього виду на о. Бірючий.

Ряд Сивкоподібні (*Charadriiformes*)

Родина Баранцеві (*Scolopacidae*)

Травник (*Tringa totanus*) є індикатором ступеня зволоженості біотопів. Аналіз результатів спостережень цього виду в 1995 році показав перебування 1463 ос. в 13 точках обліку з 17. У межах крупних лиманів обліковано 520 ос. (або 35.5% від загальної чисельності птахів), а у внутрішніх водоймах (мілководних сагах, пониженнях) – 943 ос. (64.5%). Цікавою в орнітологічному плані є система подів та понижень у межах кварталів 23 та 24, де в 1995 році зареєстровано 348 травників, або 40% від загальної чисельності птахів, які зустрічалися на внутрішніх водоймах. Спостереження за біологією виду в інших водно-болотних угіддях півдня України свідчить про те, що стації, віддалені від відкритих акваторій, є улюбленими для травника біотопами. У 2012 році лєвова частка таких саг, подів та понижень були сухими, тому результати обліків виявилися доволі прогнозованими, а чисельність птахів скоротилася втричі. Усі птахи тримались мілководних берегів з надводним трав'яним покривом у межах трьох основних лиманів.

Побережник червоногрудий (*Calidris ferruginea*) та побережник чорногрудий (*Calidris alpina*) є дальніми мігрантами, гніздові ареали яких знаходяться в субарктичному поясі Росії, тому чисельність птахів з року в рік коливається в досить великих показниках. Пов'язано це з погодними умовами сезону, станом кормової бази та фізичною кондицією птахів (готовністю до міграції). За довгостроковими спостереженнями за міграцією побережників в Азово-Чорноморському регіоні виявлені деякі закономірності в зміні міграційних шляхів, які впливають на чисельність куликів у регіоні. Згідно з цими спостереженнями, Азовське узбережжя втрачає пріоритетне значення для куликів і основний потік мігрантів реєструється в нижній течії р. Волга та на півночі Казахстану. Наслідком цього є зниження чисельності птахів та зміна термінів прольоту. У 1995 році зареєстровано 520 червоногрудих та 87 чорногрудих побережників, а у 2012 всього 2 та 30 ос. відповідно.

Крем'яшник (*Arenaria interpres*) має стабільну чисельність не лише в межах острова, а й по всьому регіону. Наприклад, спостереження за цим видом на косі Обіточна та Арабатській стрілці вказують на незначні щорічні коливання чисельності. У 1995 році фіксували 39 птахів, а у 2012 – 53 ос. Улюбленими місцями перебування крем'яшників були піщано-черепашкові коси та пляжі з боку відкритої частини Азовського моря.

Родина Мартинові (*Laridae*)

Єдина таксономічна група птахів, кожен з представників якої показав зростання чисельності. У випадку з мартином тонкодзьобим (*Larus genei*), якого не було зареєстровано у 1995 році, констатуємо його масову появу у 2012 році. Із 1482 ос. тонкодзьобого мартина 1300 ос. (або 88 %) зареєстровано в скупченні південно-західного кута острова.

Цікавим є факт перебування на о. Бірючий у 2012 році більш як 9 тисяч мартина звичайного (*Larus ridibundus*), якого у 1995 р. було всього 996 ос. Лише на узбережжі Азовського моря,

майже на самій верхівці острова тримались 7400 ос. (або 82 % від загальної чисельності птахів). За інформацією колег, такої чисельності мартинів у серпневий період у регіоні не виявлено, тому вважаємо, що в межах острова Бірючий склалися комфортні умови, які приваблюють сюди птахів. Мартин жовтоногий (*Larus cachinnans*) перебував у межах 8 облікових ділянок і не утворював великих скупчень, тримаючись групами від 2 до 125 ос. Чисельність цього виду в регіоні стабільна.

Родина Крячкові (*Sternidae*)

Ситуація, яка склалася з крячками, неоднозначна. На фоні зростання чисельності крячка рябодзьобого (*Thalasseus sandvicensis*) та крячка чорнодзьобого (*Gelochelidon nilotica*), навіть появи виду, якого не спостерігали в 1995 році, – крячка світлокрилого (*Chlidonias leucoptera*), констатуємо зниження чисельності крячка річкового (*Sterna hirundo*).

Головними місцями перебування крячків були лиман Бухта та невеликий за площею лиман на верхівці острова. Саме тут зареєстровано всіх крячків чорнодзьобих в одному скупченні (254 ос.), 900 ос. (або 73 % від загальної чисельності виду) крячка рябодзьобого, та 214 ос. (48 %) крячка світлокрилого.

Крячок річковий (*Sterna hirundo*), якого в 1995 році зафіксовано 239 ос., у 2012 році тримався Утлюкського узбережжя в районі лиману Олень у трьох пунктах спостережень; всього 30 птахів. Чисельність виду в регіоні також має тенденцію до зниження. Біотехнічні заходи зі стабілізації чисельності та створення умов для гніздування виду (штучні острови), на наш погляд покращили б ситуацію.

Порівняльна характеристика чисельності птахів у серпні 1995 та 2012 років та тенденції існування видів наведена в табл. 4. Аналіз даних цієї таблиці дозволяє зробити деякі попередні висновки щодо тенденцій змін чисельності окремих видів птахів.

Так, 55 видів птахів (або 61 % від всіх зареєстрованих видів в 1995 та 2012 роках) протягом періоду досліджень мають стабільну чисельність; 23 види птахів (25,6 %) – мають тенденцію до зниження, а 6 видів (6,7 %) – до зростання чисельності. Уточнення статусу вимагають ще 6 видів, які є залітними, або вперше реєструвалися на о.Бірючий.

Показово, що види, чисельність яких зростає, склали 65.6 % від загальної чисельності птахів у 2012 році (12727 ос.), а видів з тенденцією зменшення чисельності загалом зареєстровано всього 1894 ос. Отже, виявлена закономірність, яка в першому наближенні свідчить про масовість звичайних видів та скорочення чисельності рідкісних.

Таблиця 4 – Порівняльна характеристика чисельності птахів у серпні 1995 та 2012 роках та тенденції існування видів

№ п/п	Вид	∑ 1995	∑ 2012	Тенденція чисельності
1	<i>Podiceps griseigena</i>		12	стабільна
2	<i>Podiceps cristatus</i>	481	657	стабільна
3	<i>Podiceps nigricollis</i>	1	19	стабільна
4	<i>Phalacrocorax carbo</i>	7	253	збільшується
5	<i>Nycticorax nycticorax</i>	3	-	стабільна
6	<i>Egretta alba</i>	49	16	зменшується
7	<i>Egretta garzetta</i>	89	37	зменшується
8	<i>Ardea cinerea</i>	109	65	зменшується
9	<i>Ardea purpurea</i>	1	-	зменшується
10	<i>Cygnus olor</i>	429	323	стабільна
11	<i>Anser anser</i>	620	4	зменшується
12	<i>Tadorna tadorna</i>	98	7	зменшується
13	<i>Anas platyrhynchos</i>	3826	743	зменшується

№ п/п	Вид	Σ 1995	Σ 2012	Тенденція чисельності
14	<i>Anas acuta</i>	1	-	зменшується
15	<i>Anas clypeata</i>	2	16	стабільна
16	<i>Anas strepera</i>	5	3	стабільна
17	<i>Anas querquedula</i>	219	414	стабільна
18	<i>Anas crecca</i>	68	-	?
19	<i>Aythya ferina</i>	3002	2446	стабільна
20	<i>Aythya nyroca</i>	8	16	стабільна
21	<i>Aythya fuligula</i>	246	1	зменшується
22	<i>Oxyura leucocephalus</i>	-	2	?
23	<i>Circus pygargus</i>	-	1	стабільна
24	<i>Circus aeruginosus</i>	1	5	стабільна
25	<i>Falco subbuteo</i>	-	1	стабільна
26	<i>Falcovespertinus</i>	-	1	стабільна
27	<i>Falco tinnunculus</i>	3	6	стабільна
28	<i>Perdix perdix</i>	-	22	стабільна
29	<i>Phasianus colchicus</i>	12	5	стабільна
30	<i>Fulica atra</i>	1315	337	зменшується
31	<i>Pluvialis squatarola</i>	33	6	зменшується
32	<i>Pluvialis apricaria</i>	1	-	зменшується
33	<i>Charadrius alexandrinus</i>	131	7	зменшується
35	<i>Vanellus vanellus</i>	-	1	?
36	<i>Arenaria interpres</i>	39	53	стабільна
37	<i>Recurvirostra avosetta</i>	-	2	?
38	<i>Haematopus ostralegus</i>	77	27	зменшується
39	<i>Galinago galinago</i>	1	1	стабільна
40	<i>Actitis hypoleucos</i>	8	1	стабільна
41	<i>Tringa ochropus</i>	-	3	стабільна
42	<i>Tringa glareola</i>	34	10	стабільна
43	<i>Tringa nebularia</i>	1	36	стабільна
44	<i>Tringa totanus</i>	1463	577	зменшується
45	<i>Philomachus pugnax</i>	17	1	стабільна
46	<i>Phalaropus lobatus</i>	5	-	?
47	<i>Calidris ferruginea</i>	520	2	зменшується
48	<i>Calidris alpina</i>	87	30	зменшується
34	<i>Calidris canutus</i>	2	-	?
49	<i>Numenius arquata</i>	7	7	стабільна
50	<i>Numenius phaeopus</i>	-	1	стабільна
51	<i>Limosa limosa</i>	4	15	стабільна
52	<i>Larus ichthyaetus</i>	-	1	зменшується
53	<i>Larus minutus</i>	20	3	зменшується
54	<i>Larus ridibundus</i>	996	9058	збільшується
55	<i>Larus genei</i>	-	1482	збільшується
56	<i>Larus cachinnans</i>	110	261	стабільна
57	<i>Chlidonias niger</i>	12	-	зменшується
58	<i>Chlidonias leucoptera</i>	-	450	збільшується
59	<i>Gelochelidon nilotica</i>	3	254	збільшується
60	<i>Hydroprogne caspia</i>	-	1	зменшується
61	<i>Thalasseus sandvicensis</i>	25	1230	збільшується
62	<i>Sterna hirundo</i>	239	30	зменшується
63	<i>Sterna albifrons</i>	17	-	зменшується
64	<i>Columba palumbus</i>	-	2	стабільна

№ п/п	Вид	∑ 1995	∑ 2012	Тенденція чисельності
65	<i>Streptopelia turtur</i>	-	2	стабільна
66	<i>Cuculus canorus</i>	-	1	стабільна
67	<i>Coracias garrulus</i>	-	1	стабільна
68	<i>Upupa epops</i>	1	4	стабільна
69	<i>Caprimulgus europaeus</i>	3	-	стабільна
70	<i>Luscinia sp.</i>	2	-	стабільна
71	<i>Turdus philomelos</i>	1	-	стабільна
72	<i>Sylvia communis</i>	1	-	стабільна
73	<i>Hirundo rustica</i>	-	210	стабільна
74	<i>Galerida cristata</i>	-	1	стабільна
75	<i>Melanocorypha calandra</i>	-	1	стабільна
76	<i>Alauda arvensis</i>	-	2	стабільна
77	<i>Motacilla flava</i>	-	11	стабільна
78	<i>Motacilla alba</i>	-	1	стабільна
79	<i>Lanius collurio</i>	2	1	стабільна
80	<i>Lanius minor</i>	3	4	стабільна
81	<i>Oriolus oriolus</i>	-	1	стабільна
82	<i>Sturnus vulgaris</i>	-	14	стабільна
83	<i>Pica pica</i>	-	4	стабільна
84	<i>Corvus cornix</i>	-	2	стабільна
85	<i>Corvus corax</i>	-	5	стабільна
86	<i>Phylloscopus sp.</i>	1	1	стабільна
87	<i>Muscicapa striata</i>	-	3	стабільна
88	<i>Saxicola rubetra</i>	-	1	стабільна
89	<i>Phoenicurus ochruros</i>	-	1	стабільна
90	<i>Carduelis carduelis</i>	-	2	стабільна
91	<i>Anatidae spp.</i>	-	155	
Кількість видів		57	77	
Загальна чисельність		14461	19392	

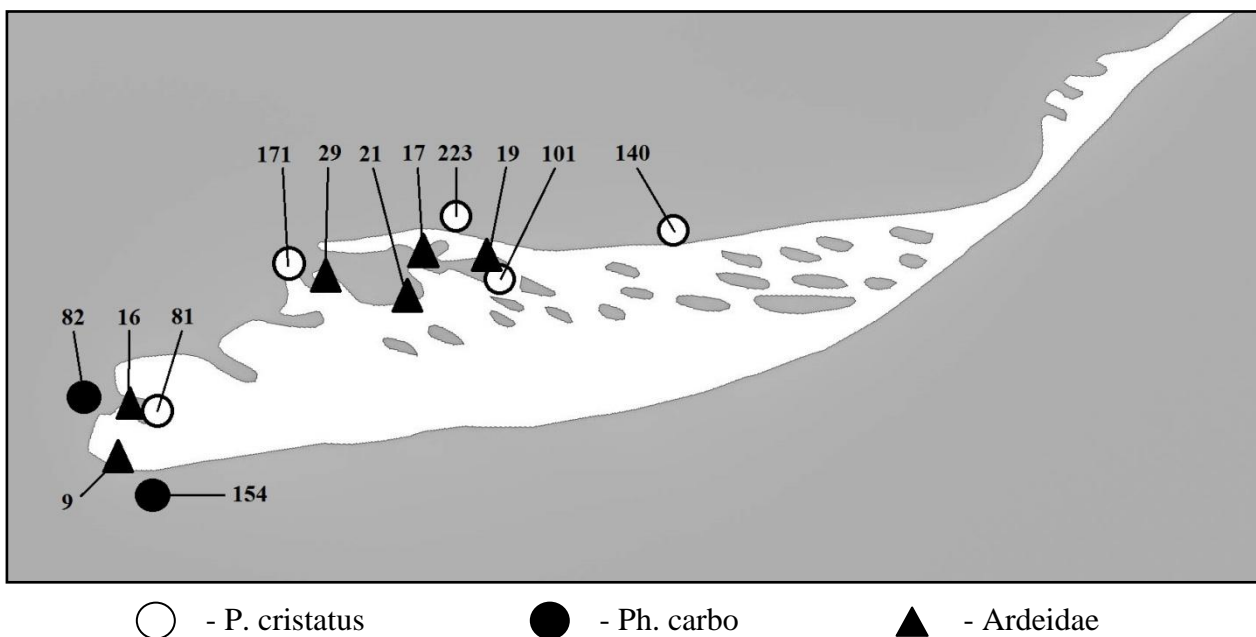
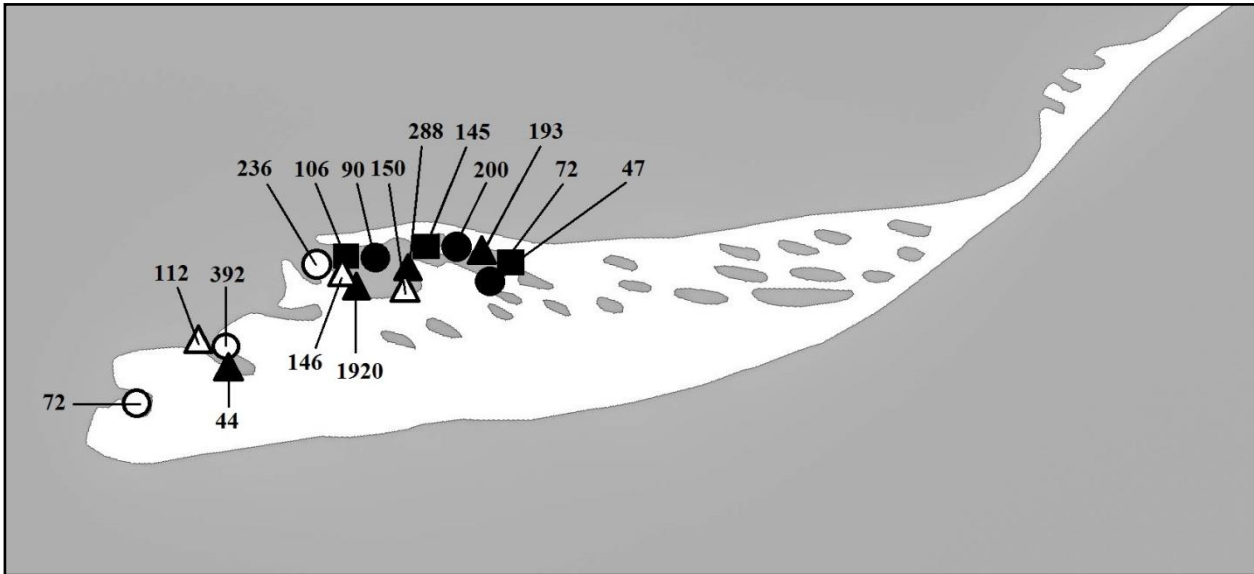
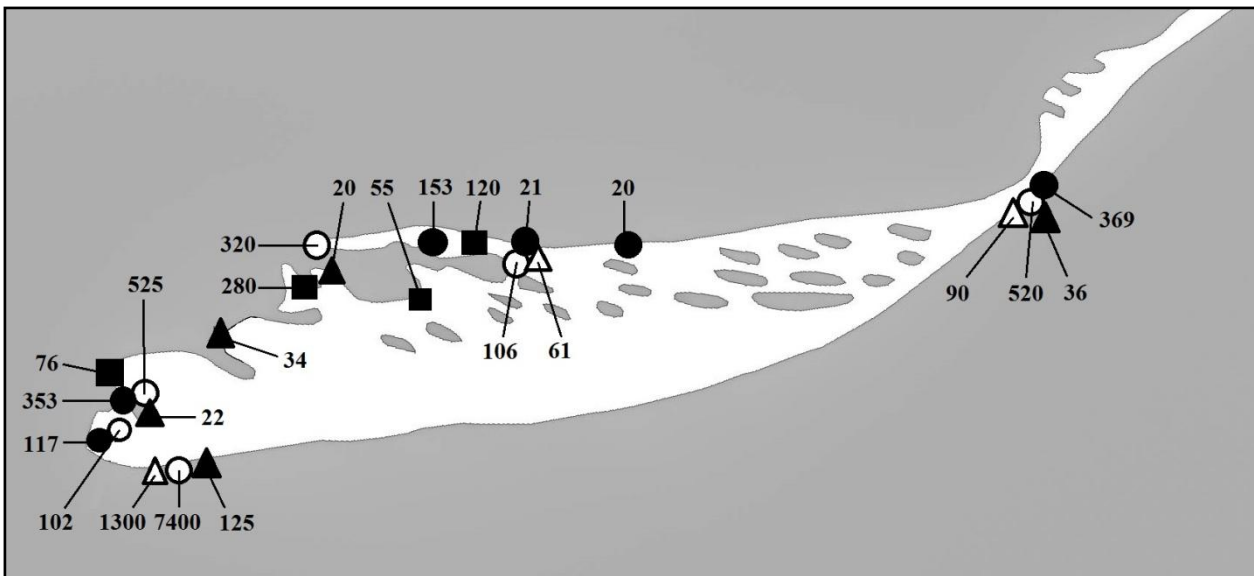


Рис. 8 Місця зустрічей *Podiceps cristatus*, *Phalacrocorax carbo* та *Ardeidae* на о. Бірючий у серпні 2012 року



- - *C. olor* △ - *A. querquedula*
 ○ - *A. platyrhynchos* ▲ - *A. ferina* ● - *F. atra*

Рис. 9 Місця зустрічей *Fulica atra* та представників ряду гусеподібних на о. Бірючий у серпні 2012 року



- △ - *L. genei* ▲ - *L. cachinnans*
 ■ - *T. totanus* ○ - *L. ridibundus* ● - *Sternidae*

Рис. 10 Місця зустрічей представників ряду сивкоподібних на о. Бірючий у серпні 2012 року

3. ВИДИ ПТАХІВ ІЗ ЧЕРВОНОЇ КНИГИ УКРАЇНИ

Аналіз зустрічей птахів, які занесені до Червоної книги України [1], ґрунтується на переліку видів з останнього видання 2009 року. На момент проведення досліджень у 1995 році чинним було видання 1994 року, згідно з яким деякі види не охоронялися (нерозень *Anas strepera*, крячок малий *Sterna albifrons*).

Отже, у 1995 році зареєстровано 4 види птахів, які на той момент охоронялися, або 6 видів з сучасного охоронного списку. Їх чисельність склала 245 ос., або 1,7% від загальної чисельності облікованих птахів. Домінували пісочник морський (131 ос.) та кулик-сорока (77 ос.).

Основними місцями перебування рідкісних видів були лимани Бухта, Вершинський та Ямківський, а також Утлюкське узбережжя острова Бірючий. Великих скупчень птахи не утворювали. Лише 92 зуйки морські тримались на піщаному пляжі вздовж берегової лінії кв. 5. Також у скупченнях зареєстровані 34 ос. (кв. 9, центральна частина) та 27 ос. (лиман Бухта) кулика-сороки.

У 2012 році зареєстровано 12 видів, чисельністю 69 ос., або 0,4% від загальної. Явних домінантів не виявлено (табл. 5). Найбільшу чисельність мав кулик-сорока (27 ос.).

Як і в 1995 році, результати обліків у 2012 році виявили тяжіння птахів Червоної книги України до лиманів Вершинський (21 ос.), Олень (20 ос.) та Ямківський (10 ос.), де зареєстровано 74 % від загальної чисельності всіх рідкісних птахів.

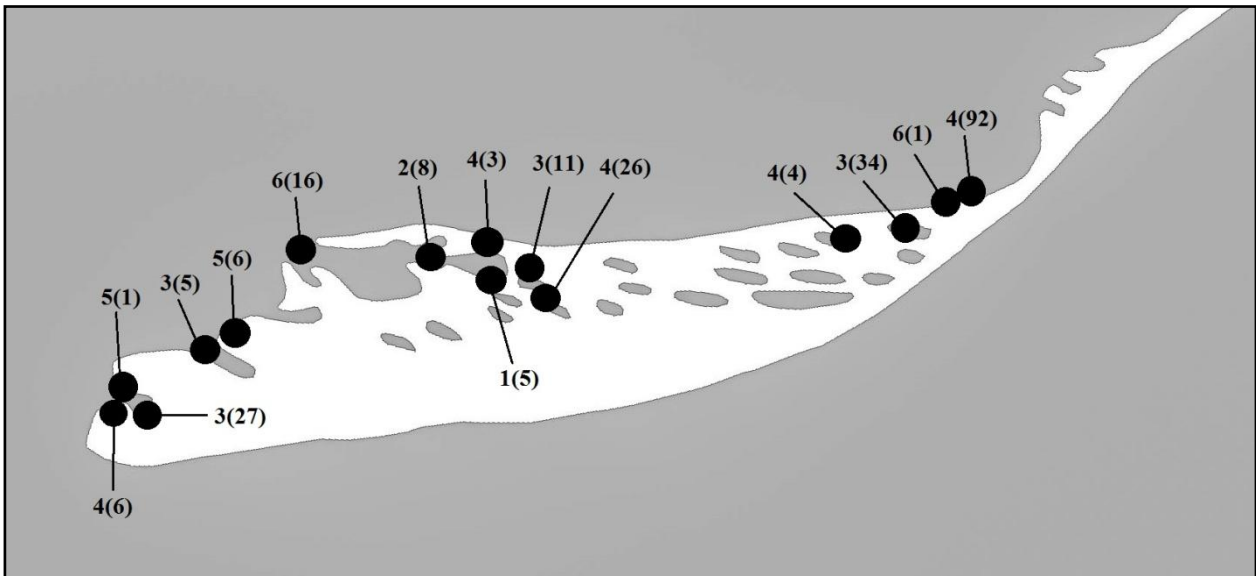
Жоден з видів не утворював великих скупчень і були зустрінуті поодинокі, або групами до 10 ос. Лише чернь білоока чисельністю 11 особин трималась на лимані Олень, але не в скупченні, а дисперсно по всій акваторії лиману.

Таблиця 5 – Характеристика зустрічей птахів Червоної книги України під час серпневих обліків у 1995 та 2012 роках

№	Назва виду	Σ 1995 рік	Σ 2012 рік
1	Anas strepera	5*	3
2	Aythya nyroca	8	16
3	Oxyura leucoccephalus		2
4	Circus pygargus		1
5	Charadrius alexandrinus	131	7
6	Recurvirostra avosetta		2
7	Haematopus ostralegus	77	27
8	Numenius arquata	7	7
9	Numenius phaeopus		1
10	Larus ichthyaetus		1
11	Sterna albifrons	17*	
12	Hydroprogne caspia		1
13	Coracias garrulus		1
Кількість видів		4 (6)	12
Загальна чисельність		245	69

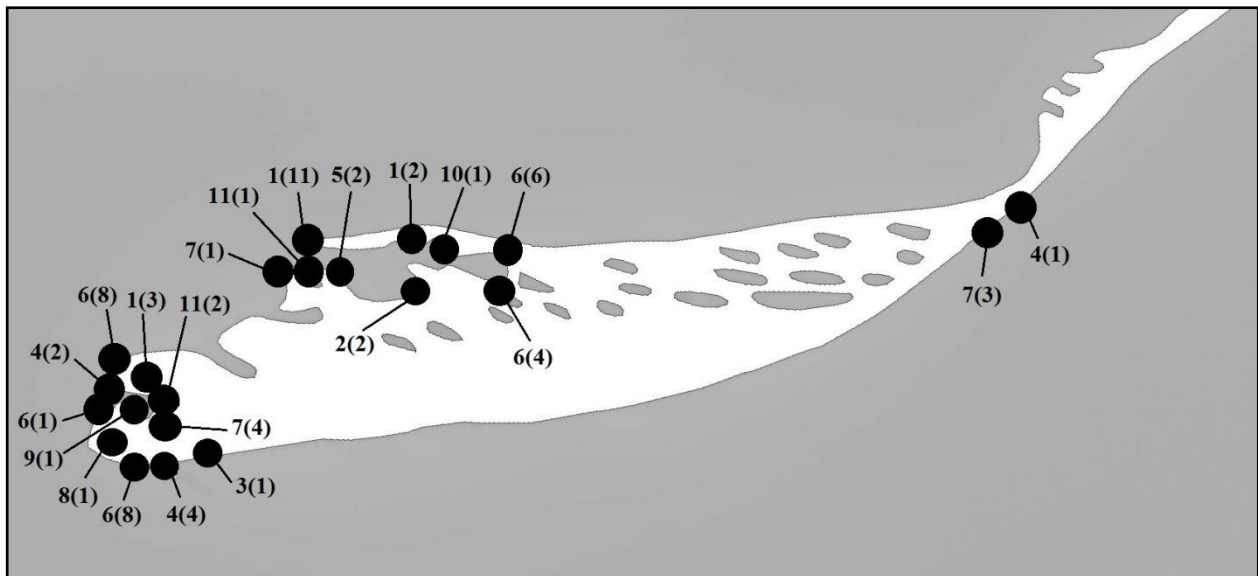
Примітки: * – види, які увійшли в Червону книгу України з 2009 року.

Розташування місць зустрічі птахів, яких включено до Червоної книги України, на о. Бірючий у 1995 році зображенні на рис. 11, а в 2012 – на рис. 12.



1 – *A. strepera*; 2 – *A. nyroca*; 3 – *H. ostralegus*; 4 – *Ch. alexandrinus*;
 5 – *N. arquata*; 6 – *S. albifrons*;
 ● 3(5): 3 – № виду птаха, (5) – кількість особин

Рис. 11 Місця зустрічей видів птахів Червоної книги України на о. Бірючий у серпні 1995 року



1 - *A. nyroca* 4 - *Ch. alexandrinus* 7 - *N. arquata* 10 - *H. caspia*
 2 - *O. leucosephalus* 5 - *R. avosetta* 8 - *N. phaeopus* 11 - *A. strepera*
 3 - *C. pygargus* 6 - *H. ostralegus* 9 - *L. ichtyaetus* 12 - *C. garrulus*
 ● 7(4): 7 – № виду птаха, (4) – кількість особин

Рис. 12 Місця зустрічей видів птахів Червоної книги України на о. Бірючий в серпні 2012 року

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАЙБІЛЬШ ЦІННИХ УГІДЬ У 2012 РОЦІ

Для характеристики найбільш цінних ділянок акваторії та суходолу о. Бірючий були взяті п'ять місць спостережень, де зареєстровано 84 % всіх облікованих птахів. До розрахунку не потрапили три скупчення мартинів звичайного (7400 ос.), тонкодзьобого (1300 ос.) та крячка рядодзьобого (900 ос.) загальною чисельністю 9600 ос. Такі концентрації птахів не мають постійного місця перебування, а випадковість зустрічей у тому чи іншому біотопі суттєво впливає на оцінку орнітологічної привабливості території. Крім того, усі ці скупчення виявлені на Азовському узбережжі кв. 72.

Отже, нами проаналізовані дані по таких моніторингових ділянках, як лимани Олень, Ямківський, Вершинський, Бухта та лиман у кв. 72. Для оцінки орнітологічного значення цих лиманів використані такі показники, як площа угіддя, кількість зареєстрованих видів, загальна чисельність птахів та середній показник числа особин на 1 га угіддя. Кожен із критеріїв ранжувався в інтервалі 1-5 балів, а по кожному угіддю розраховано його цінність як середній показник отриманих балів.

Найбільш привабливим в орнітологічному плані, безумовно, є лиман Олень, який має найбільшу площу. У біотопах цього лиману зареєстровано 40 видів птахів загальною чисельністю 4893 ос. Високий показник видового різноманіття птахів також виявив лиман Бухта, який хоча й займає третє місце за площею, але щільність населення птахів тут дуже висока – 31 ос./га. Своєрідним відкриттям став лиман у кв. 72, площею всього 15 га, де перебували 24 види птахів, загальною чисельністю майже 500 ос., що ставить це угіддя на перше місце за щільністю населення птахів – 32,3 ос./га. Лиман Вершинський, який скоротив площу через низький рівень води, був привабливим лише для 12 видів птахів, загальною чисельністю 146 ос., що для 53 га площі становить найменший показник щільності птахів на 1 га.

Проаналізувавши отримані результати, констатуємо, що найбільш цінними в орнітологічному плані є лимани Олень (4,5 бала) та Бухта (3,75). Лиман Ямківський та озеро у кв. 72 набрали по 2,75 бала, що говорить про середнє значення цих угідь, а також про те, що лиман Вершинський у серпні 2012 року майже втратив привабливість для водно-болотних птахів (табл.6).

Таблиця 6 – Характеристика найбільш цінних угідь о. Бірючий для птахів у 2012 році

Місце	S, га	Видів	Особин	ос. / га	Бали ¹	Цінність ²
Лиман Олень	325	40	4893	15,1	5, 5, 5, 3	4,5
Лиман Ямківський	88	23	873	9,9	4, 2, 3, 2	2,75
Лиман Бухта	59	33	1827	31,0	3, 4, 4, 4	3,75
Лиман Вершинський	53	12	146	6,3	2, 1, 1, 1	1,25
Лиманчик*	15	24	485	32,3	1, 3, 2, 5	2,75

Примітка: * – озеро (лимани) в кв. 72. **Бали¹** – ранжування окремого показника (площа, кількість видів, чисельність особин, середня кількість птахів на 1 га) серед п'яти основних місць спостережень. **Цінність²** – середній показник отриманих балів.

Перспектива подальших досліджень орнітофауни о-ва Бірючий, перш за все, пов'язана з НПП «Азово-Сиваський» який відповідно до законодавства країни має вести моніторинг стану біоти, зокрема птахів, на своїй території. Здійснення наукових досліджень та ведення моніторингу в об'єктах ПЗФ вимагається низкою законодавчих актів України, зокрема

законами про «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про природно-заповідний фонд України», «Про Загальнодержавну програму формування національної екологічної мережі України на 2000-2015 роки», а також Концепцією збереження біологічного різноманіття, затвердженою постановою Кабінету Міністрів України.

Розвиток співробітництва між Мелітопольським державним педагогічним університетом імені Богдана Хмельницького та Азово-Сиваським національним природним парком створює не тільки можливості для проведення польових практик студентів-екологів, а й є основою для перспективного розвитку моніторингу авіфауни цієї території. Цьому також сприяє те, що регулярні орнітологічні дослідження регіону проводяться вже з 80-х років минулого сторіччя, провідну роль у них відіграє Азово-Чорноморська орнітологічна станція.

ВИСНОВКИ

Аналіз проведених досліджень у серпні 2012 року та порівняння з результатами обліків у серпні 1995 року дозволяють зробити такі висновки:

1. Дослідження проведені в синхронні строки (9-10.08.1995 та 8-9.08.2012) і дозволяють коректно порівнювати їх між собою.
2. На о. Бірючий у серпні за всі періоди спостережень зареєстровано 90 видів птахів: у 1995 р. – 57 видів загальною чисельністю 14461 ос., а у 2012 р. – 77 видів, чисельністю 19493 ос.
3. Таксономічний розподіл птахів свідчить про належність їх до 14 рядів. У 1995 році видове різноманіття було нижчим, ніж у 2012 році – 57 видів 11 рядів та 77 видів 13 рядів, відповідно. Порівнюючи співвідношення таксонів у різні роки, бачимо чисельне домінування представників ряду гусеподібних в 1995 році (8524 ос., або 58,9% від загальної чисельності птахів). Натомість у 2012 році домінували види сивкоподібних птахів (13550 ос., або 69,9%). Видове різноманіття цих груп в обидва роки було доволі стабільним. Гусеподібні нараховували 12 (1995 рік) та 11 (2012 рік) видів, а сивкоподібні – 25 та 28 видів відповідно (табл. 1).
4. У 1995 році зареєстровано 4 види птахів, чисельністю 245 ос., або 1,7% від загальної чисельності облікованих птахів, які охороняються Червоною книгою України. Домінували пісочник морський (131 ос.) та кулик-сорока (77 ос.). У 2012 році зареєстровано 12 видів, чисельністю 69 ос., або 0,4% від загальної. Явних домінантів не виявлено. Найбільшу чисельність мав кулик-сорока (27 ос.).
5. Ключовими орнітологічними територіями на острові Бірючий у 2012 році були лимани Олень та Бухта. Лиман Ямківський та озеро у кв. 72 мають середнє значення, а лиман Вершинський у серпні 2012 року майже втратив привабливість для скупчень птахів.
6. Для деяких видів орнітокомплексу о. Бірючий (гуска сіра, крижень, крячок річковий) є потреба впровадити біотехнічні заходи для підтримання їхньої чисельності на даній території.
7. Потрібен подальший розвиток моніторингових досліджень, який дасть змогу оперативно оцінювати орнітологічну ситуацію, результативність охоронних та біотехнічних заходів, своєчасно реагувати на можливі негативні впливи на екосистему.

Подяки

Під час виконання робіт повсякчасне розуміння необхідності проведення наукових досліджень автори знаходили з боку директора Азово-Сиваського природного національного парку Є.С.Поповчука, а всі питання побутового характеру миттєво вирішував М.П.Тхор. Фінансову допомогу в проведенні досліджень надав представник Wetlands International В.А. Костюшин.

У 1995 році експедиційний виїзд було здійснено за участі завідуючого Азово-Чорноморської орнітологічної станції Й.І.Чернічко та наукового співробітника Р.М.Чернічко, а у 2012 році учасник експедиції І.Д. Белашков здійснив фото- та відеозйомку. Часткову обробку матеріалів серпневих обліків 2012 року здійснила співробітниця НДІ біорізноманіття І.Б. Сальникова-Буденко. Усім згаданим вище колегам автори висловлюють щирі подяки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Червона книга України. Тваринний світ / [за ред. І.А. Акімова]. – К. : Глобалконсалтинг, 2009. – 623 с.

REFERENCES

1. Chervona kniga Ukrainy. Tvarinnij svit // za red. I.A. Akimova. – K.: Globalkonsalting, 2009. – 623 s.

УДК 586.893.16

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕЗОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЗАРАЖЕННОСТИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (PALLAS) ДЕВЕЧИНСКОГО ЛИМАНА КРОВЕПАРАЗИТАМИ В 1993 И 2002 ГОДАХ

Гусейнов М.А.

Институт зоологии НАН Азербайджана

AZ 1073, Азербайджан, Баку, ул. А.Аббасзаде, проезд 1128, квартал 504

gus_mair@mail.ru

Приводится сравнительный анализ сезонной динамики зараженности озерной лягушки Девечинского лимана паразитами крови в 1993 и 2002 годах. Результаты сравнительного анализа сезонных изменений зараженности озерной лягушки показали, что как экстенсивность, так и средняя удельная интенсивность инвазии лягушки кровепаразитами в 1993 году была заметно выше, чем в 2002 году.

Ключевые слова: озерная лягушка, пиявка, паразит, сезон, экстенсивность и интенсивность инвазии.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ СЕЗОННИХ ЗМІН ЗАРАЖЕНОСТІ ОЗЕРНОЇ ЖАБИ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (PALLAS) ДЕВЕЧІНСЬКОГО ЛИМАНУ КРОВЕПАРАЗИТАМИ У 1993 І 2002 РОКАХ

Гусейнов М.А.

Институт зоології НАН Азербайджану

AZ 1073, Азербайджан, Баку, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504

gus_mair@mail.ru

Наводиться порівняльний аналіз сезонної динаміки зараженості озерної жаби Девечинського лиману паразитами крові в 1993 і 2002 роках. Результати порівняльного аналізу сезонних змін зараженості озерної жаби показали, що й екстенсивність, і середня питома інтенсивність інвазії жаби кровепаразитів у 1993 році була помітно вищою, ніж у 2002 році.

Ключові слова: озерна жаба, п'явка, паразит, сезон, екстенсивність та інтенсивність інвазії.

COMPARATIVE ANALYSES OF SEASONAL FLUCTUATION OF DEVECHI FIRTH FROG *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (PALLAS) INFECTION WITH BLOOD PARASITES IN 1993 AND 2002 AGES

Guseinov M.A.

Institute of Zoology, NAS of Azerbaijan

AZ 1073, Azerbaijan, Baku, A.Abbaszade str., pass. 1128, block 504

gus_mair@mail.ru

In this work given comparative analyses of seasonal dynamics of frog infection with blood parasites in 1993 and 2002 ages. In 1993 in the reach of the Khanlar Devechi Firth was conducted the seasonal researches of the frog infection with blood parasites, in this purpose there were subjected to the

dissection the 77 frogs from March till October: 28 in March, 20 in April and in May, 18 in June, July and August, 11 in September and in October. For researching of the animals of the same age there were dissected frogs in size from 30 mm to 50 mm. This size group included the fingerlings and the yearlings. In 2002 were examined 169 frogs. The dissections were conducted from January till December. Were dissected frogs in size from 30 mm to 60 mm, which included the fingerlings and the yearlings. In the frogs blood, we registered by us seven species of parasites – *Trypanosoma ibragimovi*, *T. loricatum*, *T. mega*, *T. mikailovi*, *T. neveulemairei*, *T. pipientis* and *Hepatozoon* sp. Infection of frogs by species *T. ibragimovi*, *T. mega*, *T. mikailovi* were very low during our seasonal researches and so we couldn't reveal its seasonal dynamics. That is why we conducted the analyses of seasonal fluctuation with three species – *T. loricatum*, *T. neveulemairei* and *T. pipientis*. It makes pointless to conduct analyzes of seasonal fluctuation of total frog infection with blood parasites. That is why the analyses were conducted with with three species of blood parasites said above. Were given infection rates indicators – extent of invasion (EI) and average unit intensity of invasion (UII). Specific intensity of invasion is the amount of parasites in the blood smear.

As noted above, the seasonal fluctuations of frog infection with three species of parasitic flagellates of blood differing significantly. So the seasonal dynamics of infection with flagellate *T. loricatum* can be characterized as noted below.

It is known that this type of parasite infect the frog not very strongly in spring, even less in summer and disappear in autumn. Such seasonal fluctuation of infection by the blood parasite of frog would be difficult to explain, if not to take into account other types of infection and blood parasites. Naturally, taking into account the presence of other parasites in the blood of the frog above all it is interesting to find out whether antagonism between different types of parasites. As it turned out, all the frogs infected with flagellate *T. loricatum* were free from other parasitic flagellates. Such a distribution of parasites is difficult to consider a coincidence. It can be assumed that in conditions of the Azerbaijan reservoirs, particularly in condition of Devechi Firth, *T. loricatum* able to be present in the blood of only those frogs that were not infected with other species of blood parasites.

Falling of the infection of the lake frog with flagellate *T. loricatum*, during the entire period of our researches conducted in spring, summer and autumn, give indirect evidence about that the main role in infection of these frogs with this parasite play the leeches that are most active during the cold season. Infection by blood-sucking insects, which are plentiful just in summer and in early autumn, in conditions of Devechi Firth, does not take place or slightly. In seasonal dynamics indicators of infection the flagellate *T. neveulemairei* is markedly differ from the preceding species. The results of researches of 1993rd year showed that since March frog infection with this parasite markedly increased and peaked in June – August, and decreases in autumn (September – October). Presented data on seasonal intensity of infection of the lake frog with flagellates *T. neveulemairei* suggest that apparently a multiplication of the parasite in infected frogs has been at least in the late spring and all summer. However, considering that the EI of frogs with this parasite increases in summer when the activity of the blood-sucking leeches decreases strongly suggests that as carriers of this type the parasite uses not only leeches but also blood-sucking insects.

Seasonal dynamics of infection of frogs with flagellate *T. pipientis* is similar with that one of previous species. Should be noted right away that the material collected by us in 1993 can not be considered sufficient to allow meaningful analysis because these researches were conducted not on a monthly basis but seasonally, it is not possible to detect changes of blood parasites infection of amphibians because may appear within one season. Besides, the winter season is not presented in general in the collected material. Taken together, considering the absence of any data on the seasonal dynamics of infection of blood parasites of amphibians in Azerbaijan, the research carried out by us in 2002 can be considered the first positive step in this direction.

On repeating of researches of the blood of the lake frog of the Devechi Firth, we noted the same rods flagellate species which were noted in 1993. About the nature of the fluctuation of the lake frog with flagellate infection *T. loricatum* in 2002 can be said following. The infection of frogs with this parasite occurs winter and early summer, in spring and in early summer, they multiply in the body of frogs, and by the end of summer the infection is greatly decrease. Single specimens of parasites in the blood of frogs begin to appear in the autumn. As for the flagellate *T. neveulemairei* the flagellate that infects during the year the lake frog of the Devechi Firth stronger than other blood parasites, then in 2002 as EI and II make create two ascents and two lowering forming bimodal curves. The first vertex of each of these curves is comes to June, and the second vertex comes to September. For flagellate *T. pipientis* can be said that EI and II for lake frog this parasite slowly increase from March to August, in September become a little lower, a little increase in October, and decrease in these values in the end of the year. Comparison of seasonal fluctuation of infection of frogs in Devechi Firth with three species of trypanosomes shows the following. In January the UII of the lake frog of *Trypanosoma loricatum* and *T. pipientis* species was low and EI accordingly compiled 20,0 % and 10,0 %. The *T. neveulemairei* was not registered in January. In February EI and II of the *T. loricatum* species is increasing a little, appear specie *T. neveulemairei*, and species *T. pipientis* disappears. In March registered only *T. loricatum* and

T. neveulemairei. EI is increasing a little but II is increasing significantly and reaches peak. In April EI and II continue to increase by species *T. neveulemairei*. This indicators for species *T. loricatum* become lower. Appears species *T. pipientis* but infection by it not very high.

In May EI and II of species *T. neveulemairei* noticeably increase and the same indicators of the invasion of species *T. loricatum* become lower. Infection with species *T. pipientis* is almost not changing, remaining low. *T. neveulemairei* reaches maximum, infection with species *T. loricatum* become lower and infection with species *T. pipientis* is not changing, remaining low as in May. In July EI and II of species *T. neveulemairei* decreases sharply, at the same time there is a sharp increasing of the same indicators of *T. pipientis*. In August EI and II of species *T. neveulemairei* fall lower but II not changing significantly. In this month EI and II of species *T. pipientis* increases reaches its maximum. *T. loricatum* disappears and not appears until november.

In September EI and II of species *T. neveulemairei* sharply increases again and forms the second peak. At the same time EI and II of species *T. pipientis* become lower. In September EI and II of species *T. neveulemairei* decreases, at the same time sharply increases both that indicators of the species *T. pipientis*. It seems that there is an antagonism between these two species, not allowing the simultaneous increase of the infection of the frog with both of them. In November the infection with species *T. neveulemairei* and *T. pipientis* decreases and the lowering of water temperature could be the reason of this. In this time in frog blood appears the species *T. loricatum*. However the infection with this species is not very high. In December infection with species *T. neveulemairei* and *T. pipientis* continue to decrease and infection with species *T. loricatum* increasing a bit. From the joint analysis of the fluctuation of infection of the lake frog of Deveshi Firth with all three types of flagellates it's found that infection with *T. loricatum* remains low during all the year. So researches of the seasonal fluctuation of infection of lake frog conducted with us in 1993 and 2002 years showed that the main factor determining both directly and indirectly infection of amphibians with blood parasites is the temperature of water. The direct influence of water temperature is to promote the breeding of flagellates, which is activated when the water temperature is 15 - 20 degrees. A sharp increase of the intensity of infection of parasites blood causes an increase of resistance of frog organism in response to the hyperinvasion and in a result of this the infection is decreases. After this the resistance of frog organism decreases a bit, under favorable temperature conditions there are re-increasing of the extensity and intensity of invasion. Indirect influence of the temperature factor is expressed in the fact of that the strong leeches attack on frogs and also the multiplying of flagellates in leeches is mainly occurs the cold season.

Key words: frog, leech, parasite, season, extensiveness and intensiveness of the invasion.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение зависимости паразитофауны животных от сезонных явлений является одним из важных вопросов экологической паразитологии и имеет как теоретическое, так и практическое значение. Исследование сезонной периодичности инвазии животных паразитами, с одной стороны, дает материал для выяснения особенностей биологии и экологии паразитов, их взаимоотношений с хозяевами, с другой стороны позволяет выявить периоды наибольшей зараженности животных и наиболее опасные в эпизоотологическом отношении, а также моменты, когда наиболее целесообразно организовывать борьбу с патогенными видами.

Сезонные изменения факторов среды оказывают на паразитофауну животных и на степень зараженности их паразитами большое влияние. При этом их воздействие на паразитов носит двойкий характер. С одной стороны, происходит непосредственное влияние изменения температуры на паразита, с другой стороны, сезонные изменения условий обитания могут оказать на паразитов и опосредованное воздействие через изменения в физиологическом состоянии и поведении их хозяев.

Основным фактором сезонной периодичности, оказывающим на живые организмы как непосредственное, так и опосредованное воздействие, является температура окружающей среды. Температура тела пойкилотермных животных (рыб, амфибий и др.) примерно соответствует температуре среды, в которой они обитают. В тех же температурных условиях оказываются и организмы, паразитирующие на них, причем не только эктопаразиты, но и эндопаразиты, в том числе и паразиты крови. Поэтому изменения температуры среды, в которой обитают эти животные, оказывают на кровепаразитов не только опосредованное (через изменения физиологического состояния и поведения их хозяев – рыб и амфибий, кровососущих пиявок и, возможно, насекомых), но и непосредственное воздействие.

Несмотря на то, что работы, посвященные изучению сезонных изменений зараженности рыб кровепаразитами, проводились до исследований, проведенных М.А. Гусейновым, их сравнительно немного [1-8]. Анализ же литературных данных показал, что исследования, проводимые в этом направлении по паразитам крови амфибий, за исключением двух работ М.А. Гусейнова [9, 10], отсутствуют.

Цель настоящей работы – проведение сравнительного анализа сезонных изменений зараженности озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas) Девичинского лимана кровепаразитами в 1993 и 2002 годах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При выборе объекта сезонных исследований зараженности амфибий кровепаразитами мы исходили из следующих соображений: выбранный нами вид амфибий не должен был совершать значительных миграций; быть достаточно многочисленным и легкодоступным; не представлять высокой коммерческой ценности; быть зараженным не одним, а хотя бы двумя или тремя видами кровепаразитов; иметь достаточно высокие показатели экстенсивности и интенсивности заражения паразитами крови. Всем указанным требованиям отвечала озерная лягушка, обитающая в Девичинском лимане. Учитывая это, в 1993 году на плесе Ханлар Девичинского лимана мы проводили сезонные исследования зараженности озерной лягушки кровепаразитами, для чего с марта по октябрь подвергли вскрытиям 77 лягушек: 28 – в марте, 20 – апреле и мае, 18 – июне, июле и августе, 11 – в сентябре и октябре. Чтобы сезонные исследования охватили животных примерно одного возраста, мы вскрывали только лягушек размером от 30 мм до 50 мм. Эта размерная группа включает сеголеток и годовиков.

Кровь у лягушек брали из сердца, приготавливали мазки, фиксировали метиловым спиртом и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза (рН 7,2). Приводятся такие показатели зараженности озерной лягушки кровепаразитами, как экстенсивность инвазии (ЭИ) и средняя удельная интенсивность инвазии (УИИ ср.). Удельная интенсивность инвазии (УИИ) – это количество паразитов, приходящееся на мазок крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В крови озерной лягушки, обитающей в лимане, нами зарегистрировано семь видов паразитов – *Trypanosoma ibragimovi*, *T. loricatum*, *T. mega*, *T. mikailovi*, *T. neveulemairei*, *T. pipientis* и *Hepatozoon* sp. Зараженность озерной лягушки видами *T. ibragimovi*, *T. mega* и *T. mikailovi*, во время наших сезонных исследований была очень низкой, что не позволило раскрыть ее сезонную динамику. Мы не стали проводить анализ сезонных изменений зараженности озерной лягушки споровиком *Hepatozoon* sp., так как этот вид не был идентифицирован. Невозможно даже утверждать, соответствует ли это название одному виду или указанный нами споровик является “сборным”, т.е. состоит из двух или более видов. Показатели зараженности озерной лягушки остальными тремя видами – *T. neveulemairei*, *T. pipientis* и *T. loricatum* за каждый из указанных отрезков времени приведены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что сезонные изменения зараженности лягушки различными видами кровепаразитов различаются довольно существенно. Это делает бессмысленным анализ сезонных изменений общего заражения озерной лягушки кровепаразитами. Поэтому на рисунках 1 и 2 мы приводим данные о сезонных изменениях ЭИ и УИИ лишь отдельными видами кровепаразитов, а не всеми вместе.

По-видимому, сезонные изменения ЭИ озерной лягушки могут быть результатом как полного исчезновения жгутиконосцев из крови части особей и нового заражения лягушек, так и уменьшения количества паразитов до такой степени, что мы уже не могли обнаружить их. Вслед за этим происходит новое увеличение количества паразитов, что позволяет нам вновь зарегистрировать их в крови лягушек. Допустимо и такое предположение, что

в определенные периоды кровепаразиты могут скапливаться во внутренних органах и по этой причине не обнаруживаться в периферической крови лягушек.

Как уже отмечалось выше, сезонные изменения зараженности озерной лягушки тремя видами паразитических жгутиконосцев крови существенно отличаются друг от друга. Так, сезонную динамику заражения жгутиконосцем *T. loricatum* можно охарактеризовать следующим образом.

Ранней весной (в марте) из 28 обследованных лягушек этим паразитом были заражены только две (7,1%), у одной удельная интенсивность инвазии (УИИ) составила 1 экз., а у другой – 25 экз. (средняя удельная интенсивность 13,0 экз.). В апреле-мае из 20-ти обследованных лягушек этим паразитом были заражены также две лягушки (10,0%), УИИ была соответственно 4 экз. и 7 экз.

Летом (июнь-август) из 18 обследованных лягушек этим паразитом была заражена только одна, УИИ составили 1 экз. Осенью (сентябрь-октябрь) мы обследовали 11 лягушек, но паразита не обнаружили.

Таблица 1 – Показатели зараженности озерной лягушки жгутиконосцами *Trypanosoma loricatum*, *T. neveulemairei* и *T. pipientis* с марта по октябрь 1993 года

Вид паразита	Месяцы	Показатели зараженности			
		ЭИ (%)	УИИ	УИИ (ср.)	УИО
<i>Trypanosoma loricatum</i>	III	7,1	1-25	13,0	1,0
	IV – V	10,0	4-7	5,5	0,55
	VI – VIII	5,6	1	1	0,06
	IX – X	0	0	0	0
<i>T. neveulemairei</i>	III	3,6	2	2	0,07
	IV – V	20,0	1-12	6,8	0,8
	VI – VIII	61,1	1-25	10,9	3,9
	IX – X	27,3	1-4	2,3	0,6
<i>T. pipientis</i>	III	0	0	0	0
	IV – V	5,0	1	1	0,05
	VI – VIII	11,1	2-4	2,7	0,33
	IX – X	27,2	1-5	2,6	0,5
Вместе	III	10,7	1-25	12,3	1,1
	IV – V	25,0	1-12	7,1	1,4
	VI – VIII	61,1	1-27	11,2	4,1
	IX – X	36,4	1-6	2,1	1,3

Из приведенных данных видно, что этот вид паразита заражает озерную лягушку не очень сильно весной, еще меньше – летом, а осенью он вообще исчезает. Такой характер сезонных изменений зараженности лягушки данным паразитом было бы трудно объяснить, если не учитывать зараженность и другими видами кровепаразитов. Естественно, при учете присутствия и других паразитов в крови лягушки, прежде всего, интересно выяснить, имеется ли какой-либо антагонизм между различными видами паразитов. Как оказалось, все лягушки, зараженные жгутиконосцем *T. loricatum*, оказались свободными от других паразитических жгутиконосцев. Такое распределение паразитов трудно считать случайным совпадением. Можно предположить, что *T. loricatum* в условиях водоемов Азербайджана, в частности, в условиях Девичинского лимана способна присутствовать в крови только тех лягушек, которые не заражены другими видами кровепаразитов.

Падение зараженности озерной лягушки жгутиконосцем *T. loricatum* в течение всего периода наших исследований, приходящихся на весну, лето и осень, косвенно

свидетельствует и о том, что в заражении лягушек этим паразитом основную роль играют пиявки, которые наиболее активны в холодное время года. Заражение же посредством кровососущих насекомых, которые многочисленны как раз летом и в начале осени, в условиях Девичинского лимана или не имеет место, или же незначительно.

По сезонной динамике показателей зараженности жгутиконосец *T. neveulemairei* заметно отличается от предыдущего вида. Результаты исследований 1993 года, приведенные в таблице 1, а также на рисунках 1 и 2, показывают, что в марте этим паразитом была заражена только одна особь лягушки, УИИ при этом составила 2 экз. В апреле-мае ЭИ повысилась до 20,0%, а УИИ ср. до 6,8 экз., при максимальной УИИ – 12 экз. Летом (июнь-август), как ЭИ, так и УИИ были еще выше – соответственно 61,1% и 10,9 экз., при максимальной УИИ 25 экз. Осенью (сентябрь-октябрь) ЭИ упала до 27,3%, а УИИ ср. – до 2,3 экз. Абсолютный показатель УИИ равнялся 4 экз.

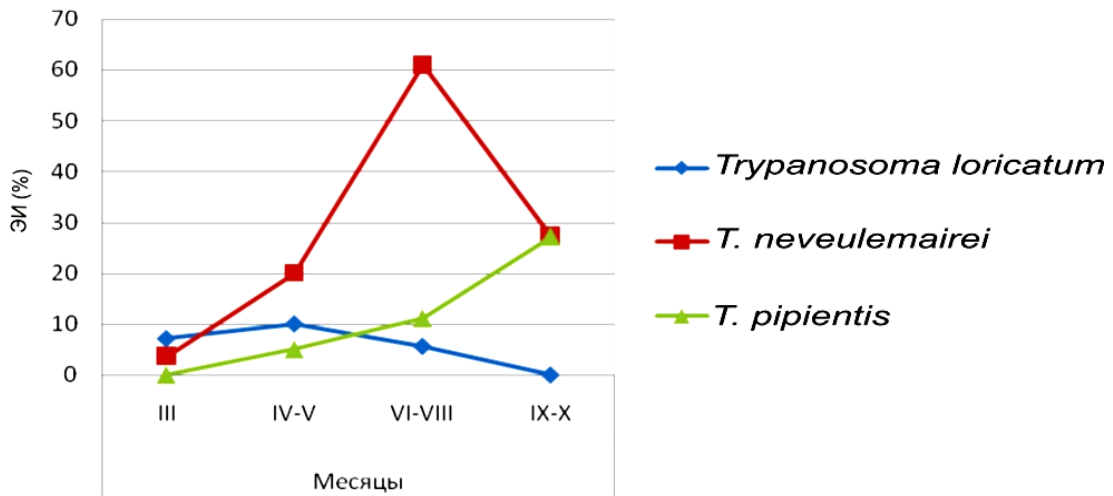


Рис. 1. Сезонные изменения экстенсивности инвазии (%) озерной лягушки Девичинского лимана жгутиконосцами *Trypanosoma loricatum*, *T. neveulemairei* и *T. pipientis* в 1993 году.

Приведенные данные по сезонной интенсивности зараженности озерной лягушки жгутиконосцем *T. neveulemairei* позволяют предположить, что, по-видимому, имело место размножение этого паразита в организме зараженных лягушек, по крайней мере, в конце весны и все лето. Однако, учитывая то, что ЭИ лягушек этим паразитом повышается летом, когда активность кровососущих пиявок сильно падает, можно предположить, что в качестве переносчиков этот вид паразитов использует не только пиявок, но и кровососущих насекомых.

Сезонная динамика зараженности лягушек жгутиконосцем *T. pipientis* схожа с таковым предыдущего вида. В марте мы этого паразита в крови лягушек не находили. В апреле-мае он был отмечен у одной лягушки (5,0%), УИИ составила 1 экз. Летом (июнь-август) зараженными были две особи лягушек (11,1%), УИИ ср. составила 3,0 экз. Осенью (сентябрь-октябрь) зараженность этим паразитом мало изменилась, среди всех обследованных лягушек этим жгутиконосцем были заражены две особи (27,2%), УИИ равнялась 2,6 экз.

Жгутиконосец *T. pipientis*, за одним исключением, отмечался нами в крови только тех лягушек, которые не были заражены другими видами кровепаразитов. Лишь в крови у одной лягушки, обследованной осенью, кроме этого жгутиконосца (УИИ 1 экз.), была отмечена и *T. neveulemairei* (УИИ – 1 экз.). Возможно, что слабую зараженность лягушек жгутиконосцем *T. pipientis* можно объяснить антагонизмом между видами.

Следует сразу же отметить, что материал по зараженности озерной лягушки в Девичинском лимане, собранный нами в 1993 году, нельзя считать достаточным для проведения полноценного анализа, так как эти исследования велись не ежемесячно, а посезонно, что не позволяло выявить изменения зараженности амфибий кровепаразитами, возможно, имеющее место внутри одного сезона. Кроме того, в собранных материалах зимний сезон вообще не представлен. Вместе с тем, учитывая отсутствие каких-либо данных о сезонной динамике зараженности амфибий паразитами крови в Азербайджане, исследования, проведенные нами в 2002 году, можно считать первым положительным шагом, сделанным в этом направлении.

Новые исследования сезонной динамики зараженности озерной лягушки кровепаразитами на плесе Ханлар Девичинского лимана охватили период с января по декабрь. В таблице 2 показано количество лягушек, обследованных нами в различные месяцы, и средняя температура воды за каждый месяц.

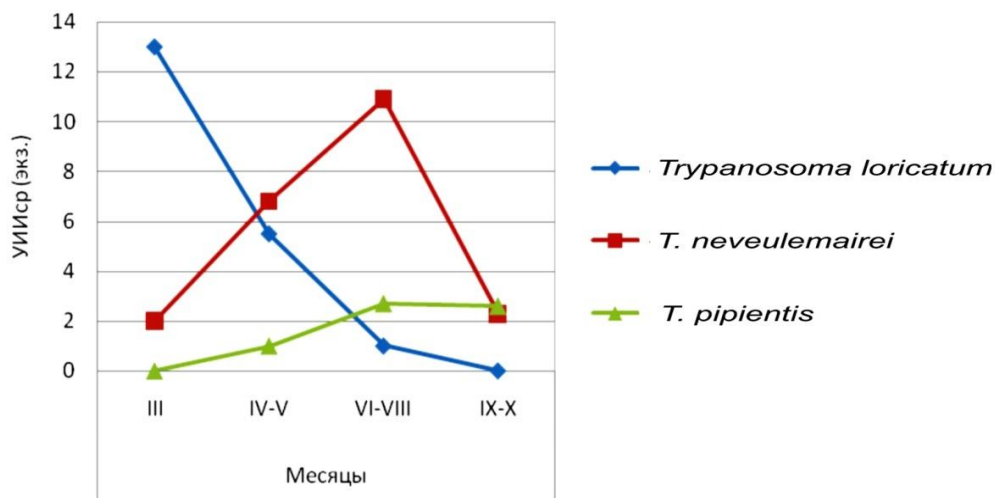


Рис. 2. Сезонные изменения среднего значения удельной интенсивности инвазии (в экз.) озерной лягушки Девичинского лимана жгутиконосцами *Trypanosoma loricatum*, *T. neveulemairei* и *T. pipientis* в 1993 году.

В течение этого года на наличие кровепаразитов было обследовано 169 особей озерной лягушки. Чтобы сезонные исследования охватили животных примерно одного возраста, мы вскрывали лягушек размером от 30 мм до 60 мм, которые состояли из сеголеток и годовиков.

При повторном исследовании крови озерной лягушки Девичинского лимана нами были отмечены те же три вида жгутиконосцев, что и в 1993 году. В таблице 3 приводятся экстенсивность инвазии (ЭИ), удельная интенсивность инвазии (УИИ), средняя удельная интенсивность инвазии (УИИ ср.) и удельный индекс обилия (УИО – сумма паразитов, обнаруженных в одном мазке каждого зараженного хозяина, разделенная на количество исследованных хозяев) каждого паразита за каждый месяц года.

По данным наших исследований, в самом начале января 2002 года ЭИ жгутиконосцем *Trypanosoma loricatum* составила 20,0%; УИИ была невысокой – 1-2 экз., УИИ ср. – 1,5 экз. В феврале ЭИ изменяется незначительно, она поднимается до 25,0%, в то же время наблюдается изменение УИИ (1-7 экз.), она повышается более, чем в два раза (3,6 экз.). В марте УИИ продолжает расти (2-23 экз.; УИИ ср. – 12,5 экз.), несмотря на то, что ЭИ даже несколько понижается (до 18,2%). Это свидетельствует о том, что в организме лягушек проходило размножение *T. loricatum*.

В апреле начинается понижение зараженности лягушек жгутиконосцем *T. loricatum* (ЭИ – 12,5%; УИИ – 3-19 экз.; УИИ ср. – 10,5 экз.), которая продолжается в мае (ЭИ – 11,8%; УИИ – 2-8 экз.; УИИ ср. – 5,0 экз.), июне (ЭИ – 6,7%; УИИ – 2 экз.; УИИ ср. – 2,0 экз.) и июле (ЭИ – 6,3%; УИИ – 2 экз.; УИИ ср. – 1,0 экз.).

В августе, сентябре и октябре жгутиконосца *T. loricatum* у озерной лягушки мы ни разу не отметили. В ноябре этот паразит отмечен в крови одной особи лягушки, при этом УИИ ср. составила 1 экз., а в декабре – в крови двух лягушек (ЭИ – 18,2%; УИИ – 1-2 экз.; УИИ ср. – 1,5 экз.).

В целом, о характере изменений зараженности озерной лягушки жгутиконосцем *T. loricatum* можно сказать следующее. Зимой и в начале лета происходит заражение лягушек этим паразитом, весной и в начале лета они размножаются в организме лягушек, а к концу лета зараженность сильно падает. Единичные особи паразита начинают появляться в крови лягушек осенью.

Таблица 2 – Количество обследованных нами лягушек и средняя температура воды (по данным Гидрометеослужбы) на плесе Ханлар Девичинского лимана в течение 2002 года

Месяцы	Число лягушек (экз.)	Температура воды
Январь	10	2,9
Февраль	12	3,4
Март	11	5,9
Апрель	16	14,7
Май	17	19,9
Июнь	15	23,9
Июль	16	26,8
Август	15	27,4
Сентябрь	17	25,3
Октябрь	15	19,6
Ноябрь	14	12,1
Декабрь	11	6,6

В январе жгутиконосец *T. neveulemairei* крови лягушек не отмечен. В феврале и в марте он найден по одному разу (ЭИ, соответственно, составляла 8,3% и 9,1%; УИИ – 1 экз. и 2 экз.; УИИ ср. – 1,0 экз. и 2,0 экз.).

В апреле с повышением температуры воды начинается заметное увеличение показателей зараженности, ЭИ составляет 25,0%, УИИ – 3-6 экз., УИИ ср. – 3,9 экз. В мае повышение зараженности продолжается, ЭИ достигает 29,4%, УИИ – 1-15 экз., УИИ ср. – 7,4 экз.

В июне зараженность достигает максимума, ЭИ доходит до 66,7%, УИИ – до 2-26 экз., УИИ ср. – до 13,8 экз.

В июле, по-видимому, повышается резистентность организма лягушек в ответ на гиперинвазию этим паразитом и происходит падение зараженности. ЭИ понижается до 37,5%, УИИ – до 2-8 экз., а УИИ ср. – до 3,3 экз. В августе понижение зараженности продолжается, ЭИ составляет 20,0%, УИИ – 1-7 экз., УИИ ср. – 4,3 экз.

После понижения зараженности, по-видимому, снижается и резистентность организма лягушек, которая повысилась в ответ на гиперинвазию.

В сентябре, когда температура воды еще достаточно высокая для размножения кровепаразитов ЭИ равнялась 52,9%, УИИ – 2-16 экз., УИИ ср. – 9,1 экз.

В дальнейшем, в связи с падением температуры воды зараженность лягушек этим паразитом понижается: в октябре ЭИ уменьшается до 33,3%, УИИ – до 1-4 экз., а УИИ ср. – до 2,6 экз.; в ноябре ЭИ падает еще до 14,3%, УИИ – до 1-2 экз., а УИИ ср. – до 1,5 экз.; в декабре ЭИ падает до 9,1%, УИИ – до 1 экз., а УИИ ср. – до 1 экз.

По приведенным выше данным, в 2002 году ЭИ и интенсивность инвазии (ИИ) жгутиконосцем *T. neveulemairei*, который заражает в течение года озерную лягушку

Девичинского лимана сильнее других кровепаразитов, совершают два восхождения и два опускания, образуя двухвершинные кривые. Первая вершина каждой из этих кривых приходится на июнь, а вторая вершина – на сентябрь.

Третий из кровепаразитов озерной лягушки *T. pipientis*, сезонную динамику зараженности которой мы исследовали, найден в крови одной из десяти (10,0%) исследованных лягушек. УИИ при этом составила 1 экз., УИИ ср. – 1,0 экз.

В феврале и марте среди обследованных лягушек не были зарегистрированы особи, зараженные жгутиконосцем *T. pipientis*.

В каждый из месяцев (апрель, май и июнь) были зарегистрированы по две особи лягушки, зараженные этим паразитом (ЭИ была, соответственно, 12,5%, 11,8% и 13,3%). УИИ составляла 1-2 экз., 1-2 экз. и 1-3 экз., а УИИ ср. – 1,3 экз., 1,5 экз. и 2,0 экз. В июле начинается повышение зараженности озерной лягушки жгутиконосцем *T. pipientis*. Это повышение продолжается два месяца, в июле ЭИ составляет 25,0%, УИИ – 1-3 экз., а УИИ ср. – 2,3 экз.

В августе ЭИ достигает 40,0%, УИИ – 1-5 экз., а УИИ ср. – 2,8 экз. В сентябре ЭИ падает до 17,6%, УИИ – до 1-2 экз., а УИИ ср. – до 1,3 экз.

В октябре происходит небольшое повышение зараженности, ЭИ доходит до 33,3%, УИИ остается 1-2 экз., а УИИ ср. немного повышается – до 2,4 экз.

В ноябре и декабре происходит понижение заражения. ЭИ составляет, соответственно, 21,4% и 18,2%, УИИ – 1-2 экз. и 1 экз., УИИ ср. – 1,7 экз. и 1 экз.

Можно сказать, что как ЭИ, так и ИИ озерной лягушки жгутиконосцем *T. pipientis* медленно повышается с марта по август, в сентябре немного понижается, в октябре чуть повышается и далее до конца года идет на понижение.

Сравнение сезонных изменений зараженности озерной лягушки Девичинского лимана тремя видами трипаносом, которое приводится в рис. 3 и 4, показывает следующее.

В январе УИИ ср. озерной лягушки видами *Trypanosoma loricatum* (1,5 экз.) и *T. pipientis* (1,0 экз.) была низкой, а ЭИ составляла, соответственно, 20,0% и 10,0%. *T. neveulemairei* в январе не была отмечена.

В феврале ЭИ и ИИ видом *T. loricatum* несколько повышается, появляется вид *T. neveulemairei*, а вид *T. pipientis* исчезает. В марте отмечены только *T. loricatum* и *T. neveulemairei*. ЭИ первым повышается немного, а ИИ повышается очень существенно и достигает пика. В апреле продолжается повышение ЭИ и ИИ инвазии видом *T. neveulemairei*. У вида *T. loricatum* эти показатели немного понижаются. Появляется вид *T. pipientis*, но зараженность им невысокая.

В мае ЭИ и ИИ видом *T. neveulemairei* заметно повышаются, а эти же показатели инвазии видом *T. loricatum* понижаются. Зараженность видом *T. pipientis* почти не изменяется, оставаясь невысокой.

В июне ЭИ и ИИ видом *T. neveulemairei* достигает максимума, зараженность видом *T. loricatum* понижается, а видом *T. pipientis* почти не изменяется, оставаясь, как и в мае, невысокой.

В июле ЭИ и ИИ видом *T. neveulemairei* резко падают, в это время происходит резкое повышение тех же показателей по *T. pipientis*.

В августе ЭИ видом *T. neveulemairei* падает еще ниже, а ИИ изменяется незначительно. В этот же месяц ЭИ и ИИ видом *T. pipientis* повышается, достигнув своего максимума. *T. loricatum* исчезает и не появляется до ноября.

Таблица 3 – Показатели зараженности озерной лягушки жгутиконосцами *Trypanosoma loricatum*, *T. neveulemairei* и *T. pipientis* в течение 2002 года

Паразиты	Показатели зараженности	Месяцы											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Trypanosoma loricatum</i>	ЭИ	20,0	25,0	18,2	12,5	11,8	6,7	6,3	0	0	0	7,1	18,2
	УИИ	1-2	1-7	2-23	3-19	2-8	2	1	0	0	0	1	1-2
	УИИ (ср.)	1,5	3,6	12,5	10,5	5,0	2,0	1,0	0	0	0	1,0	1,5
	УИО	0,3	0,9	2,3	1,3	0,6	0,1	0,06	0	0	0	0	0
<i>T. neveulemairei</i>	ЭИ	0	8,3	9,1	25,0	29,4	66,7	37,5	20,0	52,9	33,3	14,3	9,1
	УИИ	0	1	2	2-6	1-15	2-26	2-8	1-7	2-16	1-4	1-2	1
	УИИ (ср.)	0	1	2	3,9	7,4	13,8	3,3	4,3	9,1	2,6	1,5	1
	УИО	0	0,1	0,2	1,0	2,2	9,2	1,2	0,9	4,8	0,9	0,2	0,1
<i>T. pipientis</i>	ЭИ	10,0	0	0	12,5	11,8	13,3	25,0	40,0	17,6	33,3	21,4	18,2
	УИИ	1	0	0	1-2	1-2	1-3	1-3	1-5	1-2	1-2	1-2	1
	УИИ (ср.)	1,0	0	0	1,3	1,5	2,0	2,3	2,8	1,3	2,4	1,7	1,0
	УИО	0,1	0	0	0,2	0,2	0,3	0,6	1,1	0,2	0,8	0,4	0,2

В сентябре ЭИ и ИИ видом *T. neveulemairei* снова резко повышается, образуя второй пик. Одновременно падает ЭИ и ИИ видом *T. pipientis*.

В октябре ЭИ и ИИ видом *T. neveulemairei* падают, в то же время резко повышаются оба эти показателя по виду *T. pipientis*. Создается впечатление, что между этими видами существует антагонизм, что препятствует одновременному повышению заражения лягушки обоими паразитами.

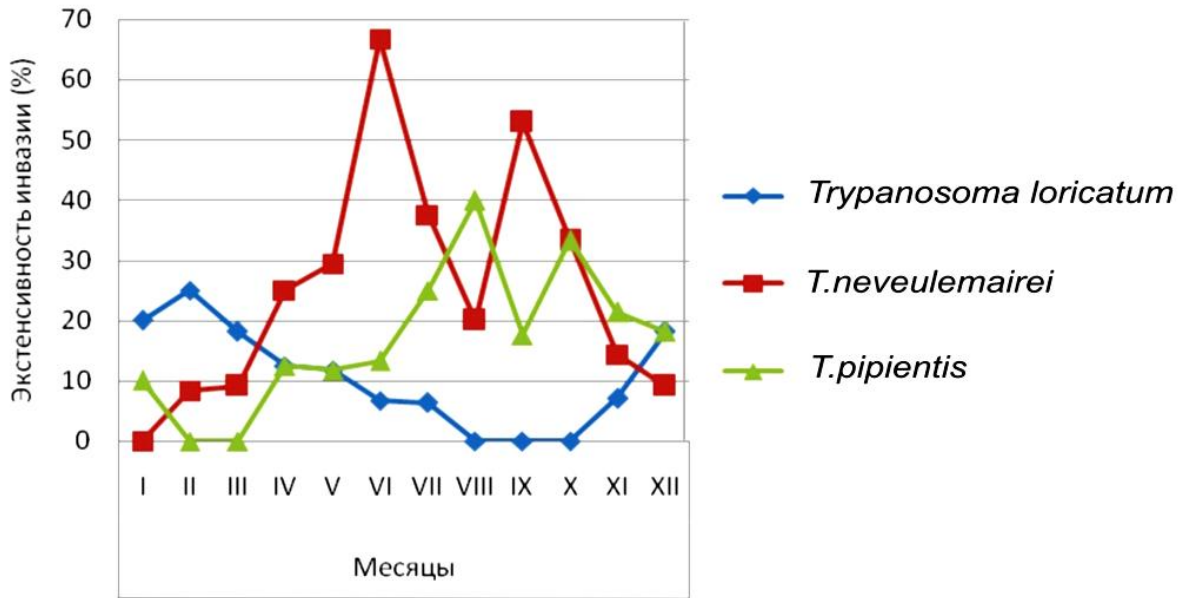


Рис. 3. Сезонные изменения экстенсивности инвазии (%) озерной лягушки Девичинского лимана жгутиконосцами *Trypanosoma loricaum*, *T. neveulemairei* и *T. pipientis* в 2002 году.



Рис. 4. Сезонные изменения среднего значения удельной интенсивности инвазии (экз.) озерной лягушки Девичинского лимана жгутиконосцами *Trypanosoma loricaum*, *T. neveulemairei* и *T. pipientis* в 2002 году.

В ноябре зараженность видами *T. neveulemairei* и *T. pipientis* падает, причиной чего может быть понижение температуры воды. В это же время в крови лягушек появляется вид *T. Loricatum*, однако зараженность им бывает невысокой. В декабре зараженность видами *T. neveulemairei* и *T. pipientis* продолжает понижаться, а зараженность видом *T. loricatum* несколько повышается.

Из совместного анализа изменений зараженности озерной лягушки Девечинского лимана всеми тремя видами жгутиконосцев видно, что зараженность видом *T. loricatum* в течение всего года остается невысокой.

Поскольку материал, собранный нами в 1993 году, не охватывает все месяцы года и не дает полноценных данных, достаточных адекватным сборам 2002 года, мы намеренно не даем сравнительный анализ зараженности озерной лягушки Девечинского лимана в 1993 и 2002 годах.

Перспективами дальнейших исследований является изучение сезонной динамики зараженности болотной черепахи Девечинского лимана гемогрегариной (*Haemogregarina* sp.). Кроме того, предусмотрено изучение жизненного цикла этого споровика.

ВЫВОДЫ

1. Исследования сезонных изменений зараженности озерной лягушки, проведенные нами в 1993 и 2002 годах, показали, что основным фактором, определяющим и прямо, и косвенно инвазированность амфибий кровепаразитами, является температура воды.
2. Прямое воздействие температуры воды заключается в стимулировании размножения жгутиконосцев, которое активизируется при температуре воды 15-20°С. Резкое повышение интенсивности инвазии кровепаразитами вызывает повышение резистентности организма лягушек в ответ на гиперинвазию, в результате этого зараженность снижается. После этого резистентность организма лягушек несколько падает и при наличии благоприятных температурных условий происходит повторное повышение экстенсивности и интенсивности инвазии.
3. Опосредованное же воздействие температурного фактора выражается в том, что активное нападение пиявок на лягушек, а также размножение жгутиконосцев в пиявках приходится, в основном, на холодное время года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивасик В.М. Паразиты карпа в рыбхозах западных областей УССР и болезни, ими вызываемые / В.М. Ивасик // Тр. НИИПОРХ УССР. – К., 1953. – Т. 9. – С. 85-122.
2. Залевская-Шаповал Н.М. Кровепаразитические простейшие рыб бассейна Днепра: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.19. / Н.М. Залевская-Шаповал. – Киев, 1954. – 20 с.
3. Хайбулаев К.Х. Кровепаразитические простейшие рыб Каспийского моря: дисс. ... канд. биол. наук / К.Х. Хайбулаев. – Махачкала, 1969. – 232 с.
4. Naturally occurring Trypanosoma granulosum infections in the European eel, *Anguilla anguilla* L. from County Mayo, western Ireland / Zintl A., Poole W.R., Voorheis H.P., Holland C.V. // Journal of Fish Diseases. – 2004. – Vol. 27, issue 5. – P. 333-341.
5. Cottrell B. J. A trypanosome from the plaice, *Pleuronectes platessa* L. / B.J. Cottrell // Journal of Fish Biology. – 2007. – Vol. 71, Issue 1. – P. 35 – 47.
6. Ahmed Sh.M. A Study on Trypanosomiasis in some Freshwater Fishes at Assiut Governorate / Sh.M. Ahmed // Envir. Encyclopedia Ass. Univ. – 2004. – Vol.45, №. 2. – P. 5 – 17.

7. Hansen H. Infection of haemoflagellates (Protozoa, Kinetoplastida) in freshwater fish from the lake Vannsjo, Norway. Cand. Scient / H. Hansen // Thesis in Parasitology. – University of Oslo, Zoological Museum, Sars gate 1, N-0562 Oslo, 2005. – 44 p.
8. Akmirza A. Seasonal variation in some haematological parameters in naturally infected and uninfected rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) with *Cryptobia tincae* / A. Akmirza, R. Tepecik // Bull. Eour. Fish. Pathol. – 2006, № 26(4). – P. 180 – 185.
9. Гусейнов М.А. Простейшие – кровепаразитов рыб и амфибий Девичинского лимана и Малого Кызыл-Агачского залива Каспийского моря: диссертация канд. биол. наук. 00.03.19: – «Паразитология» / М.А. Гусейнов. – Баку, 1983. – 167 с.
10. Гусейнов М.А. Сезонная динамика зараженности озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas) Девичинского лимана паразитами крови / М.А. Гусейнов // Вестник инновационного евразийского университета. – Казахстан, Павлодар, 2011. – №1 (41). – С. 213-217.

REFERENCES

1. Ivasik V.M. Parazity karpa v rybhozah zapadnyh oblastej USSR i bolezni, imi vyzyvaemye / V.M. Ivasik // Tr. NIIPORH USSR. – Kiev, 1953. – Т. 9. – S. 85-122.
2. Zalevskaja-Shapoval N.M. Kroveparaziticheskie prostejshie ryb bassejna Dnepra: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk: 03.00.19 / N.M. Zalevskaja-Shapoval. – Kiev, 1954. – 20 s.
3. Hajbulaev K.H. Kroveparaziticheskie prostejshie ryb Kaspijskogo morja: diss. ... kand. biol. nauk. / K.H. Hajbulaev. – Mahachkala, 1969. – 232 s.
4. Naturally occurring *Trypanosoma granulosum* infections in the European eel, *Anguilla anguilla* L. from County Mayo, western Ireland / Zintl A., Poole W.R., Voorheis H.P., Holland C.V. // Journal of Fish Diseases. – 2004. – Vol. 27, issue 5. – P. 333-341.
5. Cottrell B. J. A trypanosome from the plaice, *Pleuronectes platessa* L. / B. J. Cottrell // Journal of Fish Biology. – 2007. – Vol. 71, Issue 1. – P. 35 – 47.
6. Ahmed Sh.M. A Study on Trypanosomiasis in some Freshwater Fishes at Assiut Governorate / Sh.M. Ahmed // Envir. Encyclopedia Ass. Univ. – 2004. – Vol.45, №. 2. – P. 5 – 17.
7. Hansen H. Infection of haemoflagellates (Protozoa, Kinetoplastida) in freshwater fish from the lake Vannsjo, Norway. Cand. Scient / H. Hansen // Thesis in Parasitology. – University of Oslo, Zoological Museum, Sars gate 1, N-0562 Oslo, 2005. – 44 p.
8. Akmirza A. Seasonal variation in some haematological parameters in naturally infected and uninfected rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) with *Cryptobia tincae* / A. Akmirza, R. Tepecik // Bull. Eour. Fish. Pathol. – 2006, № 26(4). – P. 180 – 185.
9. Gusejnov M.A. Prostejshie – kroveparazitov ryb i amfibij Divichinskogo limana i Malogo Kyzyl-Agachskogo zaliva Kaspijskogo morja: dissertation kand. biol. nauk. 00.03.19 – «Parazitologija» / M.A. Gusejnov – Baku, 1983. – 167 s.
10. Gusejnov M.A. Sezonnaja dinamika zarazhennosti ozernoj ljagushki *Pelophylax ridibundus* (Pallas) Devechinskogo limana parazitami krovi / M.A. Gusejnov // Vestnik innovacionnogo evrazijskogo universiteta. – Kazahstan, Pavlodar, 2011. – №1 (41). – S. 213-217.

УДК 576.893.19

**ЭЙМЕРИИ (*EIMERIIDA*, *COCCIDEA*, *APICOMPLEXA*)
ДОМАШНИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ
В АЗЕРБАЙДЖАНЕ**

Искендерова Н.Г.

*Институт зоологии НАН Азербайджана**AZ 1073, Азербайджан, Баку, ул. А.Аббасзаде, проезд 1128, квартал 504*

nargiz308@gmail.com

В статье представлены результаты многолетних исследований кокцидий рода *Eimeria* у домашних жвачных животных Азербайджана. В Азербайджане количество обнаруженных видов эймерий уменьшилось, у крупного рогатого скота было отмечено 10, ныне 8, у буйволов, соответственно 9 и 6. Самыми распространенными патогенными видами эймерий являются *E.zuernii*, *E.bovis*, которые наносят существенный ущерб хозяйству. В Азербайджане сегодня валидными видами у мелких жвачных животных считаем 18, из них 10 видов общие для коз и овец. У верблюдов, разводимых в Азербайджане, видовой состав кокцидий рода *Eimeria* отмечен одним видом – *E.dromedari*.

Ключевые слова: кокцидии, эймерия, виды, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, зараженность.

**ЕЙМЕРІЇ (*EIMERIIDA*, *COCCIDEA*, *APICOMPLEXA*)
СВІЙСЬКИХ ЖУЙНИХ ТВАРИН
В АЗЕРБАЙДЖАНІ**

Искендерова Н.Г.

*Институт зоології НАН Азербайджану**AZ 1073, Азербайджан, Баку, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504*

nargiz308@gmail.com

У статті представлені результати багаторічних досліджень кокцидій роду *Eimeria* у свійських жуйних тварин Азербайджану. В Азербайджані кількість виявлених видів еймерій зменшилася, у великої рогатої худоби було відзначено 10, нині 8, у буйволів, відповідно 9 і 6. Найпоширенішими патогенними видами еймерій є такі: *E.zuernii*, *E.bovis*, які завдають істотної шкоди господарству. В Азербайджані сьогодні валидними видами в дрібних жуйних тварин вважаємо 18, із них 10 видів спільні для кіз і овець. У верблюдів, що розводяться в Азербайджані, видовий склад кокцидій роду *Eimeria* відзначений одним видом – *E.dromedari*.

Ключові слова: кокцидії, еймерія, види, велика рогата худоба, дрібна рогата худоба, зараженість.

**EIMERIA (*EIMERIIDA*, *COCCIDEA*, *APICOMPLEXA*)
OF FARM RUMINANTS
IN AZERBAIJAN**

Iskenderova N.Q.

*Institute of Zoology, NAS of Azerbaijan**AZ 10073, Azerbaijan, Baku, A.Abbaszade str., Pass.1128, block 504*

nargiz308@gmail.com

Eimeria (*Eimeria*, *Coccidia*, *Sporozoa*, *Apicomplexa*) are the intracellular parasite protozoa that parasite on all species of vertebrates inhabiting all natural and urbanized ecosystems of all geographic belts. This group of protozoan pathogens has complex homoxenous life cycle which most often passes in the host's intestine.

Coccidia of the genus *Eimeria* are narrowly specific parasites localized in the intestine different hosts. Many of them are morphologically similar. Specificity of *coccidia* of the genus *Eimeria* is manifested not only in relation to the host, but also localization in the organism of the animal.

By reason of eimeriosis suffer almost all farm animals, but mostly cattle. Some representatives eimerian *coccidia* causes serious diseases of farm animals and cause enormous damage to the national economy. In some livestock farms of Azerbaijan disease caused by *coccidia* are spread widely. At present, despite the

application of many drugs and various preventive measures, eimerian are still pose a threat to livestock development.

In farms when violating the sanitary and veterinary rules for animal keeping, small stables being congested with animals, not using pastures properly outbursts of eimerioses often occur. The eimeriosis of cattle is a protozoan disease of the 1-7 months animals characterized with extremely acute course and accompanied with enteritis and anemia.

The study of the farm ruminant animals (cattle, buffaloes, sheep and goats) infection with eimeria has been conducted in Azerbaijan since 60-s of the last century. The eimerian species composition was ascertained. In many areas: Eastern Azerbaijan, the Greater Caucasus, Lankaran natural area, Absheron peninsula dependence of the animals' infection with eimeria on the host's age and sex, season, landscape and vertical belt was studied.

It is known from literature that currently 20 species of *Eimeria* parasiting on cattle and buffaloes are regarded valid ones. Our study of *Eimeria* parasiting on the cattle and buffaloes in the lowland-, foothill- and highland natural and climatic zone revealed 8 of those. Thus in the farms of the lowland zone 7 species of the coccidian genus *Eimeria* (*E. bovis*, *E. braziliensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*) were found in the cattle. In Devechi region 1 species was found in buffaloes – *E. zuernii*. In the cattle of the foothill zone 6 species (*E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. bukidnonensis*, *E. subspherica*) were found, in buffaloes – 4 (*E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*), in zebus – 3 (*E. bovis*, *E. subspherica*, *E. zuernii*). The study of the infection dynamics with eimeria in the cattle and buffaloes for many years showed that currently the amount of the eimerian species found by us reduced. In the cattle 10 species were found before and now – ones, in buffaloes – 9 and 4, respectively. *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii* were found both in the cattle and buffaloes.

The most widespread and pathogenic eimerian species are *E. zuernii*, *E. bovis*, they bring significant loss to farms.

Currently of the eimerian species parasiting on sheep and goats (*Ovis aries* and *Capra hircus*) 32 are recognized as valid ones. Of them 18 species parasite on sheep, 17 ones on goats, 3 species: *E. gilruthi*, *E. pallida* and *E. punctata* are common for the both hosts.

Currently in Azerbaijan of the eimerian species parasiting on small ruminant animals 18 are regarded valid ones of which 10 species are common for both goats and sheep: *E. ninaekohlyakimovae* = *ovinoidalis*, *E. faurei*, *E. intricata*, *E. parva*, *E. ahsata*, *E. arloingi*, *E. jolchijevi*, *E. alijevi*, *E. tunisiensis*, *E. absheronica*.

In Azerbaijan camels are scarce. Currently the camels *Camelus bactrianus* only are bred there, the total number of livestock not being more than 2010 animals in a special farm in Salyan region. One species, *E. dromedari* was found there and also eimerian oocysts which were not defined till species. It is known from literature that 5 eimerian species parasite on *C. dromedarius* and *C. bactrianus*.

Key words: *Coccidia*, *Eimeria*, ones, cattle, small ruminant, infestation

ВВЕДЕНИЕ

Отдельные представители эймериидных кокцидий вызывают тяжелые заболевания сельскохозяйственных животных и наносят огромный материальный ущерб народному хозяйству. В некоторых животноводческих хозяйствах Азербайджана болезни, вызываемые кокцидиями, распространены довольно широко. От эймериозов страдают практически все сельскохозяйственные животные, но в большей степени крупный рогатый скот. В настоящее время, несмотря на применение многих лекарственных препаратов и различные профилактические меры, эймерии по-прежнему представляют угрозу развитию животноводства.

В Азербайджане начало исследованиям эймерий животных было положено в 1931 г. [1]. С 60-х годов прошлого столетия во все сезоны исследовали зараженность сельскохозяйственных животных кокцидиями, особенно, эймериями (*Eimeria*). Установлены видовой состав эймерий домашних жвачных животных, зависимость распространения паразитов от возраста и пола хозяина, времени года, ландшафта и вертикальной поясности практически во всех районах Азербайджана. Известна и многолетняя динамика зараженности эймериями крупного рогатого скота [2].

Целью нашей работы явилось исследование домашних жвачных животных, зараженных эймериями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследований служили изоляты фекалий, собранные от крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, буйволов, зебу и верблюдов. Собранный материал обрабатывали в лаборатории протистологии Института зоологии НАН Азербайджана по общепринятой методике Фюллеборна-Дарлингга.

В крупных животноводческих хозяйствах в Лянкяранской природной области у коров было отмечено 10 видов эймерий (*E. zuerni*, *E. smithi*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. bovis*, *E. zurnabadensis*, *E. auburnensis*, *E. brasiliensis*, *E. subspherica*, *E. bukidnonensis*). У зебу и буйволов – 8. В Губа-Хачмазской зоне у крупного рогатого скота было обнаружено 8 видов (*E. zuernii*, *E. smithi*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica*, *E. cylindrica*, *E. bovis*, *E. auburnensis* и *E. canadensis*).

На Абшеронском полуострове обнаружено 9 видов кокцидий: *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. subspherica*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. canadensis*, *E. alabamensis*. В хозяйствах восточного Азербайджана (в двух на севере: Хачмазский, Кубинский и трех на юге: Беласуварский, Сальянский, Нефтечалинский районах) у крупного рогатого скота было найдено 9 видов эймерий (*E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica*, *E. zuernii*, *E. smithi*). В хозяйствах Шекинского района у крупного рогатого скота – 3 вида кокцидий (*E. bovis*, *E. braziliensis*, *E. zuernii*) [3 – 5] (табл.1).

В последние годы изучали кокцидиофауну сельскохозяйственных животных в тех районах Азербайджана, в которых ранее подобные исследования не проводились. Например, в хозяйствах, расположенных в окрестностях г. Гянджи и прилегающих предгорных и горных районах Дашкесана и Гекгель, у коров, зебу, буйволов отмечено 9 видов эймерий *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. auburnensis*, *E. bukidnonensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica*, *E. zuerni*.

Исследования также проводили в фермерских хозяйствах Шеки-Загатальского региона, включая районы Балакянский, Гахский, Шекинский. Установили высокую зараженность домашних жвачных животных эймериями. Видовой состав эймерий представлен у коров известными видами – *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis*, у буйволов – 5 видами: *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. alabamensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. canadensis* [6] (табл. 1).

По литературным данным в настоящее время у крупного рогатого скота *Bovinae* валидными считаются более 20 видов *Eimeria*. Наиболее распространенными видами эймерий являются: *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica* [7].

В конце прошлого столетия (70-80- годы) исследование эймерий выявило сравнительно низкую экстенсивность инвазии (ЭИ) крупного рогатого скота в разных природных областях Азербайджана, и количество видов эймерий не превышало 10. Мы обнаружили, что в современных условиях хозяйствования у коров увеличилась экстенсивность инвазии (ЭИ) по сравнению с прошлыми годами почти в 2 раза [2].

Таким образом, в Азербайджане количество обнаруженных нами видов эймерий уменьшилось, у крупного рогатого скота ранее было отмечено 10, ныне 8, у буйволов, соответственно: 9 и 4. Из них несколько видов эймерий (*E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*) встречались и у крупного рогатого скота и буйволов.

Таблица 1 – Кокцидии рода *Eimeria* у крупного рогатого скота и буйволов в Азербайджане

Название вида	Хозяин	Ленкоранская природная область (1978 г.)	Абшеронский полуостров (1983 г.)	Восточный Азербайджан (1986 г.)*	Хозяйства Шекинского района (1983 г.)	Западный Азербайджан (2005 г.)	Шеки-Загатальский регион (2013 г.)
<i>E. zuernii</i>	крс, буйволы, зебу.	+	+	+	+	+	+
<i>E. smithi</i> = <i>E.bovis</i>	крс	+	+	+	-	-	-
<i>E. ellipsoidalis</i>	крс, буйволы,	+	+	+	-	+	+
<i>E. zurnabadensis</i> = <i>E. canadensis</i>	крс	+	-	-	-	-	-
<i>E. subspherica</i>	крс, буйволы, зебу	+	+	+	-	+	-
<i>E. brasiliensis</i>	крс	+	-	+	+	+	-
<i>E. cylindrica</i>	крс, буйволы, зебу	+	+	-	-	+	-
<i>E. bovis</i>	крс, буйволы, зебу	+	+	+	+	+	+
<i>E. auburnensis</i>	крс	+	+	+	-	+	+
<i>E. canadensis</i>	крс	-	+	+	-	+	+
<i>E. alabamensis</i>	крс	-	+	-	-	-	+
<i>E. bukidnonensis</i>	крс	-	-	+	-	+	-
Источник информации		[3]	[4]	[5]	[3 – 5]	[9]	[12]

Примечание: *Восточный Азербайджан – север – Губинский, Хачмазский, юг – Беласуварский, Сальянский, Нефтчалинский районы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, кокцидии рода *Eimeria* относятся к узкоспецифичным паразитам. Строгая специфичность кокцидий рода *Eimeria* проявляется не только в отношении хозяина, но и локализации в организме животного. Основными возбудителями эймериозов крупного рогатого скота являются *Eimeria zuernii*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. bukidnonensis*. Возбудители этого протозойного заболевания локализуются в кишечнике (чаще в толстом отделе) крупного рогатого скота, а также буйволов и зебу.

Болеет в основном молодняк до года. Эймериоз телят крупного рогатого скота характеризуется исключительно острым течением, сопровождающимся энтеритом и анемией. Болезнь проявляется при неполноценном кормлении, скученном содержании и особенно при переходе животных от стойлового содержания к пастбищному, и, наоборот. Инвазия чаще встречается в годы с теплым и влажным летом и теплой осенью, с большим количеством осадков. Высокая смертность происходит у телят, инфицированных наиболее патогенными видами *E. zuernii* и *E. bovis*. Выздоровевшие животные приобретают иммунитет. Взрослые животные являются паразитоносителями.

Резервуаром возбудителей кокцидиоза являются загрязненные ооцистами кокцидий корма, вода, кормушки, подстилка. При несоблюдении санитарно-ветеринарных норм, отсутствии централизованного ветеринарного контроля количество зараженных животных возрастает.

Зараженность эймериями мелкого рогатого скота также изучали в разных регионах нашей страны. В результате исследования в хозяйствах Губа-Хачмасской зоны у овец было обнаружено 7 видов эймерий: *E. arloingi*, *E. ahsata*, *E. granulosa*, *E. crandalis*, *E. ninaekohlyakimovae*, *E. parva*, *E. faurei*. На Абшеронском полуострове у овец обнаружено 8 видов *E. ahsata*, *E. bakuensis*, *E. crandalis*, *E. granulosa*, *E. intricata*, *E. ovis*, *E. parva*, *E. faurei*, 7 видов у коз: *E. absheronae*, *E. arloingi*, *E. aliyevi*, *E. africensis*, *E. jolchijevi*, *E. ninaekohlyakimovae*, *E. tunisiensis* [8,9]. В Шекинском межколхозном овцеводческом объединении у каракульских и местных овец зарегистрировано по 7 видов кокцидий – *E. ahsata*, *E. bakuensis*, *E. crandalis*, *E. faurei*, *E. intricata*, *E. ovis*, *E. parva*. У домашних овец в восточном Азербайджане обнаружено 7 видов эймерий: *E. absheronae*, *E. africensis*, *E. aliyevi*, *E. arloingi*, *E. ninaekohlyakimovae*, *E. tunisiensis*, *E. jolchijevi* [8]. У коз тоже 7 видов *E. ninaekohlyakimovae*, *E. arloingi*, *E. crandalis*, *E. ahsata*, *E. absheronica*, *E. aliyevi*, *E. christenseni*. В западном Азербайджане (Шамкирский, Кедабекский районы) овцы заражены 7-видами эймерий (*E. ahsata*, *E. crandalis*, *E. bakuensis*, *E. granulosa*, *E. ovis*, *E. parva*, *E. faurei*). В Нахичеванской Автономной Республике у коз 6 видов эймерий (*E. absheronae*, *E. africensis*, *E. arloingi*, *E. jolchijevi*, *E. ninaekohlyakimovae*, *E. tunisiensis*) [9]. В хозяйствах, расположенных в окрестностях г. Гянджи у овец и коз диагностированы 11 видов эймерий: *E. intricata*, *E. faurei*, *E. ninaekohlyakimovae*, *E. ahsata*, *E. arloingi*, *E. parva*, *E. tunisiensis*, *E. absheronae*, *E. punctata*, *E. jolchijevi*, *E. aliyevi* [10]. За последние годы (2011-2013гг.) в Шеки-Загатальском регионе у мелкого рогатого скота найдены 5 видов – *E. arloingi*, *E. ahsata*, *E. parva*, *E. faurei*, *E. ovinoidalis* [11] (табл. 2.).

У исследуемых овец и коз на наличие ооцист кокцидий рода *Eimeria* наиболее часто встречающимися видами были следующие: *E. Ninaekohlyakimovae = ovinoidalis*, *E. faurei*, *E. intricata*, *E. parva*, *E. ahsata*, *E. arloingi*. В настоящее время валидными видами *Eimeria* для мелкого рогатого скота, овец и коз (*Ovis aries* и *Capra hircus*) признаны 32 вида. Из них 18 видов паразитируют у овец, 17 – у коз, 3 вида *E. gilruthi*, *E. pallida* и *E. punctata* являются общими для обоих хозяев [7].

В Азербайджане сегодня валидными видами *Eimeria*, паразитирующими у мелких жвачных животных, считаем 18, из них 10 видов общие для коз и овец: *E. Ninaekohlyakimovae = ovinoidalis*, *E. faurei*, *E. intricata*, *E. parva*, *E. ahsata*, *E. arloingi*, *E. jolchijevi*, *E. aliyevi*, *E. tunisiensis*, *E. absheronica* (табл. 2).

Таблица 2 – Кокцидии рода *Eimeria* мелкого рогатого скота в Азербайджане

Название вида	Хозяин	Губа-Хачмазская зона	Абшеронский полуостров	Шекинское межколхозное овцеводческое объединение	Западный Азербайджан	Нахичеванская Автономная Республика	Западный Азербайджан	Шеки-Загатальский регион
		1978г.	1981г.	1983г.	1994г.	2001г.	2007г.	2013г.
<i>E. arloingi</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	-	+	-	+	+	+
<i>E. ahsata</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. granulosa</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	-	+	-	-	-
<i>E. crandalis</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. ninaekohlyakimovae</i> = <i>E. ovinoidalis</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	+	-	+	+	+
<i>E. parva</i>	ОВЦЫ	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. faurei</i>	ОВЦЫ	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. absheronae</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	+	-	-	+	-
<i>E. africensis</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	-	+	-	-	+	-	-
<i>E. aliyevi</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	-	+	+	-	-	+	-
<i>E. arloingi</i>	КОЗЫ	-	+	-	-	-	-	-
<i>E. tunisiensis</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	-	-	+	+	-
<i>E. jolchijevi</i>	ОВЦЫ, КОЗЫ	+	+	-	-	+	+	-
<i>E. bakuensis</i>	ОВЦЫ	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. intricata</i>	ОВЦЫ	-	-	+	+	-	+	-
<i>E. ovis</i>	ОВЦЫ	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. christenseni</i>	КОЗЫ	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. punctata</i>	КОЗЫ	-	-	-	-	-	+	-
Источник информации		[6]	[7]	[8]	[7]	[8]	[9]	[12]

Исследования верблюдов на зараженность кишечными паразитическими простейшими в Азербайджане впервые были проведены в 2010 г. Из литературы известно, что у верблюдов одногорбых и двугорбых (соответственно *Camelus dromedarius* и *C. bactrianus*) паразитируют 5 видов *Eimeria*. В исследованном нами материале у двугорбых верблюдов со специализированной фермы с. Хыдырлы Сальянского района были найдены ооцисты эймерий двух типов. По нашим данным для верблюдов в Азербайджане можно считать установленным наличие только одного вида – *E. dromedari* [12].

Для предотвращения этих эймериозов необходимо соблюдать меры борьбы и профилактики, предусмотренные ветеринарным законодательством нашей страны.

Перспективы дальнейшего исследования – определение видового состава эймерий (*Eimeriida*, *Coccidea*, *Apicomplexa*) некоторых домашних и диких животных Азербайджана.

ВЫВОДЫ

1. В Азербайджане на сегодняшний день валидными видами *Eimeria*, паразитирующих у крупного рогатого скота, являются 8, а у мелких жвачных животных – 18. Из них 10 видов общие для коз и овец.
2. Для верблюдов в Азербайджане впервые нами выявлен один вид эймерии – *E.dromedari*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Якимов В.Л. Болезни домашних животных, вызываемые простейшими (*Protozoa*). Ветеринарная протозоология / В.Л. Якимов. – М.-Л.: Гос. изд-во сельск.-хоз. и колхозно-коопер. лит-ры, 1931. – 862 с.
2. Мусаев М. А. Зараженность крупного рогатого скота эймериями (*Eimeria*, *Coccidia*) в Азербайджане / М. А. Мусаев, Ш. Г. Манафова // XX əsrin sonunda heyvanlar aləminin öyrənilməsi və qorunması. Akademik M.Ə.Musayevin anadan olmasının 80 illiyinə həsr olunmuş elmi konfransın materialları. – Bakı, Elm, 2001. – С.95-98.
3. Мусаев М. А. Степень зараженности кокцидиями крупного рогатого скота, зебу и буйволов в Ленкоранской зоне Азербайджанской ССР / М. А. Мусаев, Ш. Г. Манафова // Изв. АН Азерб. ССР. Сер. биол. наук. – 1978. – № 2. – С. 56-60.
4. Зараженность эймериями завезенного в восточный Азербайджан породистого крупного рогатого скота / Мусаев М.А., Суркова А.М., Гаибова Г.Д., Манафова Ш.Г. // Изв. АН Азерб. ССР. Сер. биол. наук. – 1986. – № 5. – С. 35-40.
5. Мусаев М. А. Кокцидии сельскохозяйственных животных в Шекинском межколхозном овцеводческом объединении / М. А. Мусаев, А. М. Суркова // Протозоологические исследования в Азербайджане. – 1983. – С. 40-43.
6. Гаибова Г.Д. Видовой состав и многолетняя динамика зараженности крупного рогатого скота эймериями (*Eimeria*, *Coccidia*, *Sporozoa*) некоторых районах Азербайджана / Г.Д. Гаибова, Н.Г. Искендерова, М.А. Мусаев // Azərbaycan Respublikası Azərbaycan Zooloqlar Cəmiyyətinin əsərləri CİLD. – 2008. – Səh. 23-32.
7. Duszynski D., Couch L., Upton S. The Coccidia of Bovidae (cattle, bison, goats, sheep). <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/artiodactl.html>home.html. 2004.
8. Мусаев М.А. Видовой состав кокцидий овец в Куба-Хачмасской зоне Азербайджанской ССР / М.А. Мусаев, М. А. Мамедова // Изв. АН Азерб. ССР. Сер. биол. наук. – 1980. – № 1. – С. 77- 87.
9. Мусаев М.А. Эймерии мелкого рогатого скота в Нахичеванской Автономной Республики / М.А. Мусаев, М.А. Мамедова // Азербайджанское зоологическое общество (Сб. трудов). – 2003. – С. 26-29.

10. Искендерова Н.Г. Кишечные кокцидии (*Coccidia, Sporozoa*) рогатого скота в фермерских хозяйствах некоторых районов Азербайджана / Н.Г. Искендерова // Известия НАН Азербайджана. Сер. биол. науки. – 2005. – № 3-4. – С. 90-97.
11. Гаибова Г.Д. Кишечные кокцидии рогатого скота в Балакян-Шекинском регионе Азербайджана / Г.Д. Гаибова, Н.Г. Искендерова, Н.А. Гаджиева // Актуальные проблемы паразитологии в Грузии: XI Междунар. науч. конф. паразитологов Грузии, посвященная 100-летию со дня рождения проф. Б.Курашвили. – Тбилиси, 2011. – С. 74-79.
12. Гаибова Г.Д. Зараженность кокцидиями верблюдов и страусов, завезенных в Азербайджан для разведения / Г.Д. Гаибова, Н.Г. Искендерова // Azərbaycan Respublikası Azərbaycan Zooloqlar Cəmiyyətinin əsərləri II CİLD. – 2010. – S. 39-45.

REFERENCES

1. Yakimov V.L. Bolezni domashnikh zhivotnykh, vyzyvaemye prosteyshimi (Protozoa) / V.L. Yakimov // Diseases of domestic animals caused by protozoa (Protozoa). – 1931. – 862 s.
2. Musayev M.A. Zarazhennost krupnogo roqatoqo skota eymeriyami (Eimeria, Coccidia) v Azerbaydzhane / M.A. Musayev, Sh. Q. Manafova // Infestation of cattle eimerian (Eimeria, Coccidia) in Azerbaijan. – 2001. – S.95-98.
3. Musayev M.A. Stepen zarazhennosti koktsidiyami krupnogo roqatoqo skota, zebu i buyvolov v Lenkoranskoj zone Azerbaydzhanskoj SSR / M.A. Musayev, Sh. Q. Manafova // Infectivity coccidia cattle, zebu and buffalo in the Lankaran district of Azerbaijan SSR. – 1978. – S. 56-60.
4. Zarazhennost eymeriyami zavezennoqo v vostochniy Azerbaydzhan porodistogo krupnogo roqatoqo skota / M.A. Musayev, A.M. Surkova, Q.D. Qaibova, Sh.Q. Manafova // Eimerian infection in eastam Azerbaijan imported pedigree cattle. – 1986. – S. 35-40.
5. Musayev M.A. Koktsidii selskoxozyastvennyx zhyvotnykh v Shekinskom mezhkolxoznom ovtsevodcheskom obedinenii / M.A. Musayev, A.M. Surkova // Coccidia farm animals in Sheki interfarms sheep association. – 1983. – S. 40-43.
6. Qaibova Q.D. Vidovoy sostav i mnoqoletnyaya dinamika zarazhennosti krupnogo roqatoqo skota eymeriyami (Eimeria, Coccidia, Sporozoa) nekotorykh rayonakh Azerbaydzhana / Q.D. Qaibova, N.Q. Iskenderova, M.A. Musayev // Species composition and multiannual dynamics of cattle, zebu and buffalo infection with eimeria (*Eimeria, Coccidia, Sporozoa*). – 2008. – Səh. 23-32.
7. Duszynski D., Couch L., Upton S. The Coccidia of Bovidae (cattle, bison, goats, sheep). <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/artiodactl.htmlhome.html>. 2004.
8. Musayev M.A. Vidovoy sostav koktsidiy ovets v Kuba-Xachmasskoj zone Azerbaydzhanskoj SSR / M.A. Musayev, M.A. Mamedova // Species composition of coccidia of sheep in Cuba Khachmass zone of Azerbaijan SSR. – 1980. – S. 77-87.
9. Musayev M.A. Eymerii, melkoqo roqatoqo skota Nakhchivanskoj Avtonomnoy Respubliki / M.A. Musayev, M.A. Mamedova // Edy views parasitizing small animals Nakhchivan Autonomous Republic in eymerian. – 2003. – С. 26-29.
10. İskenderova N.Q. Kishechniye koktsidii (koktsidii, Sporozoa) roqatoqo skota v fermerskikh rayonov Azerbaydzhana / N.Q. İskenderova // Intestinal coccidia (*Coccidia, Sporozoa*) of cattle buffalos and sheep in farm economies of Azerbaijan. – 2005. – S. 90-97.
11. Qaibova Q.D. Kishechniye koktsidiyi roqatoqo skota v Balakyan-Shekinskom reqione Azerbaydzhana / Q.D. Qaibova, N.H. Iskenderova, N.A. Qadzhiyeva // Intestinal coccidian of cattle, buffalo and sheep in Balakan-Sheki region of Azerbaijan. – 2011. – S. 74-79.
12. Qaibova Q.D. Zarazhennost koktsidiyami verblyudov i strausov, zavezennykh v Azerbaydzhan dlya razvedeniya / Q.D. Qaibova, N.H. Iskenderova // Infection of camels and ostriches introduced in Azerbaijan for breeding with coccidia (*Coccidia, Sporozoa*). – 2010. – S. 39-45.

СЕЗОННІ ЗМІНИ У ВИДОВОМУ КОМПЛЕКСІ ГОЛИХ АМЕБ У р. КАМ'ЯНКА (м. ЖИТОМИР)

Пацюк М.К.

*Житомирський державний університет імені Івана Франка
10004, Україна, Житомир, вул. Б. Бердичівська, 40*

kostivna@ukr.net

Встановлено, що основними чинниками, які впливають на видове різноманіття голих амеб, є температура, вміст розчиненого у воді кисню та органічних речовин. При дослідженні сезонних змін у видовому комплексі голих амеб зафіксовано весняний та літній піки видового розвитку цих організмів, що сягає максимуму різноманіття у квітні та серпні.

Ключові слова: голі амеби, сезонні зміни, р. Кам'янка.

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ВИДОВОМ КОМПЛЕКСЕ ГОЛЫХ АМЕБ В р. КАМЕНКА (г. ЖИТОМИР)

Пацюк М.К.

*Житомирский государственный университет имени Ивана Франко
10004, Украина, Житомир, ул. Б. Бердичевская, 40*

kostivna@ukr.net

Установлено, что основными факторами, влияющими на видовое разнообразие голых амеб, являются температура, содержание растворенного в воде кислорода и органических веществ. При исследовании сезонных изменений в видовом комплексе голых амеб зафиксирован весенний и летний пик видового развития этих организмов, который приходится на апрель и август.

Ключевые слова: голые амебы, сезонные изменения, р. Каменка.

SEASONAL CHANGES IN NAKED AMOEBAE SPECIES COMPLEX IN THE RIVER KAMYANKA (ZHYTOMYR CITY)

Patsyuk M.K.

*Zhytomyr Ivan Franko State University
10004, Ukraine, Zhytomyr Velyka Berdychivska str., 40*

kostivna@ukr.net

Seasonal changes in naked amoebae species complex in the river Kamyanka (Zhytomyr city) in 2009-2010 are analyzed.

The most important abiotic factors influencing naked amoebae development are the temperature, the content of oxygen and organic substances dissolved in the water. 17 naked amoebae species were identified in the researched period. They are *D. mycophaga*, *S. stagnicola*, *Saccamoeba* sp.(1), *Saccamoeba* sp.(3), *K. stella*, *M. cantabrigiensis*, *M. vespertilioides*, *Mayorella* sp.(1), *Vexillifera* sp., *V. lata*, *T. striata*, *P. valamo*, *P. levis*, *Cochliopodium* sp.(1), *Flamella* sp., *Vahlkampfia* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(2).

The richest species diversity was in spring-summer period and in the beginning of autumn – in April (12 species), in May (10 species), in June (8 species), in July (10 species), in August (12 species) and in September (10 species). The poorest species diversity was observed in December (4 species).

During the all researched seasons *M. cantabrigiensis*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(1); in February – *Saccamoeba* sp.(3); in April and August – *M. vespertilioides*; in September – *Mayorella* sp.(1) were registered.

The temperature diapason in the researched water reservoir was from +3 °C to +26 °C, the content of dissolved oxygen – from 3.05 mg/L to 17.31 mg/L, the content of dissolved organic substances (on permanganate oxidation) – from 2.17 mg O₂/L to 50.01 mg O₂/L. In relation to temperature eurythermal species (6 species), stenothermal heat-loving species (8 species), stenothermal cold-loving species (3 species) were distinguished.

During the year pH index changed from 6.53 (February, 2010) to 7.50 (November, 2010). It is optimal for reactions taking place in the development of the majority of organisms in river reservoirs (pH=6.5–8.5).

Seasonal changes in naked amoeba diversity were evaluated using biodiversity indices, particularly Shannon-Weaver diversity information measure index.

During the whole period of naked amoeba diversity research, two peaks were registered: spring (April) and summer (August) – 12 species in each. The poorest naked amoebae species diversity was observed in autumn – winter period and in the beginning of the spring and in summer when researched objects reproduction was limited by temperature and oxygen. In June (8 amoeba species) significant water temperature increase is observed, it causes significant decrease of dissolved oxygen concentration and increase of dissolved organic substances concentration. It causes the decrease in protista population in the river Kamyanka and the decrease of registered species number. As for the May, July and September of 2010, naked amoeba species diversity is relatively similar in species number (10 species).

For statistic check of relations between species diversity and hydrophysical and hydrochemical indices, the correlation analysis, particularly.

Spirmer non-parameter method of rank correlation was used. The analysis showed reliable positive correlation in Shannon-Weaver diversity index and temperature, and dissolved oxygen concentration as the trend line proves it.

The correlation in naked amoebae diversity and dissolved organic substances concentration turned out to be doubtful. The influence of this factor on naked amoebae species complex in the reservoir was intermediary and the dependence – non-linear. During the year diversity positive trend under organic substances concentration increase is observed.

Data on seasonal changes in naked amoebae species structure in the river Kamyanka prove that in naked amoebae complex in this reservoir stenothermal heat-loving and oxyphilous species prevail.

Key words: naked amoebas, seasonal changes, the river Kamyanka.

ВСТУП

Голі амеби – одноклітинні амебоїдні організми, що населяють різні природні біотопи з широким діапазоном абіотичних факторів. Однак слабо вивченими залишаються питання екології голих амеб, зокрема проблема сезонних явищ у житті цих організмів [1]. Тому метою нашої роботи є аналіз сезонних змін у видовому комплексі голих амеб у р. Кам'янка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проби для дослідження сезонної динаміки голих амеб відбирали 3 рази на місяць протягом 2009-2010 рр. у р. Кам'янка в околицях м. Житомира. Проби (воду та взмучені донні відклади) відбирали вручну в скляні посудини ємкістю до 500 мл і доставляли до лабораторії. Амеб виділяли з проб, в які входили верхній шар донного ґрунту і невелика кількість придонної води. Спостереження за найпростішими проводили за допомогою світлового мікроскопу Axio Imager M1 (Центр колективного користування науковими приладами «Animalia» Інституту зоології ім. І.І. Шмальгаузена) із застосуванням диференційного інтерференційного контрасту.

Як показник різноманітності ми використовували інформаційну міру різноманіття Шеннона-Уівера (H_{sh}) [2].

При зборі матеріалу визначали температуру води (t°), вміст розчиненого у воді кисню (мг/л) та перманганатну окислювальність (мг O_2 /л) [3].

Дані накопичували в базах даних у вигляді електронних таблиць Microsoft Excel 2003 та таблиць статистичного пакету STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження сезонних змін у видовому комплексі голих амеб проводилось у р. Кам'янка (м. Житомир) у 2009-2010 рр.

Як було показано у попередніх дослідженнях [1, 4-11], важливими факторами, що впливають на розвиток голих амеб, є температура, активна реакція водного середовища, вміст розчинених у воді кисню та органічних речовин, тому при вивченні сезонних змін нами реєструвались значення цих гідрохімічних показників (табл. 1).

Незважаючи на постійну присутність голих амеб у водоймі, видовий склад їх значно варіює впродовж усього сезону дослідження (табл. 2).

Усього за цей період було ідентифіковано 17 видів голих амеб – *Deuteramoeba mycophaga* Pussard, Alabouvette et Pons, 1980, *Saccamoeba stagnicola* Page, 1974, *Saccamoeba* sp.(1), *Saccamoeba* sp.(3), *Koromevella stella* Schaeffer, 1926, *Mayorella cantabrigiensis* Page, 1983, *Mayorella vespertilioides* Page, 1983, *Mayorella* sp.(1), *Vexillifera* sp., *Vannella lata* Page, 1988, *Thecamoeba striata* Penard, 1890, *Paradermamoeba valamo* Smirnov et Goodkov, 1993, *Paradermamoeba levis* Smirnov et Goodkov, 1994, *Cochliopodium* sp.(1), *Flamella* sp., *Vahlkampfia* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(2).

Серед голих амеб упродовж усіх сезонів зустрічались *M. cantabrigiensis*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(1) (табл. 2), тоді як *Saccamoeba* sp.(3) знайдена лише в лютому місяці, *M. vespertilioides* Page, 1983 – у квітні та серпні, *Mayorella* sp.(1) – у вересні.

Таблиця 1 – Значення гідрохімічних показників р. Кам'янка (м. Житомир) протягом 2009-2010 рр.

місяць	температура, t °C	pH	вміст розчиненого у воді кисню, мг/л	вміст розчинених у воді органічних речовин, мг O ₂ /л
січень	+4	6,84	8,35	30,84
лютий	+3	6,53	3,48	10,54
березень	+6	7,01	3,81	36,21
квітень	+16	7,11	12,45	38,03
травень	+20	6,92	17,31	13,28
червень	+26	7,12	3,05	50,01
липень	+24	7,25	10,54	28,98
серпень	+24	7,30	12,69	28,26
вересень	+14	7,32	17,21	13,29
жовтень	+10	7,48	9,45	9,54
листопад	+3	7,50	11,85	9,03
грудень	+4	7,08	9,56	2,17

Таблиця 2 – Сезонні зміни видового складу голих амеб у р. Кам'янка (м. Житомир)

№ п/п	види	місяці											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>D. mycophaga</i>				+	+	+	+	+				
2	<i>S. stagnicola</i>									+	+	+	
3	<i>Saccamoeba</i> sp.(1)			+	+	+			+	+			
4	<i>Saccamoeba</i> sp.(3)		+										
5	<i>K. stella</i>				+	+	+	+	+	+	+	+	
6	<i>M.cantabrigiensis</i>				+	+	+	+	+	+	+		+
7	<i>M. vespertilioides</i>				+				+				
8	<i>Mayorella</i> sp.(1)									+			
9	<i>Vexillifera</i> sp.				+	+	+	+	+	+			
10	<i>V. lata</i>	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
11	<i>T. striata</i>				+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>P. valamo</i>	+	+	+									
13	<i>P. levis</i>	+	+	+									
14	<i>Cochliopodium</i> sp.(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

№ п/п	види	місяці											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15	<i>Flamella</i> sp.				+			+	+				
16	<i>Vahlkampfia</i> sp.(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
17	<i>Vahlkampfia</i> sp.(2)				+	+		+	+				
Всього		5	5	6	12	10	8	10	12	10	6	5	4

В осінньо-зимовий період нами було знайдено такі види голих амеб: у жовтні – *S. stagnicola*, *K. stella*, *M. cantabrigiensis*, *V. lata*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp. (1); у листопаді – *S. stagnicola*, *K. stella*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (1); у грудні – *M. cantabrigiensis*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (1); у січні – *V. lata*, *P. valamo*, *P. levis*, *Cochliopodium* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (1); у лютому – *Saccamoeba* sp. (3), *P. valamo*, *P. levis*, *Cochliopodium* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (1); у березні – *Saccamoeba* sp. (1), *V. lata*, *P. valamo*, *P. levis*, *Cochliopodium* sp. (1), *Vahlkampfia* sp. (1).

У квітні та серпні були відмічені такі види: *D. mycophaga*, *Saccamoeba* sp.(1), *K. stella*, *M. cantabrigiensis*, *M. vespertilioides*, *Vexillifera* sp., *V. lata*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp.(1), *Flamella* sp., *Vahlkampfia* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(2).

У червні нами реєструвались такі види: *D. mycophaga*, *K. stella*, *M. cantabrigiensis*, *Vexillifera* sp., *V. lata*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(1).

Температурний діапазон у водотоці за період дослідження становив від + 3°C до + 26°C. Шість видів виявилися евритермними (*K. stella*, *M. cantabrigiensis*, *V. lata*, *T. striata*, *Cochliopodium* sp.(1), *Vahlkampfia* sp.(1)), оскільки реєструвались в усьому діапазоні зміни температури. Інші види досліджуваної водотоку відмічались при таких діапазонах температури – *D. mycophaga* – 16-26°C; *S. stagnicola* – 3-14°C; *Saccamoeba* sp.(1) – 6-24°C; *Saccamoeba* sp.(3) – 3°C; *M. vespertilioides*, *Flamella* sp., *Vahlkampfia* sp.(2) – 16-24°C; *Mayorella* sp.(1) – 14°C; *Vexillifera* sp. – 14-26°C; *P. valamo* та *P. levis* – 4-6°C.

Отже, теплолюбними стенотермними є *D. mycophaga*, *S. stagnicola*, *Saccamoeba* sp.(1), *M. vespertilioides*, *Flamella* sp., *Vahlkampfia* sp.(2), *Mayorella* sp.(1), *Vexillifera* sp.; холодолюбними стенотермними – *Saccamoeba* sp.(3), *P. valamo* та *P. levis*.

Найбільше число видів голих амеб у дослідженій водотоці припадало на весняно-літній період та початок осені – у квітні (12 видів), травні (10 видів), червні (8 видів), липні (10 видів), серпні (12 видів) та вересні (10 видів) (табл. 2).

Проте слід відмітити, що ці зміни скоріше за все пов'язані зі зниженням чисельності певних видів при несприятливих для них умовах, або з переходом їх на стадію цисти. Відомо, що такий показник, як число видів, досить сильно залежить від чисельності певних видів і від об'єму вибірки [2]. У зв'язку з цим сезонні зміни різноманітності голих амеб краще оцінювати з використанням індексів біорізноманіття, зокрема інформаційної міри різноманіття Шеннона-Уівера, яка використовується в більшості сучасних екологічних досліджень [2].

Значення рН упродовж року змінювалось у межах від 6,53 (лютий 2010 р.) до 7,50 (листопад 2010 р.). При цьому залежності різноманіття голих амеб від активної реакції середовища нами не спостерігалось, можливо, через невеликий діапазон змін цього чинника. У зв'язку з цим вплив цього параметра нами не аналізувався.

Стосовно інших чинників, на рис. 1-3 видно, що існує певний зв'язок між різноманіттям голих амеб і такими чинниками, як температура води, концентрація розчинених у воді кисню та органічних речовин.

Так, за період дослідження спостерігалось два піки різноманітності амеб: весняний (квітень) та літній (серпень). Значення цього показника становить 2,485 у кожному з цих місяців.

Деяке зниження показника Шеннона-Уівера у досліджуваній водотоці у порівнянні з іншими місяцями весняно-літнього періоду спостерігалось в червні місяці (2,079).

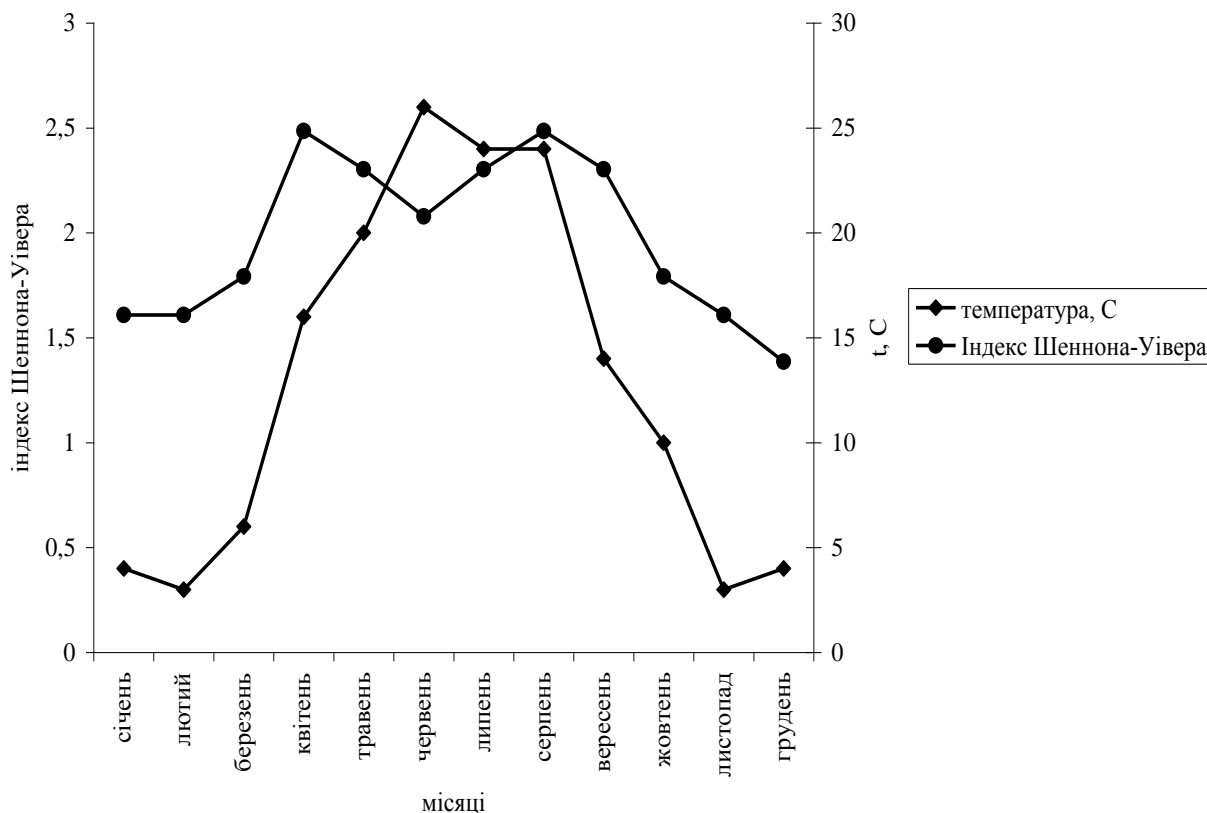


Рис. 1. Сезонні зміни різноманіття голих амеб (показник Шеннона-Уівера) та температури у р. Кам'янка (м. Житомир) протягом 2009-2010 рр.

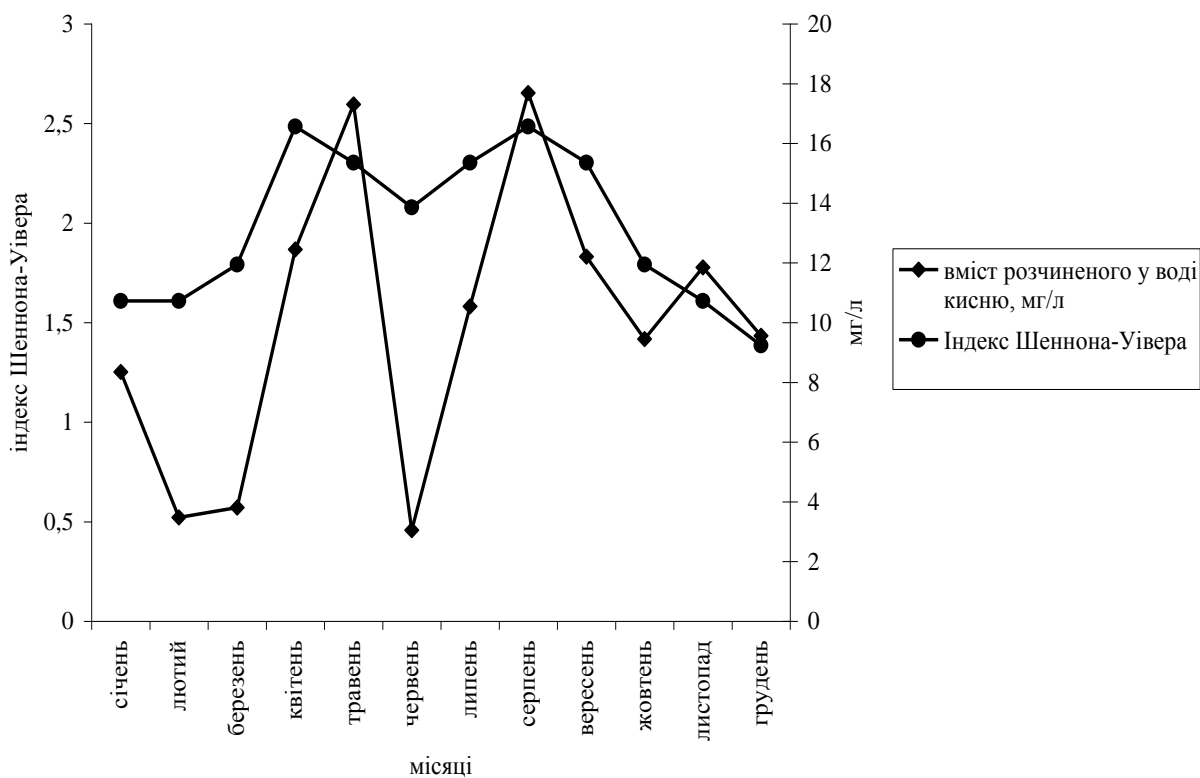


Рис. 2. Сезонні зміни різноманіття голих амеб (показник Шеннона-Уівера) та концентрації розчиненого у воді кисню в р. Кам'янка (м. Житомир) протягом 2009-2010 рр.

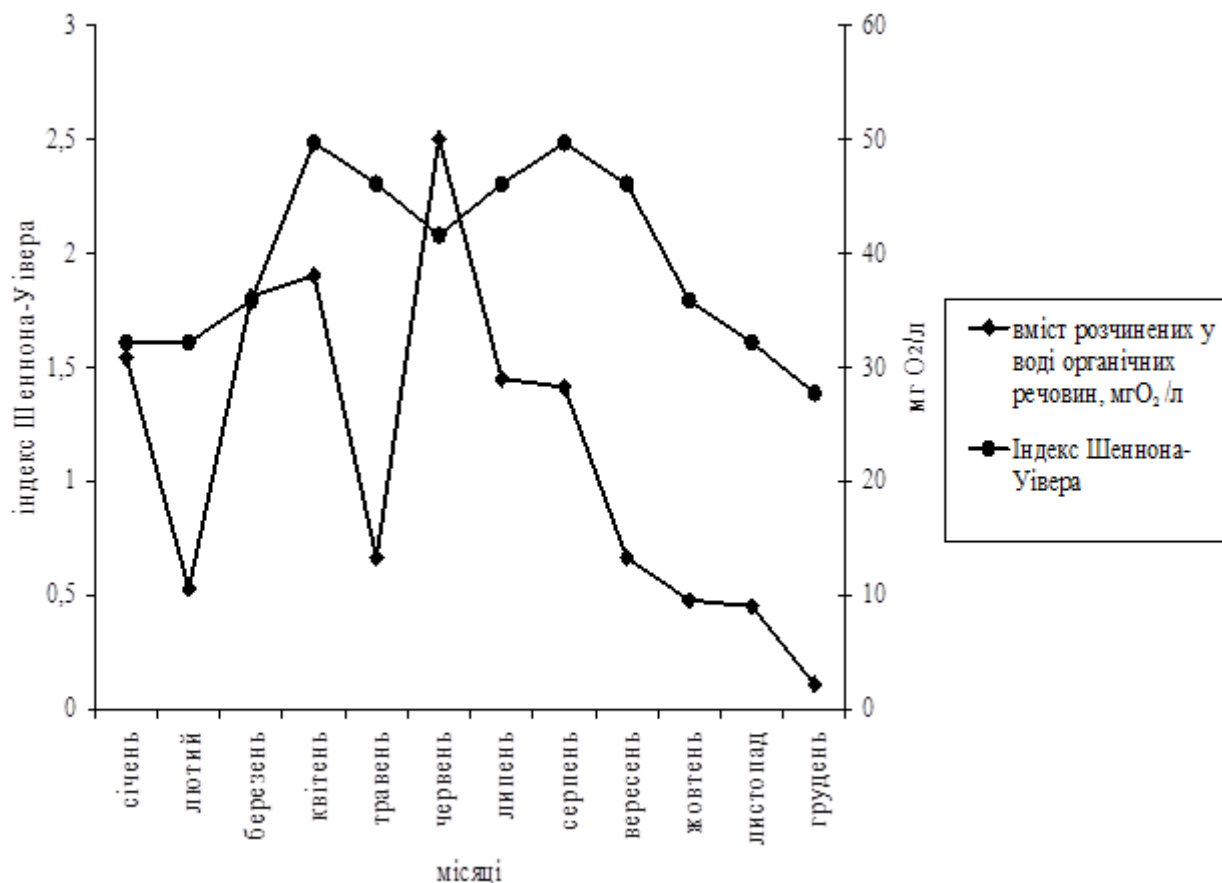


Рис. 3. Сезонні зміни різноманіття голих амеб (показчик Шеннона-Уївера) та концентрації розчинених у воді органічних речовин (за перманганатною окислюваністю) у р. Кам'янка (м. Житомир) протягом 2009-2010 рр.

За нашими даними, ці зміни обумовлені абіотичними факторами середовища. Так, показники температури розчиненого у воді кисню та органічних речовин у квітні та серпні 2010 р. становили відповідно +16 °С, 12,45 мг/л, 38,03 мг O₂/л і +24 °С, 12,69 мг/л, 28,26 мг O₂/л (рис. 1-3; табл. 1).

У червні 2010 року, навпаки, спостерігалось значне підвищення температури води, що призвело до значного зменшення розчиненого у воді кисню і підвищення концентрації розчинених у воді органічних речовин (+26 °С, 3,05 мг/л, 50,06 мг O₂/л відповідно) (рис. 3). Із цим збігається певне зниження різноманіття амеб в р. Кам'янка.

Для статистичної перевірки наявності зв'язку між видовим різноманіттям і вказаними гідрофізичним і гідрохімічними показниками ми використовували кореляційний аналіз. У зв'язку з тим, що перевірка нормальності розподілу отриманих даних за критерієм Колмогорова-Смірнова показала, що розподіл не відповідає нормальному, ми використовували непараметричний метод рангової кореляції Спірмена (рис. 4-6).

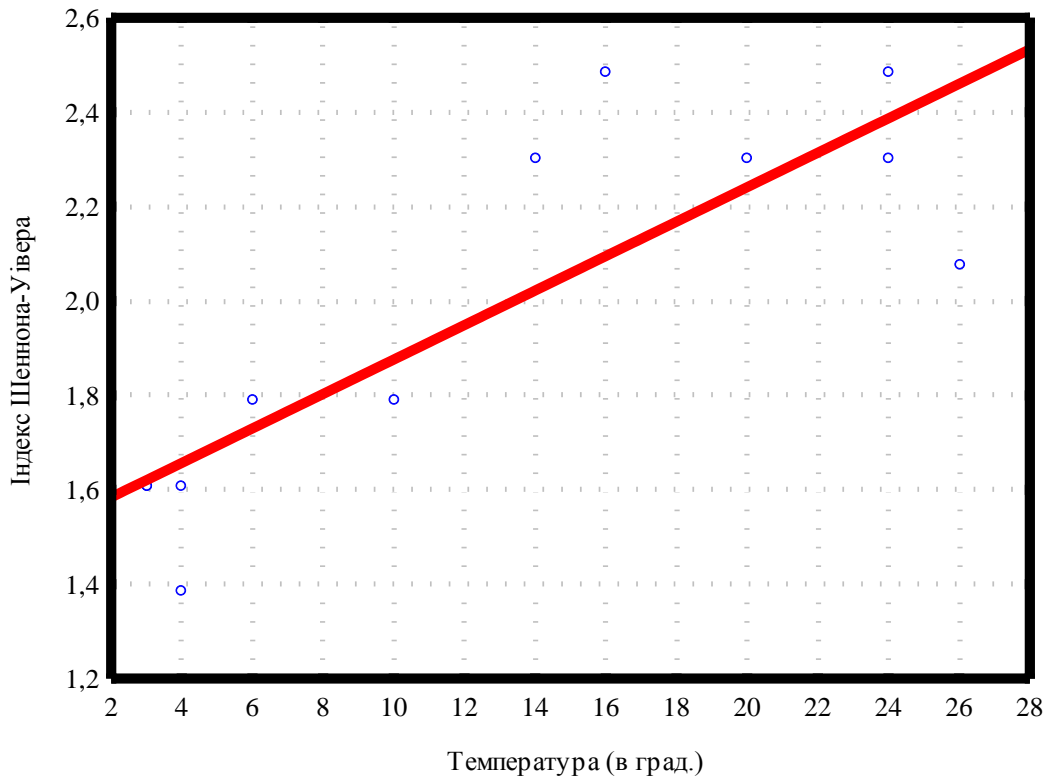


Рис. 4. Залежність різноманітності голих амеб від температури

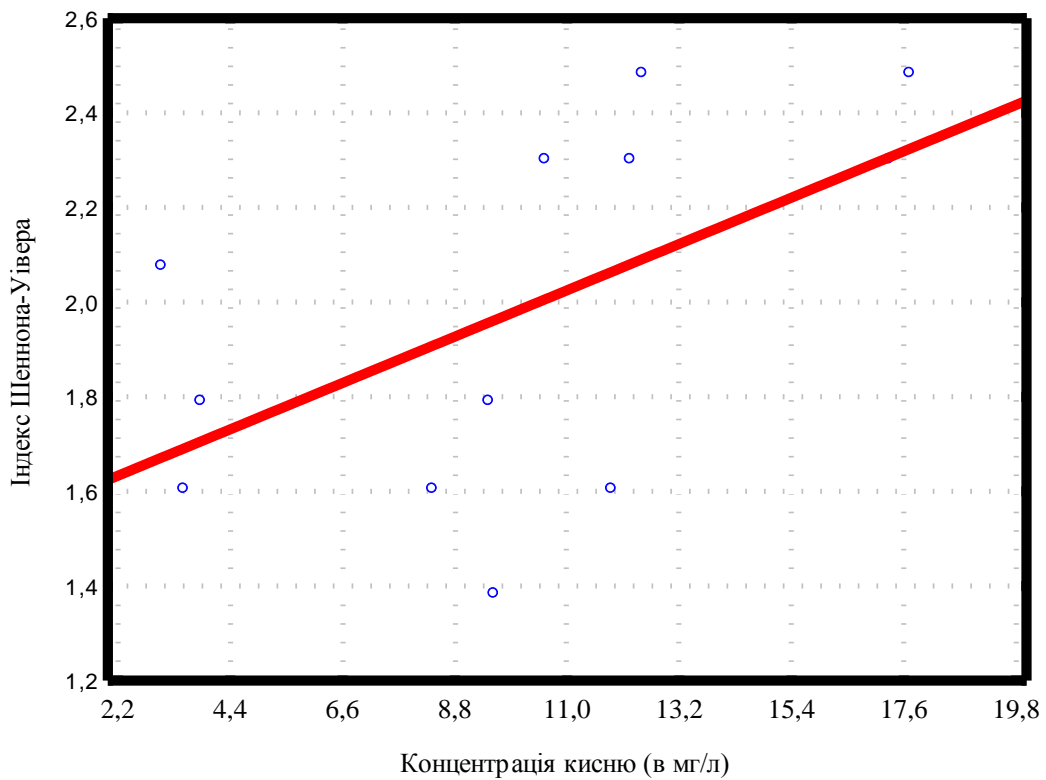


Рис. 5. Залежність різноманітності голих амеб від концентрації розчиненого у воді кисню

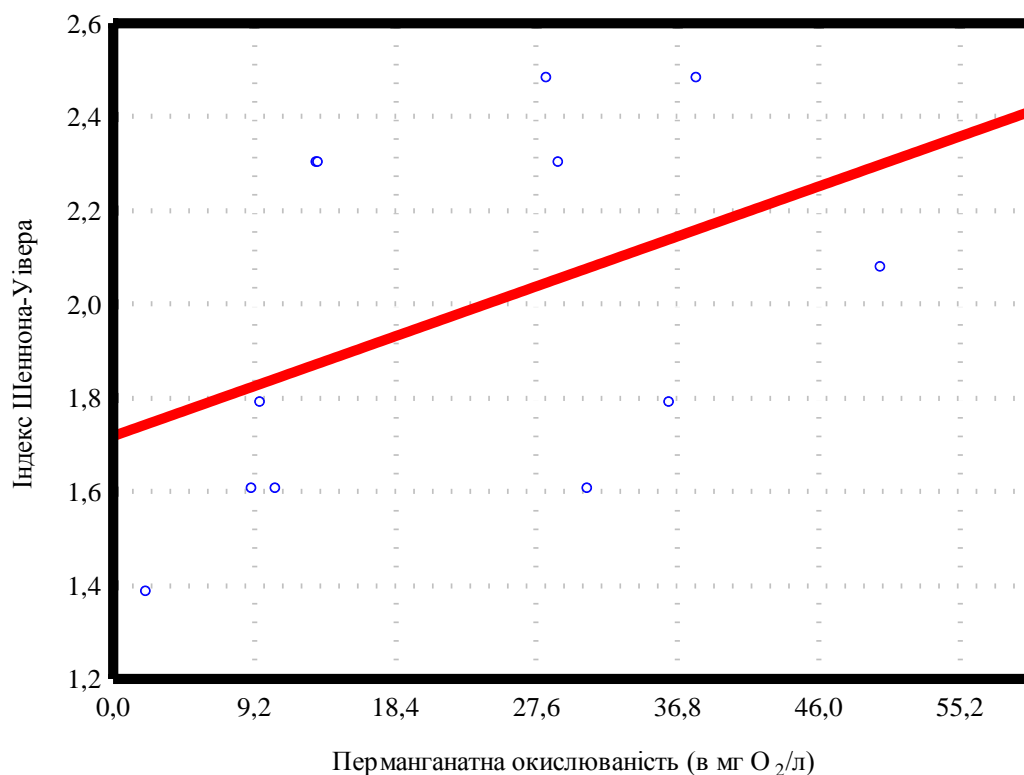


Рис. 6. Залежність різноманітності голих амеб від концентрації розчинених у воді органічних речовин

Проведений аналіз показав наявність достовірної позитивної кореляції між індексом різноманіття Шеннона-Уївера і температурою ($r=0,8$; $p=0,001$) (рис. 4). Про це свідчить і лінія тренду.

Також відмічена достовірна позитивна кореляція між показником різноманіття голих амеб та концентрацією розчиненого у воді кисню ($r=0,63$; $p=0,03$) (рис. 5).

Кореляція між різноманіттям голих амеб та концентрацією розчинених у воді органічних речовин виявилася недостовірною ($r=0,52$; $p=0,09$), можливо тому, що вплив цього фактора на видовий комплекс голих амеб у водоймі є опосередкованим через концентрацію розчиненого кисню, а сама залежність, відповідно, нелінійна. До того ж сезонні зміни цього показника були досить нерегулярними (рис. 3). При цьому протягом року спостерігається позитивний тренд різноманіття при підвищенні концентрації розчинених у воді органічних речовин (рис. 6).

Отже, кореляційний аналіз підтверджує наявність зв'язку отриманої нами картини сезонних змін у різноманітті голих амеб у дослідженій водоймі з основними чинниками середовища. Різноманіття амеб збільшується з підвищенням температури, концентрації розчиненого кисню, та, певною мірою, розчиненої органіки.

Проте вплив розчинених органічних речовин є більш складним. Так, можна з високою вірогідністю припустити, що локальний спад різноманіття, що спостерігався в червні, пов'язаний зі зниженням концентрації розчиненого у воді кисню, яке було спричинене підвищенням концентрації у воді органічних речовин.

Такий характер сезонних змін свідчить про те, що у видовому комплексі голих амеб у р. Кам'янка переважають стенотермні теплолюбні і оксифільні види. Це підтверджують і

наші дані про сезонні зміни видового складу голих амеб у цьому водотоці, а також дані про діапазони толерантності голих амеб Житомирського і Волинського Полісся [6, 7].

Перспективним у подальшому залишається вивчення сезонних явищ у житті амеб у різних типах водойм, а також їх поширення під впливом абіотичних чинників водного середовища.

ВИСНОВКИ

1. Для сезонної динаміки різноманіття голих амеб у досліджуваній водоймі характерні два піки: весняний (квітень місяць) та літній (серпень місяць).
2. Мінімальний розвиток голих амеб був зафіксований у грудні та червні.
3. Показана наявність достовірного позитивного зв'язку між різноманіттям голих амеб та температурою і концентрацією розчиненого у воді кисню.
4. Зареєстрований у червні локальний спад різноманіття пов'язаний зі зниженням концентрації розчиненого у воді кисню, яке було спричинене підвищенням концентрації розчинених у воді органічних речовин.
5. Шість видів голих амеб здатні мешкати в широкому діапазоні зміни температури.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пацюк М.К. Динаміка видового багатства голих амеб (Protista, Gymnamoebia) в р. Кам'янка (м. Житомир) / М.К. Пацюк // Тези доповідей Конф. молодих дослідників-зоологів – 2012. – Київ, 2012. – С. 25-26.
2. Песенко Ю.А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях / Ю.А. Песенко. – М.: Наука, 1982. – 285 с.
3. Строганов Н.С. Практическое руководство по гидрохимии / Н.С. Строганов, Н.С. Бузинова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 196 с.
4. Patsyuk M.K. New Gymnamoebae species (Gymnamoebia) in the fauna of Ukraine / M.K. Patsyuk // Vestnik zoologii. – 2012. – 46 (2). – P. 105-111.
5. Patsyuk M.K. Biotopic distribution of naked amoebas (Protista) in Ukrainian Polissya area / M.K. Patsyuk, I.V. Dovgal // Vestnik zoologii. – 2012. – 46 (4). – P. 355-360.
6. Patsyuk M.K. Tolerance of Naked Amoebas to the Abiotic Factors of Water Environment / M.K. Patsyuk // V International Symposium of Ecologists of the Republic of Montenegro – The Book of Abstracts and Programme. – Tivat, 2013. – P.137.
7. Patsyuk M.K. Tolerance of Naked Amoebas (Protista) to the Abiotic Factors / M.K. Patsyuk // Nature Montenegrina. – Podgorica, 2013. – № 12 (2). – P. 319-323.
8. Пацюк М.К. Голі лобозні амеби (Lobosea, Gymnamoebia) деяких водойм околиць м. Радомишль / М.К. Пацюк // Наукові записки Тернопільського Національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія. – 2010. – № 2 (43). – С. 390-395.
9. Пацюк М.К. Виявлення голих амеб в озері Світязь / М.К. Пацюк // Наукові записки Тернопільського Національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2011. – № 3 (48). – С. 27-30.
10. Пацюк М.К. Биотопическое распределение голых амеб в водоёмах Украинского Полесья / М.К. Пацюк // Экология свободноживущих простейших наземных и водных экосистем: IV Междунар. Симпозиум: тезисы докладов, 17–21 окт. 2011 г., Тольятти, Россия. – Тольятти: Кассандра, 2011. – С. 53.

11. Пацюк М.К. Таксономічний склад голих амеб Шацьких озер / М.К. Пацюк // Природа Західного Полісся та прилеглих територій : зб. наук. пр. – Луцьк: Волин. нац. ун-т ім. Лесі Українки, 2012. – № 9. – С. 177-180.

REFERENCES

1. Patsyuk M.K. Dynamika vydovogo bagatstva golykh ameb (Protista, Gymnamoebia) v r. Kamyanka (m. Zhytomyr) / M.K. Patsyuk // Tezy dopovidey Konf. molodykh doslidnykiv-zoologiv – 2012. – Kyiv, 2012. – S. 25-26.
2. Pesenko Yu.A. Printsypy i metody kolichestvennogo analiza v faunisticheskikh issledovaniyakh / Yu.A. Pesenko. – M.: Nauka, 1982. – 285 s.
3. Stroganov N.S. Prakticheskoe rukovodstvo po gidrokhimii / N.S. Stroganov, N.S. Buzinova. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1980. – 196 s.
4. Patsyuk M.K. New Gymnamoebae species (Gymnamoebia) in the fauna of Ukraine / M.K. Patsyuk // Vestnik zoologii. – 2012. – 46 (2). – P. 105-111.
5. Patsyuk M.K. Biotopic distribution of naked amoebas (Protista) in Ukrainian Polissya area / M.K. Patsyuk, I.V. Dovgal // Vestnik zoologii. – 2012. – 46 (4). – P. 355-360.
6. Patsyuk M.K. Tolerance of Naked Amoebas to the Abiotic Factors of Water Environment / M.K. Patsyuk // V International Symposium of Ecologists of the Republic of Montenegro – The Book of Abstracts and Programme. – Tivat, 2013. – P.137.
7. Patsyuk M.K. Tolerance of Naked Amoebas (Protista) to the Abiotic Factors / M.K. Patsyuk // Nature Montenegro. – Podgorica, 2013. – № 12 (2). – P. 319-323.
8. Patsyuk M.K. Goli lobozni ameby (Lobosea, Gymnamoebia) deyakykh vodoym m. Radomyshl / M.K. Patsyuk // Naukovi zapysky Ternopil'skogo Natsionalnogo universytetu imeni Volodymyra Gnatyuka. Seriya: Biologiya. Spetsialnyy vypusk: Hidroekologiya. – 2010. – № 2 (43). – S. 390-395.
9. Patsyuk M.K. Vyjavlennya golykh ameb v ozeri Svityaz / M.K. Patsyuk // Naukovi zapysky Ternopil'skogo Natsionalnogo universytetu imeni Volodymyra Gnatyuka. Seriya: Biologiya. – 2011. – № 3 (48). – S. 27-30.
10. Patsyuk M.K. Biotopicheskoe raspredelenie golykh ameb v vodoemakh Ukrain'skogo Polesya / M.K. Patsyuk // Ekologiya svobodnozhyvuschikh prosteyshykh i vodnykh ekosistem: IV Mezhdunar. Simpozium: tezisyy dokladov, 17–21 okt. 2011 g., Tolyatti, Rossiya. – Tolyatti: Kassandra, 2011. – S. 53.
11. Patsyuk M.K. Taksonomichnyy sklad golykh ameb Schatskykh ozer / M.K. Patsyuk // Pryroda Zakhidnogo Polissya ta pryleglykh terytoriy : zb. nauk. pr. – Lutsk: Volyn. nats. un-t im. Lesi Ukrayinky, 2012. – № 9. – S. 177-180.

UDC 576.895.19: 598.2

LEUCOCYTOZOONOSIS IN TURKEYS (*MELEAGRIS GALLOPAVO*)

Samedova S.O., Hasanova Zh.V.

Institute of Zoology, NAS of Azerbaijan

Az 10073, Azerbaijan, Baku, A.Abbaszade str., Pass.1128, block 504

sevda.samadova@mail.ru

This study is the first report one species of parasites of the genus *Leucocytozoon* was found in the blood from domestic turkeys in Republic of Azerbaijan, collected in the period July 2013 till February 2014. *Leucocytozoon smithi* was found, described and figured in turkeys during the microscopic examinations of blood samples. Data on the morphology, size and prevalence of the observed parasite are given. The total presence of the *Leucocytozoon* in birds was 27,3% (n-32). The adult birds (aged > 8 months) had a higher prevalence of 29,3% (19/58) compared to chicks (aged < 8 months) 22,4% (13/59).

Key words: domestic birds, Leucocytozoon, blood parasite.

ЛЕЙКОЦИТОЗООНИ ІНДИЧОК (*MELEAGRIS GALLOPAVO*)

Самєдова С.О., Гасанова Ж.В.

*Інститут зоології НАН Азербайджану**AZ 1073, Азербайджан, Баку, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504*

sevda.samadova@mail.ru

У статті наводиться повідомлення щодо паразита роду *Leucocytozoon*, виявленому в крові свійських індичок (уперше для Азербайджану). Збір матеріалу проводився з липня 2013 по лютий 2014 року. При мікроскопічних дослідженнях у зразках крові свійських індичок був виявлений, описаний і сфотографований вид *Leucocytozoon smithi*. Наведено дані про морфологію, розмір і частоту народження паразита. Зараженість птахів паразитом *Leucocytozoon* становила 27,3% (n-32). У свійських птахів (старше 8 міс.) зараженість була дещо вищою (29,3% (19/58)), ніж у молодняка (нижче 8 міс.) – 22,4% (13/59).

Ключові слова: свійські птахи, Leucocytozoon, кровепаразити.

ЛЕЙКОЦИТОЗООНЫ ИНДЕЕК (*MELEAGRIS GALLOPAVO*)

Самєдова С.О., Гасанова Ж.В.

*Інститут зоології НАН Азербайджана**Az 1073, Азербайджан, Баку, ул. А.Аббасзаде, проезд 1128, квартал 504*

sevda.samadova@mail.ru

В данной статье приводится сообщение о паразите рода *Leucocytozoon*, обнаруженном в крови домашних индеек (впервые для Азербайджана). Сбор материала проводился с июля 2013 по февраль 2014 года. При микроскопических исследованиях в образцах крови домашних индеек был обнаружен, описан и сфотографирован вид *Leucocytozoon smithi*. Приведены данные о морфологии, размере и частоте встречаемости паразита. Зараженность птиц паразитом *Leucocytozoon* составляло 27,3% (n-32). У взрослых птиц (старше 8 мес.) зараженность была несколько выше (29,3% (19/58)), чем у молодняка (ниже 8 мес.) – 22,4% (13/59).

Ключевые слова: домашние птицы, Leucocytozoon, кровепаразиты.

INTRODUCTION

Bird blood parasites are a biological group of parasitic protista from *Hepatozoon*, *Atoxoplasma*, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Fallisia*, *Leucocytozoon*, *Babesia*, *Trypanosoma* genera and the microfilaria of some helminthes.

Leucocytozoonosis is a disease of birds caused by obligate intracellular protozoa of the genus *Leucocytozoon*. The disease is transmitted by bite of Simuliidae (black flies) and clinical signs vary with the age and condition of the host [1].

Leucocytozoon is the largest haemoparasite encountered in birds. Leucocytozoonosis is a parasitic disease of anseriformes, turkeys, raptors, wild birds and columbiformes. *L.simondi* is found in anseriformes, *L. smithi* in turkeys, *L. marchouxi* in columbiformes, *L.toddi* in falconiformes, and *L.ziemanni* in owls, *L.bonasaе* (grouse and ptarmigan) and *L. marchouxi* (pigeons and doves) [2,3]. *L. smithi* (Laveran et Lucet, 1905) infects both wild and domestic turkeys and is responsible for economic losses to the poultry industry.

Young birds manifest inappetence, weakness, listlessness, dyspnoea, and sometimes death within 24 h. Signs in adults appear less abruptly and consist of listlessness and a low mortality rate [4, 5]. Some other pathologic manifestations of the disease are anaemia, leukocytosis, splenomegaly, and liver degeneration and hypertrophy [6].

The genus *Leucocytozoon* is divided into two subgenera: *Akiba* and *Leucocytozoon* – based on the vector species [7]. *Leucocytozoon* affects circulating leucocytes and erythrocytes as well as tissue macrophages and endothelial cells, where in the latter it creates large tissue schizonts up to 700 µm in diameter.

The of the agricultural poultry have not been studied and blood parasites in wild birds have had only limited study in Azerbaijan [8].

Study of pigeons in Azerbaijan for 1980- years showed that 26,8 % of the birds were infected of *Haemoproteus*, 14,1%-*Leucocytozoon*, 2,7% -*Plasmodium* and it is estimated some new species blood parasites of birds [9].

This study had the aims to reveal haemoparasites in the turkeys (*Meleagris gallopavo L.*) populations in the Absheron district of Azerbaijan.

MATERIALS AND METHODS

Collection of material on the fauna of blood parasites of domestic turkeys (*Meleagris gallopavo L.*) carried out from September 2013 to December 2013. 117 young turkeys were examined from private farms of Absheron region of Azerbaijan. The birds were categorized into two age groups as follows: (aged < 8 months), and adult (aged > 8 months). Birds were released after taking a small amount of blood via bronchial venipuncture. Blood smear were made on site, and air dried, fixed with 100% methanol, and stained using a modified Romanovsky staining technique [10]. Presence and intensity of parasites was recorded.

Examination of blood smears were performed using the microscope with video camera (Carl Zeiss Axio Scope.A1) with oil immersion (400× and 1000×) for haemoparasites, which were identified to genus based on morphology at the laboratory of biochemical foundations of parasite-host of the relations of Institute of Zoology National Academy of sciences of Azerbaijan. The number of *Leucocytozoon* observed in 100 optic fields was recorded. We describe *Leucocytozoon smithi* (*Haemosporida, Leucocytozoidae*), which is the first *Leucocytozoon* parasite identified to species level in turkeys of Azerbaijan. This parasite is described based on the morphology of its blood development stages.

Data from the study were entered in Ms-Excel, for statistical processing the results used the statistical program IBM SPSS Statistics 20.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 1 species of *Leucocytozoon* was found in the blood of the birds studied. *Leucocytozoon* occurred in 32 of 117 birds (27,3%). This parasite showed an increase in prevalence rate with increase in age of the birds. The adult birds had a slightly higher prevalence of 29,3% (19/58) compared to chicks (aged < 8 months), 22,4% (13/59). The difference in rate of occurrence of *Leucocytozoon* among age groups was statistically significant ($p \leq 0.05$). Macrogametes stained dark blue with Giemsa, and the nucleus was ellipsoid and had several vacuoles occurring in darkly stained cytoplasm, according to all characteristics, the parasite was morphologically identified as *Leucocytozoon smithi* (27,3%) (Laveran et Lucet, 1905) in turkeys.

Description

***Leucocytozoon smithi* (Laveran et Lucet, 1905)** (Fig.)

Morphology: only elliptical gametocytes were seen.

The nucleus of the parasite is ellipsoid. The nucleolus could be seen in some cases.

Measurements of *Leucocytozoon smithi* (n=18).

Length of gametocytes 11.0-7.0 μm

Width of gametocytes 9.0-14.0 μm

Length of erythrocyte nucleus 22.0-40.0 μm

Length of gametocyte nucleus 4.0-6.0 μm

Width of gametocyte nucleus 1.8-3.09 μm

Host: *Meleagris gallopavo* L. (Galliformes)

Intensity of infection: found in 34 birds. An intensity of 8.0 parasites per 100 microscope fields was found.

Localities: Absheron

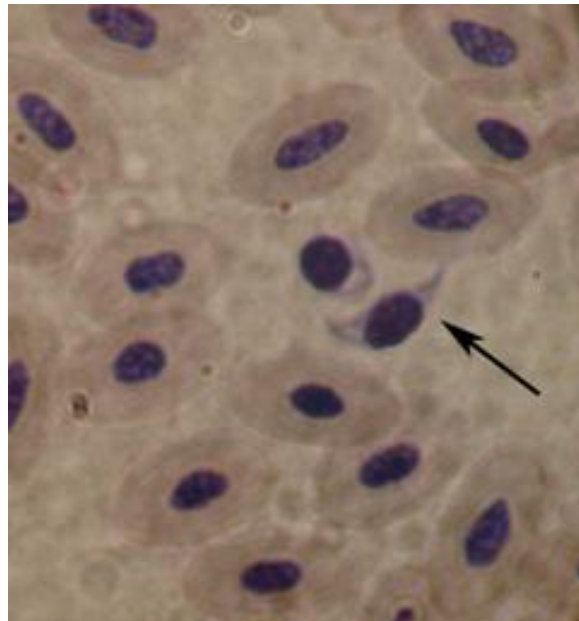


Fig. Turkey blood smear; gametocytes of *Leucocytozoon smithi* (Laveran et Lucet, 1905) in the peripheral blood of domestic turkey (Giemsa stain; Magnification 1000×).

DISCUSSION

Avian hematozoa parasites (Protista) are a heterogeneous group of organisms widely distributed worldwide [4,10]. Haemoparasites – *Leucocytozoon spp*, *Plasmodium spp.*, *Haemoproteus spp*, *Aegyptinella spp*, and *Trypanosoma spp* are found in poultry in the tropical and temperate areas [11]. The lifecycles of haemoparasites require some arthropod vectors. These vectors include the mosquitoes, poultry soft tick (*Argas persicus*) and other flies. Haemoparasites cause anaemia and death by invading erythrocytes, which consequently are destroyed by the bird's immune system [12]. *Leucocytozoon* does not threaten human populations in terms of potential infection; infected poultry is not pathogenic in humans.

Similar observations of reports on *Leucocytozoon* have been reported in many birds in Iran [13], Africa [14], Israel [15], Spain [16], New Zealand [17], and USA [18] and near areas like as Turkey [19]. However, this is the first study the investigation of *Leucocytozoon* among domestic turkeys in Azerbaijan.

Infected adult turkeys showed no clinical signs. As usually in turkeys, *Leucocytozoon smithi* causes droopiness, incoordination, and occasionally convulsions that end in death. Clinical signs in older chicks included loss appetite, anorexia, move about with difficulty and a have tendency to lie down. These data are similar to ours.

CONCLUSION

Domestic avian species are susceptible to infection with *Leucocytozoon sp*. Our findings of *Leucocytozoon smithi* is the first report on and *Leucocytozoon* in turkeys in private farms of Absheron, in Azerbaijan. Further investigation is necessary to determining more accurately of haematozoan parasites among domestic birds and to understand the epidemiology of those parasites.

LITERATURE

1. Milhous W. Turkey *Leucocytozoon* infection. Ultrastructure of *Leucocytozoon smithi* gametocytes / W. Milhous, J. Solis // Poultry Sci. – 1973. – 52. – P. 2138–2146.
2. On the status of the general *Leucocytozoon* Ziemann, 1898 and *Haemoproteus* Kruse, 1890 (*Haemosporidia: Leucocytozoidae* and *Haemoproteidae*) / [Bennett G. F., Garnham P. C. C., Fallis A. M. et al.] // Canadian Journal of Zoology 43. – 1965. – p. 927–932.
3. Soylsby E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, Bailliere Tindall / E.J.L. – Soylsby London, 1982. – P. 703-705.
4. Peirce M.A. New species of *Leucocytozoon* Berestneff, 1904 (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the avian family Artamidae / M.A. Peirce, R.D. Adlard, R.A. Lederer // Syst. Parasitol. – 2005. – Feb; 60(2). – P.151-154.
5. Springer, W.T. Other blood and tissue protozoa / W.T Springer [In: Calnek, B.W, H.J. Barnes, H.J. Beard, McDougald, Saif, Y.M.]. – Eds. Diseases of poultry. – Iowa State Press, Iowa, 1997. – P. 900-905.
6. Ozmen O. A study on the presence of leucocytozoonosis in wild birds of Burdur district / O.Ozmen, M.R. Halig, B.A. Yukari // Turk J. Vet. Anim. – 2005. – Sci.29. – P. 1273-1278.
7. Mimioglu M. Veteriner ve Tibbi Protozooloji II / M. Mimioglu, K. Goksu, F. Sayon. – Ankara Univ. Basimevi, Ankara, 1969. – P.121-130.
8. Самедова С.О. К вопросу изученности кровепаразитов (*Haemosporidia*) перепелов (*Coturnix Coturnix*) / С.О. Самедова, Ж.В. Гасанова // Труды общества зоологов Азербайджана. – Баку : Наука, 2013. – С.171-175.
9. Зейниев Н.Р. Кровепаразиты птиц северного Азербайджана / Н.Р. Зейниев // Бюллетень академии Наук Азербайджана. – 1975. – 145 p.
10. Валькюнас Г. Гемоспоридии птиц (Acta zool. Глава 3-5: монография) / Г. Валькюнас. – Вильнюс, 1997. – 607 с.
11. Arends J. J. External parasites and poultry pests. In Diseases of poultry / J. J. Arends. B.W. Calnek (Ed.). – Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997. – P.785- 813.
12. Arends J.J. External parasites and poultry pests / J.J. Arends // [In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E. (eds)] Diseases of Poultry, 11th edition. – Iowa State Press, 2003. – P. 905-930.
13. *Leucocytozoonosis* in domestic birds in southwestern Iran: An ultrastructural study / [Dezfoulia O. Zibaei M., Nayebzadeh H., et al.] // Iran J. Parasitol. – 2013. – Jan-Mar, 8(1). – P. 171–176.
14. Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinarum* / Sehgal R.N., Valkiunas G., Iezhova T.A., Smith T.B. // J Parasitol. – 2006. – Vol. 92. – P. 1336–1343.
15. Gill H. *Leucocytozoonosis* in the Israeli sparrow, *passer domesticus biblicus* Hartert 1904 / H. Gill, I. Paperna // Parasitol Res. – 2005. – Vol. 96. – P. 373–377.
16. Desser S.S. The fine structure of *Leucocytozoon simondi*.1. Gametogenesis / S.S. Desser, J.R. Baker, P.Lake // Can J. Zool. – 1987. – Vol. 48. – P. 331.
17. Prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin *Megabytes antipodes* / Hill A.G., Howe L, Gartrell B.D., Alley M.R. // Parasitology. – 2010. – Vol. 137. – P. 1477–1485.

18. Stuht J.N. Leucocytozoonosis in nestling bald eagles in Michigan and Minnesota / J.N. Stuht, W.W. Bowerman, D.A. Best // *J Wildlife Dis.* 1999. – Vol. 35. – P.608–612.
19. Ozmen O. Identification of different protozoa species from a common buzzard (*Buteo buteo*) / O. Ozmen, M. Haligur, R. Adanır // *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 2009. – Vol. 33. – P.257–260.

REFERENCES

1. Milhous W. Turkey leucocytozoon infection. Ultrastructure of Leucocytozoon smithi gametocytes / W. Milhous, J. Solis // *Poultry Sci.* – 1973. – 52. – P. 2138–2146.
2. On the status of the general Leucocytozoon Ziemann, 1898 and Haemoproteus Kruse, 1890 (Haemosporidia: Leucocytozoidae and Haemoproteidae) / [Bennett G. F., Garnham P. C. C., Fallis A. M. et al.] // *Canadian Journal of Zoology* 43. – 1965. – p. 927–932.
3. Soylsby E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, Bailliere Tindall / E.J.L. – Soylsby London, 1982. – P. 703-705.
4. Peirce M.A. New species of Leucocytozoon Berestneff, 1904 (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the avian family Artamidae / M.A. Peirce, R.D. Adlard, R.A. Lederer // *Syst. Parasitol.* – 2005. – Feb; 60(2). – P. 151-154.
5. Springer, W.T. Other blood and tissue protozoa / W.T Springer [In: Calnek, B.W, H.J. Barnes, H.J. Beard, McDougald, Saif, Y.M.]. – Eds. Diseases of poultry. – Iowa State Press, Iowa, 1997. – P. 900-905.
6. Ozmen O. A study on the presence of leucocytozoonosis in wild birds of Burdur district / O.Ozmen, M.R. Halig, B.A. Yukari // *Turk J. Vet. Anim.* – 2005. – Sci.29. – P. 1273-1278.
7. Mimioglu M. Veteriner ve Tibbi Protozooloji II / M. Mimioglu, K. Goksu, F. Sayon. □ Ankara Univ. Basimevi, Ankara, 1969. – P.121-130.
8. Samedova S.O. K voprosu izuchennosti kroveparazitov (Haemosporidia) perepelov (*Coturnix Coturnix*) / S.O. Samedova, Zh.V. Gasanova // *Trudy obshchestva zoologov Azerbajdzhana.* – Baku: Nauka, 2013. – S.171-175.
9. Zejniev N.R. Kroveparazity ptic severnogo Azerbajdzhana / N.R. Zejniev // *Bjulleten' akademii Nauk Azerbajdzhana.* – 1975. – 145 p.
10. Val'kjunas G. Gemosporidii ptic (Acta zool. Glava 3-5: monografija) / G. Val'kjunas. – Vil'njus, 1997. – 607 s.
11. Arends J. J. External parasites and poultry pests. In Diseases of poultry / J. J. Arends. B.W. Calnek (Ed.). – Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997. – P.785- 813.
12. Arends J.J. External parasites and poultry pests / J.J. Arends // [In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E. (eds)] *Diseases of Poultry*, 11th edition. – Iowa State Press, 2003. – P. 905-930.
13. Leucocytozoonosis in domestic birds in southwestern Iran: An ultrastructural study / [Dezfoulan O. Zibaei M., Nayebzadeh H., et al.] // *Iran J. Parasitol.* – 2013. – Jan-Mar, 8(1). – P. 171–176.
14. Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of Leucocytozoon schoutedeni and Trypanosoma gallinarum / Sehgal R.N., Valkiunas G., Iezhova T.A., Smith T.B. // *J Parasitol.* – 2006. – Vol. 92. – P.1336–1343.
15. Gill H. Leucocytozoonosis in the Israeli sparrow, passer domesticus biblicus Hartert 1904 / H. Gill, I. Paperna // *Parasitol Res.* – 2005. – Vol. 96. – P. 373–377.
16. Desser S.S. The fine structure of Leucocytozoon simondi.1. Gametogenesis / S.S. Desser, J.R. Baker, P.Lake // *Can J. Zool.* – 1987. – Vol. 48. – R. 331.
17. Prevalence of Leucocytozoon spp. in the endangered yellow-eyed penguin Megabytes antipodes / Hill A.G., Howe L, Gartrell B.D., Alley M.R. // *Parasitology.* – 2010. – Vol. 137. – P. 1477–1485.
18. Stuht J.N. Leucocytozoonosis in nestling bald eagles in Michigan and Minnesota / J.N. Stuht, W.W. Bowerman, D.A. Best // *J Wildlife Dis.* 1999. – Vol. 35. – P.608–612.
19. Ozmen O. Identification of different protozoa species from a common buzzard (*Buteo buteo*) / O. Ozmen, M. Haligur, R. Adanır // *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 2009. – Vol. 33. – P.257–260.

РОЗДІЛ III. ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

UDC 578.835:615.37

CURRENT STATE AND FUTURE TRENDS IN DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF POLIOMYELITIC VACCINES

Galkin O.Yu., Metalnikova N.P., Gorgo Yu.P.

*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"
03056, Ukraine, Kyiv, Peremogy av., 37*

alexft@mail.ua

The literary data concerning the history of creation, manufacture and characteristics of polio vaccines are summarized in the review of the literature. The prerequisites of their creation are examined. The resume about advantages and disadvantages of existing vaccines are made. Optimal immunization scheme is described. The perspective of creation of a new vaccine using the recombinant technologies is examined.

Key words: poliomyelitis, live, inactivated, recombinant polio vaccine, combined immunization scheme.

СУЧАСНИЙ ПІДХІД ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗРОБКИ Й ОТРИМАННЯ ПОЛІОМІЄЛІТНИХ ВАКЦИН

Галкін О.Ю., Метальнікова Н.П., Горго Ю.П.

*Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»
03056, Україна, Київ, пр. Перемоги, 37*

alexft@mail.ua

У літературному огляді узагальнені літературні дані щодо історії створення, виробництва та характеристик поліомієлітних вакцин, розглянуті передумови їх створення. Зроблені висновки щодо переваг та недоліків вакцин, які використовуються на даний момент. Розглянута перспектива створення нової вакцини з використанням рекомбінантних технологій.

Ключові слова: поліомієліт, жива, інактивована, рекомбінантна поліомієлітна вакцина, комбінована схема імунізації.

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ВАКЦИН

Галкин А.Ю., Метальникова Н.П., Горго Ю.П.

*Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»
03056, Украина, Киев, пр. Победы, 37*

alexft@mail.ua

В обзоре литературы обобщены литературные данные об истории создания, производстве и характеристиках полиомиелитных вакцин, рассмотрены предпосылки их создания. Сделаны выводы о преимуществах и недостатках вакцин, которые используются в данный момент. Описана оптимальная схема иммунизации. Рассмотрена перспектива создания новой вакцины с использованием рекомбінантних технологій.

Ключевые слова: полиомиелит, живая, инактивированная, рекомбинантная полиомиелитная вакцина, комбинированная схема иммунизации.

INTRODUCTION

Poliomyelitis is a widespread disease, which has been studied for a long time. Since effective methods for treatment hadn't been found, the investigations for making a vaccine were started. Developments were conducted in several lines and aren't finished until now. Different vaccines and vaccination schemes exist and each of them has their own advantages and disadvantages. That's why it is necessary to summarize existing information about vaccines and their manufacture, side effects, latest elaborations, etc. The purposes of this article are: to analyse literature sources about modern elaborations in making poliomyelitic vaccines, examine the history of creation of vaccines, summarize data about biotechnological bases of manufacture of vaccines, and make a resume about optimal, for the present time, vaccination scheme.

The aim of our work was to analyze the contemporary literature data schodopidhodiv to the development and production of polio vaccine and identifying promising directions in this area.

CREATION OF POLIO VACCINES: HISTORY AND PRECONDITIONS

Poliomyelitis is a disease of great antiquity. By the mid-19th century, the Industrial Revolution had brought increased urbanization to Europe and North America and, with it, significant changes and improvements in living conditions. Coincident with these massive changes was the advent of larger and more frequent outbreaks of poliomyelitis. From the late 1800s, outbreaks were occurring in several European countries and in the United States, and they remained a dominant public health problem in the developed world for the first half of the 20th century. There is no treatment for polio, outside of easing of symptoms, that's why necessity of creation a polio vaccine was evident. A major landmark in the study of poliomyelitis was the successful passage of the virus to nonhuman primates by Landsteiner and Popper in 1909. This advance, and the recognition of three distinct serotypes, opened the way for all subsequent work on vaccines and study of the biochemical and biophysical properties of the polioviruses [1-3].

By the 1950s, two different approaches to the prevention of poliomyelitis by vaccination were developed. In 1954 Salk and Younger produced the first successful polio vaccine – inactivated polio vaccine (IPV). This vaccine is produced in the following way: viruses are grown in suspension cell culture for certain time, then cell biomass is destroyed by freezing and thawing method. After that suspension viruses are separated and chemically inactivated using formaldehyde. Suspension is purified and concentrated by ultrafiltration and after quality control it is used as a vaccine. For propagating viruses the transferred cell lines, such as HeLa, Hep-2, Girardi Heart, HT-1080, are used.

CHARACTERISTICS OF INACTIVATED POLIO VACCINE

IPV is completely non-infectious, yet, following injection, it elicits an immune response that is protective against paralytic disease. IPV cannot cause poliomyelitis and thus is safe for use in immunocompromised persons and their contacts [4, 5, 6]. IPV produces protective antibodies in the blood (serum immunity). This serum immunity prevents the spread of the virus to the central nervous system and provides protection against polio paralysis. The suggested immunity is prolonged and perhaps lifelong: circulating antibodies have persisted for at least 10 years. However, IPV induces only low levels of immunity (via secretory IgA) to poliovirus in the gut. The Salk vaccine is given in two intramuscular injections spaced one month apart and requires boosters every 5 years [1, 5, 7].

In 1988 enhanced-potency IPV (eIPV) formulation became available; eIPV contains higher D-antigenic units per dose for types 2 and 3 than standard IPV. After 2 doses of enhanced-potency IPV, high levels of serum-neutralizing antibodies to all 3 types of poliovirus appears in 94-100% of individuals, and after 3 doses, seroconversion appears in 99-100% of individuals. Enhanced-potency IPV induces mucosal immunity by inhibiting pharyngeal acquisition of poliovirus and, to a lesser extent, intestinal acquisition, yet the extent of mucosal immunity induced by IPV is far less than oral polio vaccine [8].

Advantages of the IPV are: the virus is not live, thus it is easier to manage than oral polio vaccine; there is no risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP); immunization triggers an excellent immune response and long-lasting immunity to all 3 poliovirus types; no serious adverse effects to date exist.

Disadvantages of the IPV are: 1) IPV induces only little immunity in intestinal tract: if an individual is infected with the wild-type poliovirus, the virus can multiply in the intestines and be shed in stools, ultimately heightening the risk of viral circulation within the community; 2) The price of IPV is over 5 times that of oral polio vaccine (OPV); 3) Administering of IPV requires trained health workers; 4) IPV requires additional injections in infants until new combination products are available [2, 4, 5, 9].

Widespread immunization with IPV has virtually eliminated poliomyelitis in most developed countries. In 1988, the World Health Organization set a goal of eradication of poliomyelitis from the entire world by the year 2000. In the context of the WHO Global Initiative, the number of cases of poliomyelitis has decreased by 99% [10].

CHARACTERISTICS OF ORAL POLIO VACCINE

During the same period, many laboratories sought to produce live, attenuated polio vaccines. The oral polio vaccine was developed in 1958 by Albert Sabin. Sabin attenuated the wild type poliovirus by passaging the virus in monkey kidney epithelial cells [2]. Now OPV is produced in the same way with IPV only without chemical inactivation, because virus strains are non-infectious. The commonly used form of the oral polio vaccine is trivalent, which means that it contains live attenuated strains of the three serotypes of poliovirus. Trivalent OPV is characterized in vivo by efficient growth properties in the intestinal tract, unaltered immunogenic properties with respect to wild type progenitors, and attenuated neurovirulence after experimental intraspinal injection into primates. This means that an individual immunized with trivalent OPV induces long-lasting (frequently life-long) protective immunity of the gastrointestinal tract to all known forms of poliovirus [3, 9].

The Sabin oral vaccine is given in 3 doses in the first two years of life, and a booster is given when the child starts school [7, 11]. Since the three attenuated strains of poliovirus present in the OPV interfere with each other's replication in the intestine, boosters of OPV are required to induce protective immunity to all three polio serotypes. In the first immunization, one strain will grow most effectively, and immunity to this strain will be induced. With the second immunization, the immune response generated to the first strain will inhibit the growth of that same strain, such that a second strain will replicate most successfully, inducing immunity to the second strain. Similarly, immunity is induced to the third strain with the third booster [6, 9]. Further boosters are not given unless the patient is exposed to polio or will be travelling to an endemic region [1].

In the opinion of many, the OPV is nearly ideal for use in polio eradication [12-14]. Since attenuated vaccines are capable of transient growth, the OPV allows prolonged exposure of the immune system to the epitopes on the attenuated organisms, resulting in increased immunogenicity and memory-cell development. It is easily administered by mouth, facilitating its widespread use; it induces intestinal immunity, making recent OPV recipients resistant to infection by wild polioviruses and effectively blocking wild poliovirus transmission when used in mass campaigns; and it provides long-term protection against polio through durable humoral immunity. OPV virus can spread to and immunize unvaccinated contacts of vaccine recipients, increasing the impact of OPV beyond those actually immunized. Through effective use of this excellent vaccine, the WHO Global Polio Eradication Initiative has nearly achieved its goal of eradicating wild polioviruses [15, 16].

OPV cannot be used for patients with compromised immune systems because it is a live virus and can cause disease in these patients. It also cannot be used by those in close contact with immunocompromised patients because the live virus in the vaccine can be shed in the faces of those who ingest it, and can possibly be transmitted to the immunocompromised patient [1, 12]. Another disadvantage of the Sabin oral vaccine is that those who have an enterovirus infection of the gastrointestinal tract when taking the oral vaccine may not develop the immune response [2].

The monovalent oral polio vaccine 1 or mOPV1, is currently used in Egypt as a critical part of a new WHO strategy to end polio type 1 transmission (types 2 and 3 polioviruses have already been eliminated from Egypt). The production of mOPV was based on existing trivalent OPV but with appropriate "change control" procedures to assure the quality of the product, and to distinguish mOPV from trivalent OPV [17, 18].

VACCINE-ASSOCIATED PARALYTIC POLIOMYELITIS AND PROBLEM OF CIRCULATION OF VACCINE-DERIVED POLIOVIRUSES

The main disadvantage of OPV is the possibility of VAPP, which can occur when oral polioviruses revert to a more virulent form. In fact, in any attenuated vaccine, there exists a danger that the attenuated form will revert to the virulent form. The much higher incidence of polio from wild poliovirus infections at the time, however, mitigated concern over the rare occurrence of VAPP, and it has only been in recent years that VAPP has become an increasingly significant proportion of the global polio burden [12, 19]. Occasionally, immunodeficient persons exposed to OPV become chronically infected [20-22], excreting derivatives of the OPV strains for many months or years [12, 23-25]. Chronic OPV excretors, however, seem to be very rare, and have so far been found only in upper- and middle-income countries where appropriate clinical management of immunodeficiency is available [26].

In retrospect, it is remarkable that OPV has attained such an outstanding record of safety and efficacy over the four decades of worldwide use [14, 19]. It is now known that most RNA viruses have highly mutable genomes that are potentially capable of very rapid evolution, many orders of magnitude faster than the genomes of DNA viruses or cellular organisms [27, 28], and polioviruses are among the most rapidly evolving of all RNA viruses [12, 23-25, 29, 30]. Moreover, the attenuating mutations of the OPV strains are strongly selected against when the vaccine replicates in the intestinal tract of OPV recipients [31-33]. To counter the daunting challenges of delivering a live, attenuated RNA virus vaccine via its natural route of infection, immunization strategies were developed to minimize adverse events [12, 34]. In developed countries, OPV was first delivered in mass campaigns to achieve high rates of coverage, and this was followed by a strategy of comprehensive routine immunization. Similar strategies were adopted in developing countries, with mass OPV campaigns often playing a more prominent role than routine immunization. In most instances, OPV was delivered in the context of pre-existing high population immunity to poliovirus, because of recent exposure to circulating wild polioviruses or, as with developed countries in the early 1960s, from the combination of immunity acquired from natural infection and immunity acquired from several years of immunization with the inactivated poliovirus vaccine (IPV). These strategies probably minimized the epidemiological consequences of the frequent phenotypic reversion of the OPV strains [11, 35].

While reversion to nearly wild-type phenotype regularly occurs soon after the onset of OPV reproduction in the gastro-intestinal tract of vaccine recipients or their contacts, this is usually not a big problem, provided the vaccine is used either for mass vaccination or in populations with a relatively high level of anti-polio immunity. However, if these conditions are not met, the vaccine viruses are likely to be converted into highly transmissible agents with a nearly wild-type level of neurovirulence [36]. Moreover, OPV viruses may persist and evolve even in adequately immunized populations. The current strategy for the "endgame" of poliovirus eradication envisions cessation of OPV usage shortly after the last isolation of a wild poliovirus [16, 17, 35]. If implemented, this strategy would result in rapid growth of non-immune human populations at the time when OPV derivatives would very likely be persisting. Safe discontinuation of OPV vaccination will be possible only after an efficient new vaccine or an anti-poliovirus drug is available. To achieve this goal, stimulation of poliovirus research and elimination of organizational and financial obstacles preventing it are needed [11, 16, 37].

VAPP occurs more frequently after administration of the first dose of OPV in the all-OPV series than after subsequent doses; the risk of VAPP is one case per 750,000 doses distributed for the first dose of oral poliovirus vaccine (OPV) and one case per 2.4 million doses of OPV distributed overall. Because of this risk, vaccine schedule that starts with IPV is preferred, even though extra injections are required [38].

THE COMBINED SCHEME OF IMMUNIZATION

The American Academy of Family Physicians (AAFP) and the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) now recommend that the first two doses of poliovirus vaccine should be IPV. OPV is no longer recommended for the first two doses and is acceptable only in special circumstances. The combined IPV/OPV schedule for routine immunization against poliomyelitis includes two doses of IPV administered at two and four months of age followed by two doses of OPV administered at 6 to 18 or 12 to 18 months of age and at four to six years of age [10, 39].

Most studies have shown that two doses of IPV induce protective levels of antibodies in 90 percent or more of recipients [40]. Thus, when OPV is administered as part of the sequential schedule, most recipients already have humoral seroprotection due to IPV, which should greatly reduce the incidence of VAPP occurring after the first dose of OPV.

The sequential immunization schedule provides better intestinal immunity than the all-IPV schedule [41]. The percentage of children who shed poliovirus in their stools after being given a challenge dose of OPV is 85 % after the administration of three doses of IPV; 66 % after the administration of two doses of IPV and one previous dose of OPV; 25 % after the administration of two doses of IPV and two previous doses of OPV; and 24 % after the administration of two doses of IPV and three previous doses of OPV. Based on this data, the ACIP concluded that two doses of OPV were necessary in the sequential schedule [40]. Priming with IPV in the sequential schedule does not reduce reversion of attenuated OPV viruses to virulent forms; thus, unvaccinated persons in contact with persons being immunized on the IPV/OPV sequential schedule still have a very small risk for VAPP; however, shedding of serotype 3 poliovirus may be reduced in vaccine recipients [10].

A NEW TREND: THE RECOMBINANT VACCINE

In the exciting research field of recombinant biotechnology, scientists are also attempting genetic alteration of the poliovirus. Researchers are using *Escherichia coli* as a host for bacterial gene cloning. Work is being done to take the genes of poliovirus, which code for the synthesis of the viral capsid (the protein coat of a virus particle) and to combine it with *E. coli*'s genes. The *E. coli* can then synthesize viral capsid proteins to be used in making a vaccine. This latter approach eliminates any possibility of the virus infecting the vaccinated patient because the vaccine contains only a part of the virus, excluding potentially dangerous content.

DNA vaccines successfully elicit an immune response, although the mechanism of this response is as yet undetermined. A potential risk of using DNA vaccines in humans is that injecting naked DNA might not be safe; this foreign DNA could insert itself into and damage human chromosomes and potentially increase the risk of cancers or autoimmune disorders [42].

There are no effective methods for treatment of poliomyelitis. Vaccination is only effective way to control poliomyelitis and there is no doubt of its necessity. Existing vaccines – OPV and IPV – are nearly answered the demands and are used in combined immunization schedule. However, in connection with risk of VAPP and discomfort of multiple doses of vaccine investigations in the field of recombinant biotechnology are carried out. DNA vaccine, which only contains a part of virus and cannot cause the disease, has been developed.

Further research may focus on the analysis of modern technological approaches to obtaining polio vaccines (live, inactivated, and recombinant).

LITERATURE

1. Mensi C. Poliomyelitis: Present epidemiological situation and vaccination problems / C. Mensi, F. Pregliasco // *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* – 1998. – Vol. 5, № 3. – P. 278-280.

2. Poliomyelitis. In: *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. – Atlanta: National Immunization Program, 1998. – P. 249-262. – (Forth Edition).
3. Modlin J. Poliomyelitis and poliovirus immunization / In: *Human Enterovirus Infections*, Editor H.A. Rotbart. – Washington: ASM Press, 1995. – P. 195-220. – (First Edition).
4. Salk J. Are booster doses of poliovirus vaccine necessary? Jonas Salk proposes a scientific evaluation / J. Salk // *Vaccine*. – Vol. 8, № 5. – P. 419-420.
5. Murdin A.D. Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience / A. D. Murdin, L. Barreto, S. Plotkin // *Vaccine*. – 1996. – Vol. 14. – P. 735-746.
6. Plotkin S. Current issues in the efficacy of oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine immunization / S. Plotkin // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1997. – Vol. 10, № 12. – P. 979-981.
7. Faden H. Poliovirus vaccination / H. Faden // *J. Infect. Dis.* – 1993. – Vol. 28, № 8. – P. 25-28.
8. Duchene M. Production, testing and perspectives of IPV and IPV combination vaccines: GSK biologicals' view / M. Duchene // *Biologicals*. – 2006. – Vol. 34, № 2. – P. 163-166.
9. Beal A.J. Efficacy and safety of oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine / A.J. Beal // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1991. – Vol. 10, № 12. – P. 970-972.
10. Mateen F.J. Oral and inactivated poliovirus vaccines in the newborn: A review / F.J. Mateen, R.T. Shinohara, R.W. Sutter // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31, № 21. – P. 2517-2524.
11. Oita I. Poliovirus separation from cell extracts using capillary electrophoresis: Potential use in vaccine production and control? / I. Oita, H. Halewyck, S. Pieters // *J. Virol. Meth.* – 2012. – Vol. 185, № 1. – P. 7-17.
12. Bonnet M.C. World wide experience with inactivated poliovirus vaccine / M.C. Bonnet, A. Dutta // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 39. – P. 4978-4983.
13. Nathanson N. Poliomyelitis eradication – a dangerous endgame / N. Nathanson, P. Fine // *Science*. – 2002. – Vol. 296, № 5566. – P. 269-70.
14. Polio eradication: the OPV paradox / [Dowdle W.R., De Gourville E., Kew O.M. et al.] // *Rev. Med. Virol.* – 2003. – Vol. 13, № 5. – P. 277-291.
15. World Health Organization. Progress towards the global eradication of poliomyelitis // *Weekly Epidemiological Record*. – 2003. – Vol. 78. – P. 138-144.
16. Heymann D.L. Polio eradication: finishing the job and protecting the investment / D.L. Heymann // *Bulletin of the World Health Organization*. – 2004. – Vol. 82, №1. – P. 32-38.
17. Heymann D.L. A vision of a world without polio: The OPV cessation strategy / D.L. Heymann, Sutter R.W., Aylward R.B. // *Biologicals*. – 2006. – Vol. 34, № 2. – P. 75-79.
18. Graf H. Manufacturing and supply of monovalent oral polio vaccines / H. Graf // *Biologicals*. – 2006. – Vol. 34, № 2. – P. 141-144.
19. Fine P. Transmissibility and persistence of oral polio vaccine viruses: implications for the global poliomyelitis eradication initiative / P. Fine, I. Carneiro // *American J. Epidemiol.* – 1999. – Vol. 150, № 10. – P. 1001-1021.
20. Vaccine-associated poliomyelitis in a child with sex-linked agammaglobulinemia / [Wright P.F., Hatch M.H., Kasselberg A.G. et al.]// *J. Pediatrics*. – 1977. – Vol. 91, №3. – P. 408-412.
21. Sutter R.W. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons / R.W. Sutter, R. Prevots // *Infections in Medicine*. – 1994. – Vol. 11. – P. 426-438.
22. Persistence of vaccine-derived polioviruses among immunodeficient persons with vaccine-associated paralytic poliomyelitis / [Khetsuriani N., Prevots D.R., Quick L. et al.] // *J. Infect. Diseases*. – 2003. – Vol. 188, № 12. – P. 1845-1852.

23. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient / [Kew O.M., Sutter R.W., Nottay B.K. et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, № 10. – P. 2893-2899.
24. Evolution of poliovirus type I during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient / [Bellmunt A., May G., Zell R. et al.] // *Viol.* – 1999. – Vol. 265, № 2. – P. 178-184.
25. Evolution of the Sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion / [Martin J., Dunn G., Hull R. et al.] // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, № 7. – P. 3001-3010.
26. Search for poliovirus carriers among people with primary immune deficiency diseases in the United States, Mexico, Brazil, and the United Kingdom / [Halsey N.A., Pinto J., Espinosa-Rosales F. et al.] // *Bulletin of the World Health Organization.* – 2004. – Vol. 82, № 3. – P. 37-39.
27. Domingo E. RNA virus mutations and fitness for survival / E. Domingo, J. Holland // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1997. – Vol. 51. – P. 151-178.
28. Drake J.W. Mutation rates among RNA viruses / J.W. Drake, J.J. Holland // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1999. – Vol. 96, № 24. – P. 13910-13913.
29. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model / [Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y. et al.] // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, № 16. – P. 7381-7390.
30. Liu H.-M. Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China / H.-M. Liu, D.P. Zheng, L.B. // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, № 23. – P. 11153-11161.
31. Minor P.D. The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut / P.D. Minor, G. Dunn // *J. General Virol.* – 1988. – Vol. 69, № 5. – P. 1091-1096.
32. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment / [Yoshida H., Horie H., Matsuura K. et al.] // *J. General Virol.* – 2002. – Vol. 83, № 5. – P. 1107-1111.
33. Minor P.D. Poliovirus vaccines: molecular biology and immune response. In: *Molecular biology of picornaviruses* / Minor P.D. [Editors B.L. Semler, E. Wimmer]. – Washington: ASM Press, 2002. – P. 381-390. – (First Edition).
34. Sabin A.B. Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses / A.B. Sabin, M. Ramos-Alvarez, J. Alvarez-Amezquita // *J. American Med. Association.* – 1960. – Vol. 173, № 14. – P. 1521-1526.
35. Smith J. Certification of polio eradication: process and lessons learned / J. Smith, R. Leke, A. Adams // *Bulletin of the World Health Organization.* – 2004. – Vol. 82, № 1. – P. 1-33.
36. Agol V.I. Vaccine-derived polioviruses / V.I. Agol // *Biologicals.* – 2006. – Vol. 34, № 2. – P. 103-108.
37. Nathanson N. From emergence to eradication: the epidemiology of poliomyelitis deconstructed / N. Nathanson, O.M. Kew // *Am. J. Epidemiol.* – 2010. – Vol. 172, № 11. – P. 1213-1229.
38. Ohka S. Recent insights into poliovirus pathogenesis / S. Ohka, A. Nomoto // *Trends Microbiol.* – 2001. – Vol. 9, № 10. – P. 501-506.

39. Mueller S. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event / S. Mueller, E. Wimmer, J. Cello // *Virus Research*. – 2005. – Vol. 111, № 2. – P. 175-193.
40. Centers for Disease Control and Prevention. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine; recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 1997. – Vol. 46. – P. 1-25.
41. Antibody response and viral excretion after live polio vaccine or a combined schedule of live and inactivated polio vaccines / [Ramsay M.E., Begg N.T., Gandhi J. et al.] // *Pediatric Infectious Diseases Journal*. – 1994. – Vol. 13, № 12. – P. 1117-1121.
42. Caldwell M. The Dream Vaccine / M. Caldwell // *Discover*. – 1997. – Vol. 9. – P. 3-5.

UDC 577.27:57.083.33

OBTAINING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN IgG SUITABLE FOR USAGE IN HIGHLY SENSITIVE AND SPECIFIC IMMUNOASSAYS

^{1,2}Galkin O.Yu., ³Solovjova V.F., ¹Metalnikova N.P., ¹Dugan O.M., ¹Gorgo Yu.P.

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

03056, Ukraine, Kyiv, Peremogy av., 37, ²Hema Ltd.

03022, Ukraine, Kyiv, Vasilkovskaya str. 98

³*Ukrainian Scientific & Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Pharmacy*
01042, Ukraine, Kyiv, Chygorina str., 18

alexft@mail.ua

The original set from 12 clones of hybridomas, producers of monoclonal antibodies (McAbs) against human IgG has been obtained. Criteria for selecting McAbs with satisfactory properties has been justified. Monoclonal antibodies with such properties have to provide high informativeness indexes (sensitivity and specificity) of immunoassay methods based on obtained McAbs. The study of following biological properties of McAbs has been conducted: specificity, constant of affinity and titer in a cultural medium. Obtained McAbs are directed to the two epitop regions on IgG molecule. The first group of McAbs relates to epitop region, represented by two epitopes; the second epitop region is represented by only one epitop.

Keywords: monoclonal antibodies, hybridomas, human IgG, affinity, epitop mapping.

ОТРИМАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО ІgG ЛЮДИНИ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ВИСОКОЧУТЛИВИХ І СПЕЦИФІЧНИХ МЕТОДАХ ІМУНОАНАЛІЗУ

^{1,2}Галкін О.Ю., ³Соловйова В.Ф., ¹Метальнікова Н.П., ¹Дуган О.М., ¹Горго Ю.П.

¹*Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»*

03056, Україна, Київ, пр. Перемоги, 37

²*ТОВ «Хема»,*

03022, Україна, Київ, вул. Васильківська, 98

³*Український науково-дослідний інститут харчування, біотехнології та фармації*
01042, Україна, Київ, вул. Чигоріна, 18

alexft@mail.ua

Одержано оригінальний набір з 12 клонів гібридом, продуцентів моноклональних антитіл (МкАт) до ІgG людини. Проведено обґрунтування критеріїв відбору МкАт із властивостями, що забезпечуватимуть високі показники інформативності (чутливості та специфічності) розроблених на їх основі методів імуноаналізу. Проведено поглиблене вивчення таких біологічних властивостей антитіл: встановлено їхню специфічність, константу афінності та титр у культуральній рідині. Отримані антитіла спрямовані до двох епітопних регіонів на молекулі ІgG.

Перша група антитіл відноситься до епітопного регіону, що представлений двома епітопами; другий епітопний регіон представлений лише одним епітопом.

Ключові слова: моноклональні антитіла, гібридоми, IgG людини, афінність, епітопне картування.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К IgG ЧЕЛОВЕКА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И СПЕЦИФИЧНЫХ МЕТОДАХ ИММУНОАНАЛИЗА

^{1,2}Галкин А.Ю., ³Соловьева В.Ф., ¹Метальникова Н.П., ¹Дуган А.М., ¹Горго Ю.П.

¹*Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»
03056, Украина, Киев, пр. Победы, 37*

²*ООО «Хема»*

03022, Украина, Киев, ул. Васильковская, 98

³*Украинский научно-исследовательский институт питания, биотехнологии и фармации
01042, Украина, Киев, ул. Чигорина, 18*

alexft@mail.ua

Получен оригинальный набор из 12 клонов гибридом, продуцентов моноклональных антител (МкАт) к IgG человека. Проведено обоснование критериев отбора МкАт со свойствами, которые будут обеспечивать высокие показатели информативности (чувствительности и специфичности) разрабатываемых на их основе методов иммуноанализа. Проведено углубленное изучение таких биологических свойств антител: установлена их специфичность, константа аффиности и титр в культуральной жидкости. Полученные антитела направлены к двум эпитопным регионам на молекуле IgG. Первая группа антител относится к эпитопному региону, представленному двумя эпитопами; второй эпитопный регион представлен только одним эпитопом.

Ключевые слова: моноклональные антитела, гибридомы, IgE человека, аффиность, эпитопное картирование.

INTRODUCTION

As known immunoglobulins (Igs) are a group of glycoproteins which are contained in the blood plasma (antibodies) and on the surface of certain cells of immune system (immunoglobulin receptors). There are five classes of human immunoglobulins: IgG, IgA, IgM, IgE, and IgD, which are different in their structure, properties and functions. IgG is the major class of antibody in humans, it constitutes 70-75 % of all immunoglobulins. IgG always play an important role both at the primary and the secondary immune response [1]. Immunoglobulin G is a bifunctional molecule, which is responsible for binding to the antigen and provides some more effector functions (e.g., to activate complement, bind to cells and others). Structural regions of the IgG molecules, which are responsible for effector activity, outlying from the antigen binding sites and are located in the Fc-region. The isotype of Igs are also due to antigenic determinants of Fc-fragment [2].

By the presence of specific IgG in human plasma it's possible to conclude about the presence of the pathogen in the body or about infection in anamnesis. Therefore, diagnosis of many infections are based on the detection of specific IgG in human serum.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is one of the methods which is widely used in the diagnosis of infectious diseases. This method can be applied to determine the pathogen antigens and detection of antibodies against it. Development and production of ELISA test kits for the diagnosis of these infections are not possible without anti-species antibodies (e.g., mouse Abs against human Igs) specific to a particular class of immunoglobulins [3]. Polyclonal Abs to human Igs have a number of deficiencies (non-specific binding, cross-reactivity, low level of studies results reproducibility, etc.), which significantly limits their usage [4]. More successful reagents in this case are anti-Igs monoclonal antibodies (McAbs). The advantages of McAbs are the exclusive specificity, homogeneity and the possibility of obtaining virtually unlimited quantities. Having armed by panel of McAbs to human immunoglobulines it is possible to select high affinity and specific clones, which will be suitable for usage in highly sensitive and specific immunoassays. It is known that the development of any ELISA test kit needs a wide range (set) of relevant McAbs, because usually only one or several clones from whole McAbs panel provide satisfactory results [3-4].

The aim of our study was: obtaining of monoclonal antibodies to human IgG, study their properties and selection of McAbs which are most promising for use in highly sensitive and specific immunoassay methods.

MATERIALS AND METHODS OF THE STUDY

Immunization of animas. An immunization schema for Balb/c mice was chosen according to available literature data and own experience [5-11]. The most effective immune response is usually developed following immunization by antigen mixed with Freund's complete antigen (FCA) into hind leg pads [12]. The antigen – human IgG used for immunization – was purified in our laboratory. In the course of immunization (during 7-8 days) each animal received 50-60 mg of the human IgG preparation. Two first injection were carried out using the FCA, and the last one – without any adjuvant. On the third day following the last antigen injection, lymphocytes were taken from regional lymphatic nodes and fused with myeloma Sp 2/0 cultured cells.

Obtaining of hybridomas. The fusion was made using polyethylene glycol 3500-3700 (Sigma, USA) according to Kohler's & Milstein's approach [13] modified by Lane & Koprowski [14]. The hybridomal clones obtained were multiplied on peritoneal macrophage feeder cells in a complete growth medium H-Y (Sigma, USA) supplemented with calf embryo serum (Sigma, USA) and HAT medium (Sigma, USA). The cells were cultivated in 96-welled plates for tissue cultures (Costar, USA).

The presence of anti-human MAbs in hybridomal growth media was controlled by an indirect ELISA approach on the 10th-12th day of cultivation. Following experiment, the optical density values of supernatant fluids of McAbs-positive cultures were by 2-3 times higher comparing to the conjugate. Cells from appropriate wells were taken into 24-welled plates with peritoneal macrophage feeder cells in the complete growth medium supplemented with the HT medium (Sigma, USA). The cells obtained were frozen in a medium containing newborn calf serum (50 %, Sigma, USA), DMEM medium (43 %, Sigma, USA), and dimethylsulfoxide (7%, Sigma, USA). The aliquots of culture fluids were used to determine the McAbs specificity, their titers and affinity constants as well as their isotypes. The McAbs specificity was evaluated by an indirect ELISA approach with human different class antibodies – IgA, IgM, and IgG as well as with IgG Fc-fragments. The hybridomas secreting the most active McAbs of the highest affinity having demonstrated positive results with human IgG and their Fc-fragments and showing no cross reactions with any Igs classes were taken for the next work. The chosen hybridomal clones were then thawed and cloned several times to reach stable levels of antibody synthesis. The cloning was carried out using the end-point dilution method; the hybridomal cells were grown on peritoneal macrophage feeder cells in the complete growth medium. The screening of hybridomal cells was realized by the indirect ELISA approach evaluating the interactions of McAbs secreted by these cells with a human IgG preparation.

Hybridomal cells with stable antibody production were multiplied and injected to mice in order to obtain ascite fluids, the mice having been previously primed by pristane (Sigma, USA). The MAb purification from ascite fluids was carried out by a double precipitation protocol using 18 % and 16 % Na₂SO₄ (w/v) [10]. The McAb preparations obtained in such way were taken for synthesis of horse-radish peroxidase (HRP) containing conjugates.

Indirect ELISA. The sorption of human IgG and their Fc-fragments was made overnight in 0,05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9,6) at 4 °C, their concentrations being 5 and 2,5 mg/ml, respectively. For plate washing, a phosphate salt buffer supplemented with the Tween 20 (0,05 %) (PBS-T, pH 7,2-7,4) was used. The plates were incubated during 1 h (37 °C) and then washed. To detect the bound antibodies, goat HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins were taken. They were added to the wells, incubated during 1 h at the ambient temperature and washed away (three times by the PBS-T and once by water). In all experiments 0,003 % hydrogen peroxide in 0,15 M citrate buffer (pH 5,0) was used as substrate, and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was a chromogen.

The reaction was stopped by 2 M sulfuric acid. The optical density values were read at wave lengths 450/620 nm by spectrophotometer.

Evaluation of McAbs affinity. The McAb affinity constants were evaluated according to the inhibition method proposed by B. Friguet [15] and modified by B. Kim [16]. Affinity constants were calculated by S. Bobrovnik recommendation [17]. Immunoglobulin solutions with different IgG concentrations (10^{-9} - 10^{-6} mole per liter) were mixed with McAbs-containing culture fluid samples. Following incubation (1 h at 37 °C) the mixtures were put into 96-welled plate wells sensitized previously by a human IgG preparation and the ELISA performance was carried out. Control plate wells contained culture fluid samples non-incubated with the IgG preparation.

Determination of the McAbs isotype. The isotype determination of the McAbs obtained was made using a standard kit for this procedure – ISO-2 (Sigma, USA). The isotyping was carried out by antigen-mediated ELISA. Hybridomal culture fluids were put into the plate wells sensitized by human IgG, each sample was put into six wells. The McAbs isotype was determined by a goat monospecific serum. The typing antibodies were detected by an anti-goat HRP-containing conjugate (Sigma, USA). The results were read according to the manufacturer's recommendations.

Synthesis of HRP-containing conjugates. The McAb conjugation with the horse-radish peroxidase was carried out according to periodate oxidation approach [18] with some modifications, the IgG/enzyme mass ratio being 2:1. The HRP (15 mg/ml, Sigma, USA) was diluted in the 0.1 M bicarbonate buffer (pH 8.3) and mixed with an equal volume of the sodium periodate solution (14 mM). For the HPR oxidation, the mixture was incubated during 2 h at the ambient temperature. The solution of the oxidized HRP was mixed with an antibody solution which had been previously dialyzed against the 0.1 bicarbonate buffer (pH 9.2). This mixture was then put into a chromatographic column; dry Sephadex G-25 (Fluka, Switzerland) was added (1:3, v/v), and the mixture was incubated 3 h at the room temperature. The conjugate solution was eluted from the column; 1/20 volume of the aqueous NaBH₄ solution (5 mg/ml) was then added. To stop the reaction, the mixture was kept 30 min at room temperature; then additional portion of the NaBH₄ solution (3:20, v/v) was added, and the mixture was incubated 60 min. The obtained solution of a McAbs-HPR conjugate was dialyzed against the 0.02 M phosphate buffer containing 0.15 M NaCl.

Studies on animals were carried out in compliance with bioethical norms [19].

RESULTS AND ITS DISCUSSION

More than 900 different hybridomal clones were obtained following hybridization. To choice primary effective clones, culture fluids of hybridomas were tested to determine their interaction with human IgG; the McAbs specificity was assayed with IgG Fc-fragments (F_γc); the McAbs cross-reactivity was assessed testing their interactions with human IgA and IgM to reject cross-reacting hybridomal clones. During the first testing following hybridization, specific antibodies against human IgG were detected in all wells of seven plates. To find the most active hybridomas, culture fluids were diluted for the next screening, the background levels having become significantly lower. In such a way 37 clones were chosen with the highest signals according to the ELISA results. All hybridomes chosen were cryoconserved, their culture fluids having been taken for further investigations. As a result of a repeated testing, high MAb activities were confirmed for 21 hybridomal clones (table 1).

The next analysis step was to check hybridomal culture fluids and to determine if they possessed the cross-reactivity with human IgM and IgA; we had also to determine our McAbs specificity to human IgG Fc- or Fab-fragment. For such purpose, the titers of all these hybridomal culture fluids were evaluated using human IgG and its Fc-fragments as antigens; results obtained were compared.

The analysis of our results demonstrated the following:

9 clones gave high signals (signal in ELISA ≥ 2.8) while their testing with human IgG and human IgG Fc-fragments showing no cross-reactivity with IgM and IgA molecules (clones 201C8, 202B7, 202D10, 204H7, 206B2, 206C8, 206E3, 207F3, 207G8);

9 clones gave somewhat lower signals (signal in ELISA < 2.8) both with human IgG and its Fc-fragments showing no cross-reactivity with IgM and IgA (clones 201C9, 201F10, 202B11, 203D10, 203G4, 206C12, 206H11, 207B10, 207G4);

3 clones showed higher signals with human IgG comparing to their Fc-fragments or demonstrated their cross-reactivity with human IgM and IgA (clones 201A2, 206H10, 208D5).

Table 1 – Characterization of monoclonal antibodies to human IgG

No	Hybridoma /McAbs	Optical density in ELISA ¹⁾				Isotype	Titer in cultural liquid ¹⁾	Affinity constant ¹⁾ , 10^9 M^{-1}	Epitope specificity
		IgG	F γ c	IgA	IgM				
1	201A2	2,742	2,777	1,035	0,902	– ²⁾	–	–	–
2	201C8	3,001	2,985	0,039	0,019	IgG ₁	1:800	20.0	A2
3	201C9	2,077	2,139	0,066	0,052	IgG ₁	1:500	4.0	–
4	201F10	2,889	2,661	0,072	0,070	IgG ₁	1:800	10.0	B
5	202B7	3,094	3,002	0,048	0,101	IgG _{2a}	1:1000	20.0	A1
6	202B11	2,402	2,201	0,025	0,020	IgG ₁	1:400	4.0	–
7	202D10	3,112	3,066	0,076	0,010	IgG _{2a}	1:1000	28.0	A1
8	203D10	2,145	2,321	0,025	0,066	IgG ₁	1:800	20.0	A2
9	203G4	2,333	2,451	0,045	0,081	IgG _{2b}	1:800	16.0	B
10	204H7	2,988	2,904	0,081	0,090	IgM	–	–	–
11	206B2	3,008	2,988	0,031	0,035	IgG ₁	1:800	20.0	A1
12	206C8	3,015	3,025	0,029	0,019	IgG _{2b}	1:1000	28.0	A2
13	206C12	2,455	2,399	0,055	0,084	IgG ₁	1:500	8.0	B
14	206E3	3,071	3,001	0,036	0,020	IgG _{2a}	1:500	8.0	A2
15	206H10	2,214	0,525	0,095	0,082	–	–	–	–
16	206H11	2,544	2,651	0,024	0,074	IgG ₁	1:800	8.0	B
17	207B10	2,731	2,801	0,018	0,045	IgM	–	–	–
18	207F3	2,918	2,899	0,042	0,052	IgG _{2b}	1:800	20.0	A2
19	207G4	2,541	2,282	0,028	0,072	–	–	–	–
20	207G8	2,839	2,892	0,048	0,070	IgM	–	–	–
21	208D5	2,246	0,066	0,036	0,099	–	–	–	–

Remarks. ¹⁾ The average values of the results of hybridoma supernatants testing in 4 replications ($p < 0.05$). ²⁾ The parameter is not defined.

Among 21 hybridomas selected during the second screening to further properties were only 16 clones that were characterized by relatively high signal to human IgG and Fc-fragments of IgG and showed no cross-reactivity with other classes of immunoglobulins. At the next phase of work it should be defined criteria for assessing antibodies for further characterization of selected clones of hybridomas. Based on published data and our own experience [1, 4-12] analysis of hybridomas was

carried out for following criteria: McAbs titer in the culture fluid, McAbs affinity and isotyp. Selection of McAbs for the first two criteria (titer and affinity) had to provide high levels of specificity and sensitivity of ELISA using such antibodies.

Studying isotypes of 17 McAbs we obtained the following results: 8 antibodies were IgG₁ isotype, 3 – IgG_{2a} isotype, 3 – IgG_{2b} isotype, 3 – IgM isotype (Fig. 1). The set of obtained data (activity in ELISA, isotype, titer and McAbs affinity constant) used for final selection of hybrid clones for subsequent thawing, cloning, building and accumulation of antibodies. For further studies did not use the hybridomas that produce antibodies of IgM isotype. In addition, the advantage provided clones with high titer ($\geq 1:500$) and affinity constant ($\geq 8,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) and intense signal in the indirect ELISA.

Focusing on the established selection criteria, we formed 4 groups of McAbs which are not promising for developing of highly informative (sensitive and specific) immunoassay methods: 1) McAbs, that are specific to the Fab-fragment of IgG molecule (clones 206H10, 207G4, 208D5); 2) McAbs, which have relatively high signal in the indirect ELISA, but belonged to the IgM-antibodies, that means further non effective approach of isolation and purification of McAbs from ascitic or culture fluid (clones 204H7, 207B10, 207G8); 3) McAbs, which have relatively high signal in the indirect ELISA, but had relatively low titer in culture fluid and/or affinity constant (clones 201C9, 202B11); 4) McAbs, which are showed cross-activity to human IgA and/or IgM by the result of indirect ELISA testing (clone 201A2). Thus, the analysis of data on 19 hybrid clones has led to further studies that were selected 12 hybrids (Table 1): **201C8, 201F10, 202B7, 202D10, 203D10, 203G4, 206B2, 206C8, 206C12, 206E3, 206H11, 207F3.**

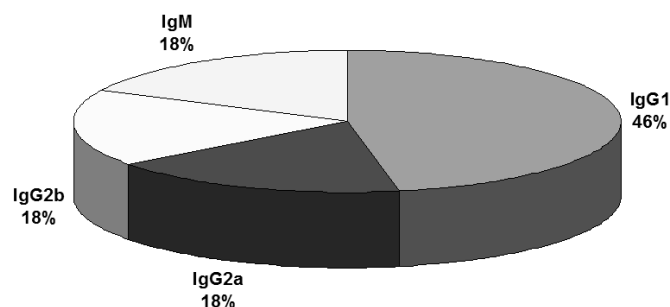


Fig. 1. The distribution of isotypes among obtained monoclonal antibodies

Cloning of hybridomas was carried out by the most simple and effective way (limiting dilution method). All hybridomas were cloned 2-3 times up to complete stability in the level of McAbs synthesis. At the first cloning of hybridomas only 40-60 % of clones gave positive results. The second and third cloning procedure provided high level of positive response (90-100 %). Such developments are likely explained by the gradual stabilization of the total genome of hybrid cells after cryopreservation, including unlocking the genes responsible for the synthesis of immunoglobulins. Isolated positive clones from 96-well plates were transplanted into bigger 24-well plates; hybridomas has been grown, and injected into mice Balb/c for ascites formation. After 7-10 days accumulated ascites were taken out from animals. One mouse gave an average of 10 ml of ascitic fluid. After McAbs isolation of ascites it was used for the synthesis of peroxidase conjugates.

Comparative epitop characteristic of McAbs were performed using a competitive ELISA. Results of competing effects were calculated as the percentage of decrease in activity of McAbs conjugate in the presence of competing antibody. In this embodiment, setting competitive ELISA full or partial decrease in activity is a measure of the total or partial similarity epitop specificity of investigated McAbs. Instead, compared activity with the control McAbs conjugate indicated different competing epitop specificity. Thus, as a result of such testing epitop comparative profile for each monoclonal antibody was obtained (including 11 variants of competition with other McAbs). Correlation analysis was used to facilitate the analysis of such large data of compare profiles. The degree of

similarity was the correlation coefficient profiles provided its statistical significance ($p < 0,05$). High values of positive correlation coefficients between profiles ($0,75 \leq r \leq 1,00$) were interpreted as evidence of equal epitop specificity, lower values ($0,44 \leq r < 0,75$) were considered as an indicator of cross-epitopes and statistically significant coefficients ($r < 0,44$) were regarded as evidence of independent, wholly distinct epitopes.

Table 2 – Comparative epitop characteristic of monoclonal antibodies to human IgG

Epitops	McAbs	Epitop regions and epitops											
		B				A							
		B				A1			A2				
		201F10	206C12	206H11	203G4	206B2	202B7	202D10	203D10	206E3	201C8	207F3	206C8
B	201F10	1,00	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	206C12	0,96	1,00	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	206H11	0,91	0,94	1,00	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	203G4	0,92	0,97	0,98	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	206B2	0,07	0,12	0,11	0,16	1,00	+	+	+	-	+	±	+
	202B7	0,09	0,11	0,09	0,19	0,90	1,00	+	+	+	±	±	-
	202D10	0,05	0,08	0,04	0,05	0,94	0,98	1,00	+	-	-	-	±
A2	203D10	0,27	0,40	0,14	0,09	1,00	0,83	0,92	1,00	+	+	+	+
	206E3	0,12	0,30	0,16	0,05	0,40	0,90	0,40	0,94	1,00	±	+	+
	201C8	0,17	0,14	0,16	0,19	0,87	0,52	0,37	0,91	0,92	1,00	+	+
	207F3	0,19	0,18	0,13	0,13	0,53	0,45	0,35	0,82	0,95	0,81	1,00	+
	206C8	0,25	0,09	0,18	0,30	0,76	0,42	0,61	0,95	0,97	0,98	1,00	1,00

Remarks. McAbs has been related to epitop regions and epitopes by its correlation coefficients (r). Statistically significant r ($p < 0,05$) are in bold. The symbol “+” means common epitopes ($0,75 \leq r \leq 1,00$), “±” – cross epitopes ($0,44 \leq r < 0,75$), “-” – independent epitopes ($r < 0,44$).

Comparative epitop characterization of monoclonal antibodies showed that the studied McAbs directed against two epitop regions (ER) of human IgG molecule (conditionally designated by us as A and B epitop regions) (Table 2). 8 monoclonal antibodies referred to epitopnoho region A (ER-A). It should be noted that the reactivity of this group of McAbs is characterized by an average homogeneity, however, EP-A contains 2 McAbs epitopes with high homogeneity: 3 antibodies (206B2, 202B7, 202D10) refers to the epitope A1 (average coefficient is 0,94), and 5 antibodies (203D10, 206E3, 201C8, 207F3, 206C8) refers to the A2 epitope (average coefficient is 0,93). It should be noted that there is a pronounced cross-reactivity between the monoclonal antibodies of epitopes A1 and A2 (average coefficient is 0,62). These data indicate the spatial proximity of epitopes A1 and A2. Another 4 McAbs (201F10, 206C12, 206H11, 203G4), directed to epitope B (average coefficient is 0,95). It should be noted that it is not observed cross-reactivity between the monoclonal antibodies of EP-B and EP-A epitops (correlation coefficients is 0,15). This indicates a quite different spatial localization of epitopes of these two regions.

CONCLUSIONS

1. Set of 12 new monoclonal antibodies to human IgG has been obtained. Following biological properties of obtained McAbs has been studied: activity in the indirect ELISA, specificity within IgG molecule (Fab- or Fc- fragment), cross-reactivity with other classes of serum immunoglobulins (human IgA and IgM), titer in the culture fluid, affinity constant, and relative epitop specificity.
2. Criteria for selecting of monoclonal antibodies for its further usage for the development of highly sensitive and specific immunoassay methods have been founded. McAbs with following characteristics are the most promising for this kind of goals: it has to be directed to the Fc-fragment of IgG, has a high signal in the indirect ELISA, has no cross-reactivity with other classes of immunoglobulins, has titer in the culture fluid not less then 1:500, and affinity constant not less then $8.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. McAbs of IgM isotype also are not suitable for effective biotechnological approaches.
3. Further research may focus on the establishment of the serological diagnostic sets (with obtained monoclonal antibodies), based on the determination (detection) of specific IgG- antibodies.

LITERATURE

1. Галкін О.Ю. Моноклональні антитіла до імуноглобулінів людини: особливості одержання та застосування / О.Ю. Галкін, І.В. Ніколаєнко, М.Я. Співак // Імунологія та алергологія. – 2005. – № 1. – С. 3-9.
2. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis / [Nikolayenko I.V., Galkin O.Yu., Grabchenko N.I. et al.] // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2005. – Vol. 2, №2. – P. 3-11.
3. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases / O.Yu. Galkin // *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. – 2010. – Т.5, № 4. – С. 54-60.
4. Принципи, особливості та застосування гібридомної технології / І.В. Ніколаєнко, Л.М. Шинкаренко, О.Ю. Галкін, М.Я. Співак // Імунологія та алергологія. – 2003. – №4. – С. 7-17.
5. Галкін О.Ю. Порівняння схем імунізації мишей лінії Balb/c для одержання моноклональних антитіл до IgM людини / О.Ю. Галкін, О.М. Дуган // Імунологія та алергологія. – 2009. – №1. – С.68-73.
6. Галкін О.Ю. Порівняння схем імунізації мишей лінії Balb/c для одержання моноклональних антитіл до IgA людини / О.Ю. Галкін, О.М. Дуган // *Науковий вісник Національного університету біоресурсів та природокористування України*. – 2009. – Вип. 134, Ч. 1. – С.88-97.
7. Goding J. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice [Monograph]* / James Goding. – San Diego: Academic Press, 1996. – 492, [1] p. – (Third Edition).
8. Johnstone A. *Immunochemistry 2 : A Practical Approach* / A. Johnstone, M. Turner. – Oxford: IRL Press, 1997. – 270, [1] p. – (Practical Approach Series).
9. Evaluation of thirty-one mouse monoclonal antibodies to human IgG epitopes / [Reimer C., Phillips D., Aloisio C. et al.] // *Hybridoma*. – 1984. – Vol. 3, №3. – P. 263-275.
10. Harlow E. *Antibodies. A Laboratory Manual* / E. Harlow, D. Lane. – N.-Y.: Cold Spring Harbor. – 1988. – 726, [1] p.
11. Моноклональные антитела к подклассам IgG человека: получение и исследование специфичности / [Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю. и др.] // *Иммунология*. – 1998. – №3. – С. 27-31.

12. Панель моноклональних антитіл для внутрішньотипової диференціації поліовірусів II типу / [Широбоков В.П., Ніколаєнко І.В., Копаниця Л.В. та ін.] // Мікробіол. журн. – 1997. – №6. – С. 27-35.
13. Kohler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // Nature. – 1975. – Vol. 256. – P. 495-497.
14. Lane D. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies / D. Lane, H. Koprowski // Nature. – 1982. – Vol. 296. – P. 200-202.
15. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay / [Friguet B., Chaffote A., Djavadi-Ohanian L. et al.] // J. Immunol. Meth. – 1985. – Vol. 77. – P. 305-319.
16. Evaluation of dissociation of antigen-antibody complexes by ELISA / [Kim B., Dikova E., Sheller U. et al.] // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 131. – P. 213-222.
17. Бобровник С.А. Влияние полиреактивных иммуноглобулинов сыворотки крови на определение аффинности сывороточных антител / С.А. Бобровник, М.А. Демченко, С.В. Комисаренко // Укр. біохім. журн. – 2010. – 82, №1. – С. 66-69.
18. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P. Tijssen // Lab. Techniques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – Vol. 15. – 674 p.
19. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.

REFERENCES

1. Galkin O.Ju. Monoklonal'ni antytila do imunoglobuliniv ljudyny: osoblyvosti oderzhannja ta zastosuvannja / O.Ju. Galkin, I.V. Nikolajenko, M.Ja. Spivak // Imunologija ta alergologija. – 2005. – № 1. – S. 3-9.
2. Nikolayenko I.V. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis / I.V. Nikolayenko, O.Yu. Galkin, N.I. Grabchenko, M.Ya. Spivak // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2005. – Vol. 2, №2. – P. 3-11.
3. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases / O.Yu. Galkin // Ukrai'ns'kyj zhurnal klinichnoi' ta laboratornoi' medycyny. – 2010. – T.5, №4 – S. 54-60.
4. Прынцыпы, особливості та застосування гібридомної технології / I.V. Nikolajenko, L.M. Shynkarenko, O.Ju. Galkin, M.Ja. Spivak // Imunologija ta alergologija. – 2003. – №4. – S. 7-17.
5. Galkin O.Ju. Porivnjannja shem imunizacii' myshej linii' Balb/c dlja oderzhannja monoklonal'nyh antytil do IgM ljudyny / O.Ju. Galkin, O.M. Dugan // Imunologija ta alergologija. – 2009. – №1. – S. 68-73.
6. Galkin O.Ju. Porivnjannja shem imunizacii' myshej linii' Balb/c dlja oderzhannja monoklonal'nyh antytil do IgA ljudyny / O.Ju. Galkin, O.M. Dugan // Naukovyj visnyk Nacional'nogo universytetu bioresursiv ta pryrodokorystuvannja Ukrai'ny. – 2009. – Vyp. 134, ch. 1. – S.88-97.
7. Goding J. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice [Monograph] / James Goding. – San Diego: Academic Press, 1996. – 492, [1] p. – (Third Edition).
8. Johnstone A. Immunochemistry 2 : A Practical Approach / A. Johnstone, M. Turner. – Oxford: IRL Press, 1997. – 270, [1] p. – (Practical Approach Series).
9. Reimer C. Evaluation of thirty-one mouse monoclonal antibodies to human IgG epitopes / C. Reimer, D. Phillips, C. Aloisio et al. // Hybridoma. – 1984. – Vol. 3, №3. – P. 263-275.
10. Harlow E., Lane D. Antibodies. A Laboratory Manual. – N.-Y.: Cold Spring Harbor. – 1988. – 726 p.
11. Monoklonal'nye antitela k podklassam IgG cheloveka: poluchenie i issledovanie specifichnosti / V.B. Klimovich, M.P. Samojlovich, I.Ju. Kruteckaja i dr. // Immunologija. – 1998. – №3. – S. 27-31.
12. Panel' monoklonal'nyh antytil dlja vnutrishn'otypovoi' dyferenciacii' poliovirusiv II typu / V.P. Shyrobokov, I.V. Nikolajenko, L.V. Kopanycja ta in. // Mikrobiol. zhurn. – 1997. – №6. – S. 27-35.

13. Kohler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // Nature. – 1975. – Vol. 256. – P. 495-497.
14. Lane D. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies / D. Lane, H. Koprowski // Nature. – 1982. – Vol. 296. – P. 200-202.
15. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay / B. Friguet, A. Chaffote, L. Djavadi-Ohanian et al. // J. Immunol. Meth. – 1985. – Vol. 77. – P. 305-319.
16. Evaluation of dissociation of antigen-antibody complexes by ELISA / B. Kim, E. Dikova, U. Sheller et al. // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 131. – P. 213-222.
17. Bobrovnik S.A. Vliyanie polireaktivnykh immunoglobulinov syvorotki krovi na opredelenie affinnosti syvorotochnykh antitel / S.A. Bobrovnik, M.A. Demchenko, C.B. Komisarenko // Ukr. biohim. zhurn. – 2010. – 82, №1. – S. 66-69.
18. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P. Tijssen // Lab. Techiques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – Vol. 15. – 674 p.
19. Naukovo-praktychni rekomendacii' z utrymannja laboratornyh tvaryn ta roboty z nymy / Ju. M. Kozhem'jakin, O. S. Hromov, M. A. Filonenko, G. A. Sajfetdinova. – K.: Avicena, 2002. – 156 s.

УДК 796.071:612

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНОВ ВЫСОКОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Голубенко А.В.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

020190@ukr.net

Статья посвящена поиску возможных путей коррекции антиоксидантной системы организма спортсменов высокой квалификации. Актуальность исследования антиоксидантной системы защиты организма спортсмена, который регулярно поддается нагрузке высокой интенсивности, не вызывает сомнений и обусловлена необходимостью контроля данных показателей, величины которых в значительной степени влияют на работоспособность спортсмена высокого класса. В нашем исследовании приняли участие 15 девушек 18-20 лет сборной команды аэробики ЗНУ, имеющих спортивный разряд не ниже кандидата в мастера спорта. Предварительное определение биохимических показателей, характеризующих функционирование антиоксидантной системы спортсменов, на начальном этапе исследования показало отсутствие достоверных различий. В экспериментальной группе, спортсменки которой принимали эрдистерон, удалось зафиксировать достоверное ингибирование синтеза оксида азота индуцибельной NOS, снижение потребления аргинина аргиназой, повышение синтеза NO конститутивной NOS, понижение уровня мочевой кислоты, и как следствие, ингибирование ксантиоксидазной реакции, которая является причиной возникновения супероксиданион радикала.

Ключевые слова: антиоксидантная система, эрдистерон, оксид азота, спортсменки 18-20 лет.

МОЖЛИВІ ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ СПОРТСМЕНІВ ВИСОКОЇ КВАЛІФІКАЦІЇ

Голубенко А.В.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

020190@ukr.net

Стаття присвячена пошуку можливих шляхів корекції антиоксидантної системи організму спортсменів високої кваліфікації. Актуальність дослідження антиоксидантної системи захисту організму спортсмена, який регулярно піддається навантаженню високої інтенсивності, не викликає сумнівів і обумовлена необхідністю контролю даних показників, величини яких значною мірою впливають на працездатність спортсмена високого класу. У нашому дослідженні взяли

участь 15 дівчат 18-20 років збірної команди аеробіки ЗНУ, які мають спортивний розряд не нижче кандидата в майстри спорту. Попереднє визначення біохімічних показників, що характеризують функціонування антиоксидантної системи спортсменок, на початковому етапі дослідження показало відсутність достовірних відмінностей. В експериментальній групі, спортсменки якої вживали екдистерон, вдалося зафіксувати достовірне пригнічення синтезу оксиду азоту індукційною NOS, зниження споживання аргініну аргіназою, підвищення синтезу NO конститутивною NOS, зниження рівня сечової кислоти і, як наслідок, інгібування ксантиоксидазної реакції, яка є джерелом виникнення супероксиданіон радикала.

Ключові слова: антиоксидантна система, екдистерон, оксид азоту, спортсменки 18-20 років.

POSSIBLE WAYS TO CORRECT THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN ORGANISM OF HIGH QUALIFICATION SPORTSWOMEN

Golubenko A.V.

Zaporizhzhya National University,

69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

020190@ukr.net

The article is dedicated to the research of the ways to correct antioxidant system of high qualification sportswomen.

The actuality of the research of antioxidant protect system of the sportsmen' organism that regularly deals with high intensity loads does not cause doubts and is conditioned by the necessity of information indexes' control, the sizes of which greatly influence on high qualification sportsmen' capacity.

It is known from literature, that the oxide of nitrogen is closely related to antioksidant-prooksidant status of organism, because this molecule possesses high affinity to cooperating with a superoxide-anion, as a result of that peroxinitrit appears, which has expressed citotoxic – prooxidant characteristics. In case of oxidative stress occurring in the conditions of the enhanceable physical loading in an organism there are all pre-conditions for the products of peroxinitrit in an amount, sufficient for an origin and development of pathological processes.

Also we've investigated the intensity of flowing of xantioxidaze reaction which is the reason of origin of superoxide-anion, as starting link of radical reactions cascade and predecessor of most active forms of oxygen. It is able to induct the processes of free-radical oxidization with organic hydroperoxides formation. Cytotoxicness of peroxigen is expressed through its lasability hydroxylic radicals through reactions which catalyze the ions of metals (Phenton and Geber-Weiss reaction).

In our research took part 15 girls from ZNU aerobics collapsible team 18-20 years old, having a degree not less than candidate in masters of sport. To the participants of experimental group (n=8) it was suggested to accept ekdisteron. The girls of control group (n=7) continued trainings in the ordinary mode.

Taking into account the information of researches received before, confirming considerable efficiency of the ekdisteron use at the end of competition period, the real research was conducted in an indicated period among girls 18-20 years old from ZNU aerobics collapsible team.

To estimate the state of different ways of oxide synthesis of nitrogen at all inspected respondents on the indicated stage of competition period biochemical indexes were determined in the blood plasma that characterizes intensity of arginine exchange on two alternative ways of metabolism (no oxidizing arginizing and oxidizing No-synthesis). Intensity of no oxidizing metabolism was estimated, determining activity of arginase and maintenance of urea, appearing during work of this enzyme. Intensity of oxidizing degradation of arginine (at which the oxide of nitrogen appears by the way of de novo synthesis) was estimated on activity of different isoferments of No-synthesis – of calcium dependent constituent (total activity was determined eNos+ nNos = cNos) and calcium independent (iNos) synthesis of nitrogen oxide. Estimated was the intensity of no oxidizing reutilizations of nitrate-anions for resynthesis of nitrogen oxide, determining NADF-dependent nitrate reducing activity. Intensity of xantioxidaze reaction flowing was determined on a change by maintenances of urinary acid and peroxide in blood plasma.

Preliminary determination of biochemical indexes, characterizing functioning of the antioxidant system of sportswomen, on the initial stage of research rotined the absence of reliable distinctions.

At the end of experiment we succeeded to fix information, testifying to the favorable affecting of ekdisteron indexes of blood biochemistry of sportswomen from experimental group in a difference from control group.

The meaningful, statistically reliable increase of intensity of constitutive way of nitrogen oxide formation(+29,53%), nitrate reductive ways of NO formation (tendency to the increase of activity of

nitrate reductive on +18,18%), and, vice versa, reliable decline of inducible intensity and arginase ways of l-arginine metabolism (decline of ions activity on 32,34%, and arginases on 24,53%), was marked diminishing of amount of well-educated urinary acid and peroxide (accordingly on 49,37% and 28,49 %).

Thus, we've exposed, that the antioxidant action of ecdisteron consists in inhibition of nitrogen oxide synthesis of inducible NOS, in the decline of consumption of arginine an arginase, increase of NO synthesis by constitutive NOS, lowering of urinary acid level and as a result inhibition of xantioxidaze reaction which is the reason of radical superoxidation origin. Achievement of decline of amount of well-received peroxinite is achieved through diminishing of producing toxic amounts of NO.

Determination of biochemical indexes of blood plasma, responsible for antioxidant status of organism, fellows, subject to the systematic physical loadings, and also determination of degree of the expressed ecdisteron influence on the system of nitrogen synthesis can become a long-range research.

Key words: antioxidant system, ecdisteron, nitrogen oxide, 18-20 years old sportswomen.

ВВЕДЕНИЕ

В организме человека существует сложная многоуровневая антиоксидантная система защиты, которая контролирует и тормозит все этапы свободнорадикальных реакций, начиная от их инициации и заканчивая образованием гидропероксидов и малонового диальдегида [1].

Состояние организма, когда в результате действия каких-либо факторов генерация свободнорадикальных форм кислорода возрастает больше, чем мощность антиоксидантных систем, называют оксидативным стрессом [2].

Поскольку любая спортивная работа протекает в условиях повышенного потребления кислорода, а интенсивность мышечной деятельности при этом может часто и многократно меняться, возможно возникновение относительной гипероксии в мышечной ткани, что тоже приводит к активации свободнорадикального окисления [3].

Актуальность исследования антиоксидантной системы защиты организма спортсмена, который регулярно поддается нагрузке высокой интенсивности, не вызывает сомнений и обусловлена необходимостью контроля данных показателей, величины которых в значительной степени влияют на работоспособность спортсмена высокого класса [4].

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования стал поиск возможных путей коррекции антиоксидантной системы организма спортсменов высокой квалификации с помощью экдистерона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте приняли участие 15 девушек – членов сборной команды по аэробике Запорожского национального университета, имеющих спортивный разряд не ниже кандидата в мастера спорта.

В соответствии с целью исследования нами было проведено определение биохимических показателей спортсменок, которые были условно разделенных на 2 группы, контрольную (n=7) и экспериментальную (n=8). Участникам экспериментальной группы было предложено принимать экдистерон (из расчета 1 капля на 10 килограммов веса) 1 раз в сутки на 100 мл сока в течение 20 дней.

Принимая во внимание полученные ранее данные исследований, подтверждающих значительную эффективность использования экдистерона в конце соревновательного периода, настоящее исследование было проведено в указанный период среди девушек 18-20 лет сборной команды аэробики ЗНУ.

Для оценки состояния различных путей синтеза оксида азота у всех обследуемых на указанном этапе соревновательного периода в плазме крови определяли биохимические показатели, которые характеризуют интенсивность обмена аргинина по двум альтернативным (неокислительному аргиназному и окислительному NO-синтазному) путям метаболизма. Интенсивность неокислительного метаболизма оценивали, определяя

активность аргиназы и содержание мочевины, образующейся при работе этого фермента. Интенсивность окислительной деградации аргинина (при которой образуется оксид азота путем *de novo* синтеза) оценивали по активности различных изоферментов NO-синтаз – кальцийзависимой конститутивной (определялась суммарная активность eNOS + nNOS = cNOS) и кальцийнезависимой индуцибельной (iNOS) синтазы оксида азота. Оценивали интенсивность неокислительной реутилизации нитрат-анионов для ресинтеза оксида азота, определяя НАДФ-зависимую нитратредуктазную активность. Интенсивность протекания ксантиноксидазной реакции определяли по изменению содержания мочевой кислоты и перекиси водорода в плазме крови.

Активность синтазы оксида азота (NO-синтазы) в плазме определяли с помощью классического метода [5], приспособленного для фотометрических измерений одного из продуктов реакции деградации L-аргинина. Базальную аргиназную активность определяли по методу М. М. Bradford [6]. Активность индуцибельной NOS определяли высокочувствительным колориметрическим методом [6]. Активность конститутивной NOS в плазме крови рассчитывали, отнимая от суммарной активности NOS (eNOS+nNOS) активность индуцибельной NOS.

Содержание мочевой кислоты и мочевины определяли по колориметрической реакции в аликвотах плазмы крови с помощью набора реактивов фирмы "Филист-Диагностика", г. Днепропетровск, Украина.

Общую нитратредуктазную активность определяли в плазме крови в присутствии излишка NADH («Reanal», Венгрия) и нитрат-аниона.

Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные были обработаны стандартными методами математической статистики с использованием статистического пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В регуляции деятельности антиоксидантной системы организма важная роль принадлежит оксиду азота (NO). Как утверждают М. Whiteman¹, J. S. Armstrong¹, S. H. Chul и др. [7], обмен NO тесно связан с антиоксидантно-прооксидантным статусом организма, так как данная молекула обладает высоким сродством к взаимодействию с супероксид-анионом, в результате чего образуется пероксинитрит (ONOO⁻), который имеет выраженные цитотоксические прооксидантные свойства.

Обычно образование пероксинитрита незначительное, поскольку избыток супероксида удаляется супероксиддисмутазой, но при возникновении оксидативного стресса в условиях повышенной физической нагрузки в организме складываются все предпосылки для продукции пероксинитрита в количестве, достаточном для возникновения и развития патологических процессов [8].

Пероксинитрит имеет гораздо большую реакционную способность по сравнению с супероксидным радикалом и NO. Он участвует во многих химических реакциях, в том числе в нитровании остатков тирозина в белках, инициации перекисного окисления липидов, инактивации аконитаз, угнетении транспорта электронов в митохондриях и окислении биологических тиолов, приводит к нарушению структуры ДНК, что, в результате, проявляется цитотоксичностью, апоптозом и может привести к возникновению мутаций. Кроме того, он активирует циклооксигеназу, которая является ключевым ферментом синтеза простагландинов, которые являются мощными медиаторами воспаления [9].

Важно отметить, что NO-синтаза принадлежит к группе оксидаз, которая, при определенных условиях, например при недостатке субстрата (L-аргинина) или кофакторов, способна синтезировать перекись водорода вместо оксида азота, или параллельно синтезировать эти два продукта, что существенно влияет на образование пероксинитрита [9].

Доказано, что супероксиданион является пусковым звеном каскада радикальных реакций и предшественником большинства активных форм кислорода. Он способен индуцировать процессы свободнорадикального окисления с образованием органических гидроперекисей [10].

Повышение количества активных форм кислорода не только индуцирует процессы свободнорадикального перекисного окисления липидов, но и вызывает повреждения ДНК, что сопровождается возникновением точковых мутаций [11].

Известно, что L-аргинин (условно-незаменимая аминокислота) является важным метаболитом организма человека, участвуя в процессах азотистого обмена. Так, на сегодня известны такие пути взаимопревращения L-аргинаина: неокислительный аргиназный и окислительный NO-синтазный.

Интенсивность протекания неокислительного пути может быть количественно охарактеризована изменением активности аргиназы, фермента, катализирующего образование мочевины из аминокислоты. Концентрация мочевины также может быть индикатором направленности метаболизма L-аргинаина.

Мочевина является показателем, характеризующим интенсивность протекания аргиназной реакции. Этот метаболит выступает в качестве хелатора свободного железа, таким образом в низких концентрациях проявляя антиоксидантные свойства за счёт взаимодействия с гидроксильным радикалом, образующимся в реакции Фентона. В высоких концентрациях мочевина представляет собой токсический продукт обмена. Поэтому для оценки функционирования антиоксидантной системы мы учитывали уровень мочевины, контролируя аргиназную реакцию.

Установлено, что NO-синтазный путь приводит к образованию оксида азота под действием NO-синтазы. Об интенсивности данного процесса можно судить по данным активности конститутивной кальцийзависимой cNOS и индуцибельной кальцийнезависимой iNOS.

Говоря о продукции оксида азота, важно выделять нитрат/нитритредуктазный путь его синтеза. Это бескислородный механизм, об интенсивности которого судят по изменению уровня НАДФ-зависимой нитратредуктазной активности.

Известен факт, что мочевая кислота является продуктом ксантинооксидазной реакции. Исследование этого показателя со стороны анализа антиоксидантной системы проводится нами вследствие специфики вышеуказанной реакции, продуктами которой являются помимо мочевой кислоты, токсические прооксидантные соединения. Ксантинооксидаза катаболизирует пурины до мочевой кислоты и в сопряжённой реакции восстанавливает кислород до супероксида (спонтанно дисмутирующий в пероксид водорода). Таким образом, в процессе реакции образуются реактивные формы кислорода, способные вызвать оксидативный стресс.

Предварительное определение биохимических показателей, характеризующих функционирование антиоксидантной системы спортсменок, принявших участие в исследовании, на начальном этапе эксперимента показало отсутствие достоверных различий в пробах (табл. 1).

Таблица 1 – Значения биохимических показателей состояния антиоксидантной системы организма девушек 18-20 лет (контрольная и экспериментальная группы) ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа	Экспериментальная группа	<i>t</i>
Индукцибельная NO-синтаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	26,15±0,66	26,23±0,70	0,08
Конститутивная NO-синтаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	15,69±1,24	15,73±1,36	0,02

Показатели	Контрольная группа	Экспериментальная группа	<i>t</i>
Нитратредуктаза, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	3,70±0,31	3,78±0,23	0,21
Аргиназа, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	1,34±0,06	1,32±0,08	0,20
Мочевая кислота, нмоль ⁻¹ мг белка	2,32±0,23	2,36±0,29	0,11
Мочевина, нмоль ⁻¹ мг белка	77,69±5,03	77,60±5,17	0,01
Перекись водорода, пмоль ⁻¹ мг белка	4,49±0,29	4,51±0,19	0,06

Это позволило нам получить однородные группы испытуемых и перейти ко второму этапу исследования, заключающемуся в анализе влияния экдистерона на показатели антиоксидантной защиты спортсменок экспериментальной группы. При этом нами было осуществлено повторное биохимическое исследование среди девушек, не принимающих экдистерон.

В контрольной группе по окончании экспериментального исследования нам не удалось зафиксировать статистически значимых изменений показателей биохимии плазмы крови (табл. 2). Были замечены лишь незначительные тенденции в уменьшении показателей iNOS, cNOS, активности аргиназы, количества мочевой кислоты и мочевины (уменьшение на 0,46%, 0,38%, 3,08%, 0,43%, 1,03 соответственно) и в увеличении показателей активности нитратредуктазы и содержания перекиси водорода (увеличение на 3,65% и 2,18% соответственно)

Таблица 2 – Значения биохимических показателей состояния антиоксидантной системы организма девушек 18-20 лет (контрольная группа) до и после проведения эксперимента (M±m)

Показатели	Начало эксперимента	Окончание эксперимента	<i>t</i>	Δ%
Индукцибельная NO-синтаза, пмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	26,15±0,66	26,03±0,68	0,13	-0,46
Конститутивная NO-синтаза, пмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	15,69±1,24	15,63±1,02	0,04	-0,38
Нитратредуктаза, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	3,70±0,31	3,84±0,34	0,30	3,65
Аргиназа, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	1,34±0,06	1,30±0,04	0,55	-3,08
Мочевая кислота, нмоль ⁻¹ мг белка	2,32±0,23	2,31±0,17	0,03	-0,43
Мочевина, нмоль ⁻¹ мг белка	77,69±5,03	76,9±4,87	0,11	-1,03
Перекись водорода, пмоль ⁻¹ мг белка	4,49±0,29	4,59±0,24	0,27	2,18

Полученные данные могут свидетельствовать о некотором снижении работоспособности, вызванном ухудшением показателей системы антиоксидантной защиты организма, присущее концу соревновательного периода спортсменов [12].

Таблица 3 – Значения биохимических показателей состояния антиоксидантной системы организма девушек 18-20 лет (экспериментальная группа) до и после проведения эксперимента ($M \pm m$)

Показатели	Начало эксперимента	Окончание эксперимента	<i>t</i>	$\Delta\%$
Индукцибельная NO-синтаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	26,23 \pm 0,70	19,82 \pm 1,40*	4,10	-32,34
Конститутивная NO-синтаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	15,73 \pm 1,36	22,32 \pm 1,66*	3,07	+29,53
Нитратредуктаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	3,78 \pm 0,23	4,62 \pm 0,25*	2,47	+18,18
Аргиназа, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	1,32 \pm 0,08	1,06 \pm 0,06*	2,60	-24,53
Мочевая кислота, $\mu\text{моль}^{-1}$ мг белка	2,36 \pm 0,29	1,58 \pm 0,26 *	2,00	-49,37
Мочевина, $\mu\text{моль}^{-1}$ мг белка	77,60 \pm 5,17	77,66 \pm 5,17	0,01	+0,08
Перекись водорода, $\mu\text{моль}^{-1}$ мг белка	4,51 \pm 0,19	3,51 \pm 0,31*	2,75	-28,49

После применения экидестерона нами было проведено повторное определение биохимических показателей в экспериментальной группе (табл. 3). Отмечено значимое, статистически достоверное увеличение интенсивности конститутивного пути образования оксида азота (+29,53%), нитратредуктазного пути образования NO (тенденция к увеличению активности нитратредуктазы на +18,18%), и, наоборот, достоверное снижение интенсивности индуцибельного и аргиназного путей метаболизма L-аргинина (снижение активности iNOS на - 32,34%, а аргиназы на - 24,53%) уменьшение количества образованной мочевой кислоты и перекиси водорода (соответственно на -49,37% и -28,49%).

Таблица 4 – Сравнение значений биохимических показателей состояния антиоксидантной системы организма девушек 18-20 лет по окончании эксперимента (контрольная и экспериментальная группы) ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа	Экспериментальная группа	<i>t</i>	$\Delta\%$
Индукцибельная NO-синтаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	26,03 \pm 0,68	19,82 \pm 1,40*	3,99	-31,33
Конститутивная NO-синтаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	15,63 \pm 1,02	22,32 \pm 1,66*	3,43	+29,97
Нитратредуктаза, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	3,84 \pm 0,34	4,62 \pm 0,25*	1,85	+16,88
Аргиназа, $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка	1,30 \pm 0,04	1,06 \pm 0,06*	3,33	-22,64
Мочевая кислота, $\mu\text{моль}^{-1}$ мг белка	2,31 \pm 0,17	1,58 \pm 0,26*	2,35	-46,20
Мочевина, $\mu\text{моль}^{-1}$ мг белка	76,9 \pm 4,87	77,66 \pm 5,17	0,11	+0,98
Перекись водорода, $\mu\text{моль}^{-1}$ мг белка	4,99 \pm 0,41	3,59 \pm 0,24*	2,95	-39,00

В таблице 4 представлены данные, свидетельствующие о благоприятном воздействии экидестерона на показатели биохимии крови спортсменок экспериментальной группы в отличие от контрольной. Нами выявлено, что антиоксидантное действие экидестерона заключается в ингибировании синтеза оксида азота индуцибельной NOS, в снижении потребления аргинина аргиназой, повышении синтеза NO конститутивной NOS, понижении уровня мочевой кислоты и, как следствие, ингибировании ксантиоксидазной реакции,

которая является причиной возникновения супероксиданион радикала (необходим для образования пероксинитрита). Достижение снижения количества образованного пероксинитрита достигается также за счет уменьшения продуцирования токсических количеств NO.

Экдистерон вызвал изменение активности некоторых ключевых метаболитов системы синтеза оксида азота. Достоверное снижение активности iNOS и аргиназы у тренированных девушек в результате применения экдистерона способствует снижению образования токсических количеств NO, снижая тем самым вероятность образования пероксинитрита ONOO⁻. Препарат значительно снижал образование супероксиданиона в плазме крови, о чем свидетельствует достоверное снижение количества мочевины.

Перспективным исследованием может стать определение биохимических показателей плазмы крови, отвечающих за антиоксидантный статус организма, парней, подверженных систематическим физическим нагрузкам, а также определение степени выраженности влияния экдистерона на систему синтеза азота.

ВЫВОДЫ

1. В ходе исследования был проведен биохимический анализ плазмы крови спортсменов 18-20 лет, членов сборной команды ЗНУ по аэробике; установлено, что экдистерон, вызвал достоверно значимые изменения показателей антиоксидантной системы девушек экспериментальной группы.
2. Экдистерон вызвал улучшение показателей антиоксидантной системы спортсменов экспериментальной группы вследствие ингибирования синтеза оксида азота индуцибельной NOS (снижение активности iNOS на 32,34%), в снижении потребления аргинина аргиназой (снижение активности аргиназы на 24,53%), повышении синтеза NO конститутивной NOS (увеличение активности с NOS на 29,53), понижении уровня мочевины (снижение концентрации мочевины в плазме крови на 49,37%) и, как следствие, ингибировании ксантиоксидазной реакции, снижении уровня токсического продукта перекиси водорода (на 28,49%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / [Беленічев І. Ф., Левицький Є. Л., Губський Ю. І. та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2002. – № 3. – С. 24-30.
2. Оксидативний стрес у патогенезі вазотоксичної дії свинцю / [Апихтіна О. Л., Коцюруба А. В., Коркач Ю. П. та ін.] // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2011. – № 2. – С. 19-21.
3. Величко Т. И. Физическая работоспособность и система «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» у спортсменов на различных этапах годового цикла / Т. И. Величко, Е. И. Гришина [под. ред. проф. М. М. Полевщикова] // Физическая культура, спорт, здоровье, Виртуаль – 19: материалы Всерос. науч.-практ. конф. 1-20 апреля 2012 г. – Йошкар-Ола: Изд-во МарГУ, 2012. – С. 43-46.
4. Фактор Э. А. Перекисное окисление липидов при физических нагрузках и его коррекции экзогенными средствами с целью повышения физической работоспособности спортсмена: автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.04, 13.00.04 / Э. А. Фактор. – СПб., 1995. – 24 с.
5. Chin S.Y. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / [Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al] // American Journal of Physiology. – 1999. – 277, № 5. – P. 797-804.

6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
7. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite ‘scavenger’? / [Matthew Whiteman¹, Jeffrey S. Armstrong¹, Siew Hwa Chu¹ et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2004. – № 90. – P. 765-768.
8. Роль оксида азота и кислородных свободных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии / [Манухина Е. Б., Лямина Н. П., Долотовская П.В. и др.] // *Кардиология*. – 2002. – № 11. – С. 73-84.
9. Синяченко О. В. Оксид азота в терапевтической практике / О. В. Синяченко, Т. В. Звягина. – Донецк, 2001. – 250 с.
10. Сумбаев В. В. Ксантиоксидаза как компонент системы генерирования активных форм кислорода / В. В. Сумбаев, А. Я. Розанов // *Современные проблемы токсикологии*. – 2001. – № 1. – С. 37-43.
11. Маеда Х. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке / Х. Маеда, Т. Акаике // *Биохимия*. – 1998. – № 63. – С. 1007-1020.
12. Богдановська Н. В. Вплив екдистерону на систему синтезу оксиду азоту дівчат спортсменок високої кваліфікації / Н. В. Богдановська // *Питання біоіндикації та екології*. – 2010. – Вип. 15, № 2. – С. 172-180.

REFERENCES

1. Antioksidantna sistema zahistu organizmu (ogljad) / [Belenichev I. F., Levic'kij С. L., Gubs'kij Ju. I. ta in.] // *Sovremennye problemy toksikologii*. – 2002. – № 3. – S. 24-30.
2. Oksidativnij stres u patogenezi vazotoksichnoi dii svincju / [Apihtina O. L., Kocjuruba A. V., Korkach Ju. P. ta in.] // *Zdobutki klinichnoi i eksperimental'noi medicini*. – 2011. – № 2. – S. 19-21.
3. Velichko T. I. Fizicheskaja rabotosposobnost' i sistema «perekisnoe okislenie lipidov – antioksidanty» u sportsmenov na razlichnyh jetapah godichnogo cikla / T. I. Velichko, E. I. Grishina [pod. red. prof. M. M. Polevshhikova] // *Fizicheskaja kul'tura, sport, zdorov'e, Virtual'* – 19: materialy Vseros. nauch.-prakt. konf. 1-20 aprelja 2012 g.– Joshkar-Ola: Izd-vo MarGU, 2012.– S. 43-46.
4. Faktor Je. A. Perekisnoe okislenie lipidov pri fizicheskikh nagruzkah i ego korekcii jekzogennymi sredstvami s cel'ju povyshenija fizicheskoi rabotosposobnosti sportsmena: avtoreferat dis. ... d-ra biol.nauk : 03.00.04, 13.00.04 / Je. A. Faktor. – SPb., 1995. – 24 s.
5. Chin S.Y. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / [Chin S. Y., Pandey K. N., Shi S. J. et al] // *American Journal of Physiology*. –1999. – 277, № 5. – P. 797-804.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
7. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite ‘scavenger’? / Matthew Whiteman¹, Jeffrey S. Armstrong¹, Siew Hwa Chu¹ [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2004. – № 90. – P. 765-768
8. Rol' oksida azota i kislородnyh svobodnyh radikalov v patogeneze arterial'noj gipertenzii / [Manuhina E. B., Ljamina N. P., Dolotovskaja P. V. i dr.] // *Kardiologija*. – 2002. – № 11. – S. 73-84.
9. Sinjachenko O. V. Oksid azota v terapevticheskoj praktike / O. V. Sinjachenko, T. V. Zvjagina. –Doneck, 2001. – 250 s.
10. Sumbaev V. V. Ksantioksidaza kak komponent sistemy generirovanija aktivnyh form kisloroda / V. V. Sumbaev, A. Ja. Rozanov // *Sovremennye problemy toksikologii*. – 2001. – № 1. – S. 37-43.
11. Maeda H. Oksid azota i kislородnye radikaly pri infekcii, vospalenii i rake / H. Maeda, T. Akaike // *Biohimija*. – 1998. – № 63. – S. 1007-1020.
12. Bogdanov'ska N. V. Vpliv ekdisteronu na sistemu sintezu oksidu azotu divchat sportsmenok visokoi kvalifikacii / N. V. Bogdanov'ska // *Pitannja bioindikacii ta ekologii*. – 2010. – Vip. 15, № 2. – S. 172-180.

THE CHANGE OF BIOMETALS CONTENT (Cu, Mg, Zn) IN BLOOD AND SEMEN AND THEIR RELATIONSHIP TO THE FERTILITY OF MEN, WHO WERE CONTAMINATED BY ANTHROPOGENIC AIR POLLUTION

Eshchenko Ju.V., Bovt V.D., Omel'janchik V.N., Gromenko H.A., Shatovsky J.O.

*Zaporizhzhya National University
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Gogol St., 62*

vd.bovt@gmail.com

This work is devoted to the research of the influence of the change of biometals content (Cu, Mg, Zn) in blood and seminal plasma and their relationship to the fertility of men, who were contaminated by anthropogenic air pollution. Such methods were used: cytochemical, biochemical and ecohygienic. The content of Zn, Mg, Cu in the blood and sperm of 190 men, 134 of them were metallurgical workers, was researched. We separated them according to the groups with such signs: fertility, contamination by air pollution and smoking.

The results of the research are the following: 1) air pollution influences on the content of chelatable metals in plasma of blood and semen and in the spermatozoons; 2) chronic influence of this factor decreases Zn and Mg content in blood and seminal plasma and in the spermatozoons, but this process is accompanied with increase of Cu content in fluids and cells; 3) the decrease of Zn and Mg content in fluids and cells leads to the result of an infertile status of the men who were contaminated by anthropogenic air pollution. In future we will study the methods of correction of this effect.

Key words: content of biometals in blood and seminal plasma, fertility of men, anthropogenic air pollution.

ЗМІНИ ВМІСТУ БІОМЕТАЛІВ (Cu, Mg, Zn) У ПЛАЗМІ КРОВІ І СПЕРМІ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ФЕРТИЛЬНІСТЬ ЧОЛОВІКІВ, ЩО ПІДДАВАЛИСЯ ДІЇ АНТРОПОГЕННО ЗАБРУДНЕНОГО ПОВІТРЯ

Єщенко Ю.В., Бовт В.Д., Омелянчик В.М., Громенко О.О., Шатовський Ю.О.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Гоголя, 62*

vd.bovt@gmail.com

Еколого-гігієнічними та цитохімічними методами проводилися дослідження впливу змін показників металолігандного гомеостазу (вмісту Zn, Mg, Cu в плазмі крові та спермі і в сперматозоїдах) та фертильність чоловіків, що контактують з антропогенно забрудненим повітрям (пил важких металів, тютюновий дим). Обстежено 190 робітників металургійних підприємств, поділених на групи за ознаками: фертильність, контакт з важкими металами та паління.

У результаті дослідження було встановлено, що вплив антропогенно забрудненого повітря підвищує вміст Cu в плазмі крові і спермі, а також у сперматозоїдах, зокрем, за всіма показниками знижується вміст Zn та Mg, що у свою чергу викликає порушення чоловічої фертильності, яке проявляється зниженням фертильності в групі, що перебувала під дією антропогенно забрудненого повітря та до повного зникнення фертильності в групі курців, що контактували з пилом важких металів.

Подальші дослідження необхідно спрямувати на знаходження способів попередження виникнення цих явищ, а при їх виникненні – засобів їх корекції. Також бажано перед цим дослідити вплив антропогенних факторів на експериментальних тваринах.

Ключові слова: вміст біометалів в плазмі крові та спермі, фертильність чоловіків, антропогенно забруднене повітря.

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БИОМЕТАЛЛОВ (Cu, Mg, Zn) В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СПЕРМЕ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ МУЖЧИН, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ АНТРОПОГЕННО ЗАГРЯЗНЁННОГО ВОЗДУХА

Ещенко Ю.В., Бовт В.Д., Омелянчик В.Н., Громенко Е.А., Шатовский Ю.А.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Гоголя, 62*

vd.bovt@gmail.com

Эколого-гигиеническими и цитохимическими методами, проводилось исследование влияния изменений показателей металлолигандного гомеостаза (содержание Zn, Mg, Cu в плазме крови и сперме, а также сперматозоидах) на фертильность мужчин, контактировавших с антропогенно

загрязнённым воздухом (пыль тяжёлых металлов, табачный дым). Обследованы 190 рабочих металлургических предприятий, разделённых на группы по признакам: фертильность, контакт с тяжёлыми металлами и курение.

В результате исследования установлено, что воздействие антропогенно загрязнённого воздуха повышает содержание Cu в плазме крови, сперме, а также в сперматозоидах. Кроме того, происходит снижение содержания Mg и Zn по всем показателям, что в свою очередь вызывает нарушение мужской фертильности мужчин, сочетавших курение с воздействием загрязнённого воздуха.

Дальнейшие исследования необходимо направить на нахождение способов предупреждения возникновения этих негативных проявлений, а при возникновении – методов их коррекции, желательно предварительно отработанных на экспериментальных животных.

Ключевые слова: содержание биометаллов в плазме крови и спермы, фертильность мужчин, антропогенная загрязнённость воздуха.

INTRODUCTION

On the biological trace elements Zn, Mg and Cu are important in reproduction. Zinc has been extensively studied. Its deficiency leads to gonadal dysfunction [1-3] decreases testicular weight and causes shrinkage of seminiferous tubules [4-7]. Some of the zinc deficiency states such sickle cell anemia, chronic alcoholism, idiopathic male sterility, or toxic effects of di-(2-ethyl hexyl)-phthalate (DEHP) or other phthalic acid esters (PAEs), cause atrophy of the testis and the atrophy is attributed to low availability or increased urinary excretion of zinc [1-7]. Zinc deficiency is also linked to malignant growth in the testis. Zinc content is high in the adult testis compared to immature animals or those in which the efferent duct is ligated. Zinc concentration of the men increases at puberty and reaches a maximum at the age of 34-40 years of age when functional activity of the organ is at its peak. Similarly the rats with a maldescended testicle, the ectopic testis has a decreased zinc content, whereas that of the other testicle is normal. Zinc deficiency impairs the action of the Mullerian inhibitory factor which is essential for testicular differentiation [1-4].

Angiotensin converting enzyme (ACE) is closely associated with testicular development and sperm development [1-7]. ACE is primarily localized in the germinal cells and has very little activity in Leydig and Sertoli cells. The precise role of ACE is not clear yet but reduced ACE activity in the testis of zinc-deficient rats has been analyzed [1, 3, 4]. It is believed that zinc deficiency first impairs ACE activity, and that in turn leads to depletion of testosterone and finally impairs spermatogenesis. Although the probable site of action is considered to be primary spermatocytes, it has also sperm heads [1, 8, 9].

Zinc appears to be an indispensable element in reproduction for another reason too. The gonads are the most rapidly growing tissues in body and vital enzymes involved in nucleic acid and protein synthesis are zinc metalloenzymes [1-4].

The three zinc cations, cuprum and magnesium stimulated or inhibit progressive motility depending on the concentration of each. At high concentration, these elements, individual or jointly, impair fertility in the patients with normal sperm density. Although a positive correlation between seminal fluid, zinc and sperm motility and sperm density of asthenozoospermic men is studied excessively in asthenozoospermia. Some of the important enzymes of spermatozoa are zinc metalloenzymes and can thus become dysfunctional when zinc is deficient [1-7].

Spermatozoon zinc is suggested to protect an inherent capacity of decondensation, thereby assist to extend the functional life-span of the ejaculated sperm. The spermatozoon head accumulates a fourfold higher zinc concentration than seminal plasma, and the high-affinity zinc binding sites are present within the nuclear matrix. Zinc is related to the structural integrity of DNA, and prevents destruction of DNA by inhibit degrading enzymes [1-6].

Further, an insufficient zinc level in the nucleus may destabilize the quaternary structure of chromatin, reduce the DNA content of spermatozoa and thereby reduce their fertilizing capability [1-3].

The concentration of zinc (Zn) in human seminal plasma is higher than in other tissues. Zinc is the metalloprotein cofactor for DNA-binding proteins with Zn fingers. It is part of copper (Cu)/zinc superoxide dismutase and several proteins are involved in the repair of damaged DNA (which are mutated in half of human tumors) and in the transcription processes of DNA [1, 3, 8]. Zinc has an important role in testes development, sperm physiologic functions and decreasing of its levels causing hypogonadism, decrease in testes volume, inadequate development of secondary sexual characteristics and atrophy of seminiferous tubules (and hence spermatogenesis failure). Recent studies hypothesized that insufficient intake of Zn can impair and make the sperm cell highly susceptible to oxidative damage [1-7].

Infertile and smoker men are very susceptible to oxidative damage induced by free radicals. High levels of free radicals may overwhelm the antioxidant strategies (especially the effective concentrations of seminal Zn), which is associated with low quality of sperm. In the present study, we hypothesized that major changes in the level of seminal trace elements, especially Zn levels, are related to low quality of sperm and poor fertilizing capacity. Therefore this study is focused primarily on Zn levels in the seminal plasma of fertile and infertile subjects (smokers and nonsmokers). The connection of Zn and a certain degree of Mg in the seminal plasma of all groups was evaluated [1-4].

Zinc is also localized in the Golgi complex or secretory vesicles of interstitiocytes (IT), folliculotrophs (FT) and lactotrophs (LT) of the pituitary gland. Thus it seems that the element plays an important role in the production and secretion of LH, FSH and prolactin, and these in turn regulate testosterone production. It is now well-known that zinc deficiency depresses steroidogenesis [1, 3, 4]. Besides its effect on androgen metabolism, it interacts with steroid receptors and androgen binding protein. The earliest citochemical changes occur in Leydig and Sertoli cells in mice after two weeks of zinc deficiency. Cholesterol and neutral lipids are precursors of sex steroids. Under the zinc deficiency they are uptaken by the germinal and non-germinal cells of the testis that does not seem to be affected, but probably the cells are incapable of converting them into sex steroids. This is thought to be the reason that there is a low level of serum testosterone, in spite of high serum LH and FSH levels, after LHRH injection to zinc-deficient rats. Sertoli cell products hormone (SCH) forms the metabolism of testosterone, triggers the formation of new cell lines in the testis, its insufficiency, because of defective metabolism of cholesterol, appears to be responsible for the arrest of spermatogenesis [1-7].

The main aim of this work is the study of the influence of air pollution containing hydrogen sulfide of toxic metals to the content of trace elements (Zn, Mg, Cu) in blood and seminal plasma and their relationship to fertility of the men who were contaminated by anthropogenic air pollution.

MATERIALS AND METHODS

Biochemical methods were used to estimate Zn, Mg, Cu content in blood and sperm for mass investigations of industrial workers. The methods are relatively complicated and require great quantities of blood sperm samples. The citochemical methods used here are simple and need relatively small amounts, only a few drops are required for each analysis.

The cells of 190 subjects were investigated in total, with 56 people as controls, unexposed to the air pollution. Exposure of 134 workers to hydrogen sulfide and toxic metals (in metallurgical facilities) was studied. Significant exceeding of hydrogen sulfide concentration of air to 1,4 maximum allowable concentration (MAC) was noted. Average annual indicator of hydrogen sulfide in working zone air formed 0,8 MAC. Toxic metals concentration in working zone air of metallurgic industry fluctuated within the range from 0,7 to 1,0 MAC.

All participants were within the age range of 24-35 years. Almost none of them had acute infections at the time of testing. The period of exposure was one year. The exposures were similar in each investigated department.

Procedures. All the subjects were interviewed by an experienced investigator using a questionnaire to obtain information on occupation exposure at work to metals, general health, living habits, including cigarette smoking and alcohol drinking, and medical history. In addition, a medical examination was conducted by an andrologist.

The subjects were asked to collect semen at home in the morning by masturbation into a sterile wide-mouth plastic container after at least three days abstinence. The samples were brought to the hospital within an hour of collection. Time of ejaculation, abstinence period, and spillage (if any) were recorded by the subjects; 10 ml of venous blood was also drawn from the subjects into a heparinized plastic tube on the day when they handed in the semen samples. Semen screening was performed as soon as possible after the specimen was delivered at the Semenology laboratory of the reproductive clinic. The semen screening included semen volume, sperm density, motility, morphology, and viability. These were performed according to the World Health Organization guidelines for examination of human semen. The blood and semen samples were stored in metal free containers and kept at -40°C and 4°C respectively before analysis.

Semen samples were obtained by masturbation into a sterile container after sexual abstinence for 2 to 3 days. Before semen analysis, a questionnaire was distributed to obtain information on smoking habits; alcohol use, use or abuse of other substances and drugs and a history of orchitis, testicular trauma, sexually transmitted disease, varicocele, surgery for inguinal hernia and cryptorchidism. Consent was obtained from the subjects. Fertile and infertile patients who smoked cigarettes regularly or who were nonsmokers (previously never smoked) were included in the study [1, 5-9].

Semen parameters analysis. After collection, semen specimens were allowed to liquefy at room temperature for 30 minutes and used for analysis. On microscopic examination, sperm and sperm with normal morphology were objectively evaluated according to standards set by the World Health Organization. Sperm morphology was evaluated according to the criteria by Kruger [1, 5-9].

Measurement of Cu, Mg, Zn in semen and blood plasma. Semen samples were centrifuged at 600 g for 10 minutes. After centrifugation, supernatants were diluted 10-fold by deionized water. Levels of Cu, Mg, Zn were measured by atomic absorption spectrophotometry [10].

Measurement of Cu, Mg, Zn in spermatozoons

Seminal smears were fixed for 5 min in formalin vapors before dithizone staining. 0,2% water – ammonia solution of this reagent was used. The dye was prepared in the following way. Combination of 45 ml of distilled water, 600 mg of dithizone, and 0,9 ml of 25% solution of ammonium hydroxide were placed into a flask and mixed in water bath at 70°C during 10 min. Then the content was filtered and 1% water ammonia solution of dithizone was obtained because the fourth part of reagent remained insoluble. Working solution of dithizone was prepared by fivefold dilution of basic. (1%) solution with 0,2% solution of sodium diethyldithiocarbamate. Reagent of Mg was lumomagneson, of Cu lumocuppheron metals content in spermatozooids was evaluated with semi – quantitative and quantitative methods.

The first one was carried out using the following criteria: 1 = weak, 2 = moderate, 3 = pronounced reaction intensity. The score for 100 cells was counted, using colored scales [6]. The quantitative method was based on granule number score in the cells. The number of spermatozooids was expressed as its number per 1 μl of the semen. The results are presented as $\bar{X} \pm \text{SD}$; testing for significance is performed using Students' t-test.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Average values of sperm parameters in fertile and infertile groups can be observed in Table 1. No significant differences between the groups in age and semen volume were observed. Sperm quantity, motility, and normal morphology in fertile group (smokers or nonsmokers) were significantly higher than those in infertile group. A trend toward a higher quality of sperm was seen for nonsmokers compared with smokers (Table 1).

Average concentrations of Zn, Mg, Cu in the seminal plasma of all samples can be seen in Table 2. The concentration of elements in seminal plasma was in the order Cu, Zn, Mg. No significant differences were observed in average concentrations of Zn, Mg and Cu between groups. However, a trend ($P = 0,9$) was observed for a lower average Mg levels in seminal plasma of infertile smokers compared with infertile nonsmokers. Moreover, a trend ($P = 0,7$) toward higher Mg levels was observed in seminal plasma of fertile nonsmokers compared with infertile nonsmokers (Table 2).

Fertile groups (smokers or nonsmokers) demonstrated significantly higher Zn levels in their seminal plasma than any infertile groups ($P < 0,001$). A trend was observed for a lower average Zn levels in seminal of smokers compared with nonsmokers was observed (Table 2). Fertile nonsmokers had significantly higher levels of Zn in their seminal than infertile nonsmokers ($P < 0,001$), moreover fertile smokers had significantly high levels of Zn in their seminal plasma compared with infertile smokers ($P < 0,001$). A trend ($P = 0,7$) for a lower average Zn levels in seminal plasma of fertile smokers compared with fertile nonsmokers was observed. Moreover, there was a trend ($P = 0,6$) toward higher average Zn levels. Average content of metals in spermatozoons in 2 studied groups can be observed in Table 3.

Table 1 – Age and semen parameters in 2 studied groups.

Variable	Fertile group		Infertile group	
	control (n = 56 nonsmoker, unexposed by the air pollution)	nonsmoker, exposed by the air pollution (n = 38)	nonsmoker exposed by the air pollution (n = 46)	smoker, exposed by the air pollution (n = 52)
Age (y)	31,25 ± 4,02	29,43 ± 3,6	29,63 ± 3,38	31,01 ± 4,53
Volume (ml)	4,53 ± 1,15	4,21 ± 1,35*	4,11 ± 1,61	3,2 ± 0,82
Sperm content (×10 ⁶)	87,58 ± 4,95	77,59 ± 16,35*	38,29 ± 15,9 [§]	32,02 ± 18,97 [†]
Total sperm (×10 ⁶)	384,25 ± 15,32	345,53 ± 137,6*	157,3 ± 13,58 [§]	95,38 ± 6,48 [†]
Motility (%)	65,29 ± 8,69	63,94 ± 7,85*	41,93 ± 5,14 [§]	41,87 ± 5,25 [#]
Normal morphology (%)	16,25 ± 4,01	12,31 ± 3,92*	5,7 ± 1,49 [§]	5,3 ± 0,5***

Note: Values are presented as average ± SD;

* $P < 0,05$ by using 1-way analysis of variance followed by post hoc Newman-Keuls test when values of fertile smokers are compared with fertile nonsmokers;

*** $P < 0,001$ by using 1-way analysis of variance followed by post hoc Newman-Keuls test when values of fertile smokers are compared with fertile nonsmokers;

[§] $P < 0,001$ by using 1-way analysis of variance followed by post hoc Newman-Keuls test when values of infertile nonsmokers are compared with fertile nonsmokers.

[†] $P < 0,01$ by using 1-way analysis of variance followed by post hoc Newman-Keuls test when values of infertile smokers are compared with fertile smokers.

[§] $P < 0,01$ by using 1-way analysis of variance followed by post hoc Newman-Keuls test when values of infertile nonsmokers are compared with fertile smokers.

[#] $P < 0,01$ by using 1-way analysis of variance followed by post hoc Newman-Keuls test when values of infertile nonsmokers are compared with fertile smokers.

Table 2 shows relevant data of 56 referenced subjects and 136 workers who were exposed by the air pollution. The referenced group included 38 fertile nonsmoker exposed by the air pollution (I g), 46 infertile nonsmoker exposed by the air pollution (II g) and 52 infertile, smokers exposed by the air pollution (III g). The incidence of the control group may explain higher content of Zn, Mg and lower content of Cu in blood and seminal plasma.

The incidence of the group (III g) may explain lower content of Zn and Mg and higher content of Cu in blood and seminal plasma.

Table 2 – The content of metals (Zn, Mg, Cu) in blood and seminal plasma in 2 studied groups

Variable	Fertile group		Infertile group	
	control (n = 56 nonsmoker, unexposed by the air pollution	nonsmoker exposed by the air pollution (n = 38)	nonsmoker exposed by the air pollution (n = 46)	smoker, exposed by the air pollution (n = 52)
Zn (in blood plasma, $\mu\text{mol/l}$)	12,25 \pm 2,68	10,21 \pm 0,84***	7,78 \pm 0,99**	6,57 \pm 1,63***
Zn (in seminal plasma, $\mu\text{mol/l}$)	135,85 \pm 2,54	110,25 \pm 12,25***	101,95 \pm 2,05***	94,75 \pm 2,5***
Mg (in blood plasma, mmol/l)	1,21 \pm 0,07	1,05 \pm 0,14***	0,75 \pm 0,08**	0,3 \pm 0,06***
Mg (in seminal plasma, mmol/l)	15,21 \pm 2,67	12,75 \pm 1,54	10,12 \pm 2,65**	8,25 \pm 1,33
Cu (in blood plasma, $\mu\text{mol/l}$)	15,45 \pm 2,86	17,21 \pm 2,14***	18,75 \pm 1,86***	22,12 \pm 3,95***
Cu (in seminal plasma, $\mu\text{mol/l}$)	175 \pm 9,58	192,95 \pm 1,85***	240,52 \pm 2,75***	270,75 \pm 14,85***

Note: ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Table 3 – The content of metals (Zn, Mg, Cu) in spermatozoons in 2 studied groups

Intensity of cytochemical reaction, sing	Fertile group		Infertile group	
	control (n = 56) nonsmoker unexposed by the air pollution	nonsmoker exposed by the air pollution (n = 38)	nonsmoker exposed by the air pollution (n = 46)	smoker, exposed by the air pollution
Zn (dithizone)	1,5 \pm 0,16 **	1,2 \pm 0,14**	1,09 \pm 0,09**	0,85 \pm 0,08 ***
Mg (lumomagnesone)	1,01 \pm 0,07 ***	0,92 \pm 0,02***	0,74 \pm 0,04***	0,32 \pm 0,05**
Cu (lumocuppherone)	0,50 \pm 0,05***	0,72 \pm 0,06**	0,85 \pm 0,02***	1,01 \pm 0,04***

Note: *P < 0,05; **P < 0,01; *** P < 0,001

The content of Zn and Mg in spermatozoons decreased but the content of copper increased. This fact proves that Zn and Mg are synergists but Cu is their antagonist. The influence of contamination of atmospheric air had a negative effect on the characteristics of spermatozoons.

Table 4 shows the correlations between each of the measured reproduction parameters with respect to S_{Zn} , S_{Mg} , S_{Cu} , smoking age and exposure by the air pollution S_{Zn} and S_{Mg} the increase of quantity of total sperm, motility of sperm and the decrease of percentage of pathologic sperm. S_{Cu} , smoking and exposure by the air pollution decreased these parameters.

Table 4 – The Spearman rank correlation coefficient and the level of significance (r, p) for relationships between the parameters of semen quality with respect to zinc (S_{Zn}), magnesium (S_{Mg}), copper (S_{Cu}), smoking habits, age and exposure by the air pollution.

Parameter	S_{Zn}	S_{Mg}	S_{Cu}	Smoking	Age	Exposure by the air pollution
Semen volume	0,145	0,151	-0,135	-0,004	0,035	-0,052
Sperm volume	0,291	0,318	-0,164	-0,009	-0,044	-0,210
Motile sperm, %	0,152	0,148	-0,191	-0,028	0,076	0,001
Normal morphology, %	0,139	0,142	-0,079	-0,141	0,025	-0,018

1. Air pollution influences on the content of chelatable metals (Zn, Mg, Cu) in plasma of blood and semen in the spermatozooids.
2. Chronic influence of this factor decreases Zn and Mg content in the blood and seminal plasma and in spermatozoons, but this progress is accompanied with the increasing of spermatozoons.
3. The decreasing of Zn and Mg content in blood and seminal plasma and spermatozoons leads to an infertile status of the men, who were contaminated by anthropogenic air pollution. In future we will study the method of correction of this effect.

LITERATURE

1. Zalups R.K. Cellular and molecular biology of metal / R.K. Zalups, J. Koropatnick. – N.Y.: CRC Press, 2010. – 442 p.
2. Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology / B. L. Vallee / Biofactors. – 1988. – Vol. 1. – P. 31-36.
3. Tudor R. Zinc in health and chronic disease / R. Tudor, P. Zalewski, R. Ratnaik // J. Nutr. Health Aging. – 2005. – Vol. 9, №1. – P. 45-51.
4. Eshchenko Ju.V. Zinc content in blood granulocytes of persons exposed by hydrogen sulfide and toxic metals / Ju.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko // Experimental and clinical physiology and biochemistry. – 2011. – №1. – С. 42-46.
5. Єщенко Ю.В. Стрес і метаболізм металів / Єщенко Ю.В. – Запоріжжя: ЗНУ, 2010. – 268 с.
6. Єщенко Ю.В. Порівняльні дослідження цинку в клітинах при дії екстремальних факторів / Ю.В. Єщенко // Вісник Запорізького національного університету. – 2008. – №2. – С. 63-66.
7. Єщенко Ю.В. Вміст біометалів в гранулоцитах крові шурів при охолодженні, фізичному навантаженні та іммобілізації / Ю.В. Питання біоіндикації та екології. – 2010. – Вип 15, №1. – С. 200-207.

8. Патент на корисну модель №57367. Спосіб визначення цинку в клітинах організму / Єщенко Ю.В.; заявник і патентовласник Запорізький національний університет, зареєстровано в державному реєстрі патентів України на корисну модель, 2011.
9. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии / Соколовский В.В. – Л.: Медицина, 1971. – 176 с.
10. Thomas T. Chemical laboratory diagnosis / T.Thomas. – Frankfurt: Verlagsgesellschaft, 1998. – 1727 p.

REFERENCES

1. Zalups R.K. Cellular and molecular biology of metal / R.K. Zalups, J. Koropatnick. – N.Y.: CRC Press, 2010. – 442 p.
2. Єщенко Ю.В. Стрес і метаболізм металів / Єщенко Ю.В. – Запорізька: ЗНУ, 2010. – 268 с.
3. Vallee B.L. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology / B. L. Vallee / Biofactors. – 1988. – Vol. 1. – P. 31-36.
4. Tudor R. Zinc in health and chronic disease / R. Tudor, P. Zalewski, R. Ratnaïke // J. Nutr. Health Aging. – 2005. – Vol. 9, №1. – P. 45-51.
5. Eshchenko J.V. Zinc content in blood granulocytes of persons exposed to hydrogen sulfide and toxic metals / J.V. Eshchenko, V.D. Bovt, V.A. Eshchenko // Eksperimental'na ta klinichna fiziologija i biohimija. – 2011. – №1. – S. 42-46.
6. Єщенко Ю.В. Порівняльні дослідження цинку в клітинах при дії екстремальних факторів / Ю.В. Єщенко // Вісник Запорізького національного університету – 2008. – №2. – S. 63-66.
7. Єщенко Ю.В. Вміст біометалів в гранулоцитах крові шхурів при оходоженні, фізичному навантаженні та іммобілізації / Ю.В. Питання біоіндикації та екології. – 2010. – Vip 15, №1. – S. 200-207.
8. Patent na korisnu model' №57367. Sposib viznachennja cinku v klitinah organizmu / Єщенко Ю.В.; заявник і патентовласник Запорізький національний університет, зареєстровано в державному реєстрі патентів України на корисну модель, 2011.
9. Sokolovskij V.V. Gistohimicheskie issledovanija v toksikologii / Sokolovskij V.V. – L.: Medicina, 1971. – 176 s.
10. Thomas T. Chemical laboratory diagnosis / T.Thomas. – Frankfurt: Verlagsgesellschaft, 1998. – 1727 p.

UDC 796.15-053.67:621.3.014.14

MODULATED ELECTRIC CURRENT INFLUENCE ON ORGANISM FUNCTIONAL CONDITION AT TRAINED AND UNTRAINED YOUNG MEN

Kovalyova A.V.

*Zaporizhzhya national technical university
69063, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky street, 64*

kovaleva_aleksan@mail.ru

The short characteristic of organism functional condition changes of trained and untrained young men during physical activity and processes of restoration is given in the paper following the analysis of repeated modulated electric current influence on the specified processes. The aim of the study was to compare the characteristics of a modulated electric current influence on cardiovascular system functional condition in trained and untrained persons (17-24 years old) during the physical activity and restoration.

The study included 56 healthy young men (23 trained and 33 untrained), who were divided into the main group (11 trained and 16 untrained persons) and control group (12 trained and 17 untrained persons). The study included two stages: the first stage – the baseline functional condition was estimated in both groups; the second stage – the functional condition state reaction to repeated modulated electric current during the

physical activity was recorded. The modulated electric current influence was produced using the device "LEIT". The results suggest that the modulated electric current carries out regulating influence on physiological systems of young men during the physical activity and has the character of cardiovascular system activity optimization and vegetative functions optimization.

Key words: modulated electric current, functional condition, trained young men, untrained young men, physical efficiency

ВПЛИВ МОДУЛЬОВАНОГО ЕЛЕКТРИЧНОГО СТРУМУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ОРГАНІЗМУ ТРЕНОВАНИХ І НЕТРЕНОВАНИХ ЮНАКІВ

Ковальова О.В.

*Запорізький національний технічний університет
69063, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 64*

kovaleva_aleksan@mail.ru

У роботі надана стисла характеристика змін функціонального стану організму тренуваних і нетренуваних юнаків при фізичному навантаженні і відновленні після нього при впливі модульованого електричного струму. Метою дослідження було порівняти особливості впливу модульованого електричного струму на функціональний стан серцево-судинної системи тренуваних і нетренуваних осіб в умовах фізичного навантаження і при відновленні після нього.

Дослідження включало 56 здорових молодих осіб (23 тренувані і 33 нетренувані), які були поділені на основну групу (11 тренуваних і 16 нетренуваних осіб) і контрольну групу (12 тренуваних і 17 нетренуваних осіб). Дослідження включало дві етапи: на першому етапі досліджувався вихідний функціональний стан, на другому – реакція функціонального стану на повторюваний модульований електричний струм в умовах фізичного навантаження. Вплив модульованого електричного струму проводився з використанням приладу "LEIT". Результати передбачають, що модульований електричний струм здійснює регуляторний вплив на фізіологічні системи юнаків при фізичному навантаженні і має характер оптимізації діяльності серцево-судинної системи і вегетативних функцій.

Ключові слова: модульований електричний струм, функціональний стан, тренувані юнаки, нетренувані юнаки, фізичне навантаження

ВЛИЯНИЕ МОДУЛИРОВАННОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ТРЕНИРОВАННЫХ И НЕТРЕНИРОВАННЫХ ЮНОШЕЙ

Ковалева А.В.

*Запорожский национальный технический университет
69063, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 64*

kovaleva_aleksan@mail.ru

В работе дана краткая характеристика изменений функционального состояния тренированных и нетренированных юношей при физической нагрузке и восстановлении после нее при влиянии модулированного электрического тока. Целью исследования было сравнить особенности влияния модулированного электрического тока на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы тренированных и нетренированных лиц в условиях физической нагрузки и при восстановлении после него.

Исследование включало 56 здоровых лиц (23 тренированных и 33 нетренированных), которые были поделены на основную группу (11 тренированных и 16 нетренированных лиц) и контрольную группу (12 тренированных и 17 нетренированных лиц). Исследование включало два этапа: на первом этапе исследовалось исходное функциональное состояние, на втором – реакция функционального состояния на повторяемый модулированный электрический ток в условиях физической нагрузки. Влияние модулированного электрического тока проводилось с использованием прибора "LEIT". Результаты предполагают, что модулированный электрический ток осуществляет регуляторное влияние на физиологические системы юношей при физической нагрузке и имеет характер оптимизации деятельности сердечно-сосудистой системы и вегетативных функций.

Ключевые слова: модулированный электрический ток, функциональное состояние, тренированные юноши, нетренированные юноши, физическая нагрузка

INTRODUCTION

The need for studying physiological mechanisms which underlie changes of human functional condition under the modulated electric current (MEC) influence, estimation of an optimality of such changes and their specific orientation have been considered in a considerable number

of studies [1-3]. Some studies attempted to study physiological mechanisms which define positive reactions of cardiovascular system, locomotor apparatus, external respiration system and other physiological characteristics of an organism to this exposure [4, 5]. The cumulated data enable their application in clinical practice and achieving positive medical effect [6-11].

However, studies of changes of organism functional condition following exposure to MEC are extremely insufficient. There are few data [4, 5], which were received in different conditions and on different tool base and which are not systematized. Absence of the unified approach to estimation of functional condition measurements in methodical and methodological maintenance of such studies restricts possibilities of the analysis and practical use of the practically obtained results. It particularly concerns the area of high level maintenance of general and special physical efficiency, and also estimation and correction of restoration stages after intensive physical activities in sportspeople at different stages of training process.

The aim of the study was to compare the characteristics of a modulated electric current influence on cardiovascular system functional condition in trained and untrained persons (17-24 years old) during the physical activity and restoration.

MATERIALS AND METHODS

56 healthy young men (17-24 years old) participated in research. The group of trained young men was presented by qualified sportsmen (n=23). Examined people have been divided into the main (n = 11 trained and 16 untrained persons) and control (n = 12 trained and 17 untrained persons) groups.

The study included two stages: the first stage – the baseline functional condition was estimated in both groups; the second – the functional condition state reaction to repeated modulated electric current during the physical activity was recorded. Indices of central blood circulation were defined by rheographic method. The following measurements were taken: systolic arterial pressure (SAP, mm Hg), diastolic arterial pressure (DAP, mm Hg), heart rate (HR, bpm), systolic blood volume (SBV, ml), minute blood volume (MBV, ml/min), cardiac index (CI, l/m²), general peripheric vascular resistance (GPVR, din·s·cm⁻¹). Reaction to physical activity was studied by PWC170 method through the use of bicycle ergometer. Also absolute (aPWC170, kgm/min) and relative (rPWC170, kgm/min/kg) physical efficiency were assessed [12]. Diagnostics of heart rate variability included research of stress index (SI, s.u.), vegetative balance index (VBI, s.u.), index of centralization (IC, s.u.) [13]. The obtained results were processed statistically. Exposure to MEC was carried out by means of LEIT device according to a standard technique [14].

RESULTS AND DISCUSSION

The repeated graduated physical activity in untrained young men causes significant, comparing to baseline values, reduction of SAP by 17,00±1,14 % (from 174,06±3,82 mm Hg under single exercise to 144,06±2,42 mm Hg under repeated exercise). DAP level following repeated physical activity significantly did not differ from values under a single graduated physical activity (decrease by 0,64±1,28 %, from 70,00±2,04 mm Hg to 69,38±1,82 mm Hg). The index of chronotropic heart function on HR size following a repeated graduated physical activity shows significant decrease of heart function by 13,52±0,80 % in comparison with a single graduated physical activity (from 167,44±4,71 bpm to 149,75±4,46 bpm). SBV amount following MBV decrease by 4,07±0,86 % (from 15712,89±819,33 ml/min to 14495,71±798,13 ml/min), CI by 4,07±0,86 % (from 8,17±0,38 l/min·m² to 7,54±0,37 l/min·m²) and GPVR by 5,78±1,48 % (from 552,56±28,86 din·s·cm⁻⁵ to 543,78±31,18 din·s·cm⁻⁵) significantly increased by 10,94±0,19 % in comparison with a single graduated physical activity (from 93,37±3,13 ml to 103,58±3,48 ml) (fig. 1).

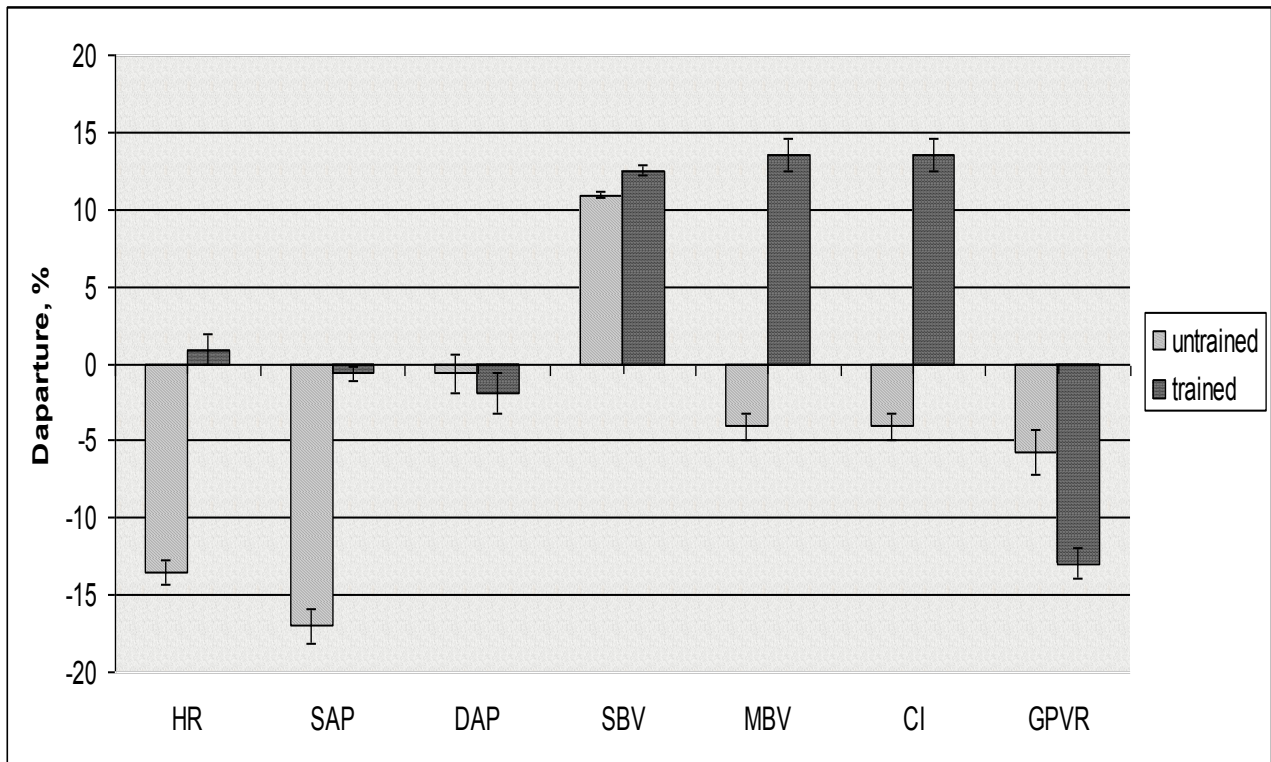


Fig. 1. MEC influence on dynamics of functional condition of blood circulation system of young men organism under a repeated graduated physical activity (% increase in comparison with values under a single decreased physical activity)

SAP level in trained young men under a repeated graduated physical activity slightly not significant decreases by $0,66 \pm 0,44$ % (from $135,00 \pm 1,78$ mm Hg to $134,09 \pm 1,76$ mm Hg), and DAP – by $1,86 \pm 1,32$ % (from $65,91 \pm 1,63$ mm Hg to $64,55 \pm 1,25$ mm Hg). At the same time HR under a repeated graduated physical activity rises slightly, in comparison with indices under a single graduated physical activity by $0,89 \pm 0,98$ % (from $143,45 \pm 1,18$ bmp to $145,36 \pm 1,40$ bmp). SBV, MBV and CI values in the trained young men of the main group against the baseline of repeated exercise showed increase by $12,52 \pm 0,32$ % (from $125,69 \pm 15,51$ ml to $141,36 \pm 17,36$ ml), by $13,51 \pm 1,07$ % (from $15395,47 \pm 1878,58$ ml/min to $17588,64 \pm 2038,17$ ml/min) and by $13,51 \pm 1,07$ % (from $7,98 \pm 0,94$ l/min·m² to $9,12 \pm 1,04$ l/min·m²) respectively following GPVR decrease by $12,98 \pm 1,01$ % (from $534,70 \pm 63,74$ din·s·cm⁻⁵ to $456,26 \pm 52,40$ din·s·cm⁻⁵) in comparison with values under a single graduated physical activity (fig. 1).

Indices of vegetative nervous system in untrained young men under a graduated physical activity under exposure to MEC decreased significantly: SI by $58,56 \pm 1,57$ % (from $796,26 \pm 8,54$ s.u. to $316,65 \pm 12,33$ s.u.), VBI by $52,03 \pm 1,82$ % (from $57,79 \pm 1,85$ s.u. to $27,71 \pm 1,42$ s.u.), IC increased by $0,76 \pm 1,02$ % (from $2,56 \pm 0,11$ s.u. to $2,57 \pm 0,09$ s.u.) in comparison with indices under a single graduated physical activity.

There was a significant increase in trained young men's SI of cardiovascular system under a repeated graduated physical activity comparing to values under a single graduated physical activity by $9,69 \pm 3,16$ % (from $534,47 \pm 10,31$ s.u. to $594,70 \pm 21,04$ s.u.), which was accompanied with significant VBI increase by $8,73 \pm 3,01$ % (from $52,45 \pm 1,40$ s.u. to $56,96 \pm 2,05$ s.u.) and significant IC decrease by $9,63 \pm 0,75$ % (from $0,59 \pm 0,04$ s.u. to $0,54 \pm 0,04$ s.u.) (fig. 2).

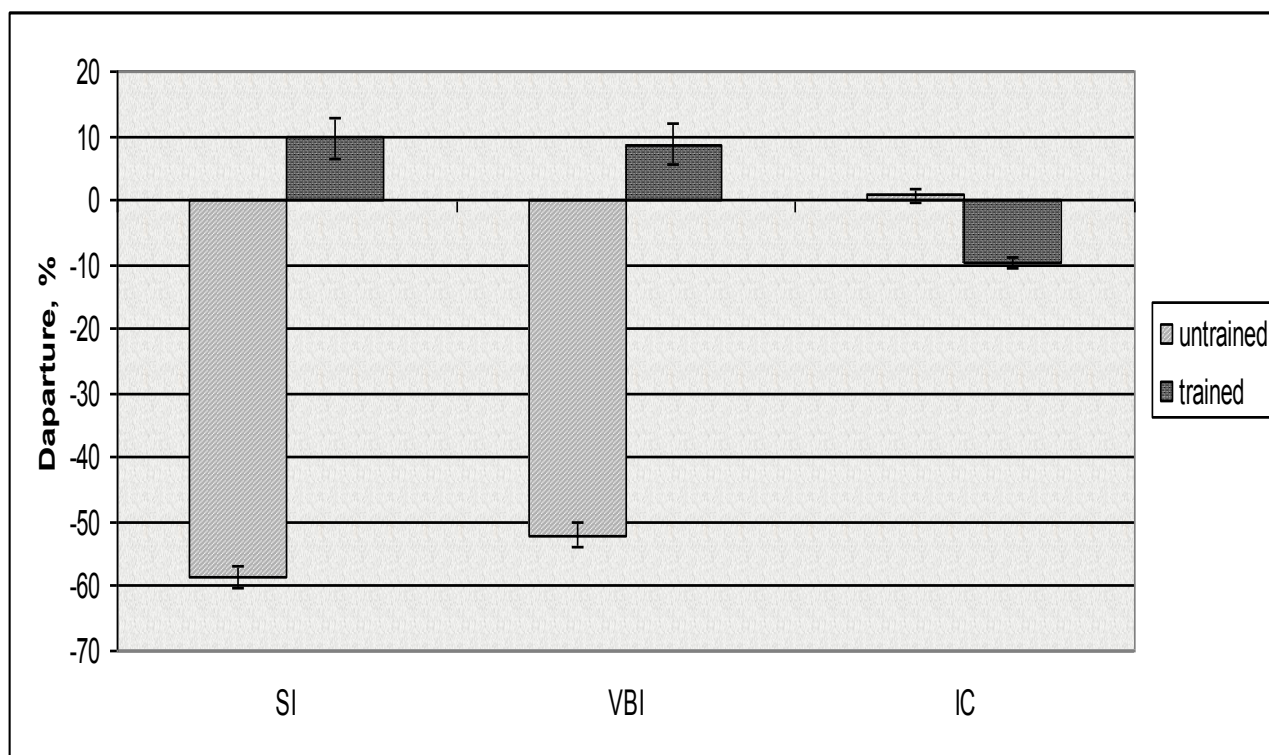


Fig. 2. MEC influence on dynamics of neurohumoral mechanisms condition of regulation of young men organism under a repeated graduated physical activity (% increase in comparison with values under a single graduated physical activity)

The index of general physical efficiency in untrained young men made $786,76 \pm 25,13$ kgm/min, relative working efficiency made $11,25 \pm 0,54$ kgm/min/kg.

The index of general physical efficiency in trained young men made $988,94 \pm 24,77$ kgm/min (relative physical efficiency – $13,84 \pm 0,67$ kgm/min/kg).

Processes of restoration after the graduated physical activity, monitored for 20 minutes, in control group of untrained young men show that returning of the basic indices of cardiovascular system to initial values occurred at different times and averaged on HR $2,06 \pm 0,18$ min, on SAP – $4,35 \pm 0,26$ min, on DAP – $4,18 \pm 0,23$ min, on SBV – $8,41 \pm 0,23$ min, on MBV, CI and GPVR – $8,47 \pm 0,33$ min. Indices of vegetative nervous system also showed quite fast returning to norm. SI, VBI and IC reached initial values not later than in 5 minutes (SI on average for $5,35 \pm 0,32$ min, VBI on average for $5,24 \pm 0,26$ min and IC on average for $5,29 \pm 0,34$ min). In trained young men HR indices were restored in $1,08 \pm 0,08$ min, SAP – in $1,92 \pm 0,19$ min, DAP – in $1,75 \pm 0,22$ min, SBV – in $5,08 \pm 0,23$ min, and MBV, CI and GPVR – in $4,92 \pm 0,19$ min. SI, VBI and IC reached initial values within 3 minutes (fig. 3).

Processes of restoration after a repeated graduated physical activity in the main group of untrained young men, monitored for 20 minutes, show that returning of the main indices of cardiovascular system to initial values occurred at different times and averaged on HR – $1,50 \pm 0,13$ min, on SAP – $3,44 \pm 0,20$ min, on DAP – $3,31 \pm 0,20$ minute, on SBV – $7,13 \pm 0,27$ min, on MBV, CI and GPVR – $7,25 \pm 0,38$ min. Indices of vegetative nervous system also showed quite fast returning to norm: SI – for $4,56 \pm 0,33$ min, VBI – $4,38 \pm 0,26$ min, IC – for $4,54 \pm 0,34$ min (fig. 4).

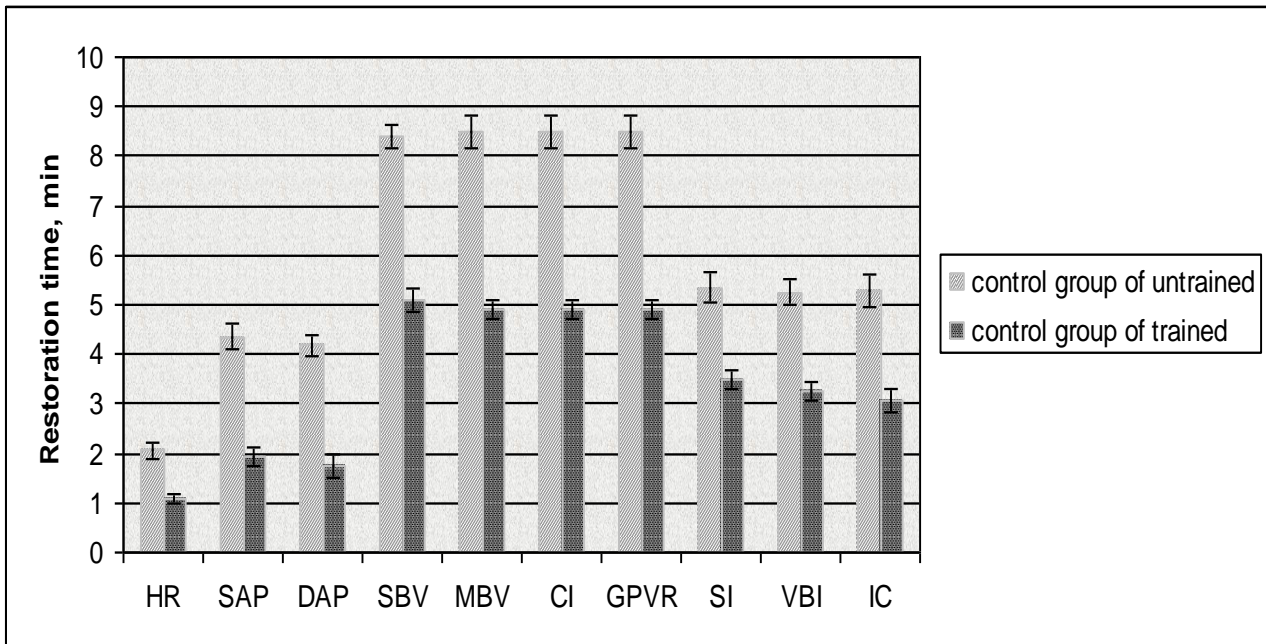


Fig. 3. Restoration time of main parameters of organism functional condition of trained and untrained young men in control group

Processes of restoration after a repeated graduated physical activity in the main group of trained young men, monitored for 20 minutes, show that returning of the main indices of cardiovascular system to initial values averaged on HR – $0,79 \pm 0,14$ min, on SAP – $1,18 \pm 0,12$ min, on DAP – $1,09 \pm 0,09$ min, on SBV – $3,82 \pm 0,23$ min, on MBV, CI, GPVR – $3,91 \pm 0,25$ min. Indices of vegetative nervous system also showed quite fast returning to norm: SI – $2,64 \pm 0,28$ min, VBI – for $2,55 \pm 0,21$ min, IC – for $2,36 \pm 0,24$ min (fig. 4).

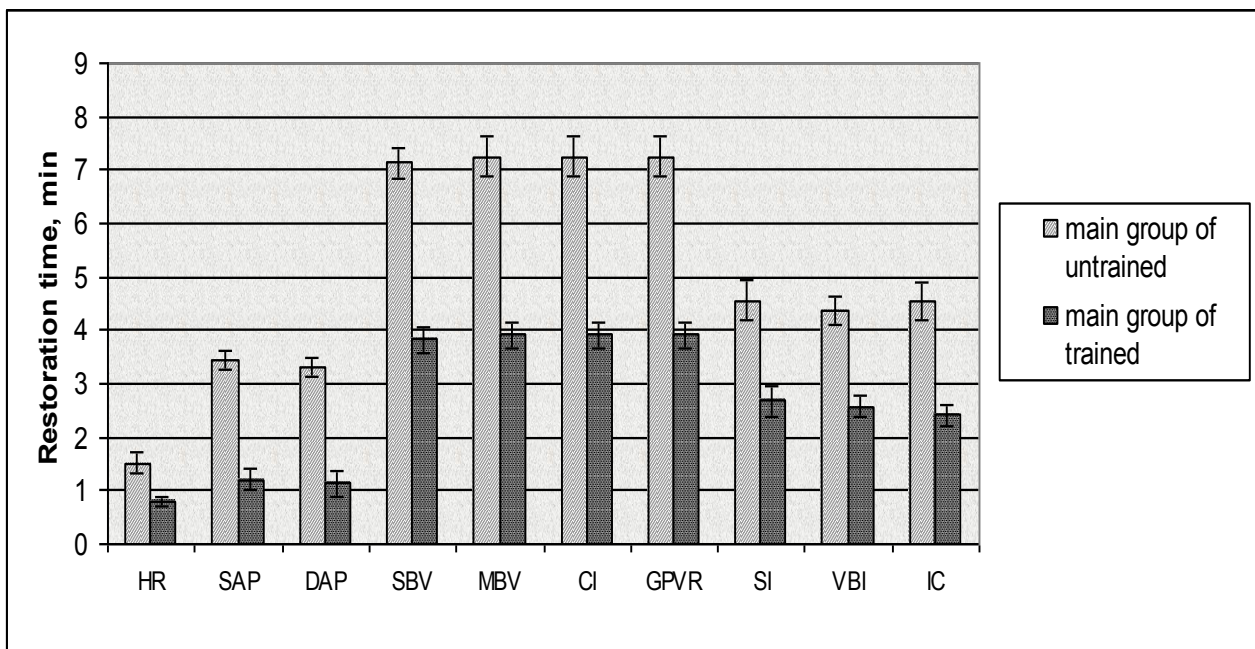


Fig. 4. Restoration time of main parameters of functional condition organism functional condition of trained and untrained young men of main group

The obtained data indicate uniformity of all studied groups according to initial anthropometrical and functional indices. Such uniformity, with high degree of a correctness, has allowed to estimate those changes which have been received as a result of the experiment.

The analysis of changes of all registered indices on control groups have shown quite small difference in the investigated indices and do not allow to judge about optimizing influence of physical activities on functional condition correction. At the same time synergic effect of physical activities and MEC leads to increase in degree of studied indices changes.

Prolonged practice in a graduated physical activity by untrained young men, accompanied with exposure to MEC, shows more pronounced changes on all components of regulation in comparison with persons who were not submitted to such influence.

Dynamics of integrated indices of blood circulation in trained young men under a repeated graduated physical activity shows that absence of significant changes in the level of arterial blood pressure in comparison with indices under a single graduated physical activity. The HR rising in comparison with indices under a single graduated physical activity can indicate certain stimulation of mechanisms of system blood circulation regulation by exposure to MEC.

Significant decreasing of indices of vegetative nervous system in untrained young men under a graduated physical activity under exposure to MEC in comparison with indices under a single graduated physical activity can indicate certain sedative effect of MEC influence. At the same time, taking into consideration the data received in control group of untrained young men, available dynamics indicates synergic effect of physical activity and MEC influence on optimization of vegetative regulation (fig. 2).

Significant increase of SI testifies that exposure to MEC, partially stimulating vegetative, allows realizing parasympathetic function (fig. 2).

The index of general physical efficiency in untrained young men corresponded to both low level of organism energy supply conformity to the offered exercise and relative working efficiency. Thus, there is general decrease in organism power possibilities against the background of unusual constant physical work that indicates certain exhaustion of power stores. Thereby, on the one hand, low SI and VBI indices described above can be interpreted as additional confirmation of inadequate physical exercise for the given group. On the other hand, comparison of vegetative indices with cardiovascular system parameters can indicate optimization of actual cardiovascular regulation and its optimization under MEC use.

The index of general physical efficiency in trained young men corresponded to an average level of organism energy supply under the offered exercise.

Indices following restoration, registered after each influence in control group of trained young men, indicate slight reduction of restoration time on a vegetative component and absence of changes in time of restoration of the majority of the surveyed indices of cardiovascular system activity. Indices of vegetative nervous system also showed relatively fast restoration to norm.

Indices following restoration, registered after each influence in the main group of untrained young men, indicate definite optimization of restoration of all studied indices. Attention is attracted to the pronounced effect of MEC influence on a vegetative component of organism physiological functions regulation. Dynamics of all studied indices shows unequivocal and unidirectional stabilization of restoration processes after each exposure to both physical activity and MEC.

Indices following restoration, registered after each influence in the main group of trained young men, indicate considerable significant reduction of restoration time on a vegetative component and indices of system blood circulation.

Thus, optimizing MEC effect on the trained organism in greater degrees covers the cardiac component that is expressed in significant increase of contractile heart function and volume indices of blood circulation. Following general optimization of system haemodynamics, young sportsmen keep stable regulation of vegetative functions and stably high general physical efficiency usual for people who do physical exercise regularly.

In untrained young men optimization process in greater degree covered vegetative indices, which can be regarded as additional positive influence of MEC on processes of organism adaptation to such stress influence which physical activity is. It is quite clear, that it is obviously impossible to improve indices of the general physical efficiency essentially during such a short time interval, but improvement of restoration parameters allows considering the use of such influence as corrective means which allows intensification of adaptation to physical exercise with people who lead sedentary life.

Comparing the data obtained in control and main groups, it is possible to draw a conclusion that the given influence promotes maintenance of high level of working capacity in people who do sports, due to increase in cardiovascular system efficiency following restoration processes improvement while in untrained people influence promotes leveling of hypodynamia functional displays including psychoemotional pressure removal.

The perspectives of further researches are to study the MEC influence on persons of another age and another degree of training and reaction of their heart activity and vegetative nervous system on this influence. Also can be studied reaction of another systems and organs on MEC influence at trained and untrained young persons.

CONCLUSIONS

1. It has been found that MEC influence carries out regulating influence on physiological systems of young men organism following physical activities and has character of cardiovascular system activity and vegetative functions optimization.
3. MEC influence on healthy young man who do not sports has positive influence of physical activities, optimizing system blood circulation due to vegetative nervous system activity level.
4. MEC influence on trained young men organism is represented in significant increase in cardiotropic function, optimization of system blood circulation indices, stabilization of vegetative nervous system regulation. In trained healthy young men MEC influence is synergic to effects from exercise amount that proves to be true by indices of system blood circulation.
5. MEC influence is displayed in optimization of cardiovascular and vegetative nervous systems indices in the period of restoration against the background of significant reduction of restoration time.
6. MEC influence on general physical efficiency is shown in increase of index PWC₁₇₀.

LITERATURE

1. Боголюбов В.М. Общая физиотерапия / В.М. Боголюбов, Г.Н. Пономаренко. – М., СПб.: Медицина, 2003. – 480 с.
2. Гильмутдинова Л.Т. Краткий справочник физиотерапевта: Методические рекомендации / Гильмутдинова Л.Т., Вечерова С. А. – Уфа: ДизайнПолиграф-Сервис, 2007. – 40 с.
3. Пономаренко Г.Н. Биофизические основы физиотерапии: учебное пособие / Пономаренко Г.Н., Турковский И.И. – М.: Медицина, 2006. – 176 с.
4. Попадюха Ю.А. Применение нетрадиционных средств в профилактике остеохондроза у спортсменов силовых видов спорта / Ю.А. Попадюха, С.А. Сычев // Педагогіка, психологія та медико-біологічні проблеми фізичного виховання і спорту. – 2007. – № 4. – С. 170-174.
5. Высоцкая Е.Ф. Скэнар-реабилитация при вертеброгенном болевом синдроме / Е.Ф. Высоцкая, Н.В. Степанова // Педагогіка, психологія та медико-біологічні проблеми фізичного виховання і спорту. – 2007. – №4. – С. 35-36.

6. Лечение гипертонических кризов с цефалгической формой / [Ковалева О.В., Фуштей И.М., Поталов С.А. и др.] // Сборник статей Харьковской городской клинической больницы скорой неотложной помощи «Неотложная медицинская помощь» / Харків: ХМАПО, 2005. – С. 176-183.
7. Опыт лечения кардиалгий, не связанных с патологией сердца на догоспитальном этапе / [Ковалева О.В., Поталов С.А., Голдовский Б.М. и др.] // Проблемні питання медицини невідкладних станів: Матеріали симпозиуму (V школа-семінар), Київ, 5-6 квітня 2007 р. – Київ, 2007 – С. 75-76.
8. Особенности изменения вегетативного гомеостаза при лечении артериальной гипертензии / [Ковалева О.В., Фуштей И.М., Селивоненко В.Г. и др.] // Від фундаментальних досліджень – до прогресу в медицині: Матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю, присвяченої 200-річчю з дня заснування Харківського державного медичного університету, Харків, 17-18 січня 2005 р. – Харків, ХДМУ, 2005. – С. 120-121.
9. Адаптація осіб молодого віку при зміні кліматичних умов / [Токаренко О.І., Маликов Н.В., Ковель Н.М. та інш.] // Український Бальнеологічний науково-практичний журнал. – 2006. – № 1-2. – С. 52-56.
10. Токаренко А.И. Вариабельность сердечного ритма у больных с патологией желудочно-кишечного тракта / А.И. Токаренко, И.М. Фуштей, Л.В. Порада // Лекарства – человеку. Современные проблемы создания, исследования и апробации лекарственных средств: материалы науч.-практ. конф. с международным участием: Харьков, 23 марта 2006 г. – Харьков, 2006. – С. 234-239.
11. Зміни серцевого ритму у хворих з патологією жовчо-вивідної системи / [Токаренко О.І., Ковальова О.В., Ковбель Н.М. та інш.] // Український Бальнеологічний науково-практичний журнал. – 2006. – № 1-2. – С. 56-60.
12. Маліков М.В. Фізіологія фізичних вправ / Маліков М.В. – Запоріжжя: ЗДУ, 2003. – 112 с.
13. Баевский Р.М. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем / Р.М. Баевский, Г.Г. Иванов, Л.В. Чирейкин [и др.] // Вестник аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65-86.
14. Ковалева О.В. Аппарат волновой энергоинформационной терапии LEIT®. MODEL No. AT-30897 / О.В. Ковалева, А.В. Ковалева, С.Н. Проценко [и др.] – Запорожье. – Днепропетровск, 2011. – 61 с.

REFERENCES

1. Bogolyubov V.M. Obschaya fizioterapiya / V.M. Bogolyubov, G.N. Ponomarenko. – M., SPb.: Meditsina, 2003. – 480 s.
2. Gilmutdinova L.T. Kratkiy spravochnik fizioterapevta: Metodicheskiy rekomendacii / Gilmutdinova L.T., Veчерova S.A. – Ufa: DizaynPoligraf-Servis, 2007. – 40 s.
3. Ponomarenko G.N. Biofizicheskiye osnovy fizioterapii: uchebnoe posobiye / Ponomarenko G.N., Turkovskiy I.I. – M.: Meditsina, 2006. – 176 s.
4. Popadyuha Y.A. Primeneniye netradicionnykh sredstv v profilaktike osteohondroza u sportsmenov silovykh vidov sporta / Y.A. Popadyuha, S.A. Sychev // Pedagogika, psihologiya ta mediko-biologochni problemy fizychnogo vyhovannya i sportu. – 2007. – №4. – S. 170-174.
5. Vysotskaya E.F. Skenar-reabilitatsiya pri vertebrogenom bolevom sindrome / E.F. Vysotskaya, N.V. Stepanova // Pedagogika, psihologiya ta mediko-biologochni problemy fizychnogo vyhovannya i sportu. – 2007. – №4. – S. 35-36.

6. Lechenie gipertonicheskikh krizov s tsefalgicheskoy formoy / [Kovaleva O.V., Fushthey I.M., Potalov S.A. i dr.] // Sbornik statey Kharkovskoy gorodskoy klinicheskoi bolnitsy skoroy neotlozhnoy pomoshchi «Neotlozhnaya medicinskaya pomoshch» / Harkiv: HMAPO, 2005. – S. 176-183.
7. Opyt lecheniya kardialdiy, ne svyazannih s patologiei serdtsa na dogospitalnom etape / [Kovaleva O.V., Potalov S.A., Goldovskiy B.M. i dr.] // Problemni pitannya meditsyny nevidkladnih staniv: Materialy simpoziumu (V shkola-seminar), Kyiv, 5-6 kvithya 2007 r. – Kyiv, 2007 – S. 75-76.
8. Osobennosti izmeneniya vegetativnogo gomeostaza pri lechenii arterialnoy gipertenzii / [Kovaleva O.V., Fushthey I.M., Selivonenko V.G. i dr.] // Vid fundamentalnyh doslidzhen – do progresu v medytsini: Materialy naukovopraktychnoy konferenciyi z mizhnarodnoyu uchastu, prasyachenoyi 200–richchyu z dnya zasnuvannya Kharkivskogo derzhavnogo medychnogo universytetu, Kharkiv, 17-18 sichnya 2005 r. – Kharkiv, HDMU, 2005. – S. 120-121.
9. Adaptatsiya osib molodogo viku pry zmini klimatychnyh umov / [Tokarenko O.I., Malikov N.V., Kovel N.M. ta inch.] // Ukrainskiy balneologichniy naukovopraktychniy zhurnal. – 2006. – № 1-2. – S. 52-56.
10. Variabelnost serdechnogo ritma u bolnih s patologiei zheludochno-kischechnogo trakta / A.I. Tokarenko, I.M. Fushthey, L.V. Porada // Lekarstva – cheloveku. Sovremenniye problemy sozdaniya, issledovaniya i aprobatsii lekarstvennyh sredstv: materialy nauchno-practicheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, (Kharkov, 23 marta 2006 g.). – Kharkov, 2006. – S. 234-239.
11. Zmini sercevego ritmu u hvorih z patologiei yu zhovchno-vyvydnoyi sistemy / [Tokarenko O.I., Kovalyova O.V., Kovbel N.M. ta inch.] // Ukrainskiy balneologichniy naukovopraktychniy zhurnal. – 2006. – № 1-2. – S. 56-60.
12. Malikov M.V. Fiziologiya fizichnih vprav / Malikov M.V. – Zaporozhye: ZDU, 2003. – 112 s.
13. Baevskiy R.M. Analiz variabelnosti serdechnogo ritma pri ispolzovanii razlichnyh elektrokardiograficheskikh sistem / R.M. Baevskiy, G.G. Ivanov, L.V. Chireykin [i dr.] // Vestnik aritmologii. – 2001. – №24. – S. 65-86.
14. Kovaleva O.V. Apparat vonovoy energoinformatsionnoy terapii LEIT®. MODEL No. AT-30897 / O.V. Kovaleva, A.V. Kovaleva, S.N. Protsenko [i dr.] – Zaporozhye. Dnepropetrovsk, 2011. – 61 s.

УДК [576.3:546.47]:502.55(203)(477.64-2)+612:014.1:576.32:159.944.4

ІНТРАВІТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІН ВМІСТУ ЦИНКУ В КЛІТИНАХ ГІПОКАМПУ, ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ДІЇ СТРЕС-ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

Кучковський О.М.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

olegk181@gmail.com

Стрес супроводжує організм людини і тварин протягом усього онтогенезу і є стимулом для його розвитку. У той же час надмірне стресування організму призводить до порушення регуляції гомеостазу, особливо металолігандного гомеостазу, що призводить до розвитку стану передхвороби, або навіть хвороби. Нами раніше були проведені дослідження змін вмісту цинку в клітинах цинкмістких органів *in vitro*, а інтравітальних досліджень змін вмісту цього металу в різних органах проведено не було.

Дослідження змін вмісту цинку в клітинах центральних та периферичних цинкмістких органів *in vitro* показало, що вміст цього металу при іммобілізації, голодуванні та введенні інсуліну підвищувався, а при дії лептину, дексаметазону, ГАМК та конвульсанту його вміст в клітинах цих органів суттєво знижувався. Протилежні зміни вмісту цинку спостерігали в клітинах гіпоталамуса, що свідчить про можливий функціональний зв'язок між цими структурами. Інтравітальне

дослідження нейронів гіпокампу, клітин підшлункової залози та клітин Панета показало однотипні зміни вмісту хелатоутворюючого цинку в цих клітинах. Ці дані можуть свідчити про можливу участь гіпокампу, або комплексу «гіпокамп-гіпоталамус» в механізмах регуляції металолігандного гомеостазу.

Ключові слова: гіпокамп, гіпоталамус, клітини В, клітини Панета, секреторний матеріал, цинк.

**ИНТРАВИТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ЦИНКА
В КЛЕТКАХ ГИППОКАМПА, ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ТОНКОГО КИШЕЧНИКА
ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕСС-ФАКТОРОВ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ**

Кучковский О.Н.

*Запорожский национальный университет,
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66
olegk181@gmail.com*

Стресс сопровождает организм человека и животных в течение всего онтогенеза и является стимулом для его развития. В то же время чрезмерное стрессирование организма приводит к нарушению регуляции гомеостаза, особенно металлолигандного гомеостаза, который приводит к развитию состояния предболезни, или даже болезни. Ранее были проведены исследования изменений содержимого цинка в клетках цинксодержащих органов *in vitro*, а интравитальных исследований изменений содержимого этого металла в разных органах проведено не было.

Исследование изменений содержимого цинка в клетках центральных и периферических цинксодержащих органов *in vitro* показало, что содержание данного металла при иммобилизации, голодании и введении инсулина повышалось, а при действии лептина, дексаметазона, ГАМК и конвульсанта его содержимое в клетках этих органов существенно снижалось. Противоположные изменения содержимого цинка наблюдали в клетках гипоталамуса, который свидетельствует о возможной функциональной связи между этими структурами. Интравитальное исследование нейронов гиппокампа, клеток поджелудочной железы и клеток Панета показало однотипные изменения содержания хелатообразующего цинка в этих клетках. Эти данные могут свидетельствовать о возможном участии гиппокампа, или комплекса «гиппокамп-гипоталамус» в механизмах регуляции металлолигандного гомеостаза.

Ключевые слова: гиппокамп, гипоталамус, клетки В, клетки Панета, секреторный материал, цинк.

**INTRAVITAL RESEARCH OF ZINC CONTENT CHANGE IN THE CELLS
OF HIPPOCAMP, PANCREAS AND SMALL INTESTINE UNDER THE INFLUENCE
OF DIFFERENT ORIGIN STRESS-FACTORS**

Kuchkovsky O.M.

*Zaporizhzhya national university
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Str., 66
olegk181@gmail.com*

Stress accompanies the organism of human beings and animals during the whole ontogeny and is the incentive for its development. At the same time, extraordinary stressing of the organism leads to the damage of homeostasis regulation, especially the metal-ligand homeostasis that leads to the pre-disease condition development or even disease.

The principal result of adaptation is reinitiation of homeostasis and stabilization of the organism functions at all the levels of its organization. An essential part of the homeostasis is the metal-ligand homeostasis which provides regulation of the activity of metal-enzymes, proteins, hormones, etc., and it also performs the functions of stabilization and sensitization of the cells of excitable tissues. Some micronutrients, for instance, zinc simultaneously perform both the function of stabilization of a cell membrane from the destroying influence of an activate neurotransmitter and sensitization of this membrane. The latter effect increases expectation of the action potential origin, especially in the postsynaptic membrane of glutamatergic neurons of cerebrum. So it is the metal that plays one of the fundamental parts in the mechanisms of glutamatergic excitotoxicity development and the mechanisms of memory, both a short-term one and a long-term one. On the one hand, zinc provides long-lasting activation for storing information with the help of cascading changes in membrane structure and on the other hand, zinc holds the integrity of neuron membrane.

Hippocampus contains the most amount of chelatable zinc among the cerebral structures. By taking into account the afferent and efferent links of this structure, the peculiarities of functioning and also with an allowance for the fact that it is the single structure of cerebrum which is able to create new neurons even in decay (the majority of which is zincergic), hippocampus is the most potential structure that is capable to provide zinc homeostasis (and probable other metals) at all the ontogeny levels.

It is well-known that hippocampus is associated with the other structures of limbic system – hypothalamus. Such a complex as "hippocampus-hypothalamus" can be relatively considered as the creative center of hypotheses, systems and different combinations of memory traces and incentives. All the given facts prove the significant role of hippocampus in regulatory activity of cerebrum. These structures are united by the presence of chelatable zinc in neuron terminals except the anatomic links. These data enable to put forward an assumption about potential participation of hippocampus and hypothalamus as a regulator of zinc metabolism in peripheral organs. Taking into account that both the structures are the first to react to stress factors through thalamic and non-thalamic ways, so that such a complex could provide more quick adaptation changes of cellular metabolism.

The research of the changes of zinc content in the cells of zinc-bearing organs in vitro has previously been conducted by us but the intravital research of the changes of this metal content in various organs has not been conducted.

The aim of this article is to carry out intravital research of the changes of chelatable zinc content in zinc-containing central and peripheral organs.

A number of experiments according to the estimation of zinc content in the cells of central (hippocampus, hypothalamus) zinc-containing organs in the conditions of physiological quietness and under the action of different nature stressors has been conducted and biologically active substances which can modify the stress reaction as well. The following chemical agents were used: insulin, GABA, dexamethasone, convulsant (8-BSQ), leptin. The estimation of zinc in zinc-containing organs in this number of experiments has been conducted with the assistance of staining of tissue sections by chelator 8-TSQ and by 8-BSQ intravitaly.

The changes of metal content of cells by means of quantitative estimation using 8-TSQ have been investigated to receive the data of the content changes of chelatable zinc in hippocampus and hypothalamus under the stress impact of different origin. The research suggests that zinc content and secretory material (neurotransmitter) in hippocampus in the cells have been increased under the stressing of immobilization, starvation, insulin injection by over 34-46% and 33-67% correspondingly. Injection of leptin, dexamethasone, GABA and convulsant (8-BSQ) impacted on the decrease of the metal content and the secretory material content by over 22-44% 33-67% and this factor became the cause of temporary state of zinc scarcity.

Hypothalamus reacted opposite changes of the researched metal content to the stress impact leading to the increase of chelatable zinc content in hippocampus cells. The explanation of this fact is the release of zinc and secretory material (hormone) into bloodstream.

Intravital research of hippocampus neurons, pancreas cells and Paneth cells has proved the single-type changes of chelatable zinc content in these cells. These data confirm the potential participation of hippocampus or the complex "hippocampus- hypothalamus" in the mechanisms of metal-ligand homeostasis regulation.

Key words: hippocampus, hypothalamus, cell of Paneth, secretory material, zinc

ВСТУП

Стрес-реакція (стрес) є одним із захисно-приспосувальних механізмів організму людини, що виробилися в процесі еволюції як засіб збереження життя в постійно мінливих умовах проживання. Дозований фізичний стрес – це спосіб досягнення резистентності (стійкості) організму при дії на нього пошкоджуючих факторів [1,2].

Основним результатом адаптації є відновлення гомеостазу, наслідком чого є стабілізація функцій організму на всіх рівнях його організації. Невід’ємною частиною гомеостазу є металолігандний гомеостаз, який забезпечує регуляцію активності металоферментів, білків, гормонів та ін., а також виконує функції стабілізації та сенсibiliзації клітин збудливих тканин [3]. Деякі мікроелементи, наприклад цинк, виконують одночасно як функцію стабілізації клітинної мембрани від руйнівного впливу збуджуючого нейромедіатора, так і сенсibiliзації цієї ж мембрани. Останній ефект збільшує вірогідність виникнення потенціалу дії, особливо на постсинаптичній мембрані в глутаматергічних нейронах головного мозку. Тому саме цей метал відіграє одну з основних ролей у механізмах розвитку глутаматергічної ексайтотоксичності, а також механізмах пам’яті, причому як короткочасної, так і тривалої. З одного боку, шляхом каскадних змін структури мембрани цинк забезпечує тривале збудження для збереження інформації, а з іншого, – зберігає цілісність мембрани нейрона [1,2,4].

У клітинах цинк, здебільшого, присутній у складі стійких біокомплексів, у яких він координаційно міцно зв'язаний з ендogenousними органічними лігандами [4]. Це зумовлюється високою здатністю мікроелемента утворювати хелатні структури. Останні, як відомо, утворюються в тих випадках, коли метал розташований між атомами-донорами електронів, якими найчастіше є атоми азоту, кисню, сірки. Утворенням таких сполук опосередковується роль цинку у функціонуванні різних біологічних систем [4,5].

Особливо важливу роль цей мікроелемент відіграє в складі молекул білків. Цинк є структурним компонентом або необхідний для каталітичної активності понад 300 металоферментів, задіяних у різних метаболічних шляхах: ДНК- та РНК-полімерази, дегідрогенази, карбоксипептидази, супероксиддисмутази, алкогольдегідрогенази, фосфатази, піруваткарбоксилази та багато інших. Отже, біологічна роль цинку в організмі значною мірою реалізується через участь у синтезі та стабілізації нуклеїнових кислот і білків, процесах енергетичного обміну, проліферації та диференціювання клітин, підтриманні антиоксидантного статусу [4,5].

У той же час цей метал у вигляді хелатоутворюючого цинку зустрічається не у всіх клітинах організму, що дозволило об'єднати такі клітини у єдину хелатофільну клітинну систему (ХКС) [6]. Оскільки вказаний метал постійно перебуває в мобільному стані, від якого залежить швидкість адаптаційних змін у організмі, то доречно припустити наявність систем регуляції змін вмісту хелатоутворюючого цинку.

Серед структур головного мозку найбільше хелатоутворюючого цинку міститься в гіпокампі. З урахуванням аферентних і еферентних зв'язків цієї структури, особливості функціонування, а також з урахуванням того, що це єдина структура головного мозку, здатна до утворення нових нейронів навіть у глибокій старості, більшість з яких є цинкергічними, він є найбільш вірогідною структурою, яка здатна забезпечити гомеостаз цинку (а, можливо, й інших металів) на всіх стадіях онтогенезу [7-10].

Відомі зв'язки гіпокампа з іншою структурою лімбічної системи – гіпоталамусом. Комплекс «гіпокамп-гіпоталамус» можна умовно вважати центром висунення гіпотез, систем і різних комбінацій слідів і стимулів. Усе це дозволяє говорити про важливу роль гіпокампу в регуляторній діяльності мозку. Крім анатомічних зв'язків, ці структури об'єднує також наявність хелатоутворюючого цинку. Ці дані дозволяють висунути припущення про можливу участь поряд з гіпокампом гіпоталамусу в якості регулятора метаболізму цинку в периферичних органах. Зважаючи на те, що обидві структури першими реагують на стресові фактори як через таламічні, так і позаталамічні шляхи, то такий комплекс міг би забезпечити найбільш швидкі адаптаційні зміни клітинного метаболізму [11].

Метою роботи було проведення інтравітального дослідження змін вмісту цинку в центральних та периферичних цинкмістких органах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди виконано на білих щурах лінії Вістар. Усі тварини утримувалися на стандартному раціоні харчування віварію, при природній зміні дня і ночі. Усі експериментальні процедури здійснювали відповідно до "Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях".

Була виконана серія дослідів з визначенням вмісту цинку в клітинах центральних (гіпокамп, гіпоталамус) цинкмістких органів в стані фізіологічного спокою та при дії стресорів різної природи та біологічно активних речовин, що можуть модифікувати стрес-реакцію. Як хімічні агенти використовували інсулін, ГАМК, дексаметазон, конвульсант (8-БСХ), лептин. При цьому визначення цинку в цинкмістких органах в цій серії дослідів проводили за допомогою забарвлення зрізів тканин хелатором 8-ТСХ.

У випадку введення конвульсанту, тварин забивали через 30 хвилин після уведення 8-БСХ. З тканин цинкмістких органів готували заморожені зрізи товщиною 30-60 мкм. Зрізи заключали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, а захисний (окулярний) – світлофільтр із скла ЖС-18.

Для отримання цитохімічної реакції на цинк зрізи досліджуваних тканин обробляли 0,1%-ним ацетоновим розчином 8-ТСХ, через 1-5 хв їх промивали дистильованою водою, заключали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом, як описано вище. У клітинах цинкмістких органів спостерігалася жовто-зелена люмінесценція рівень якої був прямо пропорційним вмісту цинку.

Інтенсивність люмінесцентної реакції в клітинах оцінювали напівкількісним методом, який полягає у визначенні інтенсивності реакції за трибальною системою, запропонованою В.В. Соколовським [12], Ф. Хейхоу і Д. Квагліно [13]. За один бал приймали слабопозитивну, два бали – помірну, три бали – виражену за інтенсивністю реакцію. На підставі підрахунку на 100 клітинах виводили середню величину (\bar{X}) інтенсивності реакції. Підраховували похибку (m) та показник вірогідності (p).

Вплив іммобілізації на організм тварин оцінювали шляхом прив'язування їх м'якими пов'язками до станка в положенні на спині на 6 год. У дослідях з голодуванням мишей на 12 годин позбавляли їжі. Ін'єкції інсуліну робили підшкірно в дозі 0,2 мл (20 ОД/кг). Для цього щурам вводили гормон, розбавлений у 2 рази.

Цифрові зображення препаратів отримували за допомогою люмінесцентного мікроскопу Мікмед-2, варіант 11 (виробництво ЛОМО, Росія). Отримані за допомогою цифрової камери знімки зберігали на жорсткому диску ПЕОМ у форматі tiff (Tagged Image File Format), який призначений для зберігання цифрових зображень без втрат їх якості. Вимірювання інтенсивності флуоресценції на цифрових знімках проводили за допомогою растрового графічного редактора GIMP, версія 2.6.10. У вікні "Гістограма" отримували основні статистичні параметри (кількість пікселів у зоні виділення, медіану, середнє значення яскравості пікселів у зоні виділення та стандартне відхилення), за якими характеризували ступінь інтенсивності люмінесцентної реакції 8-ТСХ на цинк.

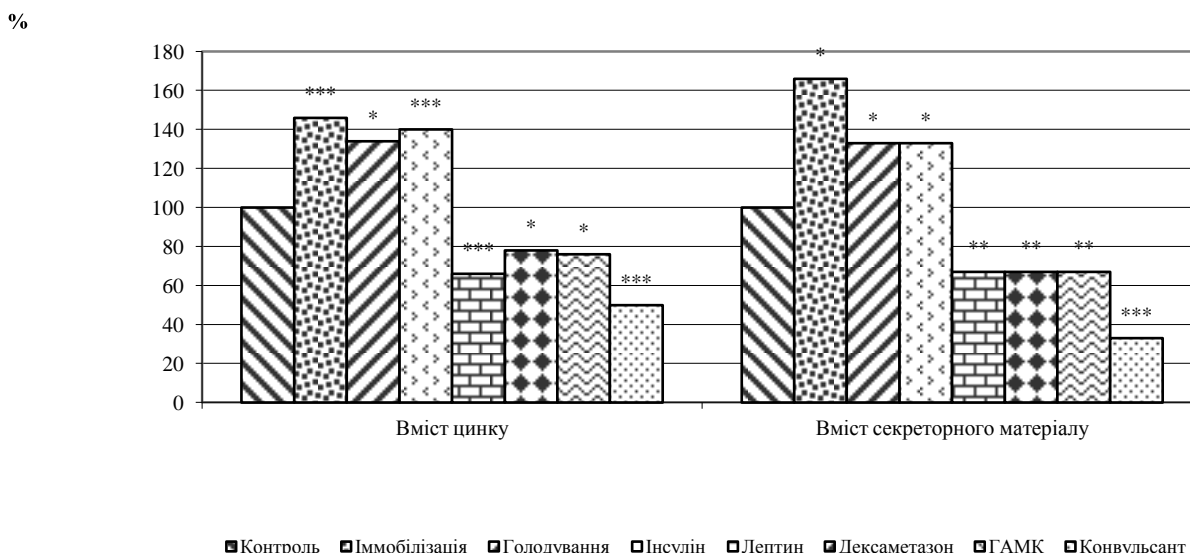
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування закономірностей змін вмісту хелатоутворюючого цинку в клітинах цинкмістких органів при дії стресорів різної природи нами було проведено серію дослідів з визначенням цього мікроелемента *in vitro* за допомогою кількісної реакції 8-ТСХ.

Із метою вивчення функціональних взаємовідносин гіпокампу з іншими органами, що містять цинк, було синхронно досліджено зміни вмісту хелатоутворюючого цинку в тканинах гіпокампу, гіпоталамусу і периферичних цинкмістких клітинах: панкреатичних та клітинах тонкого кишечника органів у ссавців, – при дії стресорів різного походження.

Результати визначення вмісту цинку в клітинах центральних (гіпокамп, гіпоталамус) та периферичних (підшлункова залоза, кишечник) цинкмістких органів при різних модельованих станах стрес-реакції свідчили про сполучені його зміни, що вказує на функціональний зв'язок процесів, які відбуваються в досліджених органах, і реалізація яких може бути пов'язана з цим хімічним елементом.

На увагу, перш за все, заслуговують центральні органи, особливо якщо йдеться, як у цьому дослідженні, про механізми реалізації стресових реакцій і з'ясування ролі цинку в цих процесах (рис. 1).



Примітка: тут і далі: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Рис. 1. Зміни вмісту цинку і секреторного матеріалу (%) в нейронах гіпокампу мишей при зниженні та підвищенні функціонального стану клітин.

Визначення в гіпокампі виявило різноспрямовані зміни вмісту цинку і секреторного матеріалу в його клітинах залежно від виду чинника, а також тривалості стресування. Так, іммобілізація, голодування та введення інсуліну підвищували вміст цинку та секрету в гіпокампі в середньому на 34-46 і 33-67% відповідно. Уведення таких сполук, як лептин, дексаметазон, ГАМК, що здатні моделювати стрес-реакцію, а також конвульсанту 8-БСХ, призводили до зниження вмісту цинку в гіпокампі і секреторного матеріалу на 22-44% і 33-67% відповідно. При цьому характер змін вмісту цинку в гіпокампі залежав від тривалості стресування: багаторазова дія іммобілізації та голодування викликали зниження вмісту цинку і секреторного матеріалу в гіпокампі.

Моделювання стресу і спостереження за змінами вмісту цинку в таких структурах-ефекторах стресу, як гіпоталамус та гіпокамп, при дії різних за походженням стресорів та хімічних модуляторів стрес-реакції, дозволило встановити сполучені, але протилежні за характером, зміни, що узгоджується з наведеними вище та іншими відомостями (табл. 1).

Таблиця 1 – Вміст цинку (забарвлення 8-ТСХ) ($\bar{X} \pm m$) та його взаємозв'язок (r) у гіпокампі та гіпоталамусі мишей при дії стресорів та модифікації стану підшлункової залози

Група тварин	Вміст цинку, мкг/г		r
	гіпокамп	гіпоталамус	
Контроль (n=26)	53,2±4,4	21,3±1,5	-0,48*
Голодування (n=16)	72,4±6,4*	12,2±0,8***	-0,43*
Введення глюкози (n=16)	41,5±3,2*	27,2±1,6	-0,69***
Імобілізація (n=18)	73,2±6,3*	11,5±0,8***	-0,52*
Введення інсуліну (n=15)	68,1±5,3*	13,0±1,1***	-0,51*

Примітка: тут і далі: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Так, вміст цинку в клітинах гіпокампу при голодуванні, іммобілізації та введенні інсуліну підвищувався на 28-39%, у той же час у клітинах гіпоталамуса знижувався на 38-48%. Введення глюкози призводило до зниження вмісту цього металу в амоніумовому розі на 22% та підвищення цього показника в клітинах гіпоталамуса на 29%. При цьому спостерігали негативну кореляцію середньої сили ($-0,46 < r < -0,72$) між змінами вмісту цинку в клітинах гіпокампу та гіпоталамуса.

Оскільки метод визначення цинку в досліджуваних тканинах здатний фіксувати зміни цього металу лише *in vitro*, через що не давав повної картини змін, які відбуваються в клітинах інтравітально, інша в методичному аспекті серія дослідів дозволила підтвердити об'єктивність одержаних і наведених вище результатів.

У цій серії, окрім зазначених вище сполук, використовували внутрішньочеревне введення в організм тварин хелаторів 8-БСХ перед стресуванням, що дозволяло досягти прижиттєвого забарвлення цинкмістких клітин (табл. 2). Забарвлення секреторного матеріалу за допомогою альдегідфуксину в панкреатичних клітинах В та флоксином в клітинах Панета тонкого кишечника проводили *in vitro* на суміжних зрізах. При цьому вміст металу і секреторного матеріалу в цій серії досліджень визначався півкількісним методом в умовних одиницях (ум.од.).

Таблиця 2 – Вміст ($X \pm m$) цинку (забарвлення 8-БСХ) і секреторного матеріалу (забарвлення альдегідфуксином і флоксином) у клітинах гіпокампу, панкреатичних острівців і клітинах тонкого кишечника в мишей після фізичного навантаження, іммобілізації та алкоголізації

Група тварин	Інтенсивність реакції, ум. од.				
	8-БСХ			альдегідфуксин (клітини В)	флоксин (клітини Панета)
	гіпокамп	клітини В	клітини Панета		
Контроль (n=22)	2,02±0,10	1,91±0,14	1,11±0,08	1,30±0,11	0,81±0,07
Фізичне навантаження (n=19)	2,49±0,17*	2,44±0,16*	1,55±0,09*	1,59±0,11*	1,12±0,09*
Іммобілізація (n=19)	2,61±0,24*	2,65±0,20*	1,50±0,11*	1,70±0,13*	1,24±0,10*
Алкоголізація (n=18)	2,50±0,17*	2,53±0,21*	1,64±0,14*	1,62±0,12*	1,11±0,12*

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Перш за все слід відмітити, що дослідження змін вмісту цинку і секреторного матеріалу в клітинах панкреатичних острівців і тонкого кишечника на фоні змін вмісту цього металу в гіпокампі при дії стресорів і забарвленні 8-БСХ показало їх підвищення в усіх типах клітин різних видів тварин. Фізичне навантаження, іммобілізація і алкоголізація викликали збільшення вмісту цинку в гіпокампі на 25%, 30% і 25%, у клітинах В – на 26%, 37% і 32%, Панета – на 36%, 27% і 36% відповідно. Також спостерігали збільшення вмісту секреторного матеріалу на 23%, 30%, 23% у клітинах панкреатичних острівців та на 38%, 50%, 38% у клітинах тонкого кишечника при дії тих же стресових факторів.

Аналіз отриманих нами даних дозволяє відмітити, що зміни вмісту досліджуваного металу незалежно від способу оцінки (*in vitro* або *in vivo*) відбуваються однотипово, що свідчить про

наявність загальних механізмів регуляції хелатоутворюючого цинку у всіх клітинах організму. Слід відмітити, що вміст цинку в клітинах гіпоталамусу знижується на фоні його підвищення в нейронах гіпокампу, що можна пояснити секрецією цього мікроелемента разом із секреторним матеріалом у кров.

Різні моделі стресових станів, введення хімічних речовин, що впливають на перебіг тих чи інших сторін стрес-реакцій, різні їх комбінації та визначення при цьому вмісту цинку дає підстави стверджувати, що в усіх ситуаціях, коли відбувається активація гіпокампу (введення конвульсанту 8-БСХ, лептину, дексаметазону, ГАМК), вміст цинку знижувався, а дія факторів, що інгібувала його активність (стресові впливи, введення інсуліну), призводила до збільшення вмісту цинку.

Інтравітальні дослідження підкріпили отримані раніше дані про вплив стрес-факторів на вміст цинку в центральних та деяких периферичних цинкмістких органах. Односпрямованість змін вмісту цього металу в клітинах як центральних, так і периферичних цинкмістких органів може свідчити на користь гіпотези про участь гіпокампу, або комплексу «гіпокамп-гіпоталамус» у регуляції метаболізму хелатоутворюючого цинку в периферійних органах.

Перспективами подальшого дослідження є вивчення впливу комплексу «гіпокамп-гіпоталамус» на метаболізм інших хелатоутворюючих металів.

ВИСНОВКИ

1. Визначення вмісту цинку в клітинах центральних (гіпокамп, гіпоталамус) та периферичних (підшлункова залоза, кишечник) цинкмістких органів при різних моделях і модифікаціях стрес-реакції свідчать про сполученість змін і функціональний зв'язок процесів, які відбуваються в цих органах, і реалізація яких пов'язана з цим хімічним елементом.
2. Негативна кореляція середньої сили ($-0,46 < r < -0,72$) між змінами вмісту цинку в клітинах гіпокампу та гіпоталамуса свідчить на користь зв'язку між нейронами цих структур.
3. Стресорні впливи (фізичне навантаження, іммобілізація, алкоголізація) та модифікація стану введенням біологічно активних речовин (інсулін, лептин, дексаметазон, ГАМК, глюкоза, 8-БСХ) супроводжувалися суттєвими змінами вмісту цинку (22 – 46%) і секреторного матеріалу (33 – 67%) в клітинах гіпокампу і периферичних цинкмістких органів, характер яких залежав від виду і тривалості дії чинника.
4. Інтравітальне дослідження вмісту цинку показало, що гостре стресування викликало як підвищення вмісту цинку в центральних і периферичних, так і секреторного матеріалу в периферичних цинкмістких органах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абрамец И.И. Метаботропные глутаматные рецепторы нейронов головного мозга и участие в долгосрочных изменениях эффективности межнейронных синаптических связей (обзор литературы и собственных исследований) / И.И. Абрамец // Журнал АМН України. – 1999. – Т. 5., № 1. – С. 3-18.
2. Влияние антител к глутамату на развитие стресс-реакций и содержание нейромедиаторов в гиппокампе и гипоталамусе крыс с разной поведенческой активностью / [Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С. и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2013. – Т. 155, №3. – С. 318-323.
3. Григорян Р.Д. Самоорганизация гомеостаза и адаптации / Р.Д. Григорян. – К. : Академперіодика, 2004. – 501 с.

4. Єщенко Ю.В. Стрес і метаболізм металів / Ю.В. Єщенко. – Запоріжжя : ЗНУ, 2010. – 268.
5. Zalups R.K. Cellular and molecular biology of metal / R.K. Zalups, J. Koropatnick. – N.Y.: CRC Press, 2010. – 442 p.
6. Єщенко Ю. В. Роль хелатоутворюючих металів в клітинах різних органів в реалізації стрес-реакції [Текст] : автореф. дис.... д-ра біол. наук : 03.00.13 / Єщенко Юлія Віталіївна ; Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2012. – 40 с.
7. Malairaman U. Effect of ca²⁺edta on zinc mediated inflammation and neuronal apoptosis in hippocampus of an in vivo mouse model of hypobaric hypoxia / U. Malairaman, K. Dandapani, A. Katyal // PLoS One. – 2014. – Vol 9, №10: e110253. doi: 10.1371/journal.pone.0110253.
8. Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor / [Doboszewska U, Sowa-Kućma M, Młyniec K. et al] // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2014. – pii: S0278-5846(14)00189-4. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.013.
9. Zinc chelation reduces traumatic brain injury-induced neurogenesis in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus / [Choi B.Y., Kim J.H., Kim H.J. et al] // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2014. – pii: S0946-672X(14)00138-2. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.007. [Epub ahead of print]
10. Takeda A. Significance of Zn²⁺ signaling in cognition: Insight from synaptic Zn²⁺ dyshomeostasis /A. Takeda // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2014. – pii: S0946-672X(14)00126-6. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.06.021. [Epub ahead of print].
11. Зайчик А. Ш. Основы общей патологии. – Ч 2: Основы патохимии /А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – СПб. : ЭЛБИ, 1999. – 688 с.
12. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии / Соколовский В.В. – Л. : Медицина, 1971. – 176 с.
13. Хейхоу Ф. Гематологическая цитохимия / Ф. Хейхоу, Д. Кваглино. – М. : Медицина, 1983. – 319 с.

REFERENCES

1. Abramets I.I. Metabotropnyie glutamatnyie retseptoryi neyronov golovного mozga i uchastie v dolgosrochnyih izmeneniyah effektivnosti mezhneuronnyih sinapticheskikh svyazey (obzor literatury i sobstvennyih issledovaniy) / I.I. Abramets // Zhurnal AMN Ukrayini. – 1999. – Т. 5., № 1. – С. 3-18.
2. Vliyanie antitel k glutamatu na razvitie stress-reaktsiy i sodержanie neyromediatorov v gippokampe i gipotalamuse kryis s raznoy povedencheskoy aktivnostyu / [Vetrlie L.A., Zaharova I.A., Kudrin V.S. i dr.] // Byul. eksp. biol. i med. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 318-323.
3. Grigorjan R.D. Samoorganizacija gomeostaza i adaptacii / R.D. Grigorjan. – К. : Akadempriodika, 2004. – 501 s.
4. Eshchenko Yu.V. Stres i metabolizm metaliv / Eshchenko YU.V. – Zaporizhzhya : ZNU, 2010. – 268 s.
5. Zalups R.K. Cellular and molecular biology of metal / R.K. Zalups, J. Koropatnick. – N.Y.: CRC Press, 2010. – 442 p.
6. Eshhenko Ju. V. Rol' helatoutvorjuchih metaliv v klitinah riznih organiv v realizacii stres-reakcii [Tekst] : avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 03.00.13 / Eshhenko Julija Vitaliivna ; Kiyiv. nac. un-t im. Tarasa Shevchenka. – К., 2012. – 40 s.
7. Malairaman U. Effect of ca²⁺edta on zinc mediated inflammation and neuronal apoptosis in hippocampus of an in vivo mouse model of hypobaric hypoxia / Malairaman U, Dandapani K, Katyal A. // PLoS One. – 2014. – Vol 9, №10: e110253. doi: 10.1371/journal.pone.0110253.
8. Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor / [Doboszewska U, Sowa-Kućma M, Młyniec K. et al] // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2014. – pii: S0278-5846(14)00189-4. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.013.

9. Zinc chelation reduces traumatic brain injury-induced neurogenesis in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus / [Choi B.Y., Kim J.H., Kim H.J. et al]. // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2014. – pii: S0946-672X(14)00138-2. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.007. [Epub ahead of print]
10. Takeda A. Significance of Zn²⁺ signaling in cognition: Insight from synaptic Zn²⁺ dyshomeostasis /A. Takeda // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2014. – pii: S0946-672X(14)00126-6. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.06.021. [Epub ahead of print].
11. Zaychik A. Sh. Osnovni obshchey patologii. – Ch 2: Osnovni patohimii. /A.Sh. Zaychik, L.P. Churilov. – SPb. : ELBI, 1999. – 688 s.
12. Sokolovskiy V.V. Gistohimicheskie issledovaniya v toksikologii / Sokolovskiy V.V. – L. : Meditsina, 1971. – 176 s.
13. Heyhou F. Gematologicheskaya tsitohimiya / F. Heyhou, D. Kvaglino. – M. : Meditsina, 1983. – 319 s.

УДК 612.821:616-073.7

КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ЕЕГ-ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ ОЦІНКИ ОСОБЛИВОСТЕЙ БІОЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В СТАНІ СПОКОЮ В БЛИЗНЯТ ТА ОДНООСІБНО НАРОДЖЕНИХ

Михалевич О. М.

*Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки
43021, Україна, Волинська область, Луцьк, вул. Потапова, 9*

myhalevych@meta.ua

У науковій праці досліджуються універсальні ЕЕГ-характеристики спектральної щільності потужності та інтегральний кількісний аналіз ЕЕГ-патерну в близнят у стані спокою порівняно з одноосібно народженими обстежуваними. Під час проведення експерименту також здійснено порівняння спектру потужності основних ритмів ЕЕГ та їх піддіапазонів між монозиготними та дизиготними близнятами. Аналізуючи експериментальні дані порівняння значень спектру потужності монозиготних близнят у стані спокою між собою, статистично достовірних відмінностей не було виявлено. У науковій роботі також використаний метод інтегрального кількісного аналізу ЕЕГ-патерну.

Ключові слова: близнята, електроенцефалограма, спектр потужності, піддіапазон, ритм, інтегральні коефіцієнти.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭЭГ-ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ОСОБЕННОСТЕЙ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ У БЛИЗНЕЦОВ И ОДИНОЧНОРОЖДЕННЫХ

Михалевич О.Н.

*Восточноевропейский национальный университет имени Леси Украинки
43021, Украина, Волинская область, Луцк, ул. Потапова, 9*

myhalevych@meta.ua

В научной работе исследуются универсальные ЭЭГ-характеристики спектральной плотности мощности, а также интегральный количественный анализ ЭЭГ-паттерна у близнецов в состоянии покоя по сравнению с одиночнорожденными обследуемыми. Во время проведения эксперимента также проведено сравнение спектра мощности основных ритмов ЭЭГ и их поддиапазонов между монозиготными и дизиготными близнецами. Анализируя экспериментальные данные сравнения значений спектра мощности монозиготных близнецов в состоянии покоя между собой,

статистически достоверных различий не было обнаружено. В научной работе также использован метод интегрального количественного анализа ЭЭГ- паттерна.

Ключевые слова: близнецы, электроэнцефалограмма, спектр мощности, поддиапазон, ритм, интегральные коэффициенты.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF EEG INDICATORS FOR EVALUATION OF CHARACTERISTICS OF THE BIO-ELECTRICAL BRAIN ACTIVITY IN REST-STATE IN TWIN BIRTHS AND ALONE

Mikhalyevich O.M.

Lesya Ukrainka Eastern European National University

43021, Ukraine Volyn region, Lutsk, Potapova, 9

myhalevych@meta.ua

In a scientific paper investigates the universal characteristics of the EEG power spectral density and integrated quantitative analysis of the EEG pattern in twins at rest compared with alone surveyed.

Opportunity to approach the analysis of brain activity in psychophysiology give existing noninvasive tests. These primarily include registration of bioelectric activity of the brain (EEG, evoked potentials, caused by magnetic fields). A range of empirical data indicates the presence of certain relations between the parameters of the EEG and psychological characteristics of the person. As it turned out, the various EEG parameters are associated with a wide range of behavioral and cognitive characteristics, intelligence, dyslexia, learning disabilities, emotional, temperament, etc. EEG parameters associated with a wide range of behavioral and cognitive characteristics. EEG - individual-specific and stable enough for the life of the individual characteristic.

Psychogenetically twin study to determine genotype-environmental determination of physiological characteristics are among the most interesting at the moment. Painting EEG adult formed from birth to 15-20 years. This process can be noted as a process of functional maturation of morphological and functional relationships between the cortex and other brain structures. With the advent of automatic frequency and spectral methods rows of EEG analysis, researchers were able to spend time withplacing not only the parameters of the alpha rhythm, as a rule, pre-undermines the overall pattern of EEG, but also on other frequency diapazone. Specific objective is to analyze the power spectra of different frequency, which depends on the amplitudes of the sinusoidal components. The power spectrum is a set of all values Power EEG rhythmic components, calculated with the definition lennym sampling interval (at a rate of tenths of Hz). Spectra can characterize the absolute power of each rhythmic component or relative, power intensity of each component (in%) relative to the total EEG power analyzed interval recording. EEG recording is one of the experimental methods disabilities, who, unlike standardized psychological tests allow variations in the surveys.

The aim of our study was to identify universal characteristics of EEG power spectral density of twins at rest, compared to single-handedly born subjects. Also, similar data were compared between monozygotic and dizygotic twins

The study involved nine pairs of twins (monozygotic pairs 6 and 3 pairs of dizygotic) and 18 individually-born subjects, which constituted the control group. Age was examined in the range of 15 to 24 years. Calculation of power biopotential EEG was performed by the program hardware-software complex "Neyrokom" (Center of Medical Electronics devices and technologies "hai Medica" National Aerospace University "Kharkiv Aviation Institute", certificate of state registration № 6038/2007 of 26 January 2007). EEG was recorded from symmetrical frontal (F3, F4), parietal (P3, P4), occipital (O1, O2) and temporal (T3, T4) on the international system 10-20%. For the characteristics of the spectral composition of the EEG was the method of fast Fourier transform. The result was obtained spectral power in EEG frequency bands: theta 1 = 4.5 Hz, theta 2 = 6-7,5 Hz, alpha alpha 1 = 7,5-9,5 Hz, alpha 2 = 9,5-11 Hz, alpha 3 = 11-13 Hz; Beta 1 = 13-20 Hz, beta 2 = 20-25 Hz.

When analyzing power values of alpha rhythm were detected areas of the cerebral cortex have demonstrated statistically significant changes in twins compared to single-handedly born subjects. These results indicate that the twins in the right hemisphere increased the power spectrum of slow components beta band (beta-1) and fast component alpha range (alpha-3). and theta bands (alpha-1, beta-1, theta-1). As for the left hemisphere, in this part of the brain in twins can be marked enhancement of fast subband power spectrum beta rhythm (beta 2) and slow theta rhythm (theta-1), and reduced slow component alpha range (alpha-1) compared to the control group. Comparing the value of the power spectrum of monozygotic twins resting together, we can conclude that the analyzed data of one and the other group do not differ.

The analysis of the experimental data we also used the method of integrated quantitative analysis of EEG patterns. Were developed integrated factors that enable an assessment of the main spectral power of EEG

frequency ranges and subranges and determine the importance of specific EEG frequency components to form a coherent pattern of EEG. All data obtained were processed using the methods of mathematical statistics.

The scientific article presents data showing that, in general, the twins are more active left hemisphere of the cerebral cortex in the functional state of calm compared to those born alone. When comparing the values of the power spectrum of monozygotic twins resting together, statistically significant differences were found.

Key words: twins, EEG, power spectrum, sub-band, rhythm, integral coefficients.

ВСТУП

Будь-яка діяльність особи розвивається на фоні певного функціонального стану її нервової системи, детальну оцінку якому можна надати за допомогою характеристики та аналізу параметрів ЕЕГ [1]. Доведено, що послідовність індивідуальних ЕЕГ-характеристик може забезпечувати прогноз особливостей реакції на постійні зміни в оточуючому середовищі.

Психогенетичні дослідження близнят для визначення генотип-середовищної детермінації психофізіологічних характеристик є одними з найбільш цікавих на даний час. Картина ЕЕГ дорослої людини формується від моменту народження і до 15-20 років. Цей процес можна відзначити як процес функціонального дозрівання морфофункціональних зв'язків між кортексом та іншими структурами мозку [2]. Велике значення у формуванні ЕЕГ має індивідуальна варіабельність. Однак існує певний «стандарт норми». Так, біоелектрична активність мозку дорослої людини вважається нормальною, якщо в ній в стані спокою домінує регулярний за частотою альфа-ритм (8-13 Гц) з середньою амплітудою близько 50 мкВ (можливо від 20 до 100 мкВ і більше) [1-3].

Стійкість індивідуальних особливостей ЕЕГ спонукала багатьох дослідників вже на перших етапах розвитку електроенцефалографії шукати спадкові причини виникнення індивідуального біоелектричного патерну мозку в цілому. Потрібно відзначити, що доволі нечисленні генетичні дослідження ЕЕГ як феномена проводилися у двох напрямках. В одному з них вивчалася успадкування патерну ЕЕГ в цілому, і тоді ЕЕГ виступає як якісна (в генетичному сенсі) ознака, подібна, наприклад, до такої ознаки, як колір очей [2-3].

Ранні генетичні дослідження ЕЕГ як цілісної характеристики стосуються в основному індивідуально-типової картини біоелектричної активності мозку в стані спокою. Велика їх частина була виконана із застосуванням близнюкового методу. При цьому і в ранніх, і в деяких більш пізніх роботах дослідники користувалися методом «сліпої» класифікації електроенцефалограм, зареєстрованих у близнят або інших родичів, коли кваліфікований фахівець із загальної маси відбирав ЕЕГ з подібним і несхожим рисунком, а потім оцінював їх ідентичність у родичів за ступенем збігу «сліпої» класифікації з фактичними даними. За допомогою цього методу була встановлена майже повна ідентичність рисунка ЕЕГ у МЗ близнюків і набагато менша схожість – у ДЗ [2].

Загалом, дані переважної більшості досліджень у цьому напрямку показують, що незалежно від ділянки відведення, способу реєстрації та аналізу ЕЕГ, віку і кількості обстежуваних, найбільш значні спадкові впливи проявляються в діапазоні альфа-ритму. Практично в жодній роботі не говориться про несхожість МЗ близнят за альфа-параметрами [2-3]. Ймовірно, значною спадковою обумовленістю саме альфа-характеристик можна пояснити і значну подібність загального рисунка ЕЕГ МЗ близнюків, оскільки саме альфа-ритм є домінуючим в ЕЕГ спокою.

Отже, найбільша визначеність існує по відношенню до альфа-ритму. Щодо решти ритмічних складових ЕЕГ то, по-перше, є менше даних, а по-друге, – ці дані (особливо ті, що стосуються повільних складових) є суперечливими, і тому поки важко зробити остаточний висновок відносно будь-якого з ритмів, окрім альфа.

Дослідження ролі генотипу в індивідуальних особливостях спектру ЕЕГ проводилося Д. Ліккеном і Х. Стассеном. Уже в перших дослідженнях було виявлено разючу схожість спектрів відносної потужності ЕЕГ у МЗ близнят.

У ДЗ близнят, навпаки, спектри виявилися схожі не більше, ніж спектри осіб, що не були родичами. Отже, результати дали підставу вважати, що спектри відносної потужності ЕЕГ значною мірою обумовлені генотипом [2].

Загалом, наведені дані говорять про те, що і структура спектру ЕЕГ спокою, і співвідношення випадкових і періодичних складових у ньому відображають значний вплив з боку генотипу [3].

Метою нашого дослідження було виявлення універсальних ЕЕГ-характеристик спектральної щільності потужності близнят у стані спокою, порівняно з одноосібно народженими обстежуваними. Також порівнювалися аналогічні дані між монозиготними та дизиготними близнятами.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні взяли участь 9 пар близнят (6 пар монозиготних та 3 пари дизиготних) та 18 одноосібно народжених обстежуваних, що становили контрольну групу. Вік обстежуваних був у межах від 15 до 24 років. Розрахунок параметрів потужності біопотенціалів ЕЕГ виконувався за програмою апаратно-програмного комплексу «Нейроком» (центр радіоелектронних медичних приладів і технологій «ХАІ-Медика» Національного аерокосмічного університету «ХАІ»; свідоцтво про державну реєстрацію № 6038/2007 від 26 січня 2007 року). ЕЕГ реєстрували від симетричних лобових (F3, F4), тім'яних (P3, P4), потиличних (O1, O2) та скроневих (T3, T4) за міжнародною системою 10-20%. Для отримання характеристики спектрального складу ЕЕГ було використано метод швидкого перетворення Фур'є. У результаті було отримано значення спектральної потужності ЕЕГ у частотних діапазонах: тета-1= 4-5 Гц, тета-2=6-7,5Гц, альфа альфа-1 = 7,5-9,5 Гц, альфа-2 = 9,5-11 Гц, альфа-3 = 11-13 Гц; бета-1=13-20 Гц, бета-2 = 20-25 Гц.

Аналіз показників потужності здійснювався в стані спокою із заплющеними очима (фон). Фонова ЕЕГ характеризує стан мозку, який склався в результаті всієї сукупності реакцій на численні та тривалі фізіологічні впливи на ЦНС. Фонові ЕЕГ-індикатори значною мірою несуть інформацію про певні стійкі риси особистості.

Отримані результати були опрацьовані з використанням стандартних методів параметричної та непараметричної статистики (t-критерій Стьюдента, U-критерій Манна – Уїтні), реалізованого нами в пакеті MS Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час аналізу значень потужності альфа-ритму були виявлені ділянки кори головного мозку, що відзначилися статистично достовірними змінами в близнят, порівняно з одноосібно народженими обстежуваними. У альфа-1 піддіапазоні спостерігається зниження спектру потужності в префронтальній та премоторній ділянках лівої півкулі ($p \leq 0,05$). Альфа-2 піддіапазон відзначається достовірною різницею лише в задньоскроневому відведенні правої півкулі. Проаналізувавши відмінності альфа-3 піддіапазону, можна відмітити підвищення спектру потужності в центральній, задньоскроневій, тім'яній та потиличній зонах правої півкулі головного мозку в осіб експериментальної групи порівняно з контрольною ($p \leq 0,05$).

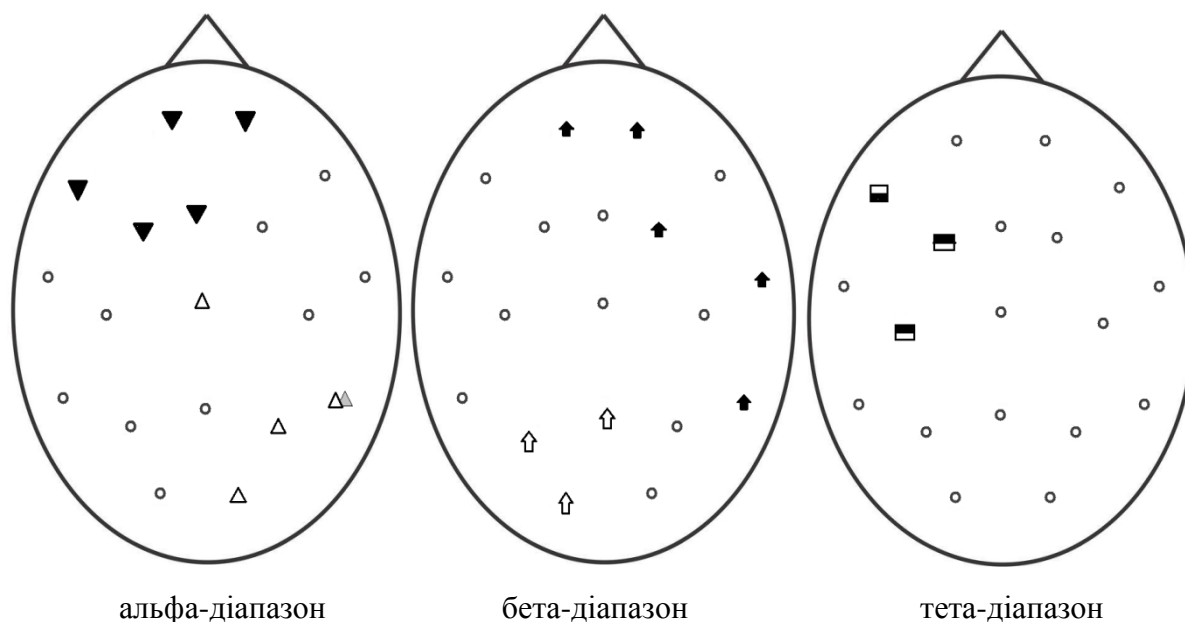








Рис. 1 Зміни спектру потужності ($\text{мкВ}^2/\text{Гц}$) піддіапазонів основних ритмів ЕЕГ близнят порівняно з одноосібно народженими обстежуваними.

Умовні позначення: альфа-1- , альфа-2- , альфа-3- ; бета-1- , бета-2- ; тета-1- . Трикутник із вершиною доверху свідчить про зростання потужності ритму, донизу – про зниження; стрілочка доверху – підвищення потужності, донизу – зниження; квадрат зафарбований у верхній частині – підвищення ритму, у нижній – зниження.

Динаміка потужності в бета-діапазоні відзначається підвищенням значень у близнят порівняно з одноосібно народженими обстежуваними. У бета-1 піддіапазоні спостерігаються достовірні зміни в префронтальній, задньолобовій, передньоскроневої та задньоскроневої ділянках правої півкулі головного мозку близнят ($p \leq 0,03$). Підвищенням значень потужності відзначаються тім'яна та потилична ділянки лівої півкулі головного мозку близнят у порівнянні з одноосібно народженими ($p \leq 0,01$).

Щодо тета-ритму достовірні відмінності спостерігаються лише в тета-1 піддіапазоні і відзначаються підвищенням значень потужності в центральній і задньолобовій ділянках та зниженням потужності в бічному лобовому відведенні лівої півкулі ($p \leq 0,05$). У тета-2 піддіапазоні достовірних відмінностей не виявлено.

Під час проведення експерименту було також здійснено порівняння спектру потужності основних ритмів ЕЕГ та їх піддіапазонів між монозиготними та дизиготними близнятами (рис. 2).

Із наведених даних видно, що достовірні відмінності спостерігаються лише в альфа-3 піддіапазоні префронтальної ділянки правої півкулі дизиготних близнятами ($p \leq 0,05$).

У групі дизиготних близнят також було виявлено підвищення спектральної щільності потужності в бета-1 ($p \leq 0,01$) та бета-2 ($p \leq 0,05$) піддіапазонах. Під час порівняння та аналізу даних тета-ритму достовірних відмінностей не було виявлено.

Аналізуючи експериментальні дані порівняння значень спектру потужності монозиготних близнят у стані спокою між собою, статистично достовірних відмінностей не було виявлено.

Отримані результати вказують на те, що в близнят у правій півкулі підвищується спектр потужності повільних компонентів бета діапазону (бета-1) та швидких компонентів альфа-діапазону (альфа-3) і тета-діапазонів (альфа-1, бета-1, тета-1). Щодо лівої півкулі, в цій ділянці головного мозку в близнят можна відмітити підвищення спектру потужності швидких піддіапазонів бета-ритму (бета-2) та повільних тета-ритму (тета-1), а також зниження повільних компонентів альфа-діапазону (альфа-1) порівняно з контрольною

групою. Порівнявши значення спектру потужності монозиготних близнят у стані спокою між собою, можна зробити висновок, що дані однієї та іншої групи практично не відрізняються.

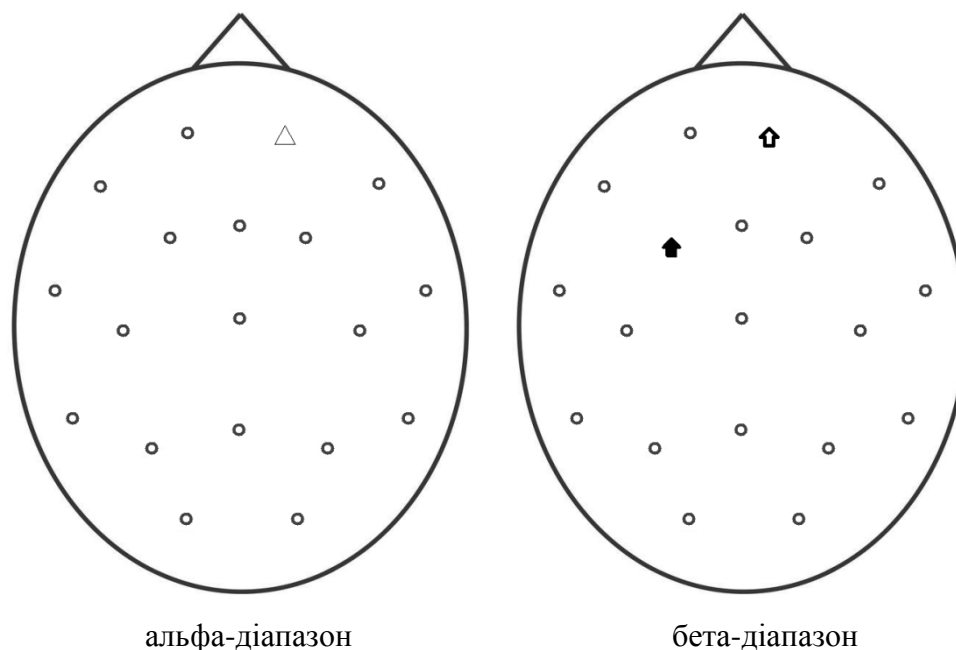


Рис. 2. Зміни спектру потужності ($\text{мкВ}^2/\text{Гц}$) піддіапазонів альфа- та бета-ритмів ЕЕГ дизиготних близнят порівняно з монозиготними обстежуваними: (умовні позначення, як на рис. 1)

Очевидно, що в близнят більш активною є ліва півкуля кори головного мозку в стані функціонального спокою.

Під час аналізу експериментальних даних нами також був використаний метод інтегрального кількісного аналізу ЕЕГ-патерну. Були розроблені інтегральні коефіцієнти, які дають можливість провести оцінку спектральної потужності основних частотних діапазонів ЕЕГ та їх піддіапазонів і визначити важливість окремих частотних компонентів ЕЕГ для формування цілісного патерну ЕЕГ. Усі отримані дані оброблялися за допомогою методів математичної статистики.

Таблиця 1 – Значення показників абсолютної спектр-потужності ($\text{мкВ}^2/\text{Гц}$) в 1-й (одноосібно народжені добровольці), 2-й (монозиготні близнята) та 3-й (дизиготні близнята) групах ($M \pm m$).

Показники АСП	Права 1-ша група (n=18)	Права 2-га група (n=12)	Права 3-тя група (n=6)	Ліва 1-ша група (n=18)	Ліва 2-га група (n=12)	Ліва 3-тя група (n=6)
$\alpha 1$	1,85±0,67	0,56±0,18	1,85±4,36*	0,49±0,08	0,57±0,08	1,47±0,54*
$\alpha 2$	2,14±1,19	4,04±2,83	6,49±5,37*	2,03±0,74	3,35±1,62	7,23±8,01*
$\alpha 3$	0,22±0,08*	0,77±0,63	0,91±0,36	0,26±0,10*	0,71±0,45	0,86±0,27
$\beta 1$	0,55±0,13	1,31±0,43	2,71±0,70	0,56±0,10	1,20±0,32	2,79±0,57
$\beta 2$	0,60±0,08	1,05±0,23	3,18±0,45	0,56±0,08	1,09±0,17	3,05±0,55
$\theta 1$	0,94±0,36	1,01±0,23*	4,84±1,06	0,99±0,36	1,31±0,17*	4,04±0,79

Показники АСП	Права 1-ша група (n=18)	Права 2-га група (n=12)	Права 3-тя група (n=6)	Ліва 1-ша група (n=18)	Ліва 2-га група (n=12)	Ліва 3-тя група (n=6)
$\theta 2$	0,82±0,56	0,68±0,15*	3,23±1,56	0,78±0,10	0,86±0,06*	2,64±0,82
сумарно	7,12±3,07	9,42±4,68	23,21±13,86	5,67±1,56	9,09±2,87	22,08±11,55

Примітка: *-достовірність відмінностей справа та зліва ($p \leq 0,05$); n-кількість обстежуваних.

Слід зазначити достатньо низький рівень сумарної АСП (абсолютної спектральної потужності) у 1-й групі й справа (7,12±3,07 мкВ²/Гц), і зліва (5,67±1,56 мкВ²/Гц). Для 2-ї групи обстежуваних характерне підвищення значень сумарної абсолютної спектр-потужності порівняно з 1-ю. Справа сумарна АСП підвищується у 1,3 разу, зліва – у 1,6 разу. Варто відмітити, що таке підвищення відбувається за рахунок росту АСП майже у всіх досліджуваних ЕЕГ-піддіапазонах. У 3-й групі виявлено значне підвищення сумарної абсолютної спектральної потужності в порівнянні з показниками 1-ї та 2-ї груп.

Як видно з табл. 1, максимальні значення абсолютної спектральної потужності (АСП) для 1-ї групи реєструються в альфа-2 піддіапазоні ЕЕГ симетрично. Вони в 3,5-3,6 разу перевищують ($p \leq 0,05$) рівень АСП бета-2 піддіапазону та в 2,5 – 2,6 разу вищі від показників АСП тета-2 хвильового піддіапазону. Для обстежуваних, що становили другу та третю групи, характерними є максимальні підвищення АСП альфа-2 піддіапазону, але достовірно значущих відмінностей від бета-2 та тета-2 піддіапазонів цих же груп виявлено не було.

У обстежуваних 1-ї групи статистично достовірними ($p \leq 0,05$) є відмінності в даних АСП альфа-3 піддіапазону, які характеризуються підвищенням значень АСП на 15,4% зліва, порівняно із правопівкулевими показниками. В обстежуваних 2-ї групи виявлена тенденція до лівопівкулевої асиметрії в альфа-2 піддіапазоні: значення АСП зліва на 10,3% перевищують ($p \leq 0,05$) правопівкулеві показники. Значення АСП альфа- та бета-піддіапазонів 2-ї групи добровольців міжпівкулевих достовірних відмінностей не мають. Проте для тета діапазону ЕЕГ 2-ї групи обстежуваних характерною є статистично достовірна ($p \leq 0,05$) лівопівкулева асиметрія: значення тета-1 піддіапазону зліва на 23% перевищують показники справа, тета-2 піддіапазону на 21% відповідно.

Показники інтегральних коефіцієнтів (ІК), що представлені у табл. 2, дозволяють уточнити особливості дезорганізації ЕЕГ-патерну в обстежуваних усіх груп.

Таблиця 2 – Рівень інтегральних коефіцієнтів у 1-й (одноосібно народжені), 2-й (монозиготні близнята) та 3-й (дизиготні близнята) групах ($M \pm m$).

Інтегральні коефіцієнти	Права 1-ша група (n=18)	Права 2-га група (n=12)	Права 3-тя група (n=6)	Ліва 1-ша група (n=18)	Ліва 2-га група (n=12)	Ліва 3-тя група (n=6)
1-й $\alpha 1 / \alpha 2$	0,21±0,04*	0,13±0,06*	0,11±0,05*	0,24±0,14	0,16±0,07*	0,07±0,02*
2-й $\alpha 2 / \alpha 3$	2,95±0,34	0,93±0,02	1,61±0,08	0,45±0,12	0,44±0,004	2,22±0,5
3-й $\beta 1 / \alpha 1$	1,19±0,27*	2,32±0,45*	1,45±0,68*	1,12±0,53*	2,12±0,87*	1,89±0,61*
4-й $\beta 2 / \alpha 2$	1,25±0,19*	1,47±0,23*	2,16±0,5	1,53±0,74*	1,44±0,22*	0,84±0,09

Інтегральні коефіцієнти	Права 1-ша група (n=18)	Права 2-га група (n=12)	Права 3-тя група (n=6)	Ліва 1-ша група (n=18)	Ліва 2-га група (n=12)	Ліва 3-тя група (n=6)
5-й β_1/β_2	0,91±0,61*	1,23±2,14	0,85±2,01*	1,005±0,04*	1,08±0,81	0,91±1,14*
6-й θ_1/α_1	2,04±0,08	1,79±0,40*	2,60±0,48*	1,98±0,52	2,31±0,41*	2,74±0,68*
7-й θ_2/α_2	0,38±0,16	0,16±0,08*	0,19±0,06	0,38±0,05	0,25±0,08*	0,3±0,05
8-й θ_1/θ_2	1,13±0,01*	1,48±0,22*	1,49±0,12*	1,27±0,05*	1,51±0,06*	1,52±0,17*
9-й θ_1/α_3	4,35±1,41	1,31±0,32	5,31±2,14*	3,81±0,5	1,85±0,2	4,69±2,02*
10-й θ_1/β_1	1,70±0,89*	0,77±0,43	1,78±0,54*	1,76±1,02*	1,08±0,23	1,45±0,15*
11-й θ_1/β_2	1,57±0,36	0,95±1,03	1,51±0,94*	1,77±1,05	1,18±0,56	1,32±0,63*

Примітка: * – достовірність відмінностей справа та зліва ($p \leq 0,05$); n – кількість обстежуваних.

Переважає більшість коефіцієнтів мають достовірні міжпівкулеві відмінності ($p \leq 0,05$) в 1-й, 2-й та 3-й групах. Винятками для 1-ї групи є лише 2-й, 6-й, 7-й та 11-й коефіцієнти. Правопівкулеві значення 2-ї групи для 2-го (α_2/α_3) коефіцієнта є вищими від лівопівкулевих на 52,7%, проте ці відмінності не є достовірними ($p > 0,05$). Статистично достовірною різницею не відзначаються в 2-й групі й 5-й, 9-й, 10-й та 11-й коефіцієнти. Щодо третьої групи, то майже всі коефіцієнти мають достовірні міжпівкулеві відмінності, окрім 2-го, 4-го і 7-го.

У подальшому планується дослідження зміни спектральних характеристик електроенцефалограми (ЕЕГ) і параметрів викликаних потенціалів, пов'язаних з подією, у близнят, залежно від рівня психометричного інтелекту та типу мислення.

ВИСНОВКИ

1. Аналізуючи експериментальні дані, нами було встановлено, що загалом у близнят більш активною є ліва півкуля кори головного мозку в стані функціонального спокою, порівняно з одноосібно народженими.
2. Під час порівняння значень спектру потужності монозиготних близнят у стані спокою між собою, статистично достовірних відмінностей не було виявлено.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зв'язок фонових та реактивних значень спектральної потужності ЕЕГ людини при виконанні діяльності з різним ступенем інформаційної насиченості / [Чернінський А.О., Крижановський С.А., Тукаєв С.В. та ін.] // Фізика живого. – 2010. – №2. – С. 85-91.
2. Взаємозв'язок ефективності діяльності людини з ЕЕГ-характеристиками її вихідного стану спокою. / І.Г. Зима, С.А. Крижановський, С.В. Тукаєв, А.О. Чернінський // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія «Біологія, хімія». – 2009.- №1. – С. 50-58.
3. Равич-Щербо И. В. Психогенетика / Равич-Щербо И. В., Марютина Т.М., Григоренко Е.Л. – М. : Аспект-Пресс, 1999 – 447 с.

REFERENCES

1. Zv'yazok fonovih ta reaktivnih znachen spektralnoyi potuzhnosti EEG lyudini pri vikonanni diyalnosti z riznim stupenem informatsiynoyi nasichenosti / Cherninskiy A.O., Krizhanovskiy S.A., Tukaev S.V. ta in. // Fizika zhivogo. – 2010.- №2. – S. 85-91.
2. Vzaemozv'yazok effektivnosti diyalnosti lyudini z EEG-harakteristikami yiyi vihidnogo stanu spokoyu. / I.G. Zima, S.A. Krizhanovskiy, S.V. Tukaev, A.O. Cherninskiy // Vcheni zapisi Tavriyskogo natsionalnogo universitetu im. V.I. Vernadskogo. Seriya «Biologiya, himiya». – 2009.- №1. – S. 50-58.
3. Ravich-Scherbo I. V. Psihogenetika. / Ravich-Scherbo I. V., Maryutina T.M., Grigorenko E.L. – M. : Aspekt-Press, 1999 – 447 s.

УДК 611.36:569.32.57.034.577.152.1

ПАРАМЕТРЫ СУТОЧНЫХ РИТМОВ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С РАЗНЫМИ ФАЗАМИ АКТИВНОСТИ

Омельянчик В.Н., Новосад Н.В., Колесник Н.В.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

kolesniknadvas@yandex.ru

В весенний период (май), в условиях естественного освещения и свободного доступа животных к корму активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) в печени мышей и кроликов на протяжении суток изменяется периодически. Период ритмов – 24-часа, акрофаза биоритма АХЭ и БХЭ в печени мышей занимает вторую половину дня и первую половину ночи с максимумом в 23 часа, акрофаза биоритма в печени кроликов занимает вторую половину ночи и утро с максимумом в 10 часов. Как в печени мышей, так и кроликов среднесуточная активность БХЭ и амплитуда ее колебания более чем в 1,5 раза выше соответствующих параметров ритма активности АХЭ. Среднесуточная активность АХЭ и БХЭ в печени мышей в 2 раза выше, чем в печени кроликов, амплитуда колебания активности АХЭ в печени тех и других животных практически одинакова, но амплитуда биоритма БХЭ печени кроликов в 2 раза выше, чем у мышей.

Ключевые слова: белые кролики, белые мыши, печень, суточный ритм, ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза.

ПАРАМЕТРИ ДОБОВИХ РИТМІВ АКТИВНОСТІ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ ТА БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ В ПЕЧІНЦІ ТВАРИН З РІЗНИМИ ФАЗАМИ АКТИВНОСТІ

Омельянчик В.Н., Новосад Н.В., Колісник Н.В.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

kolesniknadvas@yandex.ru

У весняний період (травень), в умовах природного освітлення та вільного доступу тварин до корму активність ацетилхолінестерази (АХЕ) і бутирилхолінестерази (БХЕ) в печінці мишей і кроликів протягом доби змінюється періодично. Період ритмів – 24 години, акрофаза біоритму АХЕ і БХЕ в печінці мишей займає другу половину дня і першу половину ночі з максимумом у 23 години, акрофаза біоритму в печінці кроликів займає другу половину ночі і ранок з максимумом в 10 годин. У печінці мишей і кроликів середньодобова активність БХЕ і амплітуда її коливання більш ніж в 1,5 рази вище відповідних параметрів ритму активності АХЕ. Середньодобова активність АХЕ і БХЕ в печінці мишей у 2 рази вище, ніж у печінці кроликів, амплітуда коливання активності АХЕ в печінці тих і інших тварин практично однакова, але амплітуда біоритму БХЕ печінки кроликів у 2 рази вища, ніж у мишей.

Ключові слова: кролики, білі миші, печінка, добовий ритм, ацетилхолінестераза, бутирилхолінестераза.

**CHARACTERISTICS CIRCADIAN RHYTHM OF BUTYRYLCHOLINESTERASE
AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE LIVER OF ANIMALS
WITH DIFFERENT PHASES ACTIVITY**

Omelyanchik V.N., Novosad N.V., Kolesnik N.V.

Zaporizhzhya National University

69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

kolesniknadv@yandex.ru

Objective: definition of the circadian organization of activity of soluble AChE and BChE in a liver of night animals (mouse) and twilight (rabbits) whom supported in conditions of natural lighting of May and a free access to water and food.

Studies conducted on albino male mice weighing 18-20 g, and California white male rabbits weighing 2.5-3.0 kg. Animals were kept under standard conditions of the vivarium on a standard diet, access to food and water is not limited. Throughout the day, every 6 hours under light chloroform anesthesia bled 6-7 animals destroyed by opening the jugular vein. Liver is washed in situ with a cold solution of 0.15 M KCl; excess wash solution was removed with filter paper. Weighed portion of tissue (200 mg) was homogenized in a glass homogenizer with a teflon pestle 30 s at 1000 rev / min to a cooled solution of 0.15 M KCl in relation 1:9. After 60 minutes extraction at 4 ° C homogenates was centrifuged for 20 minutes at 6000 g. Enzyme activity was determined in the supernatant by Hestrin, and expressed as mmol of substrate per minute loss per 1 g of tissue. Macroanalysis streak pictures AChE and BChE activity showed a marked effect on the time of day activity as AChE and BChE in the liver of mice and rabbits, and the same direction changes in the activity of AChE and BChE.

Microanalysis (cosinor analysis) array experimental streak pictures revealed that AChE activity in the liver of mice described biorhythm 24 hour period. Parameters average sinusoid 24 hour biorhythm AChE liver of mice were: mezor – 11.6 mmol / min / g, amplitude – 1.57; acrophase position – 12.0 - 23.01 hours. Circadian rhythm with a 24 hour period was typical for BChE activity. Options biorhythm BChE in mouse liver: mezor – 19.7 mmol / instant / g, amplitude – 2.8, acrophase position – 12.67 - 22.58 hours. Thus, fluctuations in the activity of AChE and BChE in mouse liver during the day were nearly synchronous, high cholinesterase activity corresponded to 23 hours; average BChE activity and the amplitude of its oscillations were more than 1.5 times higher than the corresponding parameters of AChE activity biorhythm.

In a liver of rabbits activity of AChE and BChE for days changes periodically, period length – 24 hours. Parameters of a biorhythm of AChE of a liver of rabbits: the mezor of -5,9 mmol/min., amplitude – 2,29, a locating акрофазы corresponds to 2.66 – 10.04 hours. Parameters of a biorhythm of activity of BChE: mezor of 11 mmol/min., amplitude – 6,3, a locating акрофазы 2,6 – 8,86 hours. Thus, activity of both cholinesterases in a liver of rabbits for days changes almost synchronously; the maximum of activity of enzymes corresponds to 9-10 o'clock in the morning; thus, average daily activity of BChE, as well as amplitude of fluctuation is twice higher than activity of AChE.

When comparing parameters of biorhythms of activity of cholinesterases in a liver of mice and rabbits it is obviously possible to note the following. Average daily activity of AChE and BChE in a liver of mice is twice higher, than in a liver of rabbits. Thus amplitude of fluctuation of activity of AChE in a liver of those and other animals are almost identical, but at BChE of rabbits it is twice higher, than at mice. The provision of a minimum of activity of enzymes in a liver of mice corresponds to a maximum of activity of enzymes in a liver of rabbits and vice versa.

Thus, for days as in a liver of mice, and rabbits of activity of AChE and BChE change in parallel and unidirectionally. Fluctuations of activity of enzymes 24 sentries are described by a daily rhythm. The maximum of activity of AChE and BChE in a liver of mice corresponds to 23 hours, and in a liver of rabbits to 10 hours. In a liver of mice average daily activity of BChE and amplitude of its fluctuation is more than 1,5 times higher than the corresponding parameters of a biorhythm at activity of AChE. In a liver of rabbits activity of BChE and amplitude of fluctuation is twice higher than the AChE corresponding parameters.

The results of research of activity of cholinesterases received by us in a liver of rabbits and mice will be compounded with ideas of a defining role of an active phase of animals in the circadian organization of components of cholinergic system. Represents theoretical and practical interest comparative research of activity of enzymes in other vital tissues of animals with different phases of activity.

Key words: white rabbits, white mice, liver, circadian rhythm, acetylcholinesterase activity and butyrylcholinesterase.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования последних лет определили присутствие ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) в холинэргических и нехолинэргических тканях и проявление обеими ферментами как классических, так неклассических функций [1,2]. Классическая функция АХЭ – обеспечение передачи нервного импульса путем гидролиза ацетилхолина (АХ) на постсинаптической мембране холинэргических тканей; а БХЭ выполняет роль молекулярного экрана, защищающего АХЭ от действия ингибиторов [1]. Неклассические функции АХЭ и БХЭ – ускорение дифференцировки клеток всех типов тканей регуляция миграции клеток, контроль роста опухолей и контроль апоптоза [2]. Механизмы реализации неклассических функций ферментов неизвестны.

АХЭ – часть холинергической системы. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о разнообразии структуры циркадных (суточных) колебаний компонентов холинэргической системы в тканях различных видов животных. Триггером циркадной организации холинергической системы является активная фаза животных [3]. Во время активной фазы повышена активность фермента синтеза АХ – холинацетилтрансферазы и снижена активность фермента гидролиза медиатора – АХЭ. Ранее мы охарактеризовали параметры суточного ритма холинэстераз в печени крыс [4]. Данные литературы о суточной организации активности БХЭ в нехолинэргических тканях животных с разной активной фазой мы не встретили.

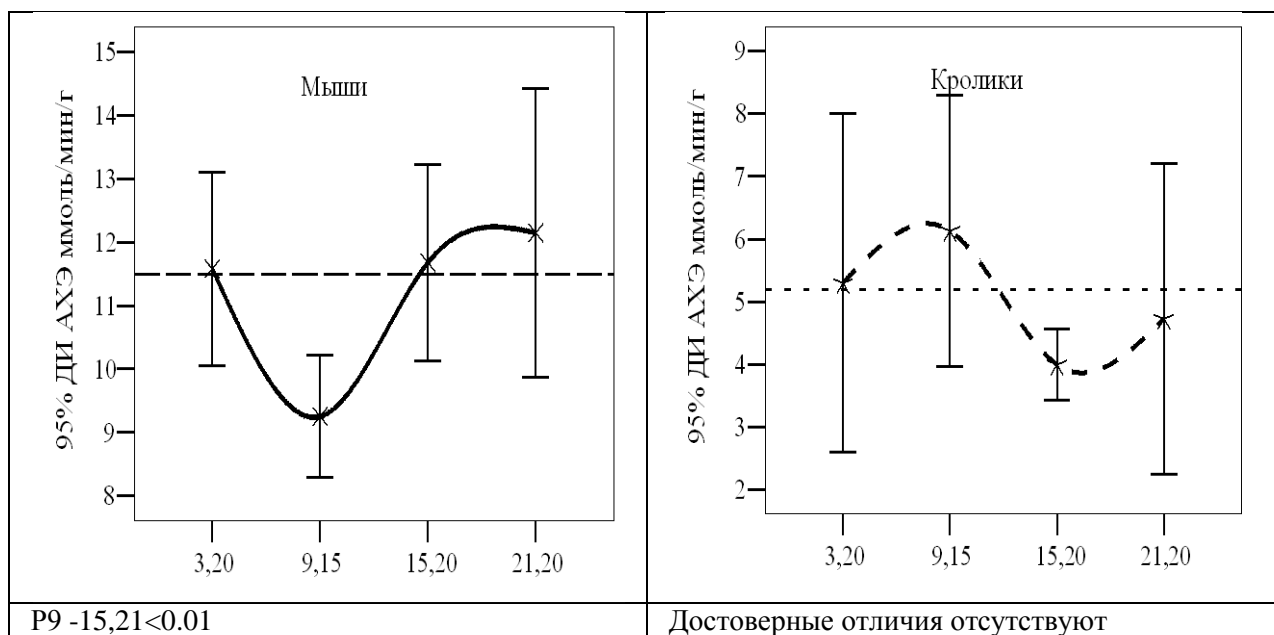
Цель исследования – определение циркадной организации активности растворимых АХЭ и БХЭ в печени ночных животных (мыши) и сумеречных (кролики), которых содержали в условиях естественного освещения мая и свободного доступа к воде и пище.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в мае на белых беспородных мышках-самцах весом 18-20 г, и белых калифорнийских кроликах весом 2,5-3,0 кг, содержащихся в обычных условиях вивария, без ограничения доступа к корму и воде. Через каждые 6 часов под легким хлороформным наркозом 6-7 животных обескровливали путем вскрытия яремной вены. Все процедуры отбора проб, приготовление гомогената ткани, определение и расчет активности ферментов, статистический и хронометрический анализ данных проводили, как описано ранее [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 отражены результаты макроанализа показателей активности АХЭ и БХЭ в печени мышей и кроликов на протяжении суток.



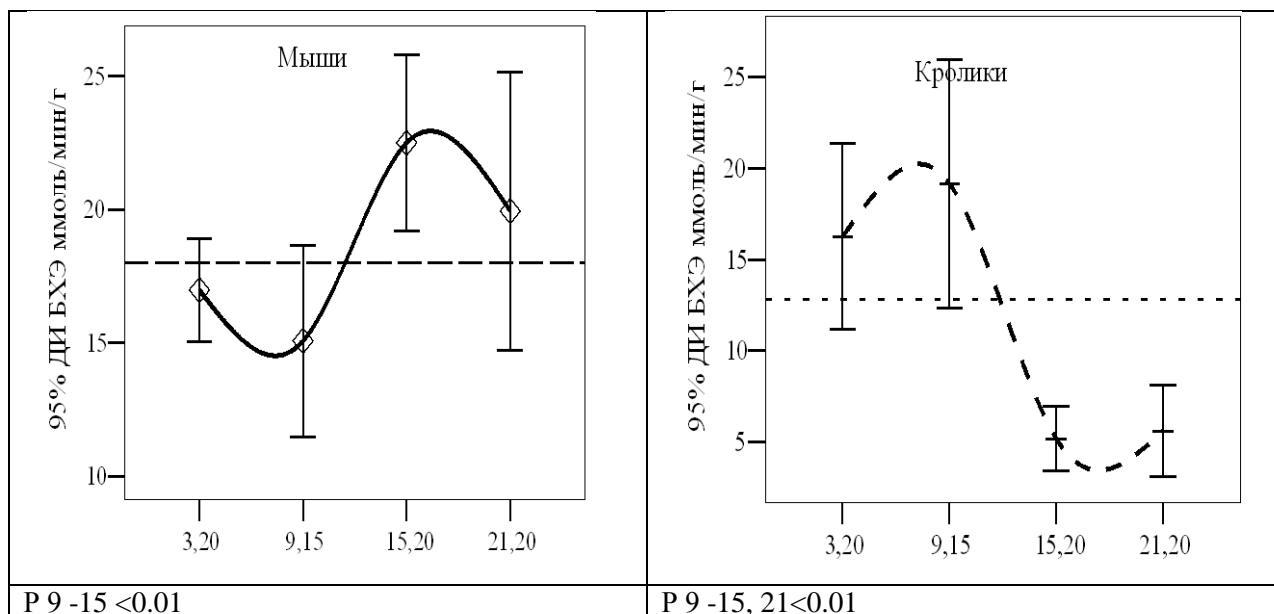


Рис. 1 Суточный профиль активности АХЭ и БХЭ в расчете на 1г ткани и 1 мг белка в печени мышей и кроликов.

Представленные на рис. 1 данные отражают выраженное влияние времени суток на активность обеих холинэстераз в печени как мышей, так и кроликов. Сравнение профиля суточной активности АХЭ и БХЭ в печени мышей и кроликов позволяет заключить, что в печени обеих групп экспериментальных животных АХЭ и БХЭ на протяжении суток изменяется практически синхронно. Акрофазы биоритма активности холинэстераз в печени мышей инвертированы к таковым в печени кроликов.

Результаты микроанализа экспериментальных данных (косинор-анализ) отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели косинор-анализа активности АХЭ и БХЭ в печени мышей и кроликов.

Период	Имя	x	y	H	A	Phi
<i>Параметры средней синусоиды АХЭ ммоль/мин/г в печени мышей</i>						
24 ч	Средние	0,401	-0,406	11,629	1,57	23.11
<i>Параметры эллипса ошибок АХЭ ммоль/мин/г в печени мышей</i>						
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоH/n	MinH	MaxH
0.97	2.99	12.0	23.01	0.48	10.46	14.19
<i>Параметры средней синусоиды БХЭ ммоль/мин/г в печени мышей</i>						
24 ч	Средние	-1,589	-2,276	19,730	2,776	15,672
<i>Параметры эллипса ошибок БХЭ ммоль/мин/г в печени мышей</i>						
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоH/n	MinH	MaxH
0.97	8.86	12.67	22.58	0.72	17.16	22.39
<i>Параметры средней синусоиды АХЭ ммоль/мин/г в печени кроликов</i>						
24 ч	Средние	0,257	2,277	5,868	2,291	5,571
<i>Параметры эллипса ошибок АХЭ ммоль/мин/г в печени кроликов</i>						
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоH/n	MinH	MaxH
1,17	4.32	2.66	10.04	0.28	4.83	6.44
<i>Параметры средней синусоиды БХЭ ммоль/мин/г в печени кроликов</i>						
24 ч	Средние	0,561	6,234	10,968	6,259	5,657
<i>Параметры эллипса ошибок БХЭ ммоль/мин/г в печени кроликов</i>						
Amin	Amax	PhiMin	PhiMax	СкоH/n	MinH	MaxH
2.48	10.06	2.60	8.86	1.13	6.65	13.48

В соответствии с результатами косинор-анализа массива экспериментальных хронограмм активности АХЭ в печени мышей ей присущ биоритм с 24-часовым периодом. Параметры средней синусоиды 24-часового биоритма АХЭ печени мышей: мезор – 11,6 ммоль/мин/г, амплитуда – 1,57; положение акрофазы – 12,0 – 23,01 часа. Суточный ритм с 24-часовым периодом характерен и для активности БХЭ: мезор – 19,7 ммоль/мин/г, амплитуда – 2,8, положение акрофазы – 12,67 – 22,58 часа. Следовательно, суточные колебания активности АХЭ и БХЭ в печени мышей практически синхронны, *максимум активности ферментов наблюдается около 23 часов вечера; среднесуточная активность БХЭ и амплитуда ее колебания более чем в 1,5 раза выше соответствующих параметров биоритма у активности АХЭ.*

В печени кроликов (табл. 2) активность АХЭ и БХЭ на протяжении суток изменяется периодически, длина периода – 24-часа. Параметры биоритма АХЭ печени кроликов: мезор – 5,9 ммоль/мин/г, амплитуда – 2,29, положение акрофазы – 2,66 – 10,04 часа. Параметры биоритма активности БХЭ: мезор 11 ммоль/мин/г, амплитуда – 6,3, положение акрофазы 2,6 – 8,86 часа. Таким образом, активность обеих холинэстераз в печени кроликов на протяжении суток изменяется практически синхронно; максимум активности ферментов гидролиза ацетилхолина и бутирилхолина выявляется в 9-10 часов утра; при этом среднесуточная активность БХЭ, как и амплитуда колебания в 2 раза выше активности АХЭ.

При сравнении параметров биоритмов активности холинэстераз в печени мышей и кроликов представляется возможным отметить следующее. Среднесуточная активность АХЭ и БХЭ в печени мышей в 2 раза выше, чем в печени кроликов. При этом амплитуды колебания активности АХЭ в печени тех и других животных практически одинаковы, но у БХЭ кроликов она в 2 раза выше, чем у мышей. Положение минимума активности ферментов в печени мышей (рис.1) соответствует максимуму активности ферментов в печени кроликов и наоборот, т.е. на протяжении суток ритмы активности холинэстераз в печени мышей и кроликов инвертированы.

Параметры суточного ритма холинэстераз в печени белых мышей практически соответствуют таким в печени белых крыс [4]. Определение суточной активности обеих холинэстераз в печени крыс мы проводили в зимний период. Тот факт, что положение акрофаз ферментов в печени мышей и крыс в зимний и весенний сезоны соответствует периоду времени суток с 12 до 24-часов свидетельствует о том, что триггером ритма холинэстераз является активная фаза животных.

Полученные нами характеристики параметров суточных ритмов активности холинэстераз в печени мышей и кроликов согласуются с представлениями об определяющей роли активной фазы животных в циркадной организации компонентов холинэргической системы [3]. Представляет теоретический и практический интерес сравнительное исследование циркадных ритмов активности ферментов в других периферических тканях животных с разными фазами активности.

ВЫВОДЫ

1. На протяжении суток как в печени мышей, так и кроликов активности АХЭ и БХЭ изменяются периодически, параллельно и однонаправлено.
2. Период суточного ритма активности АХЭ и БХЭ в печени мышей и кроликов равняется 24 часам. Акрофаза ритма АХЭ и БХЭ в печени мышей охватывает вторую половину дня и первую половину ночи с максимумом в 23 часа. Акрофаза ритма АХЭ и БХЭ в печени кроликов охватывает вторую половину ночи и утро с максимумом в 10 часов.
3. В печени мышей мезор БХЭ и амплитуда колебания более чем в 1,5 раза выше соответствующих параметров биоритма активности АХЭ. В печени кроликов мезор БХЭ и амплитуда колебания в 2 раза выше соответствующих параметров АХЭ.

4. Среднесуточная активность АХЭ и БХЭ в печени мышей в 2 раза выше, чем в печени кроликов. При этом амплитуда колебания активности АХЭ в печени тех и других животных практически одинаковы, но у БХЭ кроликов амплитуда колебания в 2 раза выше, чем у мышей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Soreq H. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor / Hermona Soreq, Shlomo Seidman // Nature Reviews Neuroscience. – 2001. – Vol.2. – P. 294-302.
2. Nese Cokugras A. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance / A. Nese Cokugras // Turk Biyokimya Dergisi. – 2003. – Vol. 28, № 2. – P. 54-61.
3. Hut R.A. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory / R.A. Hut, E.A. Van Der Zee // Behav Brain Res. – 2011. – Vol.221, №2. – P. 466-480.
4. Колесник Н.В. Суточная вариабельность активности растворимых холинэстераз в печени крыс / Н.В. Колесник, К.В. Новикова// Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – 2012. – №1. – С. 99-110.
5. Панюков А.Н. О применении метода Хестрина для отдельного измерения активности холинэстераз / А.Н. Панюков // Вопросы медицинской химии. – 1966. – Т.12, Вып. 1. – С. 88-95.

REFERENCES

1. Soreq H. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor / Hermona Soreq, Shlomo Seidman // Nature Reviews Neuroscience. – 2001. – Vol.2. – P. 294-302.
2. Nese Cokugras A. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance / A. Nese Cokugras // Turk Biyokimya Dergisi. – 2003. – Vol. 28, № 2. – P. 54-61.
3. Hut R.A. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory / R.A.Hut, E.A. Van Der Zee // Behav Brain Res. – 2011. – Vol.221, №2. – P. 466-480.
4. Kolesnik N.V. Sutochnaja variabel'nost' aktivnosti rastvorimyh holinjesteraz v pecheni krys / N.V. Kolesnik, K.V. Novikova// Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu. Biologichni nauki. – 2012. – №1. – S. 99-110.
5. Panjukov A.N. O primenenii metoda Hestrina dlja razdel'nogo izmerenija aktivnosti holinjesteraz / A.N. Panjukov // Voprosy medicinskoj himii. – 1966. – T.12, Vyp. 1. – S. 88-95.

УДК [595.143.6:591.4]:615.811

КЛЕТОЧНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ РЕАКЦИИ *HIRUDO VERBANA* (CARENA, 1820) В ПОСТТРОФИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ

Фролов А. К., Литвиненко Р. А.

Запорожский национальный университет,
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66

a_frolov@ukr.net, r_litvinenko@ukr.net

Анализовали морфофункциональные особенности тканей *Hirudo verbana* для выяснения возможных причин частичной их гибели после гирудотерапевтической процедуры. Для исследования взяты две группы пиявок: сытые (контроль) и погибшие. В кишечном эпителии погибших пиявок наблюдаются деструктивные процессы, сопровождающиеся уменьшением высоты эпителия, частичной его десквамацией. Ботриодная ткань сытых пиявок реагирует физиологическим усилением васкуляризации, активацией части ботриодных гранулоцитов на поступление продуктов пищеварения. Активация части ботриодных гранулоцитов, у погибших пиявок, с усилением инфильтрации прилегающей соединительной ткани лимфоцито-, макрофагоподобными клетками, амебоцитами и свободными гранулоцитами свидетельствует

о развитии патологических процессов, вероятно, как следствие иммунологического конфликта между съеденной кровью человека и тканевым микроокружением пиявки.

Ключевые слова: медицинская пиявка, гирудотерапия, кишечные эпителиоциты, ботриодная ткань, ботриодные гранулоциты, лакунарные каналы.

КЛІТИННІ ТА ТКАНИННІ РЕАКЦІЇ *HIRUDO VERBANA* (CARENA, 1820) У ПОСТТРОФІЧНОМУ ПРОЦЕСІ

Фролов О. К., Литвиненко Р. О.

Запорізький національний університет,

69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

a_frolov@ukr.net, r_litvinenko@ukr.net

Аналізували морфофункціональні особливості тканин *Hirudo verbana* для з'ясування можливих причин часткової їх загибелі після гирудотерапевтичної процедури. Для дослідження взято дві групи п'явок: ситі (контроль) і загиблі. У кишкового епітелію загиблих п'явок спостерігаються деструктивні процеси, що супроводжуються зменшенням висоти епітелію, частковою його десквамацією. Ботриодна тканина ситих п'явок реагує фізіологічним посиленням васкуляризації, активацією частини ботриодних гранулоцитів на надходження продуктів травлення. Активація частини ботриодних гранулоцитів, у загиблих п'явок, із посиленням інфільтрації прилеглої сполучної тканини лімфоцито-, макрофагоподібними клітинами, амебоцитами та вільними гранулоцитами свідчить про розвиток патологічних процесів, імовірно, як наслідок імунологічного конфлікту між з'їденою кров'ю людини та тканинним мікрооточенням п'явки.

Ключові слова: медична п'явка, гирудотерапія, кишкові епітеліоцити, ботриодна тканина, ботриодні гранулоцити, лакунарні канали.

CELLULAR AND TISSUE REACTIONS OF *HIRUDO VERBANA* (CARENA, 1820) IN THE POSTTROPIC PROCESSES

Frolov A. K., Litvinenko R. A.

Zaporizhzhya National University,

69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

a_frolov@ukr.net, r_litvinenko@ukr.net

In the last decade, more attention is paid to alternative naturopathic treatments, in particular hirudotherapy. Therefore, increasing the need for biotechnological medicinal leech and the development of biotechnological methods that increase their economic efficiency. However, it is known that in the conditions of the biotechnology some medicinal leeches die in the next few days after feeding with blood mammals. Taking into account that the medicinal leech is an absolute hematophagous, then it is necessary take into account the immunological aspects of the impact of eaten blood on the cell and tissue reaction of the leech organism during posttrophic period.

Objective: to establish the basic morphofunctional features of tissue well-fed pharmacy medicinal leeches *H. verbana* Carena (1820) in the case of their normal physiological and pathological response, which concludes with the death in the immediate posttrophic period.

The study involved the medical leech (n=400), obtained after hirudotherapeutic procedures in humans. The types of leeches response to feeding were the basis for the selection the experimental groups. For the study were taking *H. verbana* age of 7 months divided into 2 groups: 1) control group (n=15) – intact fed *H. verbana*, which had feeding on human blood at hirudotherapeutic procedure after 4 months of hunger, and fixed 12 days following feeding; 2) experimental group (n=15) – fed *H. verbana*, who died on 11-14 day after feeding and before that had a constriction on the body and vomited blood and fixed on the day of death.

The transverse histological sections were prepared from the middle part of the body *H. verbana* that investigated, stained with hematoxylin-eosin. Analyzed the histological features of structure of the leeches' body. Special attention was given to morphofunctional characteristics of intestinal epithelium (height, μm), connective (the number of lymphocyte-, macrophage-like cells, free granulocytes and amebocytes per unit area of $0,1 \text{ mm}^2$ tissue) and botryoidal tissues (diameter of lacunar channels in μm , size of botryoidal granulocytes in μm , the percentage of activated and non-activated botryoidal granulocytes per unit area of $0,1 \text{ mm}^2$ tissue) that directly participate in the metabolism of plastic material from eaten blood. Botryoidal granulocytes with flattened, half-moon shaped which mainly surround intermediate lacunar channels were considered as activated; unactivated were considered botryoidal granulocytes with rounded forms that do not form lacunar channels.

Statistical analysis of experimental data was carried out using application package IBM SPSS Statistics 20,0. The test data for normality of distribution was carried out using Kolmogorov-Smirnov test. Normal

distribution using parametric statistical methods – statistical significance of differences between the study groups was assessed by the Student criterion (T-test for independent samples). Results are presented as $M \pm m$, where M – average value of the characteristic, m – mean error of the arithmetic mean. The differences of the results were considered valid if $P > 95\%$, $p < 0,05$.

From the observed of 400 medical leeches pathophysiological features in the nearest posttrophic period found in $9,5 \pm 0,57\%$ leeches of whom died $4,5 \pm 0,48\%$. At histological research in fed live medicinal leeches are revealed flattened epithelial cells, their average height in different parts of crop fluctuated between $7,9-10,3 \mu\text{m}$. In the dead *H. verbana*, are marked a significant intravital destructive processes in the intestinal epithelium: intestinal epithelial cells are low ($3,5 - 9,2 \mu\text{m}$), vacuolated, with pyknotic nuclei irregularly shaped located mainly in the apical part of the cell, there are non-nuclear fragments cells and areas of desquamation of the epithelium.

Infiltration of the connective and adjacent tissues and organs by immunocompetent cells (lymphocyte-, macrophage-like cells, amebocytes and free granulocytes) in the dead *H. verbana* increases by more than 2,5 times compared with the living fed ($62,8 \pm 1,84$ and $22,2 \pm 1,50$ cells per unit area of $0,1 \text{ mm}^2$ tissue, respectively, $p < 0,01$).

In well-fed live *H. verbana* botryoidal tissue is large cellular structure, has a hollow tubular architecture typical of vascular structures, with the number of activated granulocytes $83,7 \pm 1,14\%$ (average diameter of $8,6 \pm 0,11 \mu\text{m}$) and non-activated $16,3 \pm 1,14\%$ (average diameter of $11,3 \pm 0,34 \mu\text{m}$). At the dead *H. verbana*, compared to well-fed, the relative content the activated granulocytes of botryoidal tissue slightly higher ($85,3 \pm 0,97\%$, $p > 0,05$), and they have a small diameter ($4,4 \pm 0,14 \mu\text{m}$, $p < 0,01$), whereas the content of nonactivated granulocytes – slightly lower ($14,7 \pm 0,97\%$, $p > 0,05$), their average diameter – significantly smaller ($5,5 \pm 0,15 \mu\text{m}$, $p < 0,01$). Lacunae of botryoidal tissue in dead *H. verbana* expanded (average diameter of $14,8 \pm 0,91 \mu\text{m}$), compared to the live well-fed (average diameter of $15,8 \pm 0,98 \mu\text{m}$), haemolymph are practically absent, in some of them there are accumulations of their own hemocytes.

Results of research in group of well-fed dead *H. verbana*, such as increased processes of destruction of cells and increase the number of lymphocyte-, macrophage-like cells, free granulocytes and amebocytes in the connective tissue, and the presence of multiple devastated expanded intermediate lacunae, with the central placement of their own hemocytes in some of them, they may indicate intravital exhaustion of functionality lymph-myeloid tissue, which resulted in the death of medicinal leeches in insolvency immune defense mechanisms.

Conclusions. 1. Morphofunctional changes in the crop of well-fed dead *H. verbana* consist in the development of destructive processes that are manifested in the form of pyknotic nuclei changes, their fragmentation, violation of the integrity plasmolemma, the presence areas of desquamation. 2. Activation of botryoidal tissue of healthy well-fed *H. verbana* is associated with physiological processes (absorption and accumulation of plastic substances) occurring in normal and such activation in dead *H. verbana*, probably due to the weakening of immunological defense mechanisms. 3. In well-fed dead medicinal leech in connective and botryoidal tissue adjacent to the crop (gut) observed increased cell infiltration, atonic extended hollow lacunar vessels without trophic content. 4. Destructive processes in the intestinal epithelium and associated pathological changes of connective and botryoidal tissue well-fed dead leeches are probably the result of the development of immunological conflict such as "graft versus host disease".

Key words: medicinal leech, hirudotherapy, intestinal epithelial cells, botryoidal tissue, granular botryoidal cells, lacunar channels.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие все больше внимания уделяется альтернативным натуропатическим методам лечения, изучению их эффективности, механизмов лечебного действия, возможности самостоятельного и комплексного использования с целью профилактики и лечения различного рода патологий человека и животных. К числу эффективных натуропатических методов принадлежит и гирудотерапия, которая активно используется в лечебной и профилактической медицине, ветеринарии [1-3]. Поэтому становится понятным возрастание потребности в биотехнологических медицинских пиявках и дальнейшей разработки биотехнологических приёмов повышающих их экономическую эффективность. Однако имеются сведения [4, 5], что в условиях биотехнологии часть медицинских пиявок погибает в ближайшие дни после кормления кровью млекопитающих. Причины таковой гибели не установлены. Если принимать во внимание то, что медицинская пиявка является абсолютным гематофагом, тогда необходимо учитывать и иммунологические аспекты

влияния съеденной крови млекопитающих на клеточные и тканевые реакции организма пиявки в постстрофическом периоде. Пищеварительный тракт медицинской пиявки *Hirudo verbana* Carena (1820) приспособлен для поглощения большого количества крови позвоночных, превышающей её собственный вес в 3 - 7 раз. При этом кровь млекопитающих является высокоиммунной тканью, которая содержит ряд клеточных гуморальных факторов иммунитета. Например, система комплемента остается активной в желудочной кишке медицинской пиявки до двух дней после кормления [6], а форменные элементы крови определяются ещё дольше – более 2 - 4 недель [1, 7, 8]. Поэтому представляло интерес изучение природы взаимодействия съеденной крови с организмом медицинской пиявки, которое можно приравнять к ситуации типа «реакции трансплантат против хозяина», наблюдаемой у человека и лабораторных животных [9].

Целью нашей работы явилось установление основных морфофункциональных особенностей тканей сытых аптечных медицинских пиявок *H. verbana* Carena (1820) в случае их нормального физиологического и патологического реагирования, которое завершается гибелью в ближайшем постстрофическом периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были 400 медицинских пиявок вида *H. verbana* возрастом 7 месяцев, полученные после проведения гирудотерапевтической процедуры на больных с различной хронической патологией и условно здоровых донорах. Голодных товарных медицинских пиявок, которых использовали для гирудотерапии, выращивали согласно ТУ У05.0-02125243-002:2009 «Пиявка медицинская» (санитарно-эпидемиологическое заключение МОЗ Украины № 05.03.02-06/49982, от 12.08.2009 г.) на базе научной лаборатории клеточной и организменной биотехнологии Запорожского национального университета (Запорожье, Украина). Медицинские пиявки содержались в 3-литровых бутылках с дехлорированной отстоянной водопроводной водой объемом 2 л (по 10-15 особей) при температуре +22 °С. Наблюдение за медицинскими пиявками длилось 2 месяца после полного насыщения на теле человека с периодической сменой воды каждые 3-4 дня. Анализировали морфологическое и физиологическое состояние медицинских пиявок. При отклонении от нормального состояния (малоподвижность, отсутствие сократительного и присасывающего рефлексов, отрывание крови, появление перетяжек на теле) медицинских пиявок отсаживали в отдельные 1 л бутылки с последующим ежедневным наблюдением.

Для гистологического исследования выделены 2 группы *H. verbana* по 15 особей в каждой. Контрольная группа представлена интактными сытыми пиявками, фиксированными через 12 суток после гирудотерапевтической процедуры. Опытная группа представлена сытыми пиявками, которые погибли на 11 - 14 сутки после кормления на теле человека и до этого имели морфофизиологические признаки патологии. Фиксирование проводили в день гибели.

Готовили поперечные гистологические срезы со средней части тела исследуемых *H. verbana*, окрашивали гематоксилин-эозином [10, 11]. Анализировали гистологические особенности строения тела пиявок. Особое внимание уделяли морфофункциональным характеристикам кишечного эпителия (высота, мкм), соединительной (количество лимфоцито-, макрофагоподобных клеток, свободных гранулоцитов и амебоцитов на единицу площади ткани $0,1 \text{ мм}^2$) и ботриоидной тканей (диаметр лакунарных каналов в мкм, размер ботриоидных гранулоцитов в мкм, процент активированных и неактивированных ботриоидных гранулоцитов на единицу площади ткани $0,1 \text{ мм}^2$), которые принимают непосредственное участие в метаболизме пластического материала со съеденной крови. За активированные принимали ботриоидные гранулоциты уплощенной, полумесячной формы, которые, главным образом, окружают промежуточные лакунарные каналы; неактивированными считали ботриоидные гранулоциты округлой формы, которые не формируют лакунарные каналы [12-14]. Цитоморфометрическое исследование проводили непосредственно на гистологических препаратах с использованием окуляр-микрометра

(сеточка) и объект-микрометра (PZO, Польша) на световом микроскопе (объектив 40×, 100×, окуляр К7×, система Биолар, Польша).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 20,0. Проверку данных на нормальность распределения осуществляли с помощью одновыборочного теста Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении использовали параметрические методы статистики – статистическую значимость различий между исследуемыми группами оценивали по критерию Стьюдента (Т-тест для независимых выборок). Значения в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение признака, m – средняя ошибка среднего арифметического. Достоверными считали различия результатов при $P > 95 \%$, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди наблюдаемых медицинских пиявок на 1–2 неделе после гирудотерапевтической процедуры появлялись малоподвижные особи, у которых отсутствовали или были угнетены сократительные и присасывающие рефлексы, появлялись разной формы перетяжки, что в большинстве случаев сопровождалось непрерывным отрыванием съеденной крови ($9,5 \pm 0,57 \%$, рис. 1). В дальнейшем (через 3-5 дней) часть таких особей ($4,5 \pm 0,48 \%$) погибала. Оставшаяся часть медицинских пиявок с патологическими признаками оставалась жизнеспособной на протяжении наблюдения (2 месяца), но имела остаточные проявления в виде перетяжек на теле разной ширины с частичным эпизодическим отрыванием съеденной крови. Следует отметить, что в течение всего времени наблюдения каннибализма в группе сытых медицинских пиявок не наблюдалось. Возможность каннибализма была исключена еще в начале исследования за счет полного насыщения всех пиявок, взятых в эксперимент, и трофической инертности на протяжении 1,5-2 месяцев [1].

С целью выяснения возможных причин морфофизиологических патологических проявлений в ближайший период после кормления нами выполнено выборочное гистологическое исследование.

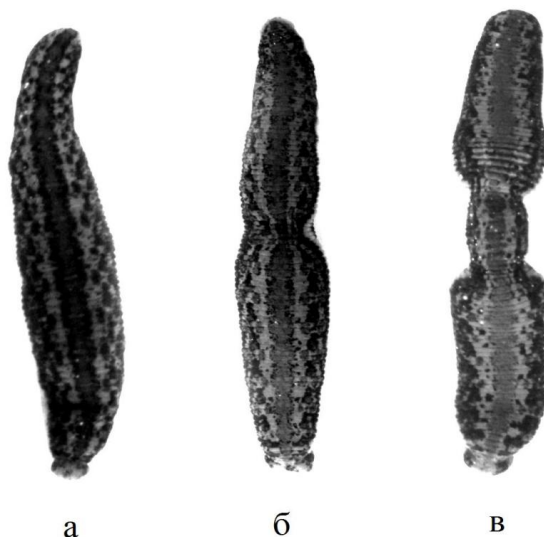


Рис. 1. Формирование перетяжек на теле *H. verbana* в посттрофический период (вид с дорзальной стороны): а – сытая здоровая *H. verbana*; б – сытая *H. verbana* с единичной перетяжкой на теле; в – сытая погибшая *H. verbana* с несколькими перетяжками на теле

Пиявки вида *H. verbana* имеют типичное для представителей рода *Hirudo* строение пищеварительной системы [1, 2] и кишечного эпителия [15]. Известно, что кишечный эпителий желудочной кишки здоровой медицинской пиявки представлен однослойным цилиндрическим/кубическим каемчатым эпителием. Нами установлено, что у сытых живых

медицинских пиявок, зафиксированных через 12 суток после приема пищи, эпителиоциты желудочной кишки уплощенные, вероятно, из-за потребления значительного объема крови, их средняя высота в разных частях желудочной кишки колеблется в пределах 7,9 - 10,3 мкм (табл. 1, рис. 2, а).

Таблица 1 – Высота эпителия желудочной кишки *H. verbana* при различных физиологических состояниях

Группа пиявок	Центральный канал		Боковые карманы	
	Дорзальный эпителий, мкм	Вентральный эпителий, мкм	Гладкая поверхность, мкм	Складки, мкм
Живые, n=15	9,5 ± 0,90	7,9 ± 0,53	9,5 ± 0,57	10,3 ± 0,37
Погибшие, n=15	4,7 ± 0,25*	3,5 ± 0,18*	7,4 ± 0,45*	9,2 ± 0,34**

Примечание: * – разница между сытыми и погибшими пиявками достоверная при $p < 0,01$; ** – при $p < 0,05$.

В исследованных погибших на 11 - 14 сутки после гирудотерапевтической процедуры *H. verbana*, отмечены значительные прижизненные деструктивные процессы в кишечном эпителии (рис. 2, б). Большинство кишечных эпителиоцитов низкие, встречаются клетки разной высоты. Ядра эпителиоцитов пикнотические, неправильной формы, размещенные, главным образом, в апикальной части клеток. Большинство кишечных эпителиоцитов вакуолизированные. Встречаются безъядерные фрагменты клеток и участки с десквамацией эпителия, в основном в центральном канале желудочной кишки. Высота эпителиоцитов (табл. 1), по сравнению с сытыми пиявками, статистически значимо уменьшается ($p < 0,01$), главным образом, в центральном канале до $4,7 \pm 0,25$ мкм (дорзальный эпителий), $3,5 \pm 0,18$ мкм (вентральный эпителий).

Отдельные морфофункциональные изменения наблюдаются также в соединительной и ботриоидной тканях (*the botryoidal tissue*), которые окружают органы пищеварительной системы *H. verbana*. У здоровой медицинской пиявки пространство между внутренними органами заполнено грубоволокнистой соединительной тканью, ассоциированной с ботриоидной тканью, как и у других видов пиявок [15-17]. У сытой живой *H. verbana*, зафиксированной через 12 суток после кормления, соединительная ткань представлена удлинёнными опорными соединительнотканью клетками, в ней часто встречаются лимфоцито-, макрофагоподобные клетки, амебоциты и свободные гранулоциты ($22,2 \pm 1,50$ клеток на $0,1 \text{ мм}^2$ ткани, табл. 2), тогда как у голодной пиявки их количество незначительное [17]. У погибших *H. verbana* инфильтрация соединительной ткани и прилегающих тканей (ботриоидная ткань) и органов (желудочная кишка) такими иммунокомпетентными клетками возрастает более, чем в 2,5 раза ($62,8 \pm 1,84$ клеток на $0,1 \text{ мм}^2$ ткани, $p < 0,01$), причем они максимально приближены к кишечному эпителию, что, очевидно, связано с интенсификацией их иммунологической функции на репарацию деструктивных процессов в кишечнике и поддержание барьерной функции слизистой оболочки желудочной кишки. Свободные гранулоциты, которые встречаются в соединительной ткани, вероятно, являются гранулоцитами I типа. Известно, что они способны к миграции, а также могут реагировать на антигенные стимулы, ведущие к дегрануляции антибактериальных веществ [18]. Лимфоцито- и макрофагоподобные клетки регулируют гистогенез тканей и обеспечивают цитотоксические функции клеточного иммунитета [19, 20]. Считается, что у медицинской пиявки выявленные нами иммунокомпетентные клетки в соединительной ткани также могут выполнять регуляторные и цитотоксические функции [21].

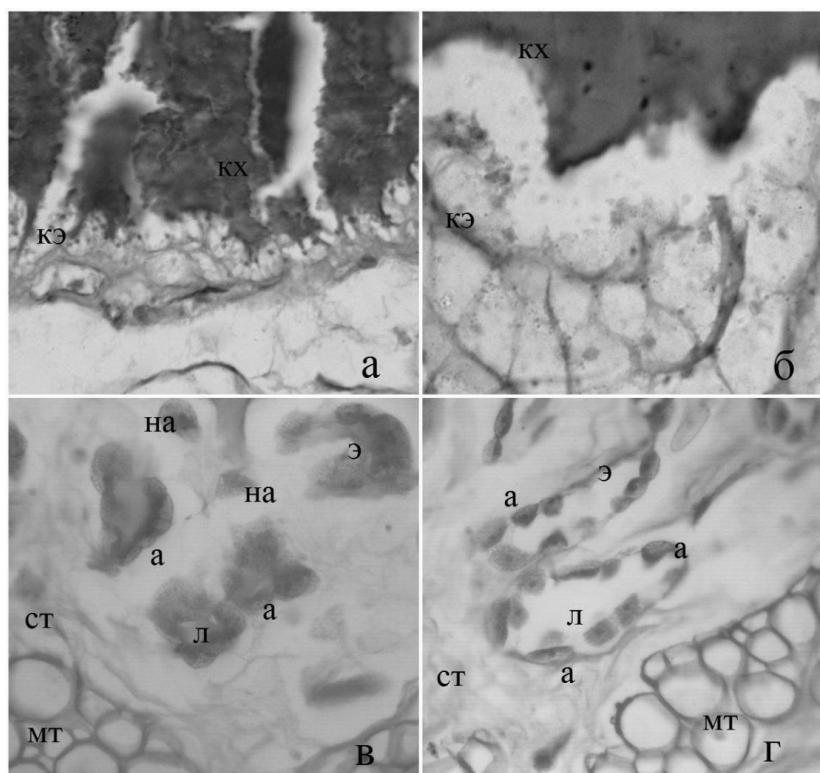


Рис. 2. Морфофункциональные особенности *H. verbanda* в посттрофический период (окраска гематоксилин-эозином): а – кишечный эпителий сытой здоровой *H. verbanda*; об.: 40×; б – кишечный эпителий сытой погибшей *H. verbanda*; об.: 100×; в – ботриоидная и прилежащая соединительная ткань сытой здоровой *H. verbanda*; об.: 40×; з – ботриоидная и прилежащая соединительная ткань сытой погибшей *H. verbanda*; об.: 40×. Условные обозначения: а – активированные гранулоциты ботриоидной ткани; на – неактивированные гранулоциты ботриоидной ткани; э – эндотелиообразные клетки ботриоидной ткани; кэ – кишечный эпителий; кх – кровь хозяина-прокормителя; л – промежуточные лакуны в ботриоидной ткани; мт – мышечная ткань; ст – соединительная ткань

Таблица 2 – Количество и функциональное состояние ботриоидных гранулоцитов и лимфоцито-, макрофагоподобных клеток, амебоцитов, свободных гранулоцитов на единицу площади ($0,1 \text{ мм}^2$) ботриоидной и прилежащей соединительной ткани *H. verbanda* при различных физиологических состояниях

Группа пиявок	Диаметр промежуточных лагун ботриоидной ткани, мкм	Гранулоциты ботриоидной ткани							Лимфоцито-, макрофагоподобные клетки, амебоциты, свободные гранулоциты в соединительной ткани, шт.
		Всего, шт.	В том числе						
			Активированные			Неактивированные			
			Шт.	%	d, мкм	Шт.	%	d, мкм	
Живые, n=15	15,8±	186,5±	156,1±	83,7±	8,6±	30,4±	16,3±	11,3±	22,2±
	0,98	7,56	6,52	1,14	0,11	2,44	1,14	0,34	1,50
Погибшие, n=15	14,8±	170,7±	145,4±	85,3±	4,4±	25,4±	14,7±	5,5±	62,8±
	0,91	9,45	7,86	0,97	0,14*	2,34	0,97	0,15*	1,84*

Примечание: d – диаметр; * – разница между сытыми и погибшими пиявками достоверная при $p < 0,01$.

Как известно, ботриоидная ткань пиявок рода *Hirudo* представляет собой оксифильную ячеистую структуру и состоит из округлых клеток двух типов – зернистых (гранулоцитарных) ботриоидных и плоских эндотелиоподобных [12, 14]. Большинство клеток ботриоидной ткани плотно прилегает вокруг каналов капиллярной сетки лакунарной (кровеносной) системы, которая соединяет дорзальный, вентральный и 2 боковых лакунарных канала. Известно, что ботриоидная ткань подвергается функциональным и структурным изменениям в ответ на различные потребности, возникающие в ходе жизненного цикла животных [12, 22, 23]. Установлено, что у здоровых пиявок ботриоидные клетки организованы в кластеры, а при экспериментальном повреждении происходит переход ботриоидной ткани с шнурообразных, кластерных структур в полую, трубчатую архитектуру, типичную для сосудистых структур [12-14]. Кроме того, ботриоидные зернистые клетки обеспечивают адсорбцию питательных веществ [12, 15, 22], которые поступают в соединительную ткань с кишечника, а также метаболитов, они являются хлорогеновыми клетками, участвуют в выделительной функции [15]. Так, цитоплазма гранулоцитов ботриоидной ткани накапливает различные включения, среди которых жёлто-коричневые зерна экскреторной природы, содержащие продукты распада гемма [22]. Вместе с эндотелиоподобными клетками ботриоидные гранулоциты формируют дополнительные промежуточные лакуны и капилляры. Кроме того, существует мнение, что зернистые клетки ботриоидной ткани также выполняют защитную иммунную функцию [12]. Также известно, что ботриоидная ткань участвует в ангиогенезе, а ее целотелиум выполняет миело/эритроидную функцию [12, 23].

Установлено, что у сытых живых *H. verbana* ботриоидная ткань крупноячеистая, в большинстве имеет полую трубчатую архитектуру типичную для сосудистых структур, реже кластерного, шнурообразного типа. Выявлено значительное количество активированных гранулоцитов ботриоидной ткани ($83,7 \pm 1,14$ %, средний диаметр клеток $8,6 \pm 0,11$ мкм), которые образуют скопления вокруг карманов, складок и перегородок желудочной кишки, а также вокруг лакунарных сосудов, в основном дорзального. В то время, как у голодных *H. verbana* ботриоидные гранулоциты, в основном находятся в неактивированном состоянии и имеют незначительные размеры [17]. В соединительной ткани живых сытых *H. verbana* значительное количество капилляров и лакун, их средний диаметр составляет $15,8 \pm 0,98$ мкм (табл. 2). Они, как и сетчатая ботриоидная ткань, хорошо заполнены оксифильной жидкостью – гемолимфой (рис. 2, в). Кроме того, отмечены значительные размеры активированных ($8,6 \pm 0,11$ мкм) и неактивированных ($11,3 \pm 0,34$ мкм) ботриоидных гранулоцитов, что, очевидно, является реакцией на поступление метаболитов питательных веществ [15, 22].

У сытых погибших *H. verbana* отмечены значительные дегенеративные (деструктивные) процессы в соединительной и ботриоидной тканях, по сравнению со здоровой сытой пиявкой. Соединительная ткань крупноячеистой структуры, в её ячейках находится значительное количество амёбообразных клеток с гомогенной или мелкозернистой цитоплазмой. В соединительной ткани присутствуют лимфоцитоподобные клетки, а в некоторых ячейках встречаются макрофагоподобные, их особенно много под складками желудочной кишки. Лакуны ботриоидной ткани расширены (средний диаметр составляет $14,8 \pm 0,91$ мкм; табл. 2, рис. 2, г). Относительное содержание активированных гранулоцитов ботриоидной ткани, по сравнению с сытыми пиявками, незначительно выше ($85,3 \pm 0,97$ %, $p > 0,05$), причем они имеют малый диаметр ($4,4 \pm 0,14$ мкм, $p < 0,01$), тогда как содержание неактивированных гранулоцитов – незначительно меньше (при $p > 0,05$), как в абсолютных ($25,4 \pm 2,34$ клеток на $0,1$ мм² ткани), так и в относительных ($14,7 \pm 0,97$ %) показателях, средний диаметр клеток значительно меньше ($5,5 \pm 0,15$ мкм, $p < 0,01$; табл. 2). При этом в промежуточных лакунах ботриоидной ткани, практически отсутствует гемолимфа, в отличие от сытых живых пиявок. Кроме того, в отдельных промежуточных лакунах ботриоидной ткани встречаются скопления собственных гемоцитов, что, вероятно, указывает на активные

миграционные процессы иммунокомпетентных клеток к месту повреждения, то есть к кишечному эпителию.

Выявленные результаты исследования в группе сытых погибших *H. verbana*, такие как усиление процессов деструкции клеток и увеличение количества лимфоцито-, макрофагоподобных клеток, амебоцитов и свободных гранулоцитов в соединительной ткани, а также наличие множественных опустошенных расширенных промежуточных лакун, с центральным размещением собственных гемоцитов в отдельных из них, могут свидетельствовать о прижизненном истощении функциональных возможностей лимфомиелоидной ткани, которое привело к гибели медицинской пиявки в условиях несостоятельности иммунных защитных механизмов. Так, известно, что морфофункциональное состояние иммунных структур в лимфоидных бляшках тонкой кишки у человека и млекопитающих животных отражает напряженность иммунитета не только пищеварительной системы, но и в целом всего организма [24].

Медицинская пиявка, как абсолютный гематофаг, приспособлена к краткосрочным контактам с хозяевами-прокормителями и к быстрому поглощению большого объема крови, превышающем её изначальный вес в 3 - 7 раз и длительному её хранению в жидком состоянии. Причем собственно переваривание пищи (съеденной крови) происходит в короткой средней и задней кишке, тогда как передняя кишка (желудок), представляющая собой цилиндрическое расширение с 11 парными карманами, занимает почти всё тело пиявки. В этом отделе длительно сохраняют свою активность клеточные и гуморальные факторы съеденной крови, и первой на пути защиты от её негативных воздействий реагирует система пищеварения, где съеденная кровь подвергается иммунному контролю со стороны медицинской пиявки.

Иммунологическая функция съеденной крови хозяина-прокормителя как «трансплантат» в норме подавляется медицинской пиявкой многокомпонентными механизмами. Во-первых, за счёт изменения исходного состояния плазмы крови путём её быстрой дегидратации [25, 26] (пиявка «потеет» уже при акте кормления), потере адгезивных свойств форменных элементов (кровь, извлеченная из желудка медицинской пиявки, не расслаивается даже при центрифугировании). Во-вторых, сниженная температура обитания медицинской пиявки (оптимум 22 - 24 °С) способствует преобладанию её иммунитета по сравнению с оптимумом для иммунных факторов крови теплокровных хозяев-прокормителей (38,5 °С для копытных и 37 °С для человека). Третья группа факторов ингибиции иммунитета крови хозяина-прокормителя происходит на молекулярно-клеточном уровне и по своей сущности остается неизученной. Одним из них может быть индукция апоптоза в лейкоцитах человека, обнаруженная нами в культуре клеток под влиянием биологически активных веществ солевого экстракта медицинской пиявки [27]. Нами также выявлена [8] максимальная длительность существования клеточных популяций крови хозяина-прокормителя в пищеварительной системе медицинской пиявки, которая составляет: для некоторых нейтрофилов – до 15 суток, для моноцитов – до 18 суток, отдельные эозинофилы, лимфоциты и эритроциты определяются в съеденной крови даже через месяц. Однако общее количество клеток крови значительно снижается уже на первой неделе, а в дальнейшем подсчёт количества лейкоцитов невозможен из-за увеличения количества детрита.

Однако, вероятно, значительная часть *H. verbana* ($9,5 \pm 0,57\%$), несмотря на наличие ряда приспособлений к паразитическому образу жизни, не в состоянии преодолеть иммунную агрессию съеденной крови, возможно, это связано с наличием конституционально обусловленных морфофункциональных дефектов в системе пищеварения, и/или недостаточности отдельных компонентов её иммунной системы, а также с нарушением нормальной симбионтной микрофлоры кишечника, которая в норме выполняет ряд трофических и антибиотических функций, которые требуют дальнейших исследований.

Появление поясков, отрывание крови и последующая гибель части особей медицинских пиявок в ближайшее (1,5 - 2 недели) посттрофическое время (рис. 1), указывает на иммунологический конфликт типа реакции «трансплантат против хозяина». Так, время возникновения патологии у данной части пиявок совпадает с максимальным временем развития клеточных иммунологических реакций [19, 28] и сроками выявления наибольшей частоты осложнений, наблюдаемых в клинической практике. Вероятно, в этой части медицинских пиявок иммунные факторы крови хозяина-прокормителя повреждают эпителий желудка – основного вместилища крови и угнетают симбионтную микрофлору пищеварительного тракта, которая в основном обеспечивает консервацию этой крови, ее переваривание и ингибирует патогенную микрофлору. Таким образом, у части медицинских пиявок, вероятно, развивается ситуация типа реакции «трансплантат против хозяина». Усугубление деструктивных процессов в кишечнике и подлежащих тканях далее приводит к отрыванию съеденной крови, потери барьерной функции пищеварительного тракта, интоксикации организма и гибели медицинской пиявки. Выявленные нами прижизненные гистологические изменения у погибших медицинских пиявок подтверждают данное предположение. Существенными признаками патоморфологических изменений у медицинской пиявки необходимо считать: выраженную атрофию слизистой оболочки кишечника и инфильтрацию её лейкоцитами, как одного из распространенных признаков иммунодефицита [28, 29]; расширение лакунарных каналов ботриоидной ткани, которые у медицинской пиявки выполняют роль кровеносных и лимфатических сосудов. Последние, в условиях несостоятельности иммунных механизмов, вероятно, могут также служить транспортным путем распространения инфекционных агентов. Сходные проявления атрофии слизистой оболочки кишечника наблюдаются у больных с расстройствами иммунной системы [30, 31].

Перспективы дальнейших исследований. Выяснение молекулярно-клеточных механизмов взаимодействия между медицинской пиявкой и кровью хозяина-прокормителя имеет фундаментальное и прикладное значение. Во-первых, позволяет изучить механизмы «реакции трансплантат против хозяина» и далее регулировать её интенсивность. Во-вторых, решение данного вопроса позволит повысить рентабельность биофабрик по выращиванию медицинской пиявки, снижая их смертность, особенно на стадии «нитчаток» и подрастающей молодежи.

ВЫВОДЫ

1. Морфофункциональные изменения в желудочной кишке сытой погибшей *H. verbana* заключаются в развитии деструктивных процессов, которые проявляются в виде пикнотических изменений ядер, их фрагментации, нарушении целостности плазмолеммы, наличием участков десквамации.
2. Активация ботриоидной ткани здоровой сытой *H. verbana* связана с физиологическими процессами (поглощением и накоплением пластических веществ), происходящими в норме, а таковая активация у погибшей *H. verbana*, вероятно, связана с ослаблением иммунологических механизмов защиты.
3. У сытой погибшей медицинской пиявки в прилегающей к кишечнику соединительной и ботриоидной ткани наблюдается повышенная клеточная инфильтрация, атонично расширенные лакунарные пустотелые сосуды без трофического содержимого.
4. Деструктивные процессы в кишечном эпителии и связанные с ними патологические изменения соединительной и ботриоидной ткани сытых погибших пиявок, вероятно, являются результатом развития иммунологического конфликта типа «реакции трансплантат против хозяина».

ЛІТЕРАТУРА

1. Каменев О. Ю. Лечение пиявками : теория и практика гирудотерапии : руководство для врачей / О. Ю. Каменев, А. Ю. Барановский. – СПб.: ИГ «Весь», 2006. – 304 с.
2. Савинов В. А. Гирудотерапия: руководство / В. А. Савинов. – М.: Медицина, 2004. – 432 с.
3. Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery / Abdullah S., Dar L. M., Rashid A., Tewari A. // Arch. Clin. Exp. Surg. – 2012. – Vol. 1, Is. 3. – P. 172-180.
4. Трофічні властивості екотипів медичної п'явки в природних водоймищах і в умовах біотехнології / О.К. Фролов, В.В. Копійка, Є.Р. Федотов, Р.О. Литвиненко // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – 2011. – №1 – С. 117-122.
5. Рассадина Е. В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях: дис. ... кандидата биол. наук : 03.00.23, 03.00.16 / Е. В. Рассадина. – Ульяновск, 2006. – 199 с.
6. Indergand S. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech / S. Indergand, J. Graf // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, № 11. – P. 4735-4741.
7. Experiments on the possible role of leeches as vectors of animal and human pathogens: a light and electron microscopy study / [Nehili M., Ilk C., Mehlhorn H. et all.] // Parasitol Res. – 1994. – Vol. 80 (4). – P. 277-290.
8. Литвиненко Р. О. Життєздатність формених елементів крові людини в кишковому середовищі медичної п'явки / Р. О. Литвиненко // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – 2013. – № 1. – С. 84-92.
9. Показатели гемопоэза в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина / [Ткачев В. О., Гойман Е. В., Лыков А. П. и др.] // Иммунология. – 2006. – Т. 27, № 3. – С. 168-170.
10. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М. : Изд-во иностр. лит., 1953. – 718 с.
11. Коржевский Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит., 2010. – 95 с.
12. Ultrastructure and functional versatility of hirudinean botryoidal tissue / [de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G. et all.] // Tissue and Cell. – 2001. – Vol. 33, Is. 4. – P. 332-341.
13. The multifunctional role of fibroblasts during wound healing in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea) / [Tettamanti G., Grimaldi A., Rinaldi L. et all.] // Biol. Cell. – 2004. – Vol. 96 (6). – P. 443-455.
14. Ras activation in *Hirudo medicinalis* angiogenic process / [Grimaldi A., Ferrarese R., Tettamanti G. et all.] // ISJ. – 2013. – Vol. 10. – P. 7-14.
15. Большой практикум по зоологии беспозвоночных: учеб. пособ. – Ч. 2. Типы: Кольчатые черви, Членистоногие / Иванов А. В., Мончадский А. С., Полянский Ю. И., Стрелков А. А. – М. : Высш. шк., 1983. – 543 с.
16. Rahemo Z. I. F. Histology of the body wall of the piscine leech, *Cystibranchnus mastacembeli* (Hirudinea: Piscicolidae) / Z. I. F. Rahemo, N. R. Hamad // Journal of Agricultural Science and Technology. – 2013. – Vol. 3. – P. 136-143.

17. Морфофункціональні особливості *Hirudo verbana* після гірудотерапевтичної процедури / [Сирцов В. К., Фролов О. К., Алієва О. Г. та ін.] // Запорожский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 106-108.
18. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes / [de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G. et all.] // *Tissue Cell*. – 2000. – Vol. 32, Is. 1. – P. 40-48.
19. Лебедев К. А. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология) / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М. : ЛИБРОКОМ, 2009. – 256 с.
20. Сапин М. Р. Иммунная система человека / М. Р. Сапин, Л. Е. Этинген. – М.: Медицина, 1996. – 304 с.
21. Галактионов В. Г. Эволюционная иммунология : учеб. пособ. / В. Г. Галактионов. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2005. – 408 с.
22. Bradbury S. The botryoidal and vaso-fibrous tissue of the leech *Hirudo medicinalis* / S. Bradbury // *Quarterly Journal of Microscopical Science*. – 1959. – Vol. 3-100. – P. 483-498.
23. Vetvicka V. Origins and functions of annelide immune cells: the concise survey / V. Vetvicka, P. Sima // *ISJ*. – 2009. – Vol. 6. – P. 138-143.
24. Сапин М. Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М. Р. Сапин, Д. Б. Никитюк. – М. : АПП «Джангар», 2004. – 184 с.
25. Sawyer R. T. Leech biology and behaviour. Vol. I-III / R.T. Sawyer. – Oxford: Clarendon Press, 1986. – xiv, 1065 p.
26. Zebe E. Metabolic changes in the medical leech *Hirudo medicinalis* following feeding / E. Zebe, F. Roters, B. Kaiping // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. – 1986. – Vol. 84, Is. 1. – P. 49-55.
27. Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами колец / А. К. Фролов, Р. А. Литвиненко, В. В. Копейка, Е. Р. Федотов // *Проблемы екології та медицини*. – 2012. – Т. 16, №5-6. – С. 37-40.
28. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология: пособ. / Г. Н. Дранник. – К. : Полиграфплюс, 2011. – 561 с.
29. Ивашкина В. Т. Гастроэнтерология. Национальное руководство: краткое издание / В. Т. Ивашкина, Т. Л. Лапина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 480 с.
30. Овсянникова В. В. Клинико-диагностическое значение функционально-морфологических изменений кишечника в развитии энцефалопатии при циррозах печени / В. В. Овсянникова, И. В. Козлова // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2010. – № 2. – С. 365-369.
31. Moes N. D. Autoimmune enteropathy in children / N. D. Moes, F. M. Ruemmele, E. H. Rings // *Ned. Tijdschr. Geneeskd*. – 2011. – Vol. 155. – P. 32-46.

REFERENCES

1. Kamenev O. Ju. Lechenie pijavkami: teorija i praktika girudoterapii: rukovodstvo dlja vrachej / O. Ju. Kamenev, A. Ju. Baranovskij. – SPb.: IG «Ves'», 2006. – 304 s.
2. Savinov V. A. Girudoterapija: rukovodstvo / V. A. Savinov. – М. : Medicina, 2004. – 432 s.
3. Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery / Abdullah S., Dar L. M., Rashid A., Tewari A. // *Arch. Clin. Exp. Surg*. – 2012. – Vol. 1, Is. 3. – P. 172-180.

4. Trofichni vlastyvoli ekotypiv medychnoi' p'javky v pryrodnyh vodojmyshhah i v umovah biotehnologii' / Frolov O. K., Kopijka V. V., Fedotov Je. R., Lytvynenko R. O. // Visnyk Zaporiz'kogo nacional'nogo universytetu. Biologichni nauky. – 2011. – № 1 – S. 117-122.
5. Rassadina E. V. Jekologicheski obosnovannaja biotehnologija vosproizvodstva *Hirudo medicinalis* L. v laboratornyh uslovijah: dis. ... kandidata biol. nauk : 03.00.23, 03.00.16 / E. V. Rassadina. – Ul'janovsk, 2006. – 199 s.
6. Indergand S. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech / S. Indergand, J. Graf // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 11. – P. 4735-4741.
7. Experiments on the possible role of leeches as vectors of animal and human pathogens: a light and electron microscopy study / [Nehili M., Ilk C., Mehlhorn H. et al.] // *Parasitol Res.* – 1994. – Vol. 80 (4). – P. 277-290.
8. Lytvynenko R. O. Zhyttjezdannist' formenyh elementiv krovi ljudyiny v kyshkovomu seredovyshhi medychnoi' p'javky / R. O. Lytvynenko // Visnyk Zaporiz'kogo nacional'nogo universytetu. Biologichni nauky. – 2013. – № 1. – C. 84-92.
9. Pokazateli gemopojeza v dinamike razvitija hronicheskoy reakcii transplantat protiv hozjaina / [Tkachev V. O., Gojman E. V., Lykov A. P. i dr.] // *Immunologija.* – 2006. – T. 27, № 3. – S. 168-170.
10. Romejs B. Mikroskopicheskaja tehnik / B. Romejs. – M.: Izd-vo inostr. lit., 1953. – 718 s.
11. Korzhevskij D. Je. Osnovy gistologicheskoy tehniki / D. Je. Korzhevskij, A. V. Giljarov. – SPb.: SpecLit., 2010. – 95 s.
12. Ultrastructure and functional versatility of hirudinean botryoidal tissue / [de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G. et al.] // *Tissue and Cell.* – 2001. – Vol. 33, Is. 4. – P. 332-341.
13. The multifunctional role of fibroblasts during wound healing in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea) / [Tettamanti G., Grimaldi A., Rinaldi L. et al.] // *Biol. Cell.* – 2004. – Vol. 96 (6). – P. 443-455.
14. Ras activation in *Hirudo medicinalis* angiogenic process / [Grimaldi A., Ferrarese R., Tettamanti G. et al.] // *ISJ.* – 2013. – Vol. 10. – P. 7-14.
15. Bol'shoj praktikum po zoologii bespozvonochnyh: ucheb. posobie. Ch. 2. Tipy: Kol'chatye chervi, Chlenistonogie / Ivanov A. V., Monchadskij A. S, Poljanskij Ju. I., Strelkov A. A. – M.: Vyssh. shk., 1983. – 543 s.
16. Rahemo Z. I. F. Histology of the body wall of the piscine leech, *Cystibranchnus mastacembeli* (Hirudinea: Piscicolidae) / Z. I. F. Rahemo, N. R. Hamad // *Journal of Agricultural Science and Technology.* – 2013. – Vol. 3. – P. 136-143.
17. Morfofunkcional'ni osoblyvosti *Hirudo* verbana pislja girudoterapevtychnoi' procedury / [Syrcev V. K., Frolov O. K., Alijeva O. G. ta in.] // *Zaporozhskij medycynskij zhurnal.* – 2013. – № 4. – S. 106-108.
18. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes / [de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G. et al.] // *Tissue Cell.* – 2000. – Vol. 32, Is. 1. – P. 40-48.
19. Lebedev K. A. Immunologija obrazraspoznajushhih receptorov (integral'naja immunologija) / K. A. Lebedev, I. D. Ponjakina. – M.: LIBROKOM, 2009. – 256 s.
20. Sapin M. R. Immunnaja sistema cheloveka / M. R. Sapin, L. E. Jetingen. – M.: Medicina, 1996. – 304 s.
21. Galaktionov V. G. Jevoljucionnaja immunologija: ucheb. posobie / V. G. Galaktionov. – M.: IKC «Akademkniga», 2005. – 408 s.
22. Bradbury S. The botryoidal and vaso-fibrous tissue of the leech *Hirudo medicinalis* / S. Bradbury // *Quarterly Journal of Microscopical Science.* – 1959. – Vol. s3-100. – P. 483-498.
23. Vetvicka V. Origins and functions of annelide immune cells: the concise survey / V. Vetvicka, P. Sima // *ISJ.* – 2009. – Vol. 6. – P. 138-143.
24. Sapin M. R. Immunnaja sistema, stress i immunodeficit / M. R. Sapin, D. B. Nikitjuk. – M.: APP «Dzhangar», 2004. – 184 s.
25. Sawyer R. T. Leech biology and behaviour. Vol. I-III / R. T. Sawyer. – Oxford: Clarendon Press, 1986. – xiv, 1065 p.
26. Zebe E. Metabolic changes in the medical leech *Hirudo medicinalis* following feeding / E. Zebe, F. Roters, B. Kaiping // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology.* – 1986. – Vol. 84, Is. 1. – P. 49-55.

27. Osobennosti reakcii blastnoj transformacii limfocitov krovi donorov stimulirovannoj rastitel'nymi lektinami i antigenami kol'checov / Frolov A. K., Litvinenko R. A., Kopejka V. V., Fedotov E. R. // Problemy ekologii' ta medycyny. – 2012. – T. 16, №5-6. – S. 37-40.
28. Drannik G. N. Klinicheskaja immunologija i allergologija: posobie / G. N. Drannik. – K.: Poligrafpljus, 2011. – 561 s.
29. Ivashkina V. T. Gastrojenterologija. Nacional'noe rukovodstvo: kratkoe izdanie / V. T. Ivashkina, T. L. Lapina. – M.: GJeOTAR-Media, 2012. – 480 s.
30. Ovsjannikova V. V. Kliniko-diagnosticheskoe znachenie funkcional'no-morfologicheskikh izmenenij kishechnika v razvitii jencefalopatii pri cirozah pecheni / V. V. Ovsjannikova, I. V. Kozlova // Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal. – 2010. – № 2. – S. 365-369.
31. Moes N. D. Autoimmune enteropathy in children / N. D. Moes, F. M. Ruemmele, E. H. Rings // Ned. Tijdschr. Geneesk. – 2011. – Vol. 155. – P. 32-46.

УДК 612:681:611.13

СТАН ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ У ДІТЕЙ У ВІЦІ ВІД 4 ДО 7 РОКІВ ЗАЛЕЖНО ВІД МОТОРНОЇ АСИМЕТРІЇ

Чинкін А.А.

*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»
01601, Україна, Київ, проспект Глушкова, 2*

chinkin.andrew@mail.ru

Проведено дослідження розвитку психофізіологічних функцій та точності короткочасної пам'яті залежно від моторної асиметрії півкуль головного мозку в дітей віком від 4 до 7 років. Визначено періоди найбільш інтенсивного розвитку психофізіологічних функцій у дітей з домінуванням правої та лівої руки. Виявлена тенденція до покращення показника точності короткочасної пам'яті (ТКЧП) з віком. Отримані дані про відмінності в розвитку психофізіологічних функцій у дітей залежно від рухової домінантності. У тестуванні взяли участь 233 дитини.

Ключові слова: функціональна асиметрія півкуль головного мозку (ФАПГМ), сенсомоторні реакції, латентний період, реакція вибору, проста сенсомоторна реакція, точність короткочасної пам'яті.

СОСТОЯНИЕ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ У ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ОТ 4 ДО 7 ЛЕТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОТОРНОЙ АСИММЕТРИИ

Чинкин А.А.

*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, УНЦ «Институт биологии»
01601, Украина, Киев, проспект Глушкова, 2*

chinkin.andrew@mail.ru

Проведено исследование развития психофизиологических функций и точности кратковременной памяти в зависимости от моторной асимметрии полушарий головного мозга у детей в возрасте от 4 до 7 лет. Выявлены периоды наиболее интенсивного развития психофизиологических функций у детей с доминированием правой и левой руки. Выявлена тенденция к улучшению показателя точности кратковременной памяти. Получены данные об отличиях в развитии психофизиологических функций у детей в зависимости от моторной асимметрии полушарий головного мозга. В тестировании приняли участие 233 ребенка.

Ключевые слова: функциональная асимметрия полушарий головного мозга (ФАПГМ), латентный период, сенсомоторные реакции, реакция выбора, простая сенсомоторная реакция, точность кратковременной памяти.

CONDITION OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL PROPERTIES AT CHILDREN IN THE AGE RANGE FROM 4 TILL 7 YEARS OLD DEPENDING ON MOTOR ASYMMETRY

Chinkin A.A

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of Biology
01601, Ukraine, Kyiv, Prospekt Hlushkov, 2*

chinkin.andrew@mail.ru

The research of development psychophysiological functions and accuracy of short-term memory depending on functional asymmetry of cerebral hemispheres in the age range from 4 till 7 years old. It is revealed the periods of the most intensive development psychophysiological functions at children with domination right, – the left hand, and also difference in short-term memory. The object of the research is psychophysiological functions of children of pre- school and junior school age. The subject of the research is functional asymmetry of cerebral hemispheres (FACH).

The methods of research. During carrying out of the research apparatus (realized in computer programs “Definition of psychophysiological indices of a man” by G.M. Chaichenko, M.Y.Makarchuk, N.B.Filimonova and “The program of testing of short- term memory” by doctor of biological science, professor M.Y.Makarchuk, candidate of physics and mathematics N.B.Filimonova) and also endorsement (form) methods (determination of FACH types was accomplished with “I.P.Pavlov test” and “The test- questionnaire for a definition of learning and thinking style” by Paul Torrens and the co-authors. (form B)) were used. These methods were approved and are used in research and educational institutions for the diagnostics of characteristics of various psychophysiological functions.

Children of the age range from 4 till 7 years old in amount of 233 persons from Kherson pre- school educations institutions №36 and №69 took part in the research. The analysis of development of functional asymmetry of cerebral hemispheres was carried out and connection of this asymmetry with memory development, right- handed and left- handed persons phenomenon was revealed.

Scientific novelty contains in revealing of the peculiarity of FACH forming and in accomplishing of comparative analysis in different groups of children (with speech defects and with normal development of speech function) of pre- school and junior school age (of 4-7 years old). The majority of similar research were made with children of the age range from 7 till 11 years old. According to the results of the present research work correlative analysis of FACH development with short term memory development will be accomplished.

The main expected scientific results of the research are determination of dynamics of FACH forming in ontogenesis period from 4 till 7 years and also the definition of influence of development of right or left hemisphere asymmetry on characteristics of short-term memory.

Practical importance of the work. The results of the present research could be used for organization of differential education of a child with taking into account FACH in direction of the most peculiar abilities of the person. The present approach will create the way to harmonious and directed development of a child in accordance with his or her abilities and modes of mastering of the information given during the study. The approach will create preconditions for spreading of the most effective methods of educations at school (according to ontogenesis of FACH) which are more productive than a search of “perfect methods”, because none of them could be suitable for each pupil at the same time.

Preliminary results of the research and their discussions. Obtained results perform that the majority of examinees display the motive domination of left cerebral hemisphere which is confirmed by the following facts.

It has been found out that at the age between 4 and 7 FANP (functional agility of neural process) is considerably increasing, the speed of primitive and complicate sensory-motor reactions is increasing too. Such progressive changes, to our mind, are connected with morphofunfunctional after ripening of cerebral cortex. Also at this age period some qualitative changes in cognitive development take place, and this is accompanied with the transaction from the preoperational stage to the stage of some certain operations (actions). But the most intensive development, which is confirmed by the data of section and longitude observations done in the children’s groups sorted on the left handedness and right handedness, corresponds to the age of 4- 6. The results of the work and their interpretation clarify the role of psychophysiological functions, particularly the features of he main neural processes and sensory-motor reaction with motional dominance of cerebral hemispheres; also the roles of functional agility of nerve processes and the brain capability in the formation of the intersystem relations as the basis of accommodative abilities of pre- school age children. The received results can be used in solving a member of practice problems in the scientific arrangement of learning activity; in particular the usage of differential approach of teaching children taking account FACH in prediction of their abilities and capacities.

Summing our data, we can claim, to the intensive development of the main psychophysiological functions happen (take place) to the children of 4- 6; we can also observe the increasing of the short- term memory capacity. Right handed children at the age between 4 and 7 have more advantages at this stage, the basis for this are physiological grounds as just at this particular period of ontogenesis the improvement of neural hemisphere interaction arrangement takes place. the further research of such abilities of the higher nervous activity as functional agility and the power of nervous processes, and their relevance of their consideration, all there facts should find their application in the teaching educational process when creating scientifically proved system of the preparation for studying. This will promote the optimization of general secondary, vocational and higher education of people with different motional dominance of cerebral hemispheres of human's brain.

Key words: functional asymmetry of cerebral hemispheres (FACH), functional agility of neural processes (FANP), latent period, sensory-motor reaction, reaction of a choice, simple sensory-motor reaction accuracy of short-term memory.

ВСТУП

Наше дослідження обумовлене необхідністю диференційованого підходу у вихованні і навчанні дітей з урахуванням ФАПГМ, а також психофізіологічних особливостей. Період життя дітей від чотирьох до семи років характеризується важливими морфофункціональними змінами у всій центральній нервовій системі, але в цей час найбільш інтенсивними темпами йде дозрівання головного мозку дитини. Зокрема, саме на цей вік припадають критичні періоди розвитку обох сигнальних систем [1-7]. В останні роки встановлено, що починаючи із чотирьох років, у головному мозку зменшується загальна кількість сірої речовини, що, імовірно, відбиває скорочення загальної кількості нейронів та синаптичних контактів: зберігаються лише ті, що включені у функціональні нейронні мережі. У цей же час відбувається паралельне збільшення маси білої речовини, яке пов'язане із завершенням процесу мієлінізації. Усі ці процеси морфогенезу головного мозку в кінцевому рахунку визначають диференціацію й інтеграцію функціонально неоднорідних ділянок мозку [1,5]. Особливий інтерес у цьому плані становить вивчення формування функціональної асиметрії півкуль головного мозку (ФАПГМ) у дітей, оскільки саме функціональна спеціалізація півкуль є одним із фундаментальних механізмів, які визначають характер сприйняття і обробки інформації, що надходить. Проблема сучасної школи полягає в тому, що теоретичні й методичні основи навчання головним чином орієнтовані на функціональну спеціалізацію лівої півкулі при сприйнятті інформації. Отже, в більш вигідних умовах перебувають "лівопівкульні" діти, "правопівкульні" – змушені пристосовуватися, тим самим створюючи проблеми педагогічного характеру.

Метою наших досліджень було вивчення механізмів міжпівкульної взаємодії головного мозку в дітей віком від 4 до 7 років на основі закономірностей формування та розвитку психофізіологічних функцій в онтогенезі, властивостей основних нервових процесів та їх зв'язку з сенсомоторними, психічними реакціями.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні як обстежувані взяли участь 233 дитини віком від 4 до 7 років. У всіх дітей моторну асиметрію визначали шляхом пробних тестувань та методом спостереження за поведінкою дитини їхніми батьками. У цьому дослідженні як пробні моторні тести для визначення домінування лівої чи правої руки застосовувались класичні „Луріївські проби”: переплетення пальців рук в «замок», аплодування, схрещування рук на грудях – «поза Наполеона». Визначення моторного домінування рук за спостереженням батьків проводили за методикою А.П. Чуприкова. Слід зазначити, що при виборі завдань тестування брали до уваги той факт, що в дітей приблизно в чотири роки формується чітка перевага однієї з рук, а до п'яти років встановлюється остаточне домінування правої або лівої руки [3]. За результатами зрізових спостережень були виділені групи дітей з превалюванням правої руки – «правші» та лівої руки – «лівші». До лівшів на основі моторних тестів було віднесено 62 дитини, а до правшів – 147 дітей; За спостереженнями батьків до лівшів було віднесено 38 дітей, а до правшів – 111 дітей. При проведенні лонгітудінального дослідження були

додатково виділені група правшів (16 дітей) та група лівшів (15 дітей), у яких відповідні дослідження проводили у віці 5 та 6 років. У всіх обстежуваних дітей досліджували функціональну рухливість нервових процесів (ФРНП), працездатність головного мозку (ПГМ), реєстрували латентні періоди простих (ПСР), та складних сенсомоторних реакцій або реакцій вибору (РВ) для лівої і правої руки, а також оцінювали точність короткочасної пам'яті (ТЧКП) на фігури та числа. Усі обстеження проводили із застосуванням спеціальної комп'ютеризованої методики для дослідження стану психофізіологічних функцій людини (Чайченко Г.М., Макарчук М.Ю., Філімонова Н.Б.) [8]. Під час тестування діти перебували в довірчій, добре знайомій обстановці, тестування проводилося по черзі з 15-хвилинними інтервалами в окремому кабінеті психолога. Схему експерименту можна представити у вигляді двох етапів: I) підготовчий; II) тестування за комп'ютерною експрес- методикою.

I) Перший етап. Дітям від 4-х років, для навчання їх роботі з комп'ютерною програмою, була розроблена така методика. Були виготовлені з кольорового картону фігури (вони відповідали кольору фігур на екрані – зеленому)

Експериментатор, пред'являючи їх, акцентував увагу дитини на умовах пропонованого тесту. Він голосно аналізував вірні й неправильні відповіді. Після роботи з паперовими фігурами дитина відпочивала і спостерігала, як працює з комп'ютерною програмою її одноліток.

II) Другий етап. Лише після усіх вищеописаних заходів дитина переходила безпосередньо до комп'ютерного тестування, результати якого повторювалися. Також була змінена стандартна комп'ютерна клавіатура, використовувана при тестуванні: були вилучені клавіші з її правої і лівої частини, щоб увага дитини не розсіювалася; на клавіші «z» і «/» були наклеєні відповідні символи трикутника й квадрата.

Результуючими були найкращі показники, які були отримані в одному із двох обстежень.

Для всіх наявних вибірок даних перевірена гіпотеза нормальності розподілу (за допомогою оцінок асиметрії A_s , ексцесу E_x і критерію Колмогорова-Смірнова). Для кожної вибірки обчислювали середньовибіркові характеристики. При відповідності нормальному закону розподілу ознаки, перевірка гіпотези про рівність середніх вибірових величин виконувалась з використанням t-критерію Стьюдента-Фішера. У випадку невиконання умов застосування t- критерію застосовували його непараметричні аналоги: U – критерій Манна Уїтні, двовибірковий критерій Колмогорова-Смірнова. Розходження вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$. Для оцінки кореляційної залежності результатів, що не підкоряються критерію нормального розподілу, використали коефіцієнти рангової кореляції Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вікова динаміка сенсомоторних реакцій різного ступеня складності та психофізіологічних функцій у дітей віком від 4 до 7 років. Одним із першочергових завдань було вивчення особливостей розвитку сенсомоторних реакцій та психофізіологічних функцій у дітей дошкільного віку (4-7 років). Було сформовано 2 групи: загальна (233 дитини); лонгітудінального дослідження (16 дітей)

Отримані результати свідчать, що в період з 4-х до 7-ми років зростають ФРНП, ПГМ та швидкість простих і складних сенсомоторних реакцій. Аналізуючи одержані дані, можна було припустити, що зростання показників ФРНП та ПГМ у віці від чотирьох до семи років пов'язане зі звиканням дітей до виконання завдань, тобто з формуванням умовних рефлексів, що, безперечно, не могло б не вплинути на швидкість обробки досліджуваними тієї чи іншої інформації, але в кожному режимі роботи передбачалась різна послідовність подання подразників, що виключало можливість запам'ятовування послідовності сигналів. Отже, отримані результати підтвердили правильність наших попередніх висновків стосовно прогресивних змін ФРНП та ПГМ в обстежуваній віковій групі. У нашому дослідженні

особливо виразним було зростання ФРНП у 5-6 років, – приріст склав 14,49%. Саме на цей період значною мірою припадає дозрівання структур неокортекса.

Експериментально отримані дані вказують на те, що з віком зменшується тривалість латентних періодів і простих, і складних сенсомоторних реакцій. Латентні періоди простих та складних сенсомоторних реакцій зростають у віці від 4-х до 7-ми років. Найбільш інтенсивний приріст ЛП ПСР та РВ припадає на період між 5 і 6 роками (табл. 1). Результати лонгітудинальних спостережень підтверджують це ствердження і мають такий приріст: ЛП ПСР (у 5-6 років) – 28 %, ЛП РВ(4-5 років) – 28,3%.

Таблиця 1 – Статистичні показники психофізіологічних властивостей у дітей 4 – 7 років (зрізові спостереження) (M±m).

Показники	Вікові групи дітей (n=233)			
	4 роки (n= 38)	5 років (n= 90)	6 років (n=72)	7 років (n=33)
ЛП ПСР(мс)	657,98± 26,12	598,19± 17,09	455,05± 16,98***	452,46± 19,12
ЛП РВ (мс)	1105,95± 49,66	960,43±22,59*	750,44±19,30***	724,43± 21,23
РВ ПРАВА (мс)	1123,65± 55,31	982,49±27,18*	765,16±23,56***	751,52±19,99
РВ ЛІВА (мс)	1227,63±66,08	1040,35± 29,97*	813,09±29,02***	764,19± 28,39
ФРНП (мс)	1596,61± 48,82	1471,53± 27,91*	1258,36±33,43***	1077,03± 50,88**
ПГМ (n-помилко)	30,03±1,93	23,09±1,34**	17,41±1,11**	14,45±1,26

Примітка:* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – різниці достовірні між показниками порівняння вибірок 4-річних з 5-річними; 5-річних з 6-річними; 6-річних з 7-річними.

Найбільший приріст ПГМ в зрізових дослідженнях спостерігався в період з 5 до 6 років і становив 24,6%; у лонгітудинальних дослідженнях в період з 4 до 5 років і становив 42%. Також у 5-6-річному віці ПГМ та ФРНП мають кращі значення в дітей з превалюванням правої руки.

Результати кореляційного аналізу показників ЛП ПСР у дітей 4-7 років з рівнем ФРНП та ПГМ свідчать про відсутність зв'язку між ЛП ПСР та властивостями основних нервових процесів, окрім 4-річних дітей, де зв'язок спостерігався між показниками ЛП ПСР та ФРНП (табл. 2). Відсутність достатніх значень кореляції між ФРНП та латентними періодами простої сенсомоторної реакції, може бути обумовлена тим, що ці реакції являють собою умовно-рефлекторну відповідь, яка реалізується без складної аналітичної діяльності вищих відділів центральної нервової системи. На нашу думку, існування взаємозв'язків між латентними періодами складних сенсомоторних реакцій та ФРНП у цьому віковому періоді зумовлено тим, що в їх основі лежить швидкість відповіді на умовний подразник. Виявлене збільшення швидкості реагування в цій віковій групі може підтверджуватись тим, що саме в ранньому дитинстві найбільш інтенсивно відбувається мієлінізація провідних шляхів моторних рефлексів і зорового аналізатора. Дещо пізніше мієлінізуються рухові шляхи, необхідні для організації більш складних рухів, і нарешті останніми мієлінізуються волокна, шляхи й структури, які керують увагою, зорово-моторною координацією, процесами пам'яті й навчання, що тісно корелює з ростом когнітивних і рухових здібностей і якостей дитини в дошкільні роки [9].

Отримані результати зрізових досліджень формування психофізіологічних функцій підтверджуються також і лонгітудинальними даними(табл.3). Лонгітудинальні дослідження показали, що найбільше зростання ФРНП відбувається в період з 5-ти до 6-ти років. Аналіз експериментальних даних, одержаних в процесі лонгітудинальних досліджень, підтвердив висновок про прогресивні зміни властивостей основних нервових процесів у дітей в період з 4-х до 7-ми років.

Таблиця 2 – Коефіцієнти кореляції та їх вірогідність між показниками властивостей основних нервових процесів та сенсомоторних реакцій у дітей 4-7 років

Вікові групи		Функціональна рухливість нервових процесів			
		ЛП ПСР	ЛП РВ	ЛП РВ п	ЛП РВ л
Діти 4-х років	R	-0,35	0,37	0,38	0,43
	P	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Діти 5-ти років	R	0,16	0,36	0,35	0,32
	P	-	<0,05	<0,05	<0,05
Діти 6-ти років	R	0,11	0,36	0,33	0,33
	P	-	<0,05	<0,05	<0,05
Діти 7-ми років	R	0,04	0,20	0,22	0,17
	P	-	-	-	-
Вікові групи		Працездатність головного мозку			
		ЛП ПСР	ЛП РВ	ЛП РВ п	ЛП РВ л
Діти 4-х років	R	-0,26	0,33	0,37	0,44
	P	-	<0,05	<0,05	<0,05
Діти 5-ти років	R	0,17	0,25	0,27	0,23
	P	-	-	<0,05	-
Діти 6-ти років	R	0,22	0,29	0,29	0,26
	P	-	<0,05	<0,05	-
Діти 7-ми років	R	-0,16	0,34	0,32	0,37
	P	-	<0,05	<0,05	<0,05

Це узгоджується з даними [3], що в період від 4-х до 7-ми років відбувається зростання функціональної зрілості мозку, про що свідчать дані електроенцефалографічних досліджень. Також відомо, що деякі психофізіологічні зміни відбуваються поступово, інші пов'язані з різким прискоренням дозрівання й наявністю якісних змін. Один з таких стрибків припадає на вік від 5-ти до 7-ми років. За Ж.Піаже, у цей період відбуваються якісні зміни в когнітивному розвитку, що супроводжують перехід від операційної стадії до стадії конкретних операцій. Отже, діти в п'ять-сім років перебувають на якісно різних ступенях розвитку. У генетиці поведінки цей вік (від п'яти до семи років) також характеризується певними якісними змінами. Так, Колорадське дослідження [11] прийомних дітей показало появу нових генетичних факторів у детермінації IQ саме на цьому віковому відрізку. Аналіз отриманих експериментальних даних дозволяє говорити, що індивідуальні відмінності складних сенсомоторних реакцій значною мірою залежать від рівня функціональної рухливості нервових процесів та працездатності головного мозку.

Таблиця 3 – Показники психофізіологічних функцій у дітей 4-6 років (лонгітудинальне дослідження, (n=12))

Показники	КС НС	ЛП ПСР	ЛП РВ	ЛП РВ (права)	ЛП РВ (ліва)	ФРНП	ПГМ
Діти 4-х років	0,66± 0,05	657,31± 27,16	1230,02± 100,96	1212,63± 122,13	1403,45± 137,64	1741,25± 79,34	33,25±4,43
Діти 5-ти років	0,69± 0,05	519,56± 30,20	881,72± 78,39	922,61± 83,02	917,66± 76,61	1313,67± 95,28	19,25±2,57
Діти 6-ти років	0,71±0,04	374,61± 22,58	646,76± 35,12	663,52± 34,40	689,95± 38,94	1159,83± 93,86	15,00±2,83

Розвиток короткочасної пам'яті. Поряд з покращенням розвитку нейродинамічних функцій (ФРНП, ПГМ, ЛП ПСР та ЛП РВ) у дітей дошкільного віку спостерігається також і покращення особливостей запам'ятовування за показниками комплексного показника та точності короткочасної пам'яті на деякі види подразників (фігури, літери та числа) у більшості випадків на достовірні величини (табл. 4).

Таблиця 4 – Характеристика змін показників короткочасної пам'яті в різних вікових групах (M±m)

Показники розвитку короткочасної пам'яті	Пред'явлені об'єкти	Вікові групи обстежених дітей			
		4 роки (n=38)	5 років (n=90)	6 років (n=72)	7 років (n=33)
КПКЧП	Літери	—	0,32± 0,01**	0,49± 0,02	0,45± 0,02
	Числа	—	0,35± 0,01	0,35± 0,01**	0,40± 0,02**
	Фігури	0,26± 0,01**	0,33± 0,02**	0,40± 0,01**	0,39± 0,01**
ТКЧП	Літери	—	0,43± 0,01**	0,40± 0,01**	0,33± 0,01**
	Числа	—	0,47± 0,01**	0,43± 0,01**	0,35± 0,02**
	Фігури	0,58± 0,01	0,51± 0,01**	0,47± 0,01**	0,39± 0,02**

Примітка: ** - p<0,05

Результати лонгітудинальних досліджень короткочасної пам'яті підтверджують дані (табл. 5). Вони дозволяють стверджувати, що покращення показників особливостей запам'ятовування в цьому віковому аспекті також можна пояснити з дозріванням певних структур головного мозку.

Із літературних джерел відомо, що важливу роль у прояві психічних функцій відіграє рівень розвитку індивідуально-типологічних властивостей ВНД, зокрема функціональної рухливості та сили нервових процесів (працездатності головного мозку). Для підтвердження цієї гіпотези ми використали кореляційний аналіз зв'язку продуктивності запам'ятовування з показниками властивостей основних нервових процесів.

Таблиця 5 – Показники обсягу пам'яті в дітей 4-6 років (лонгітудинальне дослідження, (n=12))

Показники	КПКЧП фігури	ТКЧП фігури	КПКЧП літери	ТКЧП літери	КПКЧП цифри	ТКЧП цифри
Діти 4-х років	0,26± 0,02	0,57± 0,02	-	-	-	-
Діти 5-ти років	0,29± 0,01	0,41± 0,02	0,41± 0,05	0,43± 0,03	0,36± 0,04	0,47± 0,01
Діти 6-ти років	0,54± 0,08	0,37± 0,04	0,44± 0,05	0,38± 0,03	0,43± 0,05	0,45± 0,03

Кореляційний аналіз показав, що між функціональною рухливістю та працездатністю головного мозку, з одного боку, та з показниками обсягу короткочасної пам'яті, з іншого, не завжди спостерігаються достовірні зв'язки. Так, ми спостерігаємо достовірні зв'язки між властивостями та функціями, що вивчаються в більшості вікових груп серед властивостей основних нервових процесів та точністю короткочасної пам'яті. Проведення кореляційного аналізу між ФРНП, ПГМ та ТКЧП виявило, що у 4-річному віці існує лише тенденція до зв'язку між ФРНП та ТКЧП(фігури), у 6 років кореляційний зв'язок між ФРНП та ТКЧП

(числа) становить ($r=0,38$, а зв'язок між ТКЧП (фігури) та ФРНП зменшується ($r=0,30$), також проявляється кореляційний зв'язок між ТКЧП (фігури) та ПГМ ($r=0,38$). У семи річному віці з'являється досить міцний зв'язок між ФРНП та ТКЧП(літери) ($r=0,54$). Цей факт можна пояснити, процесом активного навчання і пояснює пріоритети при запам'ятовуванні фігур, чисел і літер. Якщо у віці 4-х років діти майже не знають чисел і літер, то у віці від 6 до 7 років саме ці сигнали для них стають більш впізнаними і становлять високий інтерес, тобто є більш пріоритетними. Також отримані результати підтверджують, що рахувати діти навчаються раніше і швидше, ніж читати. За отриманими результатами діти з високим рівнем ФРНП мають переваги при запам'ятовуванні порівняно зі своїми однолітками з низьким рівнем ФРНП. Статистичний аналіз середніх значень показників пам'яті на слова, числа та фігури у дітей віком від 4-х до 7-ми років показав достовірність їх відмінностей.

Вікова динаміка сенсомоторних реакцій різного ступеня складності та психофізіологічних функцій у дітей з різною руховою домінантністю віком від 4 до 7 років. Проведені дослідження показали, що як і серед дорослих, серед обстежених дітей всіх вікових груп переважну кількість дітей складають правші. Однак серед лівшів нами було виявлено приблизно – 38% амбідекстрів. Це дозволяє припустити, що в лівшів латералізація функцій у півкулях головного мозку є не такою сильною, як у правшів. Лонгітудинальні дослідження на одних і тих же дітях показали, що в п'ять років діти-правші мають більш високу ФРНП та ПГМ в порівнянні з дітьми-лівшами (рис.1-2). Загалом такий результат можна пояснити тим, що дозрівання кожної півкулі відбувається не однаково і не одночасно. Зокрема показано, що більш динамічно у віці від 3 до 7 років розвивається ліва півкуля [1], що, можливо, і надає переваги праворуким дітям над ліворукими, що і виявляється у відповідній різниці ФРНП і ПГМ в обстежених нами дітей.

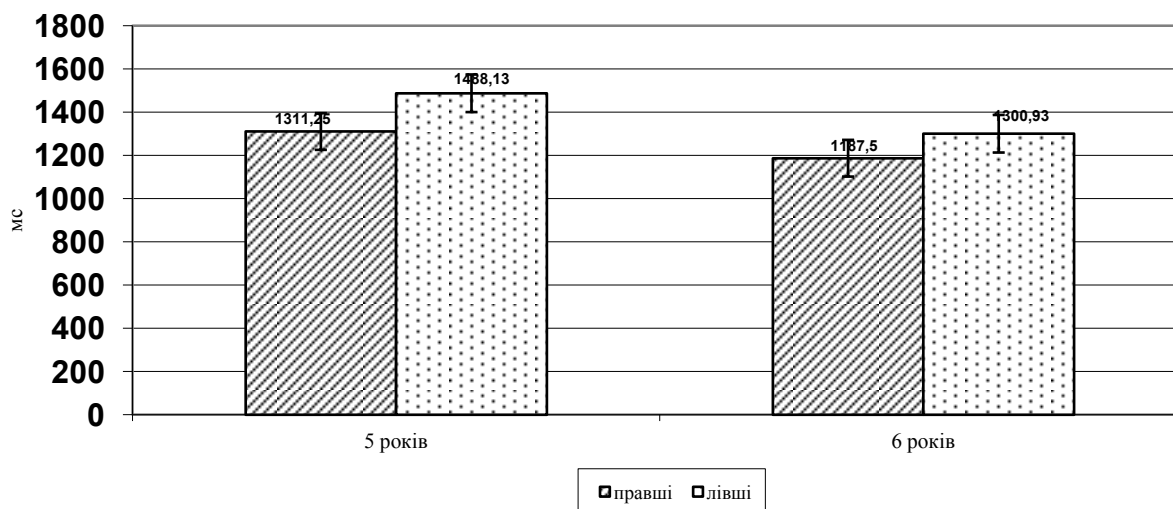


Рис. 1. Функціональна рухливість нервових процесів (мс) у дітей-правшів та лівшів у віці 5 та 6 років.

Аналіз даних у групах дітей-правшів та лівшів, виділених за моторними тестами (табл. 6), показав, що достовірні зміни спостерігались у дітей-лівшів у віці від 5 до 6 років (РВ, РВ права, ліва), і в 6-7 років (РВ, РВ права, ліва, ФРНП). У правшів у віці від 4-5 років (РВ, РВ права, ліва, ПГМ), і 5-6 років (ПСР, РВ, РВ права, ліва, ФРНП). У групах дітей-правшів і лівшів, розділених за спостереженнями батьків (табл.7) було виявлено, що лівші мають кращі показники, ніж праворукі за ПСР у 6-7 років, ЛПРВ у 4-6 років, ФРНП у 6 років, тоді як ПГМ була вищою у вікових категоріях від 5-7 років у правшів, а у віці 4-х років ПГМ була однаковою в правшів і в лівшів. При цьому виявлено також, що в дітей-лівшів достовірні зміни досліджуваних показників відбувалися лише в період від 5 до 6 років (ПСР, РВ, ФРНП), тоді як у дітей правшів у 4- 5 років (ПСР, РВ, ПГМ), 5- 6 років (ПСР, РВ, ФРНП,

ПГМ) та 6 - 7 років (ФРНП, ПГМ). Отримані результати, крім того вказують на те, що віковий період 5-6 років є часом найбільш інтенсивних змін функціональних можливостей мозку, що особливо характерне для дітей-лівшів.

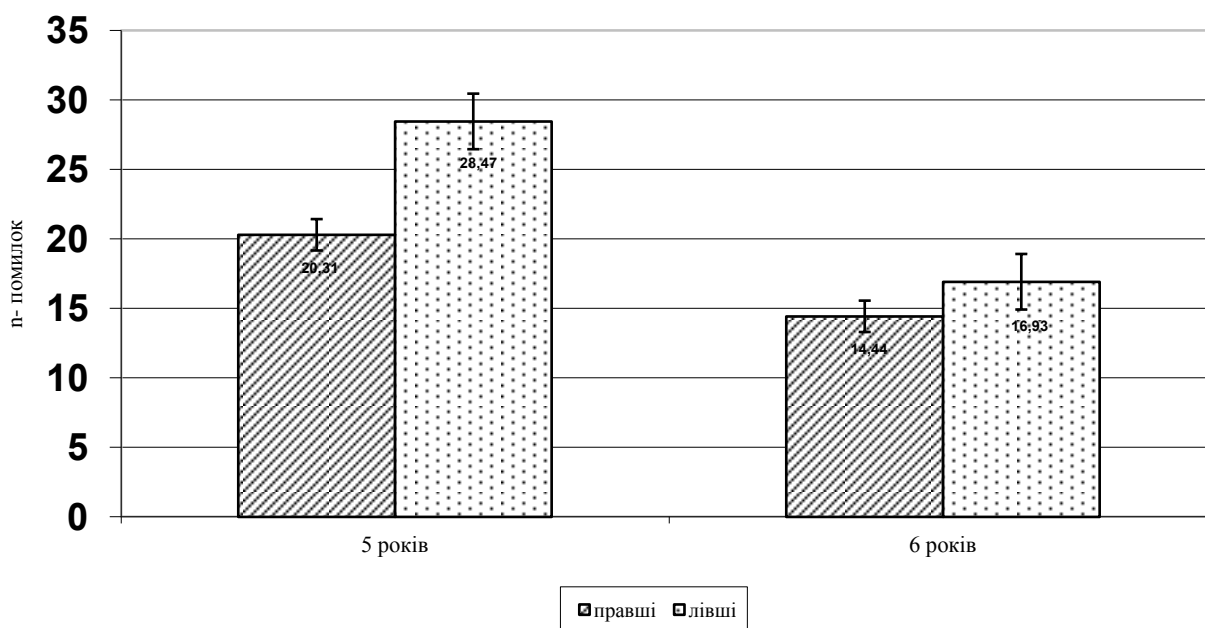


Рис. 2. Показник працездатності головного мозку (кількість помилок) у дітей-правшів та лівшів у віці 5 та 6 років.

Результати цього тривалого дослідження загалом показали, що у віці від 4-х до 7-ми років суттєво зростають ФРНП, збільшується швидкість простих і складних сенсомоторних реакцій. Такі прогресивні зміни, на нашу думку, пов'язані з морфофункціональним дозріванням кори головного мозку, що відбуваються в цьому віці. Також у цей віковий період відбуваються якісні зміни в когнітивному розвитку, що супроводжують перехід від стадії доопераціональної до стадії конкретних операцій. Але найбільш інтенсивний розвиток, який підтверджується даними зрізових і лонгітудинальних спостережень, зроблених у групах дітей, розподілених за право-, ліворукістю, припадає на вік 4-6 років.

Проведений кореляційний аналіз у дітей-правшів і дітей-лівшів виявив достовірні ($p < 0,05$) зв'язки в дітей правшів у 5 років між ЛП ПСР та РВ (коефіцієнт кореляції = 0,81), ПСР та ФРНП (0,45), РВ та ФРНП (0,60), РВ та ПГМ (0,64). У 6 років не було виявлено значимих зв'язків між РВ та ФРНП. У дітей-лівшів протягом усього дослідженого нами вікового періоду ми спостерігали зміцнення зв'язків між РВ, ФРНП та ПГМ. При цьому встановлено також наявність кореляції між ФРНП та латентними періодами РВ, а також між ПГМ у 5 річному віці. Виходячи з даних, отриманих у дослідженні, можна припустити, що у віці від 4 до 5 років у дітей структура півкуль головного мозку ще недостатньо спеціалізована, тому в цей вік не відбувається активного зменшення ЛП сенсомоторних реакцій та покращення психофізіологічних функцій. Досить незначні відмінності між правшами і лівшами пояснюються тим фактом, що в цьому віці півкулі головного мозку досить рівнозначні для виконання одного й того ж завдання, і при необхідності можуть об'єднувати свою роботу. Із підвищенням віку вже у 5-6 років, коли робоче навантаження занадто високе, робота двох півкуль у старших дітей краща, тому що в них більш високий ступінь мієлінізації аксонів мозолистого тіла і, як наслідок, це впливає на збільшення швидкості передачі інформації з однієї півкулі в іншу.

Аналіз отриманих даних, що стосуються точності короточасної пам'яті у дітей правшів, дає змогу стверджувати, що ці діти суттєво переважають дітей-лівшів у здатності до числової короточасної пам'яті.

Таблиця 6 – Стан основних психофізіологічних функцій у дітей-правшів та лівшів, виділених за моторними тестами (M±m).

Показники	Діти-лівші				Діти-правші			
	4 (n=12)	5 (n=24)	6 (n=16)	7 (n=10)	4 (n=27)	5 (n=65)	6 (n=41)	7 (n=14)
ПСР (мс)	657,44± 43,00	601,08± 35,94	534,41± 67,80	429,70± 28,01	696,08± 34,35	626,29± 27,44	470,81± 26,01*	537,07± 49,31
ЛПРВ (мс)	1003,12± 71,84	973,09± 41,91	808,96± 37,43**	695,89± 37,06**	1179,94± 69,90	977,66± 36,27**	760,02± 52,49*	790,06± 39,68
РВ права (мс)	1102,28± 83,50	1058,94± 49,68	874,59± 48,08**	748,88± 40,32***	1159,38± 79,62	981,94± 43,65***	744,50± 31,02*	796,96± 37,70
РВ ліва (мс)	1001,22± 66,63	979,67± 44,04	814,88± 29,75*	700,81± 34,99**	1368,59± 92,24	1087,95± 46,96**	865,77± 81,38**	861,75± 53,59
ФРНП (мс)	1493,50± 138,44	1438,00± 74,50	1408,29± 114,23	1130,40± 94,87*	1682,63± 74,36	1541,35± 44,82	1229,10± 99,11*	1084,67± 92,45
ПГМ (п-помилки)	23,13± 6,33	27,25± 4,04	18,29± 4,06	12,40± 1,23	34,68± 2,83	23,12± 1,99*	19,43± 3,20	16,17± 2,66

Примітка: * – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,05$.

Таблиця 7 – Стан основних психофізіологічних функцій у дітей-правшів та лівшів, виділених за спостереженнями батьків (M±m).

Показники	Діти-лівші				Діти-правші			
	4 (n=8)	5 (n=16)	6 (n=11)	7 (n=3)	4 (n=21)	5 (n=44)	6 (n=27)	7 (n=19)
ПСР (мс)	716,61± 60,68	686,77± 53,05	439,92± 25,94*	461,67± 93,03	673,54± 29,75	595,13± 23,13***	502,63± 27,23**	492,47± 32,65
ЛПРВ (мс)	1061,27± 63,82	1055,84± 70,99	757,73± 67,09*	747,63± 140,44	1157,79± 75,64	947,57± 34,53**	770,51± 32,26*	747,19± 28,94
РВ ПРАВА (мс)	1061,75± 84,11	1084,59± 69,23	744,07± 38,74*	762,05± 145,45	1174,82± 80,27	972,62± 41,06**	778,13± 25,97*	777,17± 23,80
РВ ЛІВА (мс)	1213,75± 84,83	1150,85± 85,41	857,86± 101,97**	798,26± 148,39	1287,63± 100,64	1025,71± 46,62**	848,02± 50,03*	787,07± 39,89
ФРНП (мс)	1630,50± 87,09	1629,00± 92,63	1227,09± 85,22*	1328,67± 218,64	1624,95± 80,08	1469,82± 42,48	1271,10± 60,92**	1070,21± 61,33**
ПГМ (п-помилки)	31,25± 5,16	25,00± 2,90	25,45± 3,99	27,67± 5,47	31,26± 3,17	23,68± 2,19***	16,43± 1,74**	12,37± 0,91***

Примітка: * – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,05$

У дітей-лівшів, на відміну від правшів, добре розвинутою була лише образна короткочасна пам'ять на фігури (рис. 4). Також слід зазначити, що в дітей-правшів зміни ТКЧП (фігури) (44% помилок; $m \pm 0,02$) у віці від 5 до 6 років були меншими, ніж у дітей-лівшів (38% помилок; $m \pm 0,02$) (рис. 3). Підтвердити цей факт може те, що правопівкульним дітям легше здійснювати переробку складного образного матеріалу (геометричні фігури). Одержані результати (рис.3) у дітей-правшів у 5 років показник ТКЧП (цифри) склав 42% помилок ($m \pm 0,03$), ТКЧП (літери)- 43% ($m \pm 0,02$), у 6-річному віці ТКЧП (цифри) склав 33% помилок ($m \pm 0,02$), ТКЧП (літери) – 36% ($m \pm 0,02$). ($p \leq 0,05$) За даними [11], розвиток півкуль головного мозку відбувається асинхронно. Розвиток лівої півкулі, яка відповідає за лінгвістичні здібності, відбувається прискорено у віці від 3 до 6 років, після чого уповільнюється. Дозрівання правої півкулі в ранньому дитинстві, навпаки, йде більш повільними темпами, і прискорюється у віці від 8 до 10 років. Проте цей факт підтверджується отриманими даними, що праворукі діти у віці від 5 до 6 років змогли виконати не тільки завдання на запам'ятовування геометричних фігур, але і запам'ятовувати цифри та літери.

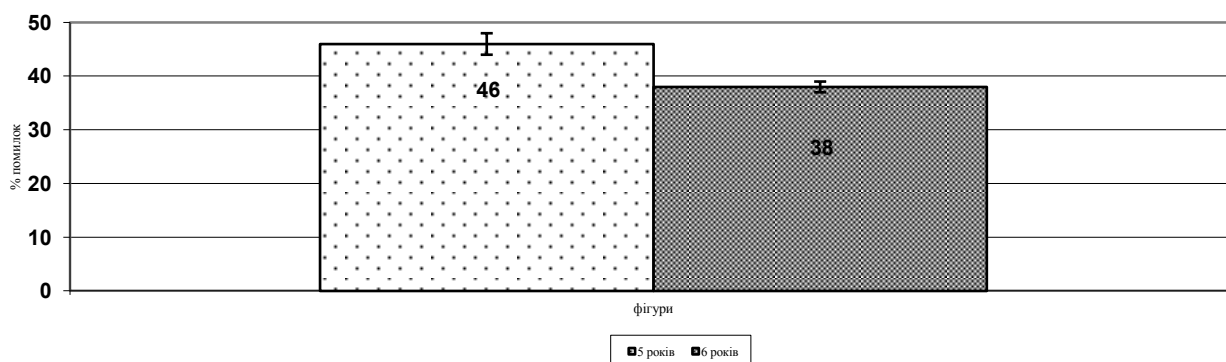


Рис. 3. Показники точності короточасної пам'яті, в дітей лівшів у віці 5 та 6 років.

Статистичний аналіз середніх значень показників пам'яті на слова, числа та фігури в дітей віком від 4 до 7 років показав достовірність їх відмінностей ($p \leq 0,05$). Проведений кореляційний аналіз між ФРНП, ПГМ та ТКЧП виявив, що в 4 річному віці існує кореляційний зв'язок середньої сили між ФРНП та ТКЧП(фігури) ($r = 0,33$ при $p < 0,05$). В 6 років зв'язок між ТКЧП (фігури) та ФРНП зменшується ($r = 0,30$ при $p < 0,05$), також проявляється кореляційний зв'язок між ТКЧП (фігури) та ПГМ ($r = 0,38$ при $p < 0,05$). У 7-річному віці виникає досить міцний зв'язок між ФРНП та ТКЧП (літери) ($r = 0,54$ при $p < 0,05$).

Цей факт може бути пов'язаний із формуванням активного навчання і пояснює пріоритети при запам'ятанні фігур, чисел і літер. Якщо у віці 4-х років діти майже не знають чисел і літер, то у віці від 6 до 7 років саме ці сигнали для них стають більш впізнаваними і становлять високий інтерес, тобто стають пріоритетними. Наші результати загалом підтверджують положення про те, що діти навчаються раніше і швидше рахувати ніж читати. Результати лонгітудинальних досліджень підтвердили правильність висновку стосовно динаміки вікових змін тривалості сенсомоторних реакцій, нервових процесів у дітей 4-7-річного віку і сприяли їх поглибленому вивченню.

Так, було показано, що найбільший приріст швидкості ПСР та РВ відбувається в 5-6 років. У групах правшів-лівшів цей приріст був більш динамічний у правшів. Лонгітудинальні дослідження підтвердили висновок і про те, що нерівномірність зростання є характерною і для властивостей основних нервових процесів. Функціональна рухливість нервових процесів, згідно з нашими даними, найбільш інтенсивно зростає в дітей в 5-6 років. На цей період припадає і стрімке збільшення працездатності головного мозку та точності короточасної пам'яті.

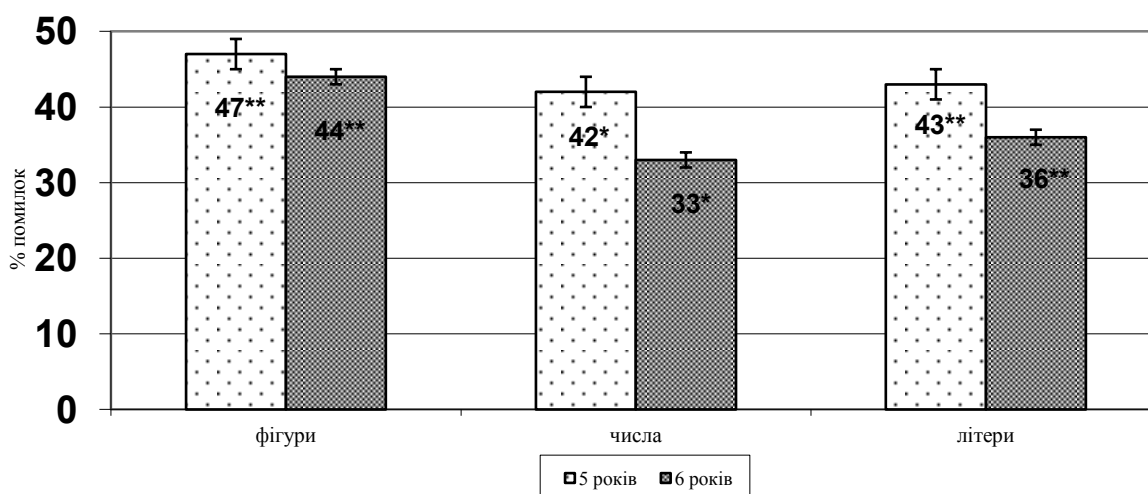


Рис. 4 Показники точності короточасної пам'яті в дітей-правшів у віці 5 та 6 років.

Примітка: * – $p \leq 0,01$; ** – $p \leq 0,05$

Узагальнюючи наші дані, можна стверджувати, що в дітей у період з чотирьох до семи років відбувається інтенсивний розвиток основних психофізіологічних функцій та збільшується обсяг короткочасної пам'яті. При цьому діти правші у віці від 4 до 7 років мають значні переваги в такому розвитку, основою чого є фізіологічне підґрунтя, оскільки саме в цей період онтогенезу прискореними темпами відбувається удосконалення нейронної організації взаємодії півкуль [1, 10].

Результати роботи та їх інтерпретація дають можливість з'ясувати роль психофізіологічних функцій, зокрема властивостей основних нервових процесів та сенсомоторного реагування, з руховою домінантністю півкуль головного мозку; роль функціональної рухливості нервових процесів та працездатності головного мозку у формуванні міжсистемних зв'язків як основи пристосувальних можливостей організму дітей дошкільного віку. Отримані дані можуть застосовуватися при вирішенні низки практичних питань у науковій організації навчальної діяльності, зокрема використання диференційованого підходу навчання дітей з урахуванням ФАПГМ, прогнозуванні їхніх здібностей та схильностей.

Подальше дослідження ролі таких властивостей ВНД, як функціональна рухливість і сила нервових процесів та доцільність їх врахування, слід застосовувати в навчально-виховному процесі під час розробки науково обґрунтованої системи підготовки до навчання. Це сприятиме оптимізації загальноосвітньої, середньоспеціальної та вищої освіти людей з різною руховою домінантністю півкуль головного мозку.

ВИСНОВКИ

1. У віковому періоді від 4-х до 7-ми років відбувається активне формування нейродинамічних та психічних функцій, що проявляється в покращенні параметрів простих і складних сенсомоторних реакцій та в зростанні обсягу короткочасної зорової пам'яті.
2. Властивості основних нервових процесів та сенсомоторних реакцій різної складності перебувають у відповідному зв'язку з руховою домінантністю півкуль головного мозку. Діти з правобічною руховою латералізацією півкуль головного мозку характеризуються кращими показниками простої сенсомоторної реакції, середніх значень реакції вибору, реакції вибору для лівої руки та працездатності головного мозку. Кращими результатами в діагностуванні функціональної рухливості характеризувалися, передусім, діти з лівобічною руховою латералізацією.
3. У віковий період від 5 до 6 років відбуваються найбільш істотні зміни основних психофізіологічних функцій і в дітей-правшів, та і у дітей-лівшів.
4. У зрізових та лонгітудінальних дослідженнях встановлено покращення особливостей продуктивності запам'ятовування в дітей дошкільного віку на різний пред'явлений матеріал. Діти з лівобічною руховою латералізацією характеризувалися кращими показниками обсягу короткочасної пам'яті на числа та літери. Точність короткочасної пам'яті на фігури вищою виявилася в ліворуких дітей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кирилова А.В. Психофизиологические исследования биоэлектрической активности головного мозга человека. / А.В. Кирилова, Л.Д. Лесова, Е.В. Архангельская // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т.52, №. 2. – С. 38-39.
2. Киселев С.Ю. Время сенсомоторной реакции у детей дошкольного и младшего школьного возраста / С.Ю. Киселев, В.И. Лупандин // Журнал высш. нерв. деят. – 1997. – Т.47. – Вып.1. – С. 159-162.
3. Коробейникова Л.Г. Особенности развития психофизиологических функций у детей младшего школьного возраста / Л.Г. Коробейникова // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т. 52, №. 2. – С. 42.

4. Коробейников Г.В. Психофизиологические механизмы умственной деятельности человека / Г.В. Коробейников – К. : Укр. фітосоціологічний центр, 2002. – С. 7-27
5. Крайг Г. Психология развития / Грэйс Крайг. – 7-е изд. – СПб. : Питер, 2000. – 992 с.
6. Шэффер Д. Дети и подростки: психология развития. / Дэвид Шэффер. -6-е изд. – СПб. : Питер, 2003. – 976 с.
7. Филиппов М.М. Психофизиология функциональных состояний / М.М. Филиппов – К. : МАУП, 2006. – 240 с.
8. Філімонова Н.Б. Особливості обробки зорових стимулів у короткочасній пам'яті при їх одномоментному пред'явленні / Н.Б. Філімонова, Т.В. Куценко // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т. 52, №. 2. – С. 75.
9. Dronkers. D. C. Right-sided neglect in a left hander: evidence for reversed hemispheric specialization of attention capacity /, D. C. Dronkers, , R. T. Knight – *Neuropsychologia*. – 1998. – Vol.27. – P. 729-735.
10. Roland S. J. How a Lateralized Brain Supports Symmetrical Bimanual Tasks / [Roland S. Johansson, Anna Theorin, Goran Westling at al.] // *PLoS BIOLOGY* – 2006. – Vol. 4, № 6. – P. 1025-1034
11. S.Swinnen Two hands, one brain: Cognitive neuroscience of bimanual skill / S.Swinnen, N.Wenderoth- *Trends Cognitive*. – 2004. – Sci 8. – P. 18-25.

REFERENCES

1. Kirilova A.V. Psychophysiological studies of bioelectric activity of the human brain / A.V. Kirilova, L.D. Lesova, E.V. Arhangelskaia // *Fiziologichnyi jurnal*. – 2006. – T.52, №.2. – S.38-39.
2. Kisilev S. Yu. Vremia sensomotornoj reakcii u detei doskolnogo i mladshogo shkolnogo vozrasta / S. Yu. Kisilev, V.I. Lupandin // *Jurnal vish. nerv. deiat.* – 1997. – T.47. – Vip.1. – S. 159-162.
3. Korobeinikova L.G. Osoblivosti rozvitky psihophysiologicalnih funkcii u ditei molodshogo shkilnogo viku / L.G. Korobeinikova // *Fiziologichnyi jurnal*. – 2006. – T.52, №. 2 – S.42
4. Korobeinikov G.V. Psihophysiological mechanisms of mental activity of a person / G.V. Korobeinikov – K.: Ukr. fitosociologichnyi centr, 2002. – С.7-27
5. Kraig G. Psihologia razvitiia / Grais Kraig – 7 izd. – SPb. : Piter, 2000. – 992s.
6. Sheffer D. Deti i podrostki: psihologia razvitiia / Sheffer Devid – 6 izd. – SPb.: Piter, 2003. – 976s.
7. Filippov M.M. Psihophysiological functional states / M.M. Filippov – K.: MAUP, 2006. – 240 s.
8. Filimonova N.B. Osoblivosti obrobki zorovih stimuliv u korotkochasnij pam'iatii pri ih odnomomentnomu prediavlenni / N.B. Filimonova, T.V. Kutsenko // *Fiziologichnyi jurnal*. – 2006. – T.52, №. 2. – S.75
9. Dronkers. D. C. Right-sided neglect in a left hander: evidence for reversed hemispheric specialization of attention capacity/ D. C. Dronkers, R. T. Knight – *Neuropsychologia*. – 1998. – Vol.27. – P. 729-735.
10. Roland S. J. How a Lateralized Brain Supports Symmetrical Bimanual Tasks / [Roland S. Johansson, Anna Theorin, Goran Westling at al.] // *PLoS BIOLOGY* – 2006. – Vol. 4, № 6. – P. 1025-1034
11. S.Swinnen Two hands, one brain: Cognitive neuroscience of bimanual skill / S.Swinnen, N.Wenderoth. – *Trends Cognitive*. – 2004. – Sci 8. – P. 18–25.

ФЕРМЕНТАТИВНІ СИСТЕМИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КАТАБОЛІЗМУ ЕНДОГЕННИХ АЛЬДЕГІДІВ У СЕРЦІ ПРИ ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕСІ

Швець В.М.

*Запорізький державний медичний університет
61600, Україна, Запоріжжя, пл. Маяковського, 26А*

talazap@i.ua

В огляді наведено дані про можливі шляхи утворення та утилізації ендogenous альдегідів у клітині, а також про механізми прояву їх токсичної дії. Показано, що процес вільнорадикального окиснення поліненасичених жирних кислот є основним джерелом ендogenous альдегідів. Найбільша частка альдегідів, що синтезуються в клітині, припадає на 4-гідрокси-2,3-ноненаль, що утворюється з лінолевої кислоти. Альдегіди здатні взаємодіяти з білками та нуклеїновими кислотами, змінюючи при цьому їх функціональні властивості. В утилізації альдегідів беруть участь: альдозоредуктаза, альдегіддегідрогеназа, альдегідредуктаза й глутатіон-S-трансфераза. Стан процесів утилізації альдегідів має модулюючий вплив на характер реалізації пошкоджуючої дії вільних радикалів на клітини. За умов посилення радикалоутворення, адекватна стимуляція цих процесів може бути причиною підвищення резистентності клітин до пошкоджуючої дії оксидативного стресу.

Ключові слова: альдегіди, серце, оксидативний стрес, глутатіонтрансфераза, альдозоредуктаза, альдегідредуктаза, альдегіддегідрогеназа.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАТАБОЛИЗМА ЭНДОГЕННЫХ АЛЬДЕГИДОВ В СЕРДЦЕ ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ

Швец В.Н

*Запорожский государственный медицинский университет
61600, Украина, Запорожье, пл. Маяковского, 26А*

talazap@i.ua

В обзоре приводятся данные о возможных путях образования и утилизации эндогенных альдегидов в клетке, а также о механизмах проявления их токсического действия. Показано, что процесс свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирных кислот является основным источником эндогенных альдегидов. Наибольшая часть альдегидов, образующихся в клетке, приходится на 4-гидрокси-2,3-ноненаль, который образуется из линолевой кислоты. Альдегиды способны взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами, изменяя при этом их функциональные особенности. В утилизации альдегидов принимают участие: альдозоредуктаза, альдегиддегидрогеназа, альдегидредуктаза и глутатион-S-трансфераза. Состояние процессов утилизации альдегидов оказывает модулирующее воздействие на характер реализации повреждающего действия свободных радикалов на клетки. В условиях усиления радикалообразования, адекватная стимуляция данных процессов может быть причиной повышения резистентности клеток к повреждающему действию оксидативного стресса.

Ключевые слова: альдегиды, сердце, оксидативный стресс, глутатионтрансфераза, альдозоредуктаза, альдегидредуктаза, альдегиддегидрогеназа.

THE ENZYMATIC SYSTEMS OF ENDOGENOUS ALDEHYDES INTERCELLULAR CATABOLISM IN THE HEART UNDER OXIDATIVE STRESS

Shvets' V.M.

*Zaporizhzhya State Medical University,
61600, Ukraine, Zaporizhzhya, Mayakovsky Ave. 26A*

talazap@i.ua

The review provides data of possible endogenous aldehydes ways of formation and utilization, and mechanisms of their cytotoxic effect. It is shown that the major source of endogenous aldehydes is the free radical oxidation of polyunsaturated fatty acids. The biggest part of aldehydes, which are generated in the cell, falls on 4-hydroxy-2,3-nonenal synthesized from linoleic acid. Malonic dialdehyde is a more widely spread aldehyde. It generates in the cells in the process of lipid peroxidation and plays an important role in the alteration of cells under oxidative stress. Arachidonic acid is its precursor. Acid can also form 2-hydroxypentanal, glyoxal and 2-hydroxy-4-decenal. The aldehydes are capable to react with

proteins and nucleic acids, thus altering their functional properties. The basis of the free radical metabolism products damaging effect is the property to cause a covalent modification of macromolecules and the ability to change the structure of biological membranes. Cytotoxic and genotoxic effect of aldehydes, formed during their metabolism, can greatly enhance this effect. Endogenous aldehydes are subjected to different redox transformations and due to this the correlation between the speed of their generation and utilization can determine the efficiency of intracellular signaling pathway and the degree of the oxidative stress damaging effects manifestation. Aldose reductase, aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase and glutathione-S-transferase participate in aldehydes utilization.

The way, associated with the glutathione transferase reaction, takes the especial place in the catabolism of aldehydes. The nucleophilic attack of glutathione with various electrophilic molecules (including aldehydes) occurs with the participation of glutathione transferase. Glutathione transferase have an unequal facility with aldehydes. They catalyze the conversion of hydroxyalkenali the fastest.

Myocardial glutathione transferase have a specific intracellular distribution. They are present in sarcoplasm in large quantity, however some of them are localized in the mitochondria. They exhibit high catalytic activity at neutral and acidic reaction of the medium (pH= 6,9). Glutathione conjugates of aldehydes appear as their competitive inhibitor.

Myocardial glutathione transferase is inclined to induction. Aldehydes and certain xenobiotics act as it inducers. It was shown that the induction of isoenzyme GST- A1 in the heart is influenced by 4-hydroxynonenal that stimulates the expression of its genes.

The most part of generated glutathione conjugates extracts from the myocardial cells. However, a certain number of them are subjected to additional enzymatic recovery under aldose reductase. Not only the presence of glutathione conjugates of aliphatic aldehydes in myocardium, but also their restored derivatives, including a 1,4-dihydroxynonen can be the conformation of that. The recovery of glutathione conjugate improves the efficiency of endogenous aldehydes utilization. It is due to the prevention of spontaneous intracellular conjugate decay and the release of cytotoxic carbonyl products. The glutathione transferase reaction is the main route of aldehydes catabolism in the heart. The data of experimental studies on the transformation of 4-hydroxynonenal in the heart is the evidence of that. For this reason, glutathione transferase plays a special role (among the other enzymes of aldehyde utilization) in myocardial protection from the free radical damage.

Another way of aldehydes catabolism, that plays a great role in the heart, is their recovery in the aldehyde reductase reaction. The corresponding alcohol appears as a product of their recovery. The significance of this metabolic pathway is greatly increased in terms of endogenous aldehydes utilization inhibition in the glutathione transferase reaction.

Aldose reductase and aldehyde reductase are widely spread among the enzymes that catalyze the aldehyde recovery in cells.

Aldose reductase have a monomer structure of molecule. A hydrophobic area is a part of its active center. It provides the substrate binding. One of the active center functional groups is the cysteine remnant. Its oxidation contribute to the activation of the enzyme. ROS (hydrogen peroxide) and AFA (peroxynitrite) can be used as the biological oxidants. Recovered pyridine coenzymes (NADP and NAD) are the coenzymes of aldose reductase. However, the enzyme shows greater affinity for NADPH.

Aldose reductase shows broad specificity for hydrophobic and hydrophilic aldehydes as substrates. In addition, they have the ability to restore glutathione conjugates of aldehydes. Moreover, the affinity of the myocardial enzyme for the glutathione conjugates is higher than to the free aldehydes. The presence of the specific domain, enriched with tryptophan and serine remnants in the N-terminus of the polypeptide chain, is the reason of that. The presence of this domain allows an efficient binding of an aldose reductase active center with a cysteine remnant of aldehyde glutathione conjugate.

Aldehyde reductase differ from aldose reductase in structure and properties. There are two types of this enzymes:

- aldehyde reductase type I, which uses a restored NADP as a coenzyme;
- aldehyde reductase type II, which uses a recovered NADP and NAD as a coenzyme. However, it shows higher affinity to NADPH.

Both types of enzymes catalyze the reaction of aliphatic aldehydes restoration, showing greater affinity for their unsaturated representatives.

Another way of endogenous aldehyde utilization in the heart is the way, associated with their oxidation to the corresponding carboxylic acids in the aldehyde dehydrogenase reaction. Subsequently, the reaction

products are able to be involved in the process of beta-oxidation in mitochondria and to be used as an oxidation substrate.

Today we know about three classes of aldehyde dehydrogenase, which differ in intracellular localization, as well as substrate and coenzyme specificity. Depending on coenzyme specificity they are divided into NAD⁺ - and NADP⁺ - dependent enzymes.

Aldehyde dehydrogenase are widely spread in cells compartments, in mitochondria. In addition, they are associated with microsomes. Certain classes of aldehyde gene expression is controlled by the HIF-1 factor. This leads to increasing of the oxidative catabolism of aldehydes value under the tissue hypoxia condition.

As glutathione transferase, aldehyde reductase and aldehyde dehydrogenase ensure the utilization of cytotoxic carbonic products of metabolism, they acts as a cell protective factors against oxidative stress. According to experimental studies, in conditions, accompanied by an increase of free radical processes in the heart intensity (heart failure, ischemia and reperfusion), the number of 4-hydroxynal and malonic dialdehyde, adducts of 4-hydroxynonal with proteins, and 1,4-dihydroxynonen as the product of its recovery, rises.

Arrised developments are accompanied by the restriction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase isoenzyme activity. Moreover, its aimed activation reduces the hearts ischemic lesion area.

Figuring out the value of endogenous aldehydes recycling enzymes in cells protection from free radical damage allowed to form an idea of the promising approaches, associated with the directed activation and induction of their synthesis, in treatment and prevention of a variety of external diseases, which pathogenesis is associated with the occurrence of oxidative stress.

Key words: aldehydes, heart, oxidative stress, glutathione transferase, aldose reductase, aldehyde reductase, aldehyde dehydrogenase.

Особливе місце серед карбонільних сполук, що утворюються в процесі вільнорадикального окиснення ліпідів, займають алифатичні альдегіди [1]. Ці метаболіти відіграють значну роль у регуляції обміну речовин [2] і модуляції внутрішньоклітинного сигнального шляху.

У процесах мікросомального окиснення, тканинного дихання, а також у ферментативних реакціях, що каталізуються флавіновими дегідрогеназами [3], постійно утворюються вільнорадикальні продукти метаболізму (активні форми кисню). Вони беруть участь у регуляції функціонального стану клітин [4] та обміну речовин. Разом з тим, вони відіграють значну роль у реалізації пошкоджуючого ефекту окислативного стресу на клітину [5].

Метою цього огляду є аналіз даних про можливі шляхи утворення та утилізації ендогенних альдегідів у клітині, а також про механізми прояву їх токсичної дії.

Різні метаболічні шляхи здійснюють неоднаковий внесок у формування пулу ендогенних альдегідів. Найпотужнішим джерелом ендогенних альдегідів в організмі людини є процес перекисного окиснення мембранних ліпідів. Цей процес протікає без участі ферментів і пов'язаний із перетворенням вільних радикалів ліпідів. Він постійно відбувається у клітинах. Однак при певних фізіологічних умовах, а також деяких патологічних процесах його швидкість значно збільшується. При цьому збільшується й утворення карбонільних продуктів ПОЛ, серед яких особливе значення мають ендогенні альдегіди.

Найбільша частка альдегідів, що синтезуються в клітині, припадає на 4-гідрокси-2,3-ноненаль, що утворюється з лінолевої кислоти.

Як ще один розповсюджений альдегід, що утворюється у клітинах у процесі ПОЛ і відіграє важливу роль в альтерації клітин при окислативному стресі, виступає малоновий діальдегід. Його попередником є арахідонова кислота, з якої також можуть утворюватися 2-гідроксигептаналь, гліоксаль та 2-гідрокси-4-деценаль [6].

Основою пошкоджуючої дії вільнорадикальних продуктів метаболізму є властивість викликати ковалентну модифікацію макромолекул і можливість змінювати структуру біологічних мембран [7]. Цитотоксичний і генотоксичний вплив альдегідів, що утворюються в процесі їх метаболізму [8], можуть значно підсилювати цей ефект.

Ендогенні альдегіди піддаються різним окисно-відновним перетворенням і у зв'язку з цим співвідношення між швидкостями їх утворення й утилізації може визначати ефективність реалізації внутрішньоклітинного сигнального шляху, а також ступінь прояву пошкоджуючих ефектів оксидативного стресу.

Якщо стимуляція процесу радикалоутворення в клітинах не компенсується збільшенням швидкості утилізації альдегідів, що там утворюються, то виникають умови для підсилення прояву пошкоджуючої дії вільних радикалів на клітинні мембрани. Це може призвести до ініціації апоптозу [9] та альтерації клітин [10].

Згідно з існуючим сьогодні уявленням, до ферментів катаболізму ендогенних альдегідів відносяться представники родини альдегіддегідрогеназ [КФ 1.2.1.3; 1.2.1.4], альдегідоредуктаз [КФ 1.1.1.1] та глутатіонотрансфераз [КФ 2.5.1.18] [11-22] (рис. 1).

Особливе положення в катаболізмі альдегідів займає шлях, пов'язаний з їх перетворенням в глутатіонотрансферазній реакції [23, 24]. За участі глутатіонотрансферази відбувається нуклеофільна атака глутатіону різноманітними електрофільними молекулами, до числа яких відносяться і альдегіди [25-28]. Глутатіонотрансферази мають неоднакову спорідненість до альдегідів [29]. Найшвидше вони каталізують перетворення гідроксиалкеналів [19, 22, 30].

Глутатіонотрансферази міокарда мають характерне внутрішньоклітинне розподілення. У значних кількостях вони присутні в саркоплазмі. Однак певна їх частина локалізується в мітохондріях [16, 19, 31].

Глутатіонотрансферази міокарда являють собою димери. Вони проявляють високу каталітичну активність при нейтральній і слабокислій реакції середовища (рН = 6,9). Як їхній конкурентніший інгібітор виступають продукти реакції – глутатіонові кон'югати альдегідів.

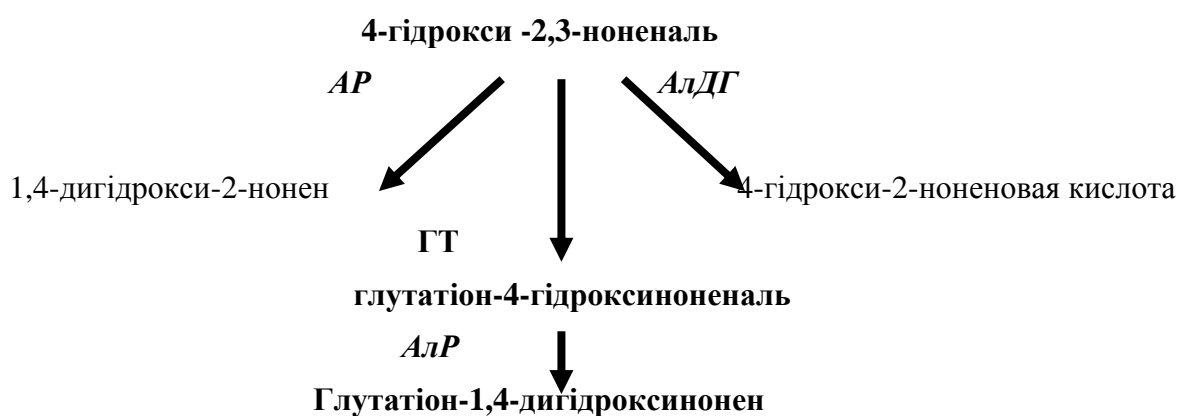


Рис.1 Основні шляхи катаболізму 4-гідроксиноненала в клітинах

Примітка. AP – альдегидредуктази (альдозоредуктаза), АлДГ – альдегиддегідрогеназа, ГТ – глутатіонотрансферази, АлР – альдозоредуктаза.

Глутатіонові кон'югати після їх утворення або негайно екскретуються з міокардіальної клітини, або піддаються в ній додатковим ферментативним перетворенням, що і захищає глутатіонотрансферази від інгібування. Властивостями їх неконкурентного інгібітора володіють альдегіди, як субстрати ензиму [32].

Глутатіонотрансфераза міокарда схильна до індукції. Як її індуктори виступають альдегіди [33, 34] і деякі ксенобіотики [35-37]. Було показано, зокрема, що індукція ізоферменту GST – A1 в серці відбувається під впливом 4-гідроксиноненала, який стимулює експресію його гена [34].

Як зазначалося раніше, глутатіонові кон'югати, що утворилися, переважно екскретуються з міокардіальних клітин. Однак певна їх кількість піддається додатковому ферментативному відновленню під дією альдозоредуктаз [26, 38]. Підтвердженням цього може служити

присутність в міокарді не тільки глутатіонових кон'югатів аліфатичних альдегідів, але і їх відновлених похідних і, в тому числі 1,4-дигідроксінонена [39, 40].

Відновлення глутатіонового кон'югату підвищує ефективність утилізації ендогенних альдегідів. Причиною того, попередження спонтанного внутрішньоклітинного розпаду кон'югату і, відповідно, звільнення цитотоксичного карбонільного продукту [27, 41].

Глутатіонтрансферазна реакція є переважним шляхом катаболізму альдегідів у серці, про що свідчать дані експериментальних досліджень про перетворення в ньому 4-гідроксіноненала [23]. З цієї причини глутатіонтрансферазі відводиться особлива роль серед інших ферментів утилізації альдегідів у захисті міокарда від вільнорадикального ушкодження [23].

Іншим шляхом катаболізму альдегідів, що відіграє важливе значення в серці, є їх відновлення в альдегідредуктазній реакції. Як продукт відновлення в ньому утворюються відповідні спирти. Значення цього метаболічного шляху значно зростає в умовах гальмування утилізації ендогенних альдегідів у глутатіонтрансферазній реакції [23].

Серед ферментів, які каталізують відновлення альдегідів у клітинах, широко розповсюджені альдозоредуктази і альдегідредуктази [42, 43].

Альдозоредуктази мають мономірну структуру молекули [44]. До складу їх активного центру входить гідрофобна ділянка, яка забезпечує зв'язування субстрату. Одна з функціональних груп активного центру представлена залишком цистеїну. Його окислення сприяє активації ензиму. Як фізіологічні окислювачі при цьому можуть використовуватися АФК (перекис водню) [12] і АФА (пероксинітрит) [45].

Коферменти альдозоредуктази являють собою відновлені піридинові коферменти (NADP і NAD) [46]. Разом з тим, фермент проявляє більшу спорідненість до NADPH [47].

Альдозоредуктази проявляють широку специфічність до гідрофобних і гідрофільних альдегідів, як субстратів [48]. Крім цього, вони мають властивість відновлювати глутатіонові кон'югати альдегідів. Причому, спорідненість ферменту міокарда до глутатіонових кон'югатів виявляється вищою, ніж до вільних альдегідів [38, 49]. Причиною цього є наявність на N-кінці поліпептидного ланцюга особливого домену, збагаченого залишками триптофану і серину. Присутність цього домену забезпечує ефективне зв'язування активного центру альдозоредуктази з цистеїновим залишком глутатіонового кон'югату альдегіду [50].

Альдегідредуктази відрізняються за будовою і властивостями від альдозоредуктаз [51]. Відомі два типи цих ензимів [52]:

- альдегідредуктаза I типу, яка використовує як кофермент відновлений NADP [44] ;
- альдегідредуктаза II типу, яка використовує як кофермент відновлені NADP і NAD. Однак більшу спорідненість проявляє стосовно NADPH [53].

Обидва типи ферментів каталізують реакцію відновлення аліфатичних альдегідів, проявляючи більшу спорідненість до їх ненасичених представників [24].

Зараз існують переконливі дані на користь того, що альдегіди виступають як важливий ендогенний фактор регуляції експресії генів альдегідредуктаз і альдозоредуктаз [54, 55].

Ще одним шляхом утилізації ендогенних альдегідів у серці є шлях, пов'язаний з їх окисленням у відповідні карбонові кислоти в альдегіддегідрогеназній реакції. Продукти реакції надалі здатні залучатися в процес бета-окислення в мітохондріях і, таким чином, використовуватися в них як субстрат окислення [56, 57].

На сьогодні описано три класи альдегіддегідрогеназ, які відрізняються за внутрішньоклітинною локалізацією, а також субстратною і коферментною специфічністю. Залежно від коферментної специфічності вони поділяються на NAD⁺- і NADP⁺-залежні ензими [58-62].

Альдегіддегідрогенази широко поширені в компартментах клітин. У значних кількостях вони присутні в мітохондріях. Крім цього, альдегіддегідрогенази знаходяться в асоційованій з мікросомами формі [58, 63, 64].

Експресія генів певних класів альдегіддегідрогеназ контролюється фактором HIF-1 [65]. Це зумовлює підвищення значення окисного шляху в катаболізмі альдегідів в умовах тканинної гіпоксії.

Через те, що глутатіонтрансферази, альдегідредуктази і альдегіддегідрогенази забезпечують утилізацію цитотоксичних карбонільних продуктів обміну, що утворюються при стимуляції вільнорадикальних процесів, вони виступають в ролі факторів захисту клітин від оксидативного стресу [23, 33, 34, 37, 48, 55, 66-75]. Згідно з даними експериментальних досліджень, при станах, що супроводжуються підвищенням інтенсивності вільнорадикальних процесів в серці (серцева недостатність, ішемія і реперфузія), в міокарді і крові зростає вміст 4-гідроксиноненала і малонового діальдегіду [39, 40, 47, 76-78], адуктів 4-гідроксиноненала з білками, а також 1,4-дигідрооксинанона, як продукту його відновлення [39, 40]. Виникаючі зрушення супроводжуються обмеженням активності мітохондріального ізоферменту альдегіддегідрогенази. Причому, його спрямована активація сприяє зменшенню площі вогнища ішемічного ураження у серці [66].

Згідно з даними Li Y. et al. (2005), обробка культури кардіоміоцитів 4-гідроксиноненалем призводить до різкого зниження їх життєздатності. При цьому в них різко зростає вміст аддуктів білків з 4-гідроксиноненалем. У той же час, індукція глутатіонтрансферази, шляхом внесення в середу культивування клітин 1,2-дитіол-3-тіону, зменшує прояв шкідливої дії альдегіду на кардіоміоцити. І навпаки, внесення в середовище культивування міокардіальних клітин сульфозалазину як інгібітора глутатіонтрансферази призводить до посилення їх пошкодження [23].

У літературі існують також відомості про важливу роль альдегідредуктази в захисті міокарда від його пошкодження при оксидативному стресі, що супроводжують розвиток ряду внутрішніх захворювань [29, 55, 74].

З'ясування значення ферментів утилізації ендogenous альдегідів у захисті клітин від вільнорадикального ушкодження дозволило сформулювати уявлення про перспективність підходу, пов'язаного зі спрямованою активацією і індукцією їх синтезу в лікуванні і профілактиці цілого ряду внутрішніх захворювань, патогенез яких пов'язаний з виникненням оксидативного стресу [37, 55, 66, 79-86].

Резюмуючи вищевикладене, можна дійти висновку, що мітохондрії відіграють велику роль в утворенні активних форм кисню та азоту, будучи при цьому їх основними джерелами в клітині. Ці продукти метаболізму виявляють важливе фізіологічне значення, виступаючи регуляторами обміну речовин і своєрідними месенждерами внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. З утворенням вільнорадикальних продуктів обміну в мітохондріях пов'язана ініціація ланцюгових вільнорадикальних процесів, які за певних умов зумовлюють формування оксидативного стресу. У кардіоміоцитах існують потужні захисні системи, наявність яких дозволяє обмежити прояви на них шкідливої дії оксидативного стресу. До їх числа відноситься антиоксидантна система, а також система ферментів, які каталізують реакції утилізації цитотоксичних карбонільних продуктів вільнорадикального окислення.

Під впливом різних факторів у міокардіальних клітинах може формуватися стан мітохондріальної дисфункції, наслідком якого стає зміна рівня їх енергетичного забезпечення. У результаті цього модулюється скорочувальна здатність і електрична активність міокарда. Подібні зрушення можуть виникати при фізіологічних станах (стрес, старіння, тощо) і патологічних процесах (ішемічна хвороба серця, кардіоміопатії, міокардити та ін) [87-91].

Зниження активності ензимів й зменшення їх вмісту в кардіоміоцитах виступає як один із факторів альтерації міокарда при цих захворюваннях. Разом з тим, за умов тимчасової “м’якої” ішемії, у серці виникають зсуви адаптивної спрямованості, пов’язані зі збільшенням рівня їх експресії й збільшенням активності, які в умовах подальшої вираженої ішемії забезпечують ефективний захист міокарда.

Питання внутрішньоклітинного катаболізму ендogenous альдегідів у серці є актуальним, адже одержана інформація дозволить більш детально сформулювати уявлення про патогенез багатьох захворювань, що супроводжуються тканинною гіпоксією, та запропонувати ефективні методи корекції стійкості організму до вільнорадикального окиснення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Free Radical / [Reinhechel T., Nack H., Lorenz S. et al.] // Free Radic. Res. – 1998. – Vol. 29. – P. 297-305.
2. Dianzani M.U. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-HNE / M.U. Dianzani, G. Barrera, M. Parola // Acta Biochim. Pol. Med. – 1999. – Vol. 46. – P. 61-75.
3. Lenaz G. Expression of glutathione-S-transferase isozyme / G. Lenaz // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1366. – P. 53-67.
4. Allen R.G. Expression of rat aldehyde reductase AKR7A1 / R.G. Allen, M. Tresini // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28. – P. 463-499.
5. Purification and properties of aldose and aldehyde reductase from EHS tumor cells / [Mecocci P., Fano G., Fulle S. et al.] // Free Radical. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26, – P. 303-308.
6. Mlakar A. Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid / A. Mlakar, G. Spiteller // Chem. Phys. Lipid. – 1996. – Vol. 79, №1. – P. 47 – 53.
7. Davies M.J. Differential role of 3H-1,2-dithiole-3thione-induced glutathione / M. J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean // Free Radical. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, – P. 1151-1163.
8. Esterbauer H. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging / H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner // Free Radical. Biol. Med. – 1991. – Vol. 11. – P. 81-128.
9. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging / Anderson K.M., Seed T., Ou D., Harris J.E. // Med. Hypotheses. – 1999. – Vol. 52. – P. 451-463.
10. Bauer V. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals / F. Bauer, V. Bauer // Gen. Physiol. Biophys. – 1999. – Vol. 18. – P. 7-14.
11. Esterbauer H. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-HNE by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions / H. Esterbauer, H. Zollner // Biochem. J. – 1985. – Vol. 28, №2. – P. 363–373.
12. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress / [Xie C., Lovell M. A., Xiong S. et al.] // Free Radical. Biol. Med. – 2001. – Vol. 31, №1. – P. 73–81.
13. Expression of rat aldehyde reductase AKR7A1: influence of age and sex and tissue-specific inducibility / [Grant A., Staffas L., Mancowiz L. et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2001. – Vol. 62, №11. – P. 1511–1519.
14. Hartley D. P. The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase / D. P. Hartley, J. A. Ruth, D. R. Petersen // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 316. – P. 197–205.
15. 4-hydroxynonenal metabolism by aldo/keto reductase in hepatoma cells / [Muzio G., Salvo R. A., Taniguchi N. et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 1999. – Vol. 463. – P. 445–452.

16. Ishikawa T. Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart / T. Ishikawa, H. Esterbauer, H. Sies // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 1576–1581.
17. Kawanishi K. Aldose reductase inhibitors from the nature / K. Kawanishi, H. Ueda, M. Moriyasu // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 10, N 15. – P. 1353–1374.
18. Laurent A. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices / A. Laurent, E. Perdu-Durand, J. Alary // *Toxicol. Lett.* – 2000. – Vol. 114, № 3. – P. 203–214.
19. Membrane Association of Glutathione S-Transferase mGSTA4-4, an Enzyme That Metabolizes Lipid Peroxidation Products / [Singh S. P., Janecki A. J., Srivastava S. K. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 6. – P. 4232–4239.
20. Poli G. 4-hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress / G. Poli, R. J. Schaur // *IUBMB Life.* – 2000. – Vol. 50, № 4-5. – P. 315–321.
21. Tanimoto T. Purification and properties of aldose and aldehyde reductase from EHS tumor cells / T. Tanimoto, S. Sato, P. F. Kador // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 39, № 3. – P. 445–453.
22. Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling / [Cheng J. Z., Singhal S. S., Sharma A. et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 392. – P. 197–207.
23. Differential role of 3H-1,2-dithiole-3thione-induced glutathione, glutathione S-transferase and aldose reductase in protecting against 4-hydroxy-2-nonenal toxicity in cultured cardiomyocytes / Li Y., Cao Z., Zhu H., Trush M. A. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – Vol. 439, № 1. – P. 80–90.
24. Esterbauer H. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions / Esterbauer H., Zollner H., Lang J. // *Biochem. J.* – 1985. – Vol. 228, № 2. – P. 363–373.
25. Колесниченко Л. С. Глутатионтрансферазы / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский // *Успехи совр. биологии.* – 1989. – Т. 107, № 2. – С. 179–184.
26. Davydov V. V. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging / V. V. Davydov, N. M. Dobaeva, A. I. Bozhkov // *Exp. Gerontol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 11–16.
27. Metabolism of the Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-trans-2-nonenal, in Isolated Perfused Rat Heart / [Srivastava S., Chandra A., Wang L. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 18. – P. 10893 – 10900.
28. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases / [Awashi Y. C., Yang Y., Tiwari N. K. et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 37, № 5. – P. 607–619.
29. Alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds: inhibition of rat liver glutathione S-transferase isozymes and chemical reaction with reduced glutathione / Chien C. I., Kirillos K. S., Linderman R. J., Dauterman W. C. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol. 1204. – P. 175–180.
30. Danielson U. H. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalyzed by mammalian glutathione transferases / U. H. Danielson, H. Esterbauer, B. Mannervik // *Biochem. J.* – 1987. – Vol. 247. – P. 707–713.
31. The mayor enzyme of rat cardiac glutathione transferases / Ishikawa T., Milbert U., Oesch F., Sies H. // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – Vol. 154. – P. 299–305.

32. Chen J. J. Detoxication of reactive aldehydes in mitochondria: effect of age and dietary restriction / J. J. Chen, B. P. Yu // *Aging*. – 1996. – Vol. 8. – P. 334–340.
33. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal / [Fukuda A., Nakamura Y., Ohigashi H. et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – Vol. 236, № 2. – P. 505–509.
34. 4-Hydroxy-2-nonenal upregulates endogenous antioxidants and phase 2 enzymes in rat H9c2 myocardial cells: protection against overt oxidative and electrophilic injury / [Zhu H., Zhang L., Xi X. et al.] // *Free Radic. Res.* – 2006. – Vol. 40, № 8. – P. 875–884.
35. Cao Z. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury / Z. Cao, Y. Li // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 489, № 1-2. – P. 39–48.
36. Cao Z. Protection cardiomyocytes against oxidative and electrophilic injury / Z. Cao, D. Tin, Li Y. // *J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 186, № 1. – P. 9–12.
37. Peng X. Induction of cellular glutathione-linked enzymes and catalase by the unique chemoprotective agent, 3H-1,2-dithiole-3-thione in rat cardiomyocytes affords protection against oxidative cell injury / X. Peng, Y. Li // *Pharmacol. Res.* – 2002. – Vol. 45, № 6. – P. 491–497.
38. Selective recognition of glutathiolated aldehydes by aldose reductase / [Ramana K. V., Dixit B. L., Srivastava S. et al.] // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39, № 40. – P. 12172–12180.
39. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium / [Nakamura K., Kusano K., Nakamura Y. et al.] // *Circulation*. – 2002.- Vol. 105, № 24. – P. H2867–2871.
40. Véronneau M. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts / M.Véronneau, B. Comte, C. Des Rosiers // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33, № 10. – P. 1380–1388.
41. Identification of cardiac oxidoreductase(s) involved in the metabolism of the lipid peroxidation-derived aldehyde-4-hydroxynonenal / [Srivastava S., Chandra A., Ansari N. H. et al.] // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 329. – P. 469–475.
42. Jes J. M. A new nomenclature for the aldo-keto reductases / J. M. Jes, T. G. Flinn, T. M. Penning // *Biochem. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 54, № 6. – P. 639–647.
43. The aldo – keto reductase superfamily homepage / Hyndrman D., Bauman D. R., Heredia V. V., Penning T. M. // *Chem. Biol. Interact.* – 2003. – Vol. 133-134. – P. 621–631.
44. Liu S. Q. Bovine lens aldose reductase. pH-dependence of steady-state kinetic parameters and nucleotide binding / S. Q. Liu, A. Bhatnagar, S. K. Srivastava // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 34. – P. 25494–25499.
45. Role of nitric oxide in regulating aldose reductase activation in the ischemic heart / [Kaiserova K., Srivastava S., Tang X. L., et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 14. – P. 9101–9112
46. Aldehyde reductase: a role of C-terminal residues in defining substrate and cofactor specificities / [Rees-Milton K. J., Jia Z., Green N. C. et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998.- Vol. 355, N 2. – P. 137–144.
47. Srivastava S. K. Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart / S. K. Srivastava, A. Bhatnagar // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 18. – P. 10893–10900.
48. Crabbe M. J. Aldose reductase and the importance of experimental design / M. J. Crabbe // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – Vol. 31, № 6. – P. 1367–1371.

49. Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal [HNE] in rat erythrocytes: role of aldose reductase / [Srivastava S., Dixit B. L., Cai J. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 29, № 13. – P. 642–652.
50. Structural and kinetic modifications of aldose reductase by S-nitrosothiols / [Srivastava S., Dixit B. L., Ramana K. V. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 358, № 1. – P. 11–118.
51. Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase / [Srivastava S., Watowich S. J., Petrash J. M. et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, № 1. – P. 42–54.
52. Sato S. Human kidney aldose and aldehyde reductases / S. Sato, P. F. Kador // *J. Diabetes Complic.* – 1993. – Vol. 7, № 3. – P. 179–187.
53. Kawasaki N. Characterization of aldose reductase and aldehyde reductase from rat testis / N. Kawasaki, T. Tanimoto, A. Tanaka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – Vol. 996, № 1-2. – P. 30–36.
54. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE / [Koch Y. H., Park Y. S., Takahashi M. et al.] // *Free Radic. Res.* – 2000. – Vol. 33, № 6. – P. 739–746.
55. 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase / [Spycher S., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V. B. et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 226, № 2. – P. 512–516.
56. Mitchell D. Y. The oxidation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenases / D.Y. Mitchell, D.R. Petersen // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1987. – Vol. 87, № 3. – P. 403–410.
57. Vasiliou V. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism / V. Vasiliou, A. Pappa, D. R. Petersen // *Chemico-Biological Interact.* – 2000. – Vol. 129, № 1-2. – P. 1–19.
58. Кислова О. В. Сравнительная характеристика мембранных форм альдегиддегидрогеназ / О. В. Кислова, Е. Г. Виноградова, Г. А. Пхакадзе // *Укр. биохим. журн.* – 1995. – Т. 67, № 6. – С. 38–45.
59. Class 2 aldehyde dehydrogenase. Characterization of the hamster enzyme, sensitive to daidzin and conserved within the family of multiple forms / [Hjelmqvist L., Lundgren L., Norin A. et al.] // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 416, № 1. – P. 99–102.
60. Coenzyme specificity in aldehyde dehydrogenase / Perozich J., Kuo I., Lindahl R., Hempel J. // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol. 130-132, № 1-3. – P. 115–124.
61. Inhibition of class-3 aldehyde dehydrogenase and cell growth by restored lipid peroxidation in hepatoma cell lines / Canuto R., Musio G., Ferro M., Maggiora M. // *Free Radical. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26, № 3-4. – P. 333–340.
62. Pietruszko R. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix / R. Pietruszko, M. Chern // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol. 130-132, № 1-3. – P. 193–199.
63. Expression of the pro-apoptotic gene gadd153/chop is elevated in liver with aging and sensitized cell to oxidant injury / [Ikeyama S., Wang X. T., Li J. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 19. – P. 16726–16731.
64. Landahl R. Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases / R. Landahl, D. Petersen // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 41, № 11. – P. 1583–1587.
65. Reisdorph R. Aldehyde dehydrogenase 3 gene regulation: studies on constitutive and hypoxia-modulated expression / R. Reisdorph, R. Lindahl // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol. 130-132, № 1. – P. 227–233.

66. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart / [Chen C. H., Budas G. R., Churchill E. N. et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 321, № 5895. – P. 1493–1495.
67. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis / [Rittner H. L., Hafner V., Klimiuk P. A. et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 103, № 7. – P. 1007–1013.
68. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress / [Sagara Y., Dargusch R., Chambers D. et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1998. – Vol. 24, № 9. – P. 1375–1389.
69. Comporti M. Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology / M. Comporti // *Free Radic. Res.* – 1998. – Vol. 28, № 6. – P. 623–635.
70. Glutathione S-transferase variants and hypertension / [Delles C., Lee W. K., Miller W. H. et al.] // *J. Hypertens.* – 2008. – Vol. 26, № 7. – P. 1343–1352.
71. 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium / [Blasig I. E., Grune T., Schonhelt K. et al.] // *Am. J. Heart Circ. Physiol.* – 1995. – Vol. 269. – P.14–22.
72. Involvement of aldose reductase in metabolism of atherogenic aldehyde / [Srivastava S., Liu S. Q., Conklin D. J. et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol. 130-132, № 1-3. – P. 563–571.
73. Keightley J. A. Proteomic analysis of oxidative stress-resistant cell: A specific role for aldose reductase overexpression in cytoprotection / J. A. Keightley, L. Shang, M. Kinter // *Mol. Cell Proteomics*. – 2003. – № 12. – P. 1236–1245.
74. Lipid peroxidation-derived aldehydes and oxidative stress in the failing heart: role of aldose reductase / Srivastava S., Chandrasekar B., Bhathagar A., Prabhu S. D. // *A.M.J. Heart Circ. Physiol.* – 2002.- Vol. 283. – P. 2615–2619.
75. Potent induction of total cellular GSH and NQO1 as well as mitochondrial GSH by 3H-1,2-dithiole-3-thione in SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary human neurons: protection against neurocytotoxicity elicited by dopamine, 6-hydroxydopamine, 4-hydroxy-2-nonenal, or hydrogen peroxide / Jia Z., Zhu H., Misra H. P., Li Y. // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1197. – P. 159–169.
76. Chen J. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart / J. Chen, G. I. Henderson, G. L. Freeman // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2001. – Vol. 33, № 11. – P. 1919 – 1927.
77. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion / [Paradies G., Petrosilo G., Pistolesse M. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, № 1-2. – P. 42–50.
78. Oxidative stress and antioxidative defense parameters early after reperfusion therapy for acute myocardial infarction / [Kaminski K., Bonda T., Wojtkowska I. et al.] // *Acute Card Care.* – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 121–126.
79. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products / [Burcham P. C., M.Kaminskas L., Fontaine F. R. et al.] // *Toxicology.* – 2002. – Vol. 181-182. – P. 229–236.
80. Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells / [Spycher S. E., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V. B. et al.] // *FASEB J.* – 1997.– Vol. 11, № 2. – P. 181–188.
81. Antioxidants and phase 2 enzymes in cardiomyocytes: Chemical inducibility and chemoprotection against oxidant and simulated ischemia-reperfusion injury / [Cao Z., Zhu H., Zhang L. et al.] // *Exp. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 231, № 8. – P. 1353–1364.

82. Glutathione conjugates of 4-hydroxynonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats / [Volkel W., Alvarez-Sanchez R., Weick I. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, № 11. – P. 1526–1536.
83. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury / [Reuf J., Liu S. Q., Bode C. et al.] // *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1745–1752.
84. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction / [Wenzel P., Schuhmacher S., Kienhofer J. et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 80, № 2. – P. 280–289.
85. Picklo M. J. Expression and activities of aldo – keto oxidoreductases in Alzheimer disease / M. J. Picklo // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2001.- Vol. 60, № 7. – P. 686–695.
86. Ramasamy R. Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion / R. Ramasamy, N. Trueblood, S. Schaefer // *Physiol. J.* – 2001. – Vol. 275, № 1. – P. 185–203.
87. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure / [Sharov V. G., Goussev A., Lesch M. et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1998. – Vol. 30, № 9. – P. 1757–1762.
88. Ballinger S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease / S. W. Ballinger // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, № 10. – P. 1278–1295.
89. Di Mauro S. Mitochondria and heart disease / S. DiMauro, M. Hirano // *Curr. Opin. Cardiol.* – 1998. – Vol. 13, N 3. – P. 190–197.
90. Echtay K. S. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach of mitochondrial ROS production / K. S. Echtay, M. D. Brand // *Redox Rep.* – 2007. – Vol. 12, № 1. – P. 26. –29.
91. Ritchie R. H. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? / R. H. Ritchie, L. M. Delbridge // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2006. – Vol. 33, № 1-2. – P. 159–166.

REFERENCES

1. Free Radical / [Reinhechel T., Nack H., Lorenz S. et al.] // *Free Radic. Res.* – 1998. – Vol. 29. – P. 297-305.
2. Dianzani M.U. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-HNE / M.U. Dianzani, G. Barrera, M. Parola // *Acta Biochim. Pol. Med.* – 1999. – Vol. 46. – P. 61-75.
3. Lenaz G. Expression of glutathione-S-transferase isozyme / G. Lenaz // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1366. – P. 53-67.
4. Allen R.G. Expression of rat aldehyde reductase AKR7A1 / R.G. Allen, M. Tresini // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28. – P. 463-499.
5. Purification and properties of aldose and aldehyde reductase from EHS tumor cells / [Mecocci P., Fano G., Fulle S. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26, – P. 303-308.
6. Mlakar A. Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid / A. Mlakar, G. Spiteller // *Chem. Phys. Lipid.* – 1996. – Vol. 79, №1. – P. 47 – 53.
7. Davies M.J. Differential role of 3H-1,2-dithiole-3thione-induced glutathione / M. J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean // *Free Radical. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, – P. 1151-1163.
8. Esterbauer H. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging / H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner // *Free Radical. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 11. – P. 81-128.
9. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging / Anderson K.M., Seed T., Ou D., Harris J.E. // *Med. Hypotheses.* – 1999. – Vol. 52. – P. 451-463.
10. Bauer V. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals / F. Bauer, V. Bauer // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – Vol. 18. – P. 7-14.
11. Esterbauer H. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-HNE by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions / H. Esterbauer, H. Zollner // *Biochem. J.* – 1985. – Vol. 28, №2. – P. 363–373.

12. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress / [Xie C., Lovell M. A., Xiong S. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31, №1. – P. 73–81.
13. Expression of rat aldehyde reductase AKR7A1: influence of age and sex and tissue-specific inducibility / [Grant A., Staffas L., Mancowiz L. et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62, №11. – P. 1511–1519.
14. Hartley D. P. The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase / D. P.Hartley, J. A. Ruth, D. R. Petersen // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1995. – Vol. 316. – P. 197–205.
15. 4-hydroxynonenal metabolism by aldo/keto reductase in hepatoma cells / [Muzio G., Salvo R. A., Taniguchi N. et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1999. – Vol. 463. – P. 445–452.
16. Ishikawa T. Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart / T. Ishikawa, H. Esterbauer, H. Sies // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 1576–1581.
17. Kawanishi K. Aldose reductase inhibitors from the nature / K. Kawanishi, H. Ueda, M. Moriyasu // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 10, N 15. – P. 1353–1374.
18. Laurent A. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices / A. Laurent, E. Perdu-Durand, J. Alary // *Toxicol. Lett.* – 2000. – Vol. 114, № 3. – P. 203–214.
19. Membrane Association of Glutathione S-Transferase mGSTA4-4, an Enzyme That Metabolizes Lipid Peroxidation Products / [Singh S. P., Janecki A. J., Srivastava S. K. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 6. – P. 4232–4239.
20. Poli G. 4-hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress / G. Poli, R. J. Schaur // *IUBMB Life.* – 2000. – Vol. 50, № 4-5. – P. 315–321.
21. Tanimoto T. Purification and properties of aldose and aldehyde reductase from EHS tumor cells / T. Tanimoto, S. Sato, P. F. Kador // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 39, № 3. – P. 445–453.
22. Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling / [Cheng J. Z., Singhal S. S., Sharma A. et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 392. – P. 197–207.
23. Differential role of 3H-1,2-dithiole-3thione-induced glutathione, glutathione S-transferase and aldose reductase in protecting against 4-hydroxy-2-nonenal toxicity in cultured cardiomyocytes / Li Y., Cao Z., Zhu H., Trush M. A. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2005. – Vol. 439, № 1. – P. 80–90.
24. Esterbauer H. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions / Esterbauer H., Zollner H., Lang J. // *Biochem. J.* – 1985. – Vol. 228, № 2. – P. 363–373.
25. Kolesnichenko L. S. Glutathiontransferazy / L. S. Kolesnichenko, V. I. Kulinskij // *Uspehi sovr. biologii.* – 1989. – T. 107, № 2. – C. 179–184.
26. Davydov V. V. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging / V. V. Davydov, N. M. Dobaeva, A. I. Bozhkov // *Exp. Gerontol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 11–16.
27. Metabolism of the Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-trans-2-nonenal, in Isolated Perfused Rat Heart / [Srivastava S., Chandra A., Wang L. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 18. – P. 10893 – 10900.
28. Regulation of 4-hydroxynonenal – mediated signaling by glutathione S-transferases / [Awashi Y. C., Yang Y., Tiwari N. K. et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 37, № 5. – P. 607–619.
29. Alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds: inhibition of rat liver glutathione S- transferase isozymes and chemical reaction with reduced glutathione / Chien C. I., Kirolos K. S., Linderman R. J., Dauterman W. C. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol. 1204. – P. 175–180.
30. Danielson U. H. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalyzed by mammalian glutathione transferases / U. H. Danielson, H. Esterbauer, B. Mannervik // *Biochem. J.* – 1987. – Vol. 247. – P. 707–713.
31. The mayor enzyme of rat cardiac glutathione transferases / Ishikawa T., Milbert U., Oesch F., Sies H. // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – Vol. 154. – P. 299–305.
32. Chen J. J. Detoxication of reactive aldehydes in mitochondria: effect of age and dietary restriction / J.J. Chen, B.P. Yu // *Aging.* – 1996. – Vol. 8. – P. 334–340.
33. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal / [Fukuda A., Nakamura Y., Ohigashi H. et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – Vol. 236, № 2. – P. 505–509.

34. 4-Hydroxy-2-nonenal upregulates endogenous antioxidants and phase 2 enzymes in rat H9c2 myocardial cells: protection against overt oxidative and electrophilic injury / [Zhu H., Zhang L., Xi X. et al.] // *Free Radic. Res.* – 2006. – Vol. 40, № 8. – P. 875–884.
35. Cao Z. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury / Z. Cao, Y. Li // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 489, № 1-2. – P. 39–48.
36. Cao Z. Protection cardiomyocytes against oxidative and electrophilic injury / Z. Cao, D. Tin, Li Y. // *J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 186, № 1. – P. 9–12.
37. Peng X. Induction of cellular glutathione-linked enzymes and catalase by the unique chemoprotective agent, 3H-1,2-dithiole-3-thione in rat cardiomyocytes affords protection against oxidative cell injury / X. Peng, Y. Li // *Pharmacol. Res.* – 2002. – Vol. 45, № 6. – P. 491–497.
38. Selective recognition of glutathiolated aldehydes by aldose reductase / [Ramana K. V., Dixit B. L., Srivastava S. et al.] // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, № 40. – P. 12172–12180.
39. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium / [Nakamura K., Kusano K., Nakamura Y. et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105, № 24. – P. H2867–2871.
40. Véronneau M. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts / M. Véronneau, B. Comte, C. Des Rosiers // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33, № 10. – P. 1380–1388.
41. Identification of cardiac oxidoreductase(s) involved in the metabolism of the lipid peroxidation-derived aldehyde-4-hydroxynonenal / [Srivastava S., Chandra A., Ansari N. H. et al.] // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 329. – P. 469–475.
42. Jes J. M. A new nomenclature for the aldo-keto reductases / J. M. Jes, T. G. Flinn, T. M. Penning // *Biochem. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 54, № 6. – P. 639–647.
43. The aldo – keto reductase superfamily homepage / Hyndrman D., Bauman D. R., Heredia V. V., Penning T. M. // *Chem. Biol. Interact.* – 2003. – Vol. 133-134. – P. 621–631.
44. Liu S. Q. Bovine lens aldose reductase. pH-dependence of steady-state kinetic parameters and nucleotide binding / S. Q. Liu, A. Bhatnagar, S. K. Srivastava // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 34. – P. 25494–25499.
45. Role of nitric oxide in regulating aldose reductase activation in the ischemic heart / [Kaiserova K., Srivastava S., Tang X. L., et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 14. – P. 9101–9112
46. Aldehyde reductase: a role of C-terminal residues in defining substrate and cofactor specificities / [Rees-Milton K. J., Jia Z., Green N. C. et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 355, N 2. – P. 137–144.
47. Srivastava S. K. Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart / S. K. Srivastava, A. Bhatnagar // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 18. – P. 10893–10900.
48. Crabbe M. J. Aldose reductase and the importance of experimental design / M. J. Crabbe // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – Vol. 31, № 6. – P. 1367–1371.
49. Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal [HNE] in rat erythrocytes: role of aldose reductase / [Srivastava S., Dixit B. L., Cai J. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 29, № 13. – P. 642–652.
50. Structural and kinetic modifications of aldose reductase by S-nitrosothiols / [Srivastava S., Dixit B. L., Ramana K. V. et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 358, № 1. – P. 11–118.
51. Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase / [Srivastava S., Watowich S. J., Petrash J. M. et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, № 1. – P. 42–54.
52. Sato S. Human kidney aldose and aldehyde reductases / S. Sato, P. F. Kador // *J. Diabetes Complic.* – 1993. – Vol. 7, № 3. – P. 179–187.
53. Kawasaki N. Characterization of aldose reductase and aldehyde reductase from rat testis / N. Kawasaki, T. Tanimoto, A. Tanaka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – Vol. 996, № 1-2. – P. 30–36.
54. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE / [Koch Y. H., Park Y. S., Takahashi M. et al.] // *Free Radic. Res.* – 2000. – Vol. 33, № 6. – P. 739–746.
55. 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase / [Spycher S., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V. B. et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 226, № 2. – P. 512–516.
56. Mitchell D. Y. The oxidation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenases / D.Y. Mitchell, D.R. Petersen // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1987. – Vol. 87, № 3. – P. 403–410.
57. Vasiliou V. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism / V. Vasiliou, A. Pappa, D. R. Petersen // *Chemico-Biological Interact.* – 2000. – Vol. 129, № 1-2. – P. 1–19.

58. Kislova O. V. Sravnitel'naja charakteristika membrannyh form al'degiddegidrogenaz / O. V. Kislova, E. G. Vinogradova, G. A. Phakadze // Ukr. biohim. zhurn. – 1995. – T. 67, № 6. – С. 38–45.
59. Class 2 aldehyde dehydrogenase. Characterization of the hamster enzyme, sensitive to daidzin and conserved within the family of multiple forms / [Hjelmqvist L., Lundgren L., Norin A. et al.] // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 416, № 1. – P. 99–102.
60. Coenzyme specificity in aldehyde dehydrogenase / Perozich J., Kuo I., Lindahl R., Hempel J. // Chem. Biol. Interact. – 2001. – Vol. 130-132, № 1-3. – P. 115–124.
61. Inhibition of class-3 aldehyde dehydrogenase and cell growth by restored lipid peroxidation in hepatoma cell lines / Canuto R., Musio G., Ferro M., Maggiora M. // Free Radical. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26, № 3-4. – P. 333–340.
62. Pietruszko R. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix / R. Pietruszko, M.Chern // Chem. Biol. Interact. – 2001. – Vol. 130-132, № 1-3. – P.193–199.
63. Expression of the pro-apoptotic gene gadd153/chop is elevated in liver with aging and sensitized cell to oxidant injury / [Ikeyama S., Wang X. T., Li J. et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, № 19. – P. 16726–16731.
64. Landahl R. Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases / R. Landahl, D. Petersen // Biochem. Pharmacol. – 1991. – Vol. 41, № 11. – P. 1583–1587.
65. Reisdorph R. Aldehyde dehydrogenase 3 gene regulation: studies on constitutive and hypoxia-modulated expression / R. Reisdorph, R. Lindahl // Chem. Biol. Interact. – 2001. – Vol. 130-132, № 1. – P. 227–233.
66. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart / [Chen C. H., Budas G. R., Churchill E. N. et al.] // Science. – 2008. – Vol. 321, № 5895. – P. 1493–1495.
67. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis / [Rittner H.L., Hafner V., Klimiuk P.A. et al.] // J. Clin. Invest. – 1999. – Vol. 103, № 7. – P. 1007–1013.
68. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress / [Sagara Y., Dargusch R., Chambers D. et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – Vol. 24, № 9. – P. 1375–1389.
69. Comporti M. Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology / M. Comporti // Free Radic. Res. – 1998. – Vol. 28, № 6. – P. 623–635.
70. Glutathione S-transferase variants and hypertension / [Delles C., Lee W. K., Miller W. H. et al.] // J. Hypertens. – 2008. – Vol. 26, № 7. – P. 1343–1352.
71. 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium / [Blasig I. E., Grune T., Schonhelt K. et al.] // Am. J. Heart Circ. Physiol. – 1995. – Vol. 269. – P.14–22.
72. Involvement of aldose reductase in metabolism of atherogenic aldehyde / [Srivastava S., Liu S. Q., Conklin D. J. et al.] // Chem. Biol. Interact.- 2001. – Vol. 130-132, № 1-3. – P. 563–571.
73. Keightley J. A. Proteomic analysis of oxidative stress-resistant cell: A specific role for aldose reductase overexpression in cytoprotection / J. A. Keightley, L. Shang, M. Kinter // Mol. Cell Proteomics. – 2003. – № 12. – P. 1236–1245.
74. Lipid peroxidation-derived aldehydes and oxidative stress in the failing heart: role of aldose reductase / Srivastava S., Chandrasekar B., Bhathagar A., Prabhu S. D. // A.M.J. Heart Circ. Physiol. – 2002.- Vol. 283. – P. 2615–2619.
75. Potent induction of total cellular GSH and NQO1 as well as mitochondrial GSH by 3H-1,2-dithiole-3-thione in SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary human neurons: protection against neurocytotoxicity elicited by dopamine, 6-hydroxydopamine, 4-hydroxy-2-nonenal, or hydrogen peroxide / Jia Z., Zhu H., Misra H. P., Li Y. // Brain Res. – 2008. – Vol. 1197. – P. 159–169.
76. Chen J. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart / J. Chen, G. I. Henderson, G. L. Freeman // J. Mol. Cell Cardiol. – 2001. – Vol. 33, № 11. – P. 1919 – 1927.
77. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion / [Paradies G., Petrosilo G., Pistolese M. et al.] // Free Radical. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, № 1-2. – P. 42–50.
78. Oxidative stress and antioxidative defense parameters early after reperfusion therapy for acute myocardial infarction / [Kaminski K., Bonda T., Wojtkowska I. et al.] // Acute Card Care. – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 121–126.
79. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products / [Burcham P. C., M.Kaminskas L., Fontaine F. R. et al.] // Toxicology. – 2002. – Vol. 181-182. – P. 229–236.
80. Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells / [Spycher S. E., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V. B. et al.] // FASEB J. – 1997.– Vol. 11, № 2. – P. 181–188.

81. Antioxidants and phase 2 enzymes in cardiomyocytes: Chemical inducibility and chemoprotection against oxidant and simulated ischemia-reperfusion injury / [Cao Z., Zhu H., Zhang L. et al.] // *Exp. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 231, № 8. – P. 1353–1364.
82. Glutathione conjugates of 4-hydroxynonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats / [Volkel W., Alvarez-Sanchez R., Weick I. et al.] // *Free Radical. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, № 11. – P. 1526–1536.
83. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury / [Reuf J., Liu S. Q., Bode C. et al.] // *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1745–1752.
84. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction / [Wenzel P., Schuhmacher S., Kienhofer J. et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 80, № 2. – P. 280–289.
85. Picklo M. J. Expression and activities of aldo – keto oxidoreductases in Alzheimer disease / M. J. Picklo // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2001.- Vol. 60, № 7. – P. 686–695.
86. Ramasamy R. Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion / R. Ramasamy, N. Trueblood, S. Schaefer // *Physiol. J.* – 2001. – Vol. 275, № 1. – P. 185–203.
87. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure / [Sharov V. G., Goussev A., Lesch M. et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1998. – Vol. 30, № 9. – P. 1757–1762.
88. Ballinger S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease / S. W. Ballinger // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, № 10. – P. 1278–1295.
89. Di Mauro S. Mitochondria and heart disease / S. DiMauro, M. Hirano // *Curr. Opin. Cardiol.* – 1998. – Vol. 13, N 3. – P. 190–197.
90. Echtay K. S. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach of mitochondrial ROS production / K. S. Echtay, M. D. Brand // *Redox Rep.* – 2007. – Vol. 12, № 1. – P. 26. –29.
91. Ritchie R. H. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? / R. H. Ritchie, L. M. Delbridge // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2006. – Vol. 33, № 1-2. – P. 159–166.

РОЗДІЛ IV. ЕКОЛОГІЯ ТА ОХОРОНА ПРИРОДИ

УДК 582.282.23:547.147:546.56

ВПЛИВ АНІОНІВ СОЛЕЙ ЦИНКУ ТА МІДІ НА ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНУ ЗДАТНІСТЬ ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН

Крупей К.С., Рильський О.Ф.

Запорізький національний університет
69600, Україна, м. Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

krupeyznu@gmail.com

У роботі наведені дані про вплив аніонів солей цинку та міді на синтез пігменту в дріжджів *Rhodotorula aurantiaca* 1193 та *Rh. glutinis* 1335. Встановлено, що втрата здатності до утворення пігменту та поява безпігментних колоній у досліджуваних штамів дріжджів спостерігалася при концентраціях на 14,3-58,4 % нижче рівня тих концентрацій аніонів солей металів, за яких відбувалося повне блокування росту дріжджових клітин. Сульфат цинку виявився більш токсичним, ніж сульфат міді як для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193, так і для *Rh. glutinis* 1335. Проте хлорид цинку, навпаки, проявив менш токсичну дію в порівнянні з хлоридом міді на обидва штами дріжджів. Дріжджі *Rh. glutinis* 1335 виявилися набагато стійкішими відносно всіх аніонів солей цинку та міді в порівнянні з дріжджами *Rh. aurantiaca* 1193.

Ключові слова: аніони, цинк, мідь, пігментосинтезувальні дріжджі, каротиноїди.

ВЛИЯНИЕ АНИОНОВ СОЛЕЙ ЦИНКА И МЕДИ НА ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Крупей К.С., Рильский А.Ф.

Запорожский национальный университет
69900, Украина, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66,

krupeyznu@gmail.com

В работе представлены данные о влиянии анионов солей цинка и меди на синтез пигмента у дрожжей *Rhodotorula aurantiaca* 1193 и *Rh. glutinis* 1335. Установлено, что потеря способности к образованию пигмента и появление беспигментных колоний у исследуемых штаммов дрожжей наблюдалась при концентрациях на 14,3-58,4 % ниже уровня тех концентраций анионов солей металлов, при которых происходило полное блокирование роста дрожжевых клеток. Сульфат цинка оказался более токсичным, чем сульфат меди как для дрожжей *Rh. aurantiaca* 1193, так и для *Rh. glutinis* 1335. Хлорид цинка, наоборот, проявил менее токсическое действие по сравнению с хлоридом меди на оба штамма дрожжей. Дрожжи *Rh. glutinis* 1335 оказались более стойкими относительно всех анионов солей цинка и меди по сравнению с дрожжами *Rh. aurantiaca* 1193.

Ключевые слова: анионы, цинк, медь, пигментсинтезирующие дрожжи, каротиноиды.

INFLUENCE OF ANIONS OF SALTS OF ZINC AND COPPER ON THE PIGMENT SYNTHESIZING ABILITY OF YEASTS CELLS

Krupey K.S., Rylsky A.F.

Zaporizhzhya National University
69900, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

krupeyznu@gmail.com

As is known, exceeding of the heavy metals (HM) concentrations in nature has an adverse effect on the ecological state of the environment, which may lead to the malfunction of physiological and biochemical processes taking place in living organisms. Main sources of HM, polluting environment, are metallurgy and galvanic shops of the industrial enterprises. That is why the search for effective methods of environment pollution indications by HM has taken the first place recently. The surest and the most available methods of the anthropogenic violations diagnosis are based on a number of microbiological characteristics, because among all the representatives of the biota, microorganisms are the most sensitive to change of the medium. So, the usage of the pigment synthesizing bacteria as bioindicators is a new and promising tendency. Visual observation of the change of the pigment brightness under the influence of HM may serve as objective bioindicator of the environment pollution.

Metals persist in the environment and can become concentrated up the food chain. Metals may be bioconcentrated, bioaccumulated and biomagnified within food chains, causing higher trophic organisms to become contaminated with higher concentrations of chemical and metal contaminants than their prey. The risk for toxicity depends on the frequency, intensity and duration of contact with the metal contaminant along with exposure route. Toxicity risk also depends on the inherent toxic potential of the metal itself.

These HM influence the microbial population by affecting their growth, morphology, biochemical activities and ultimately resulting in decreased biomass and diversity. HM can damage the cell membranes, alter enzymes specificity, disrupt cellular functions and damage the structure of the DNA. Toxicity of these HM occurs through the displacement of essential metals from their native binding sites or through ligand interactions. Also, toxicity can occur as a result of alterations in the conformational structure of the nucleic acids and proteins and interference with oxidative phosphorylation and osmotic balance.

Thus, researches of the bacteria that we carried out aroused our interest to the research of the HM influence on the pigment synthesizing ability of the yeasts. In the literature accessible for us is mentioned only the fact that yeasts have the ability to sorb HM, and there is little information about the ability to change the pigment color in HM presence in the medium.

Thus, researches of the bacteria that we carried out aroused our interest to the research of the HM, anions of salts of zinc and copper in particular, influence on the pigment synthesizing ability of the yeasts. In the literature accessible for us is mentioned only the fact that yeasts have the ability to sorb HM, and there is little information about the ability to change the pigment color in HM presence in the medium. One of the richest in quality composition carotenoids are the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rh. aurantiaca*, which are able to synthesize phytoene, neurosporene, γ -carotene, β -carotene, ξ -carotene and torulene. It is colour saturation and stability of pigment data that determined the object of our research: to study the anions of salts of zinc and copper influence on the carotenoid synthesis of the yeasts *Rh. glutinis* 1335 and *Rh. aurantiaca* 1193.

Thus, the aim of our study was to investigate the influence of anions of salts on the carotenoid synthesis of the yeasts *Rhodotorula* genus.

Solid nutrient medium Sabouraud was prepared on the base of the water with certain heavy metals salt concentrations $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nutrient medium Sabouraud without metals was used as a control. When Sabouraud set congeal, 18-days culture *Rh. glutinis* 1335 and *Rh. aurantiaca* 1193 was seeded by solid lawn on it (0,2 ml per one Petri dish). Suspension density was $10^7/\text{ml}$. Yeasts incubated in the thermostat under the temperature 27-28°C. Results were calculated during 9 days of the cultivation. Visual observation and comparison of the experimental samples with the control was carried out. For the calculation of the color intensity difference between experimental and control samples, the Petri dishes with yeasts colonies were photographed, photos were loaded in the program Adobe Photoshop, indexes of the color model channels (Lab), and then the difference of the pigment color intensity was calculated in the program CIEDE 2000.

The research has shown that *Rh. glutinis* 1335 and *Rh. aurantiaca* 1195 react on the certain metal concentrations presence in the medium by pigment loss and by growth inhibiting.

Absolute loss of pigment was observed under the concentration of metals that was by 14,3-58,4 % lower than the concentrations under which absolute blocking of the growth of yeasts was observed.

The sulfate of zinc appeared more toxic, than sulfate of copper as for yeasts of *Rh. aurantiaca* 1193, so for *Rh. glutinis* 1335. The chloride of zinc, vice versa, showed a less toxic action as compared to the chloride of copper on both strains of yeasts. Yeasts of *Rh. glutinis* 1335 appeared more proof in relation to all anions of salts of zinc and copper as compared to yeasts of *Rh. aurantiaca* 1193.

Obtained results make it possible to recommend the yeasts *Rh. glutinis* 1335 and *Rh. aurantiaca* 1195 for the usage in the bioindication research of the environment pollution by HM.

Key words: anions, zinc, copper, pigment synthesizing yeasts, carotenoids.

ВСТУП

Дія іонів важких металів (ВМ) на клітини мікроорганізмів залежить від складу середовища та природи відповідних солей. Іони ВМ здатні зв'язуватися з білками, нуклеотидами, коферментами, фосфоліпідами, порфіринами, тобто практично зі всіма класами речовин, які беруть участь у метаболізмі клітини. Сучасні дані говорять про те, що в токсичній дії солей металів основне значення належить самому металу – катіону. Кислотний радикал може змінювати цей ефект у незначному ступені (через зміну розчинності або ступінь дисоціації солі). Більш повно дисоціюють солі одновалентних катіонів і аніонів, слабкіше – солі, які

утворені двовалентними металами та аніонами [1]. Проте дослідження, проведені нами на бактеріях, показали, що не тільки катіон металу, але й аніонна частина солі відіграє значну роль у токсичній дії [2]. У попередніх роботах нами було встановлено, що дріжджові клітини втрачають здатність синтезувати пігмент із певного концентраційного рівня ВМ, причому між блокуванням синтезу пігменту та інгібуванням росту простежується певний концентраційний інтервал [3, 4]. Отримані результати спонукали нас продовжити дослідження і вивчити також вплив аніонів солей одного і того ж металу та провести порівняльний аналіз щодо впливу деяких аніонів на синтез пігменту в дріжджових клітинах. Втрата пігменту клітинами дріжджів є добре спостережуваною ознакою, внаслідок чого каротиносинтезувальні дріжджі можна рекомендувати як біоіндикатори забруднення довкілля ВМ. Таким чином, метою роботи було дослідити вплив аніонів солей цинку та міді на синтез каротиноїдів у дріжджів роду *Rhodotorula*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були каротиносинтезувальні дріжджі *Rhodotorula aurantiaca* 1193 та *Rh. glutinis* 1335, люб'язно надані нам із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Солі, які використовували в досліджах: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnCl_2$, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$.

Тверде поживне середовище Сабуро готували на основі води з певним вмістом солей ВМ. Контролем слугувало поживне середовище Сабуро без металів. Після застигання середовища на нього суцільним газоном засівали 18-годинні колекційні культури. Щільність клітин становила 10^7 /мл [5]. Інкубування проводили в термостаті при температурі 27-28°C. Облік результатів проводили на 3 добу культивування. Спостерігали візуально, порівнюючи дослідні зразки з контролем. Для розрахунку різниці в інтенсивності кольору між дослідними і контрольними зразками чашки Петрі з дріжджовими колоніями фотографували, розміщали фотографії в комп'ютерну програму Adobe Photoshop, визначали показники каналів кольорової моделі (Lab), потім у програмі CIEDE 2000 розраховували різницю в інтенсивності кольору пігменту [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, дріжджі роду *Rhodotorula* відрізняються багатим якісним складом каротиноїдів. Так, *Rh. aurantiaca* здатна синтезувати γ - і β -каротини, а *Rh. glutinis*, крім зазначених вище каротиноїдів, продукує також фітоїн, фітофлюїн, ξ -каротин, нейроспорин, торулін і торулародин [7, 8]. Втрата здатності до утворення пігменту та поява безпігментних колоній у досліджуваних штамів дріжджів спостерігалася при концентраціях на 14,3-58,4 % нижче рівня тих концентрацій ВМ, за яких відбувалося повне блокування росту дріжджових клітин. Так, для *Rh. aurantiaca* 1193, у випадку з сульфатом, хлоридом і ацетатом цинку ця різниця дорівнювала 33,4, 20 та 50 % відповідно, а з сульфатом і хлоридом міді досягала по 50 %.

Повна втрата пігменту в *Rh. glutinis* 1335 спостерігалася при концентраціях $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ та $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ на 50 і 44,5 % відповідно нижчі за тих концентрацій, які повністю блокували життєдіяльність дріжджів. Для $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ та $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ця різниця становила 14,3 та 58,4 % відповідно. Дослідження показали, що сульфат цинку виявився більш токсичним, ніж сульфат міді як для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193, так і для *Rh. glutinis* 1335. Проте хлорид цинку, навпаки, проявив менш токсичну дію в порівнянні з хлоридом міді на обидва штами дріжджів (табл. 1-2 та рис. 1).

Відомо, що хлорид-іони здатні активувати деякі ферменти, тим самим вони відіграють важливу біологічну роль. Вони забезпечують іонні потоки через клітинні мембрани та беруть участь у підтриманні осмотичного гомеостазу [9]. Це може пояснювати меншу токсичність хлоридів цинку, ніж інших аніонів відносно пігментосинтезувальної здатності дріжджів.

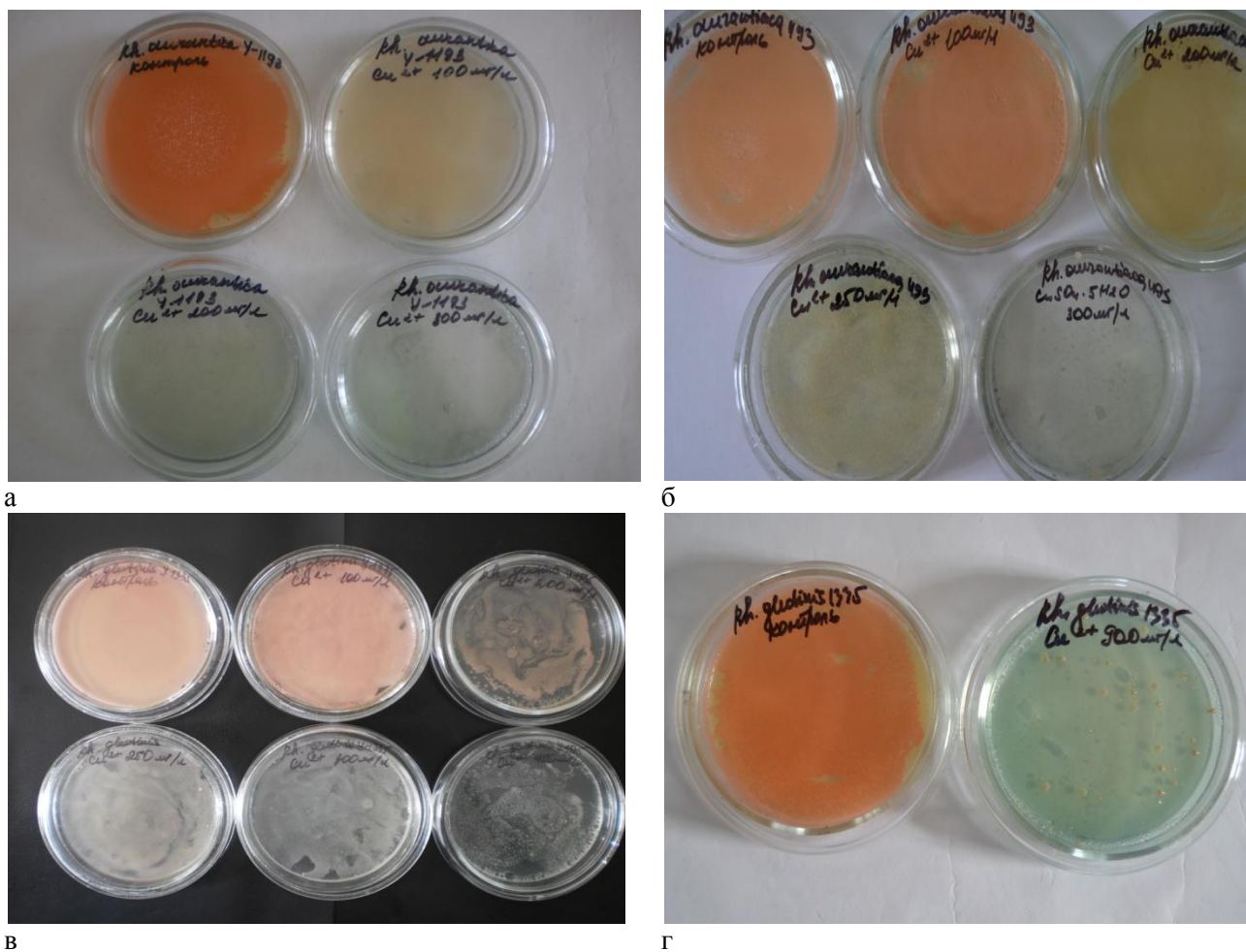


Рис. 1 Вплив аніонів солей міді на синтез пігменту в дріжджів (3 доба культивування): а – вплив $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100, 200 та 300 мг/л) на *Rh. aurantiaca* 1193; б – вплив $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100, 200, 250 та 300 мг/л) на *Rh. aurantiaca* 1193; в – вплив $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100, 200, 250, 300 та 450 мг/л) на *Rh. glutinis* 1335; г – вплив $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (900 мг/л) на *Rh. glutinis* 1335.

Таблиця 1 – Вплив аніонів солей цинку на синтез пігменту *Rh. aurantiaca* 1193

Сіль	Концентрація Zn^{2+} , мг/дм ³	3 доба культивування	
		Ріст*	Пігмент**
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50	+++	±
	100	+	-
	150	+	-
	200	-	-
ZnCl_2	50	++++	±
	100	++	±
	200	+	-
	250	+	-
	300	-	-
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50	+++	±
	100	+++	-
	200	+	-
	300	-	-

Примітка тут та далі: *ріст: ++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, - – відсутній; **пігментоутворення: ++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, - – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній.

Із підвищенням концентрацій аніонів цинку в середовищі зростала різниця в інтенсивності пігментоутворення між контролем та дослідом (dE) у *Rh. aurantiaca* 1193 (табл. 3).

Дослідження показали, що для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 серед солей цинку найбільш токсичним виявився сульфат цинку (при концентрації 100 мг/л іонів цинку спостерігався слабкий ріст безбарвних колоній), dE складала 20,8 одиниці. При тій же концентрації ацетату цинку був відмічений добрий ріст безпігментних колоній (dE дорівнювала 20,3 одиниці).

Хлорид цинку виявився у 2 рази менш токсичним для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 у порівнянні з іншими аніонами (присутність його в середовищі починала інгібувати синтез пігменту при концентрації 200 мг/л Zn^{2+}), dE становила 18,8 одиниці.

Таблиця 2 – Вплив аніонів солей цинку на синтез пігменту *Rh. glutinis* 1335

Сіль	Концентрація Zn^{2+} , мг/дм ³	3 доба культивування	
		Ріст	Пігмент
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	50	++++	±
	100	+++	±
	150	+	±
	200	+	-
	400	+	-
	500	-	-
$ZnCl_2$	200	++++	++++
	400	+++	±
	600	+	-
	700	-	-
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	100	+++	±
	400	+++	±
	500	++	-
	700	++	-
	900	+	-
	1100	-	-

Для дріжджів *Rh. glutinis* 1335 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ виявився також більш токсичним для синтезу каротиноїдів, ніж хлорид та ацетат цинку (у 3 і 2,5 рази відповідно). Пігментоутворення блокувалося при концентраціях 200, 600 і 500 мг/л сульфату, хлориду та ацетату цинку відповідно.

Таблиця 3 – Оцінка інтенсивності кольорів пігментів на концентраційний ряд аніонів солей цинку в дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193

Сіль	Концентрація Zn^{2+} , мг/дм ³	3 доба культивування			
		L	a	b	dE
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Контроль	38	25	34	-
	50	53	10	28	17,0±0,7
	100	51	3	40	20,8±0,5
	150	51	4	39	20,0±0,2
$ZnCl_2$	50	50	8	25	15,3±0,6
	100	52	9	28	16,6±0,4
	200	51	5	35	18,8±0,9
	250	49	2	39	20,1±0,7
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	50	53	14	38	16,6±0,8
	100	53	6	39	20,3±1,0
	200	49	4	44	19,7±0,5

Примітка: L, a, b – показники каналів кольорової моделі CIE Lab; dE – різниця в інтенсивності кольору між контролем і дослідом, розрахована за допомогою комп'ютерної програми CIEDE 2000.

При 100 мг/л хлориду міді спостерігався помірний ріст безпігментних колоній *Rh. aurantiaca* 1193, проте при тій же концентрації сульфату міді був відмічений суцільний ріст рожевих колоній. Синтез пігменту в *Rh. aurantiaca* 1193 інгібувався при концентрації 200 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

Дуже стійкими дріжджі *Rh. glutinis* 1335 виявилися відносно до сульфату міді. Каротиноутворення блокувалося при концентрації 1200 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Хлорид міді був менш токсичним у 4,8 разів (синтез пігменту блокувався в присутності в середовищі 250 мг/л $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Отже, дріжджі *Rh. glutinis* 1335 виявилися набагато стійкішими відносно всіх аніонів цинку та міді, ніж *Rh. aurantiaca* 1193. Можливо, це пов'язано з тим, що дріжджі *Rh. glutinis* синтезують більш широкий спектр каротиноїдів у порівнянні з *Rh. aurantiaca*, які стають «пастками» потоку вільних радикалів при ураженні клітини ВМ. Таким чином, втрата здатності до синтезу пігментів у дріжджів спонукає нас продовжувати дослідження з метою подальшого застосування пігментосинтезувальних дріжджів у біоіндикаційних дослідженнях.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що втрата здатності до утворення пігменту та поява безпігментних колоній у дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 і *Rh. glutinis* 1335 спостерігалася при концентраціях на 14,3-58,4 % нижче рівня тих концентрацій ВМ, за яких відбувалося повне блокування росту дріжджових клітин.
2. Сульфат цинку виявився більш токсичним, ніж сульфат міді як для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193, так і для *Rh. glutinis* 1335. Проте хлорид цинку, навпаки, проявив менш токсичну дію у порівнянні з хлоридом міді на обидва штами дріжджів. Хлорид цинку виявився в 2 рази менш токсичним для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 у порівнянні з іншими аніонами (присутність його у середовищі починала інгібувати синтез пігменту при концентрації 200 мг/л Zn^{2+}), для *Rh. glutinis* 1335 ZnCl_2 також проявив найменш токсичну дію (пігментоутворення блокувалося тільки при концентрації 600 мг/л іонів цинку).
3. Дріжджі *Rh. glutinis* 1335 виявилися більш стійкими відносно всіх аніонів солей цинку та міді в порівнянні з дріжджами *Rh. aurantiaca* 1193.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лужников Е.А. Клиническая токсикология / Е.А. Лужников. – М. : Медицина, 1999. – 416 с.
2. Рильський О.Ф. Наукове обґрунтування прокаріотичної біоіндикації забруднення важкими металами природного середовища : дис.... доктора біологічних наук : спец. 03.00.16 «Екологія» / О.Ф. Рильський. – К., 2011. – 40 с.
3. Рильський О.Ф. Пігментосинтезувальна активність дріжджів *Rhodotorula aurantiaca* 1193 в умовах «металевого стресу» / О.Ф. Рильський, К.С. Крупей // Вісник Запорізького національного університету : зб. наук. праць. Біологічні науки. – Запоріжжя: ЗНУ, 2013. – № 3. – С. 151-155.
4. Крупей К.С. Вплив іонів Ni^{2+} , Al^{3+} та Cr^{6+} на каротиносинтезувальну здатність дріжджів [Електронне наукове видання] / К.С. Крупей, О.Ф. Рильський, С.А. Цимбалістий // Актуальні проблеми біології, екології та хімії. – Запоріжжя : ЗНУ. – 2014. – Т. 7. – № 1. – С. 23-32. – Режим доступу: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6666.
5. Стандартизація приготування мікробних суспензій : Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006. – К. : Укрмедпатентінформ, 2006. – 5 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
6. Патент на корисну модель № 49812 Україна, МПК (2009), С12Q 1/00, С12M 1/00, С12M 1/34. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій / Рильський О.Ф., Домбровський К.О., Гороховський Є.Ю., Жиленко А.В.; заявник і патентовласник ЗНУ.

– № u200912311; заявл. 30.11.2009; опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9, 2010 р.

7. Каротинсинтезирующие дрожжи [Квасников Е.И., Васкивнюк В.Г., Суденко В.И., Гринберг Т.А.]. – К. : Наукова думка, 1980. – 171 с.
8. Joshi V K. Microbial Pigments / Joshi V K, Devender Attri, Anju Bala [et al.] // Indian Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 2. – pp. 362-369.
9. Смирнова Г.Ф. Распространение бактерий, устойчивых к кислородсодержащим анионам-ксенобиотикам / Г.Ф. Смирнова // Мікробіологічний журнал. – 2005. – Т. 67, № 5. – С. 11-18.

REFERENCES

1. Luzhnikov E.A. Klinicheskaja toksikologija / E.A. Luzhnikov. – М. : Medicina, 1999. – 416 s.
2. Ril's'kij O.F. Naukove obruntuvannja prokariotichnoї bioindikacії zabrudnennja vazhkimi metalami prirodnoho seredovishha : dis.... doktora biologichnih nauk : spec. 03.00.16 «Ekologija» / O.F. Ril's'kij. – К., 2011. – 40 s.
3. Ril's'kij O.F. Pigmentosintezuval'na aktivnist' drizhdzhiv Rhodotorula aurantiaca 1193 v umovah «metalevogo stresu» / O.F. Ril's'kij, K.S. Krupej // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu : zb. nauk. prac'. Biologichni nauki. – Zaporizhzhja: ZNU, 2013. – № 3. – S. 151-155.
4. Krupej K.S. Vpliv ioniv Ni²⁺, Al³⁺ ta Cr⁶⁺ na karotinosintezuval'nu zdattist' drizhdzhiv [Elektronne naukove vidannja] / K.S. Krupej, O.F. Ril's'kij, S.A. Cimbalistij // Aktual'ni problemi biologії, ekologії ta himії. – Zaporizhzhja : ZNU. – 2014. – Т. 7. – № 1. – S. 23-32. – Rezhim dostupu: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6666.
5. Standartizacija prigotuvannja mikrobnih suspensij : Informacijnij list pro novovvedennja v sistemi ohoroni zdorov'ja № 163-2006. – К. : Ukrmedpatentinform, 2006. – 5 с. – (Normativnij dokument. MOZ Ukraїni; Ukraїns'kij centr naukovoї medicjnoї informacії ta patentno-licenzijnoї roboti. Informacijnij list).
6. Patent na korisnu model' № 49812 Ukraїna, MPK (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. Sposib viznachennja intensivnosti pigmentoutvorenja u bakterij / Ril's'kij O.F., Dombrovs'kij K.O., Gorohovs'kij Є.Ju., Zhilenko A.V.; zajavnik i patentovlasnik ZNU. – № u200912311; zajavl. 30.11.2009; opubl. 11.05.2010, Bjul. № 9, 2010 r.
7. Karotinsintezirujushhie drozhzhi [Kvasnikov E.I., Vaskivnjuk V.G., Sudenko V.I., Grinberg T.A.]. – К. : Naukova dumka, 1980. – 171 s.
8. Joshi V K. Microbial Pigments / Joshi V K, Devender Attri, Anju Bala [et al.] // Indian Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 2. – pp. 362-369.
9. Smirnova G.F. Rasprostranenie bakterij, ustojchivyh k kislorodsoderzhashhim anionam-ksenobiotikam / G.F. Smirnova // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2005. – Т. 67, № 5. – S. 11 -18.

РОЗДІЛ V. БІООРГАНІЧНА ХІМІЯ ТА БАР

УДК 547.831.88 : 57.01

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF 4-THIOQUINOLINES (REVIEW)

Brazhko O.O.

*Zaporizhzhya National University
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Str., 66*

hellen.brazhko@gmail.com

The biological activity of newly synthesized physiologically active substances, such as 4-thioquinolines was determined. It was found out they are promising biologically active substances with various types of biological effects by antioxidant and antiradical mechanisms of action. The research also reflected antimicrobial activity inhibition of gram-positive and gram-negative microorganisms. Among thioquinolines there were found substances demonstrating not only bacteriostatic and fungistatic activities but also an analgesic one. Systematic studies of 4-thioquinolines on models *in vitro* and *in vivo* have revealed they are promising as antioxidants and antihypoxants.

Keywords: biological activity, free-radical oxidation, 4-thioderivatives quinoline.

БИОЛОГИЧНА АКТИВНІСТЬ 4-ТІОХІНОЛІНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Бражко О.О.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

hellen.brazhko@gmail.com

Проведено визначення біологічної активності нових синтезованих фізіологічно активних речовин, а саме 4-тіопохідних хіноліну. Вони проявили себе як перспективні біологічно активні речовини з різноманітними видами біологічної дії за рахунок антиоксидантного та антирадикального механізмів дії. Також дослідження антимікробної дії показало пригнічення розвитку грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. Серед тіохінолінів знайдені речовини, що володіють крім бактеріостатичної і фунгістатичної дії, також анальгетичною активністю. Систематичні дослідження 4-тіохінолінів на моделях *in vitro* та *in vivo* показали їх перспективність як антиоксидантів і антигіпоксантів.

Ключові слова: біологічна активність, вільнорадикальне окислення, 4-тіопохідні хіноліну.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 4-ТИОХИНОЛИНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Бражко Е.А.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

hellen.brazhko@gmail.com

Проведено определение биологической активности новых синтезированных физиологически активных веществ, а именно 4-тиопроизводных хинолина. Они проявили себя как перспективные биологически активные вещества с различными видами биологического действия за счет антиоксидантного и антирадикального механизмов действия. Также исследования антимикробного действия показали подавление развития грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Среди тиохинолинов найдены вещества, обладающие, кроме бактериостатического и фунгистатического действия, также анальгетической активностью. Систематические исследования 4-тиохинолинов на моделях *in vitro* и *in vivo* показали их перспективность как антиоксидантов и антигипоксантов.

Ключевые слова: биологическая активность, свободнорадикальное окисление, 4-тиопроизводные хинолина.

INTRODUCTION

Important meaning for finding new highly effective and low-toxic bioactive molecules has nitrogen-containing design as well as effective biologically active compounds. Preparations based on quinoline has an important place in the modern arsenal of antimicrobial chemotherapy drugs. Derivatives of nitrogen-containing heterocycle also exhibit antitumor, analgesic, antipyretic,

neurotropic action, they are effective immunomodulators ect. In addition, quinoline derivatives are used as veterinary drugs, pesticides, dyes, analytical reagents [1-3]. Among the best known quinoline substitutes are nitrogen (2- and 4-aminoquinolines) and oxygen-containing (8-hydroxyquinolines and quinolones-4) derivatives. Much less explored are sulfur-containing derivatives. Biological activity of 4-thioquinolines poorly understood. The absence of a systematic study of the scientific literature on this issue was the main reason for the study of 4-thioquinoline and its analogues as potential compounds with different types of biological effects.

The purpose of the review is to consider the biological activity of newly synthesized physiologically active substances, namely 4-thio derivatives of quinoline, identifying promising as biologically active substances with different types of biological action.

THE MAIN PART

4-Quinoline thioderivatives primarily developed as potential antibacterial and antimalarial drugs [4, 5], but the spectrum of quinoline derivatives is much wider. Antitumor activity is known for 4-quinoline thioderivatives. Cytotoxic effect of 4-mercapto-2-methyl-6-methoxyquinoline appears on the culture of strain KO tumors in vitro at a concentration of 100 mg/ml, due to the blocking of mitosis at metaphase [6, 7].

Investigation of antimicrobial action 4-S-quinoline derivatives showed different degrees of activity against gram-positive and gram-negative microorganisms. Thus, 4-mercapto-2-methylquinoline inhibits the development of *St. aureus* and *Ps. aeruginosa* at a concentration of 200 mg/ml of *E. coli* – 50 mg/ml. This is attributed to the complexing ability of this compound and the ability to accumulate heavy metals in toxic concentrations. Introduction aliphatic carboxylic acid residue mercapto narrow spectrum of antimicrobial activity (quinoline-4-ylthio)carboxylic acids. Salt (2-methylquinoline-4-ylthio)acetic acid have a greater range of biological activity than the corresponding acid-appears antimicrobial action with respect to *B. subtilis* at a concentration of 50mg/ml [8]. Investigation of antimicrobial S-(hinaldine-4-yl)-L-cysteine and its analogues have shown that these compounds has weak antimicrobial activity. Acids are more active than salts, and 2-aminopropane acids are more effective than propane acid. Among thioquinolines are found substances that has except bacteriostatic and fungistatic effects also analgesic activity [9]. 4-Phenylthioquinolines have antiviral effect [10].

Study antimalarial activity alkylthioquinolines showed that the inhibitory activity of the compounds caused the action with respect to NADH and suktsynooksydase KoQ-enzyme systems of mitochondria. In addition, the literature data on quinoline derivatives such as N-oxides of 2-R-3-R'-4-R''-quinoline, where R = Cl; R' = H, Hlg; R'' = SCH₂Ph, SAlk, which suppress the system of electron transporting in the respiratory chain of mitochondria.

Past research S-substituted 4-mercaptoquinolines has recently indicate promising finding among this series of compounds, not only substances with antibacterial action, but also with antihypertensive, neurotropic, woundhealing, analgesic, anti-inflammatory and other types of bioactivity [2, 8, 11-13].

For example, derivatives of 4-(aminoalkylthio)-quinoline have anti-inflammatory properties and ganglia blocking (Fig. 1) [4-7, 13-24].

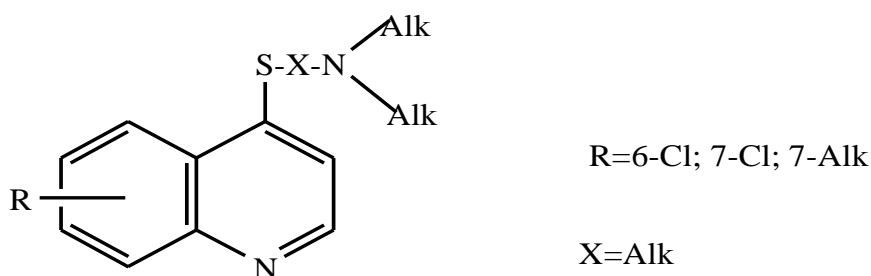


Fig.1. Derivatives of 4-(tert-aminoalkylthio)-quinolines

The combination in one molecule two heterocycles connected by sulfide sulfur, leads to very interesting biological effects. Thus, the introduction into the molecule mercaptoquinoline and 4-quinazoline leads to a significant analgesic, anti-inflammatory and neurotropic action at a sufficiently high toxicity, and 1,2,4-triazole-5-yl in a slight analgesic, neurotropic action in the absence of anti-inflammatory activity and toxicity in 1.5 times higher than in the case of 4-quinazoline derivatives [25].

Medications based on 4-alkylthioquinolines (R = H, C₁-C₅ alkyl, alkanoyl) exhibit selective anxiolytic action without revealing sedative and anticonvulsant effects [16].

Thiazolo[4,5-c]quinoline (Fig. 2) show a depressive effect and unlike benzodiazepines do not show seizures [26].

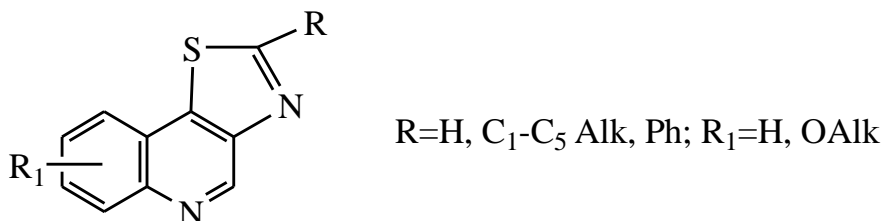


Fig.2. Derivatives of thiazolo[4,5-c]quinoline

Among the S-alkylthioderivatives quinoline found substances that are antagonists of 5-hydroxytryptamine. The toxicity of these compounds is largely determined by the length and branching of alkyl radical.

Quinoline hydrobromide benzoylmethylthioderivatives show diuretic, neurotropic activity and moderate antimicrobial action to *Staphylococcus aureus*, fungus and spores antrakoyid. With the introduction of substituents (bromine atom, nitrogroup) in the fourth position of the benzene ring moiety fenacyl observed weakening diuretic effect and appears weak neuroleptic effect [8, 47].

Systematic studies of 4-thioquinolines on models *in vitro* and *in vivo* have shown their prospects as antioxidants and antihypoxants [27-30]. Among the investigated compounds of the AOA in *in vitro* models out 4-mercaptoquinolines, due to the presence of sulfhydryl groups with potentially high antiradical and antioxidant properties. The condition " thione - thiol " balance has effect on the implementation of the biological effect of 4-mercaptoquinolines. By reducing acid properties mercaptoquinolines (respectively increased contribution of thions structure) tended to decrease in AR action. These investigation were observed in three models, the initiation of free radical oxidation (FRO) - induction superoxyderadical (SOR), enzymatic initiation (EI) POL no enzymatic initiation (NEI) POL. The most pronounced dependence " AOA - pKa " has place on a model of induction. O₂. It should be noted that the increase in the contribution mercaptoforms (thiol) contributed to an increase in acute toxicity.

When replacing a hydrogen atom in the sulfhydryl group at the 4-methylmercaptoquinolines, aralkyl or carboxyl radical observed occurrence of significant (at aspirin and more) analgesic activity. Esterification (quinoline-4-ylthio)carboxylic acids has different effect on it action. Thus, ethyl esters are somewhat inferior to the action corresponding acid and methyl exhibit significant analgesic activity that exceeds the action corresponding acid.

Based on the results of biological screening revealed that (2-methylquinoline-4-ylthio)acetic acid and its derivatives endowed with high antiradical, antioxidant, anti-hypoxic, membrane types and antiischemic activity [27, 28]. Study of water-soluble compounds - salts (quinoline-4-ylthio)acetic acid - indicate that as much antioxidant and would healing effects have substance with sodium ions and alkylammonium component (monoethanolamine) [8].

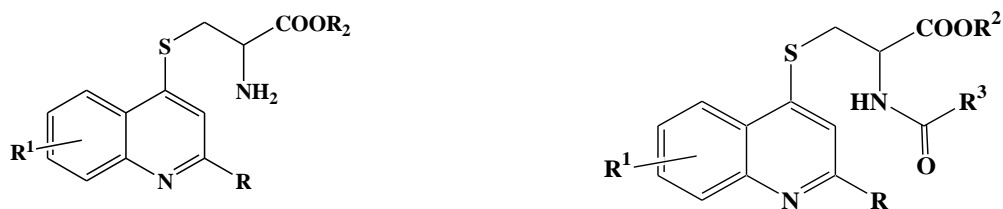
Among the S-substituted 4-mercaptoquinolines on *in vitro* models for AOA the main is hydrochloride (2-methylquinoline-4-ylthio)acetic acid, which showed significant activity

on all models of initiation and FRO exceeded the action of all other S-substituted 4-ercaptoquinoline and as standard drugs by 20-50%. In the model generation SOR derivatives (2-methylquinoline-4-ylthio)acetic acid proved to be effective "trap" superoxide anion. Enhancing effect was observed in the series: ester < hydrazide < sodium < acid < hydrochloride. Introduction to the 6th position of the quinoline series alkoxy (methoxy or ethoxy) model induction SOR helped reduce AOA. Among the most active derivatives (quinoline-4-ylthio)carboxylic acids detected compounds whose pKa is about 3.0.

The presence of sulfur atom determines how antiradical protection ($\cdot\text{OH}$), and inhibition peroxidation of lipids processes (ROON) due to the regenerative properties of 4-thioquinolines to form a six-membered sulfoxide and complexes of metals of variable valence - pro-oxidant, which greatly enhance the processes of FRO. Introduction alkoxygroups in the sixth or eighth position of quinoline for S-substituted 4-mercaptoquinoline contributed to a significant reduction of acute toxicity, occurrence of severe antiischemic, cerebroprotective, analgesic and anti-inflammatory actions [31, 32, 44]. For antiflogistic effect alkoxyderivatives 2-(4-methylquinolinethio)carboxylic acids compete with drugs phenylbutazone and compare voltarene. Their derivatives (salts, esters, hydrazides) yield the corresponding acid by the action. It is believed that the implementation of the mechanism of biological action *in vivo* of the most active compounds – sodium salts of 6-methoxy- and 6-ethoxysubstituted (2-methylquinoline-4-ylthio)acetic acid participate sulfur residue thioglycolic acid carboxyl group and endogenous nitrogen atom, which significantly increases the basicity of the methyl group at the 2nd position of the quinoline by hyper conjugation. The latter may be involved in chelation binding metals of variable valence - prooxidant in sufficiently stable five-membered complex and inhibit free radical oxidation reactions in Fenton and Khaber-Weiss. Most likely, the introduction of the 6th position alkoxygroups leads to increased activity by desalkylation and formation phenolate structure that is able to extinguish peroxide radicals [8, 33].

Revealed the ability of S-substituted 8-methoxy-2-methyl-4-mercaptoquinoline act as "traps" superoxidation *in vitro* in the water phase hydroxyl radical intercept in heterogeneous systems. Studied compounds inhibit the formation of reactive nitrogen oxide, and a range of display antioxidant properties depend on the nature of residues of carboxylic acids in the 4th position of the quinoline cycles [10].

The perspective of the creation of bioactive molecules by combining not only mercaptocarbons acids, and natural amino acids (cysteine) or analogues of quinoline system is confirmed by comprehensive studies of the compounds synthesized in the laboratory of biotechnology of the physiologically active substances (Fig. 3). These virtual screening and biological studies indicate significant potential for these substances as bioactive molecules [1-3, 34-37].



$R = \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$; $R^1 = \text{H}, 6\text{-OCH}_3, 6\text{-OC}_2\text{H}_5, 6\text{-F}, 6\text{-Cl}, 6\text{-Br}, 8\text{-OCH}_3$; $R^2 = \text{H}, \text{Na}, \text{K}, \text{CH}_3$;

$R^3 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{C}_6\text{H}_5, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}(\text{Na})$

Fig. 3. Potential bioregulators based on quinoline derivatives and cysteine

Computer prediction of biological activity of derivatives of S-heteryl-L-cysteine derivatives showed that a number of investigational compounds are perspective for finding compounds with antiradical, neuroprotective, radioprotective, antiviral activity, for the treatment of psychosexual dysfunction. Probability projected increase in toxicity for salts and esters. Conducted forecast range of biological effects in a number of derivatives of S-(2-methylquinoline-4-yl)-L-cysteine and their structural

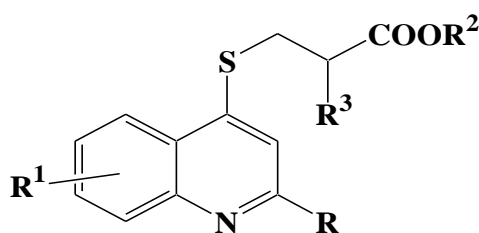
analogues showed that these substances do not have high toxicity and carcinogenicity terato-, embryotoxicity, and are also perspective for creation of a low-toxicity bioregulators with specific spectrum of activity.

We found that these derivatives belong to low-toxic and virtually non-toxic compounds, their LD50 is in the range of 100-1500 mg/kg. The simultaneous presence of amino- and carboxy residue of cysteine, and introducing radical in the 6th position of the quinoline cycle leads to a decrease in toxicity. The transition from the S-heterylderivatives cysteamine to N, S-bisheterylderivatives leads to a decrease in toxicity. Replacement hydrogen atom in sodium ion or a methyl group of S-heterylacids increases the acute toxicity of compounds [36].

The results of experimental studies of sodium salts of S-(hinaldine-4-yl)-L-cysteine under experimental ischemic brain tissue suggests that these compounds normalize levels of antioxidant enzymes, reduce the content of FRO products and exceed the known antioxidant effect of dibunol. There is a tendency to increase antioxidant and cerebroprotective action depending on the nature of the substituent in the series: $\text{OH} < \text{OCH}_3 \leq \text{OC}_2\text{H}_5 < \text{H}$. It is associated with an increase in their lipophilicity and ability to desalkylation by alkoxygroups to form phenolate structures [38].

As a perspective antioxidants and cerebroprotectors acyl analogues above compounds – sodium salt of S-(hinaldine-4-yl)-N-acetylcysteine deserve attention. These substances has the great interest due to the fact that there are structural analogues of known antioxidants - acetylcysteine [27, 37, 39, 46]. Sodium salt of S-(hinaldine-4-yl)-L-acetylcysteine for the inhibition of formation of FRO and influence on the activity of antioxidant enzymes is somewhat dominated by its no acyclic counterparts [8, 48].

Perspective bioactive substances are derivatives of β -(2-methylquinoline-4-yltio)- α -hydroxypropion acid. The analysis showed that compounds endowed with antioxidant and protective properties. The degree of development depends on the nature of the substituents in the 6th position of the quinoline, near the carboxyl and amino groups of L-cysteine residue and implemented by inhibition of the main ways the formation of reactive oxygen species and antioxidant system reactivation. Introduction alkoxygroup compounds in the sixth position of the quinoline model of oxidative stress in cerebral ischemia approached to normal performance stability of membranes of neurons and hepatocytes, the level of food inthe role, indicators of energy metabolism. The presence of methoxy contributed to the development antiischemic and antioxidant effect, and the introduction of ethoxy increased hepatoprotective activity [40, 43].



R = CH₃, C₆H₅; R₁ = H, 6 -OCH₃, 6 -OC₂H₅, 6 -F, 6 -Cl, 6 -Br, 8 -OCH₃; R₂ = H, Na, K, CH₃;
R₃ = H, OH, Cl

Fig. 4 Potential bioregulators based on derivatives of quinoline and mercaptocarbons acids

The most pronounced antioxidant, neuroprotective and membranoprotective action inherent in 2-hydroxy-3-(8-methoxy-2-methylquinoline-4-yltio)propionic acid. These affections are realized by reducing the activity of free radical processes of normalization energy processes, recovery of enzymatic antioxidant defense system [3].

The effect of salts S-(hinaldine-4-yl)-L-cysteine and its analogues are investigated on the growth and development of plant cells (cytotoxicity). For compounds having no substituent at the 6th position of the quinoline structure, an increase in performance compared to controls (mean concentration). With the introduction of a chlorine in the 6th position occurs enhance cytotoxicity

propionate compared with 2-aminopropionats. The presence of methoxy significantly stimulated the growth of performance at low and high concentrations of compounds [41].

The above substances are also promising as radioprotectors. In terms of in vivo was most effective dihydrochloride S-(6-ethoxy-2-methylquinoline-4-yl)-cysteamine, which is decarboxylated analogue S-(quinoline-4-yl)-L-cysteine. The presence of carboxyl groups or amino acyl group blocking not only leads to loss of radioprotective properties, and even has some complications of radiation sickness [41].

We prove that the derivative S-(2-methylquinoline-4-yl)-cysteamine are perspective compounds with analgesic activity. The introduction of fluorine atom at the 6-position of the quinoline nucleus that greatly enhances bioactivity [42, 45].

An important feature of the pharmacological action of 4-thioquinoline is their ability to influence the concentration of catecholamines in stress levels are greatly increased. In the model immobilization stress of rats, the concentration of epinephrine and norepinephrine, the effect of the compounds of this series on the state of the sympathetic-adrenal system. Thus, the preventive administration of the sodium salt of S-(2-methyl-6-methoxyquinoline-4-yl)-L-cysteine with subsequent immobilization resulted in a reduction of adrenaline by 65% compared with the intact group. The concentration of noradrenaline more pronounced influence sodium (2-methyl-6-methoxyquinoline-4-ylthio)acetic acid. It is believed that these compounds act on the endocrine function of unmediated adrenal medulla. This feature combined with a strong antioxidant activity, probably determines the protective effect of these drugs during stress [3].

The mechanism of antioxidant action and cerebroprotective most advanced S-desalkylation carboxyalkilderivatives realized by remaining carboxylic acid to form 4-mercaptoquinolines. Water-soluble carboxylic acid residue in this case is the transport function mercaptoderivative. Sulfur atom thiocarbons acid and endogenous nitrogen atom acting as substitutions potentially high antioxidant properties. Severity of these properties greatly depends on the "thione - thiol" balance and the ability to form complexes. 4-quinoline thioderivatives perspective bioactive substances with various types of biological action through antioxidant and antiradical mechanisms of action.

The practical importance of the review is that these substances can further be considered as promising biologically active substance with various types of biological actions: antioxidant, antiradical. antimicrobial. Also among thiohinolinov found substances with bacteriostatic and fungistatic except actions as analgesic activity. Systematic studies of the 4- thioquinolines models in vitro and in vivo have shown their promising as antioxidants and antihypoxants.

CONCLUSIONS

1. The biological activity of newly synthesized physiologically active substances, such as 4-thioquinolines was determined. It was found out they are promising biologically active substances with various types of biological effects by antioxidant and antiradical mechanisms of action.
2. The research also reflected antimicrobial activity inhibition of gram-positive and gram-negative microorganisms.
3. Among thioquinolines there were found substances demonstrating not only bacteriostatic and fungistatic activities but also an analgesic one.
4. Systematic studies of 4-thioquinolines on models in vitro and in vivo have revealed they are promising as antioxidants and antihypoxants.

LITERATURE

1. Завгородній М.П. Біологічна активність нових 4 – тіопохідних хіноліну / М.П. Завгородній, О.А.Бражко, Л.О. Омелянчик // Актуальні питання біології, екології та хімії: Електор. наук. вид. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 86-97.

2. Громова В. П. Дослідження антиоксидантної активності тіопохідних хіноліну / В. П. Громова, Л. О. Омелянчик, О. А. Бражко // Укр. біохім. журн. – 2005.–Т. 77, № 3.– С.87–95.
3. Біологічна активність S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну / [Генчева В.І., Омелянчик Л.О., Бражко О.А. та ін.] // Вісник ДОНУ. – 2010. – №2. – С. 224-228.
4. Szendey G. Anthicholinesterase-Aktivetet-Chemische modelluntersuchungen. Mitt. Symmetriische bisguartare zyklische amine mit starree interquarterer kette / G. Szendey // Arzneimittler-Forsch. – 1972. – Bd. 22, № 10. – S. 1746-1748.
5. Vendemiaie G. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease / G.Vendemiaie, I. Grattagliano, E. Altomare // Int. J. Clin. Lab. Res.– 1999.– Vol. 29, № 2.– P. 49–55.
6. Monti L. Fapre alenni derivebi tiochinolinici / L. Monti, G. Franchi // Gezz. chim ital. – 1961. – Vol. 91, № 1. – P. 115 – 120.
7. Sing T. “Proximal” hydrazine derivatives of 7-chloroquinoline / T. Sing, R. Stein., J. Bill // J. Med. Chem. – 1968. – Vol. 12, № 4 – P. 801-803.
8. Бражко О.А. Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото– та сірковмісними функціональними групами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук: 02. 00.10 / О.А. Бражко. – Запоріжжя, 2005. – 42с.
9. Buchmann G. Uber 5-brom-8-alkylmercaptochinoline / G. Buchmann, R. Schuck // Wiss. Z. Techn. Hochschule Chem. Leune - Merzburg. – 1965. – Bd. 28, № 3-4. – S.141-156.
10. Oiry J. Conjugate: A New Potent Antioxidant which Increases the GSH Level in Various Cell Lines \ [J. Oiry, P. Mialocq, J. Puy et al.] \\ Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, English. – 2001. – V. 11, № 9. – P. 1189 – 1192.
11. Гостра токсичність, антиоксидантна та ранозагоююча активність похідних хіназоліну та хіноліну / [Беленічев І.Ф., Коваленко С.І., Бражко О.А. та ін.] // Вісник ЗДУ. – 2001.– № 1.– С.143–147.
12. Поиск биологически активных веществ среди производных 4–тиохинолина и 9–тиоакридина / [Панасенко Т.В., Бражко А.А., Самура Б.А. та ін.] // Вестник проблем биологии и медицины.– 1997.– № 4.– С. 11–18.
13. Andersag H. Verfahzen zun herstellund von 4-(tret-aminoalkylmercapto)-chinolinverbindemgen/ H.Andersag, R. Hiltmann, F. Mietzsch // РЖ Химия. – 1960. – № 21. – P. 859-865.
14. Synthesis of N-acridinyl and N-quinolinyl derivatives of radioprotective amino-thiols / [Demonchaux P., Laayoun A., Demeunynck M.et al.] // Tetrahedron, English. – 1989. – V. 45, № 20. – P. 6455-6466.
15. Gage J.L. N-Acyhydrazones as inhibitors of PDE10A / J.L. Gage, R.R.A. Onrust, K.G.S. Harbol // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2011. – Vol. 21, Is. 14. – P. 4155 – 4159.
16. Syntesis and antibacterial activity of new 4-alkoxy, 4-aminoalkyl and 4-alkylthioquinoline derivatives / [Kayirere M.-G., Abdallah M., Chevalier J.et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry, English. – 1998. – V. 33, № 1. – P. 55 – 64.
17. Kazi S.A. Synthesis of quinoline thioethers as novel small molecule enhancers of monoclonal antibody production in mammalian cell culture / S.A. Kazi, G.F. Kelso, S. Harris // Tetrahedron. – 2010. – Vol. 66, Is. 48. – P. 9461 – 9467.

18. Hematin Polymerization Assay as a High-Throughput Screen for Identification of New Antimalarial Pharmacophores / [Kurosawa Y., Dorn A., Kitsuji-Shirane M. et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, English. – 2000. – V. 44, № 10. – P. 2638 – 2644.
19. Matias C. Synthesis and Antimalarial Activity of New 4,6-Dialkoxy- and 4,6-Bis(alkylthio)pyrido[3,2-g]quinoline Derivatives / C. Matias, M. Abdallah, J. Barbe // *Heterocycles*, English. – 1996. – V. 43, № 8. – P. 1621 – 1632.
20. Natarajan J.K. 4-N-, 4-S-, and 4-O-Chloroquine Analogues: Influence of Side Chain Length and Quinoyl Nitrogen pKa on Activity vs Chloroquine Resistant Malaria / J. K. Natarajan, J. N. Alumasa, K. Yearick // *Journal of Medicinal Chemistry*, English. – 2008. – V. 51, № 12. – P. 3466 – 3479.
21. Radl S. Priprava nekterych 4-fenoxy- a 4-fenyltooderivatu 1H-pyrazolo[3,4-b]chinolinu s protivirovym ucinkem / S. Radl, V. Zikan, F. Smejkal // *Cs. Farm.* – 1985. – Bd. 34, № 3-4. – S. 119-122.
22. Disulfide S-Monoxides Convert Xanthine Dehydrogenase into Oxidase in Rat Liver Cytosol More Potently Than Their Respective Disulfides / [Sakuma S., Fujita J., Nakanishi M. et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, English. – 2008. – V. 31, № 5. – P. 1013 – 1016.
23. Selvi G. Convenient method for the synthesis of 2-phenyl-4-chloro-3-formylquinoline and its utility for the synthesis of Thieno(3,2-c)-4-phenylquinoline-2- carboxylic acid / G. Selvi, S.P. Rajendran // *Heterocyclic Communications*. – 2009. – Vol. 15, Is. 5. – P. 349 – 350.
24. Avetisyan A.A. Synthesis of 1-[2-Methyl-6(8)-R-quinolin-4-yl]thiosemicarbazides / A.A. Avetisyan, I.L. Aleksanyan, L.P. Ambartsumyan // *Russian Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – Vol. 46, Is. 4 – P. 560 – 564.
25. Синяк Р.С. Синтез и биологические свойства производных 4-гетерилмеркаптохиназолина / Р.С. Синяк, И.А. Мазур, В.Р. Стец // *Хим.-фармац. журн.* – 1986. – № 2. – С. 168-171.
26. Пат. на корисну модель № 44791 Україна (2009) C07D 215/00, Лабенська І.Б., Бражко О.А., Омелянчик Л.О., Завгородній М.П. Динатрієва сіль N-сукциноіл-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну, що має гепатопротекторну активність, Заяв. 28.05.2009; Опубл. 12.10.2009, Бюл. №19. – 4 с.
27. Омелянчик Л.О. Вивчення антиоксидантної та протиішемічної дії 4-тіопохідних хінальдину на моделі гострого порушення мозкового кровообігу /Л.О. Омелянчик, І.Ф. Беленічев, О.А. Бражко // *Ліки.* – 2000. – № 1– 2. – С. 40–43.
28. Бражко О.А. Антиоксидантна активність 4-тіопохідних хіноліну у дослідях *in vitro* / О.А. Бражко, М.М. Корнет, М.П. Завгородній // *Вісник ДоНУ. Сер.А: Природничі науки.* – 2009, вип. 2. – С. 294-298.
29. Бражко О.А. L-цистеїн – синтон для створення біологічно активних речовин / О.А.Бражко // *Актуальні питання біології, екології та хімії: Електор. наук. вид.* – 2009. – Т. 1, № 1 – С. 4 – 15.
30. Бражко О.А. Дослідження біологічної дії 4-тіопохідних хіноліну / О.А. Бражко, Л.О. Омелянчик, І. Ф. Беленічев // *Медична хімія.* – 2001. – Т. 3, № 1. – С. 20–23.
31. Лабенська І.Б. Дослідження протизапальної активності N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну / І.Б. Лабенська, Л.О. Омелянчик, О.А. Бражко // *Запорожский мед. журн.* – 2011, Т.13, №5. – С.143-145.
32. Пат. на корисну модель 49819 МПК 2009, C07D215/00. Генчева В.І., Омелянчик Л.О., Бражко О.А., Завгородній М.П. Натрієва сіль 2-гідрокси-3-(8-метокси-2-метилхінолін-

- 4-ілтіо)пропанової кислоти, що має антиоксидантну, нейропротекторну активність, Заявл. 30.11.2009, Опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9, 2010. – 10 с.
33. Лабенська І.Б. Залежність біологічної активності N-ацильних похідних 6-алкокси-2-метил-4-меркаптохіноліну від природи замісників у шостому положенні гетероциклу / І.Б. Лабенська, Г.С.Шаповал, Л.О.Омельянчик //Український біохім. журн. – 2010. – Т.82, № 3. – С. 49-54.
 34. Завгородній М. П. Дослідження антиоксидантної та протиішемічної активності натрієвих солей похідних β– (2–метилхінолін – 4– ілтіо) – молочної кислоти в умовах експериментальної ішемії головного мозку / М.П. Завгородній // Вісник ЗДУ. – 2002. – № 3.– С. 100–104.
 35. Завгородній М.П. Ліпофільність S-похідних нітрогеновмісних гетероциклів /М.П. Завгородній, О.А.Бражко, Л.О. Омельянчик //Вісник ЗНУ. Сер. Біологічні науки. – 2011. – № 2. – С. 150-155.
 36. Петруша Ю.Ю. Біологічна активність деяких S-гетерилзаміснених L-цистеїну та їх аналогів /Ю.Ю.Петруша, Л.О. Омельянчик, О.А. Бражко //Ukrainica Bioorganica Acta. – 2011. – № 2. – С. 46–52.
 37. Компютерний прогноз біологічної активності деяких N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну / [Уліщенко Е.О., Бражко О.А., Омельянчик Л.О. та ін.] //Питання біоіндикації та екології.- 2011. – №2. – С. 165-179.
 38. Бражко О.А. Біорегулятори на основі N,S-похідних L-цистеїну (огляд літератури) /О.А.Бражко, Є.О.Уліщенко, М.М. Корнет // Вісник ЗНУ. – 2011. – № 1. – С. 123-132.
 39. Антиоксидантные и антитоксические свойства ацетилцистеина [Електронний ресурс] / Український медичний часопис. – 1999. – № 6 (14) XI–XII.– Режим доступу до журн. <http://www.umj.com.ua/archive/14/1203.html>).
 40. Бражко А.А. Действие производных (хинальдин–4–илтио)карбоновых кислот на содержание катехоламинов при стрессе / А.А. Бражко // Вісник ЗДУ.– 2002.– № 2.– С. 115–117.
 41. Корнет М.М. Токсичність та антиоксидантна активність 4-тіопохідних хіноліну з потенційними радіпротекторними властивостями /М.М.Корнет, О.А.Бражко, О.С.Кругляк // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 3 (22). – С. 50-56.
 42. Brazhko A.A. About interaction of the 2-methyl(phenyl)-4-chloro-quinolines with N(S)-binucleophils /A.A.Brazhko, М.М. Kornet, М.Р. Zavgorodniy // Book of Abstracts International conference „Chemistry of nitrogen containing heterocycles”, Kharkiv, 2009. – P. 21.
 43. Бражко О.А. Пошук біологічно активних речовин серед амідів та гідразидів (хінолін–2–ілтіо– і 4–ілтіо)карбонових кислот /О.А. Бражко, Л.О. Омельянчик, М.П Завгородній //Запорожский мед. журн. – 2004.– Т. 2, № 1 (22). – С. 39–42.
 44. Лабенська І.Б. Вплив N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну на мембрани еритроцитів щурів при токсичному гепатиті / І.Б. Лабенська, Л.О. Омельянчик, О.А. Бражко // Вісник ЗНУ. Сер. Біологічні науки. – 2010, № 2. – С. 111-117.
 45. Brazhko A.A. Synthesis and biological activity of derivatives (quinoline-4-thio)carboxylic acids / А.А.Brazhko, М.М.Kornet, М.Р. Zavgorodniy // Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles, CNCH-2012. Book of Abstracts. – Kharkiv : Ekskluziv Publ., 2012. – P. 67.
 46. Уліщенко Е.О. Віртуальний скринінг та синтез нових N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну як потенційних біорегуляторів направленої дії

/Є.О.Уліщенко, О.А.Бражко, Л.О. Омелянчик //Медична хімія. – 2012. – Т. 14, № 3 (52). – 94-99 с.

47. Мартыновский А.А. Синтез и биологическая активность бензоилметилтиопроизводных пиридина, хинолина и акридина / А.А. Мартыновский, А.А. Бражко, В.Г. Булах // Хим.-фарм. журн. – 1991.– № 2. – С. 20–22.
48. Пат. 28789 Україна, МКИ 7 C07D 215/36. 2–метил–6–метоксихіноліл–4–тіоацетат натрію, що проявляє протиішемічну та антиоксидантну активність / Омелянчик Л. О., Бражко О. А., Беленічев І.Ф., Завгородній М. П. (Україна). – №970947–17; Заявл. 23. 09. 97; Опубл. 15.05. 02. – Бюл. №5. – С. 3.

REFERENCES

- Zavgorodnij M.P. Biologichna aktyvnist novyh 4 – tiopohidnyh hinolinu / M.P. Zavgorodnij, O.A. Brazhko, L.O. Omeljanchyk // Aktualni pytannja biologii, ekologii ta himii: Elektor. nauk. vyd. – 2009. – Т. 1, № 1 – S. 86 – 97.
- Gromova V.P. Doslidzhennja antyoksydantnoi aktyvnosti tiopohidnyh hinolinu / V.P. Gromova, L.O. Omeljanchyk, O.A. Brazhko // Ukr. biohim. zhurn. – 2005.–Т. 77, № 3.– S. 87–95.
- Biologichna aktyvnist S-zamishhenyh 2-metyl-4-merkпто-8-metoksyhinolinu / [Gencheva V.I., Omeljanchyk L.O., Brazhko O.A. ta in.] //Visnyk DoNU. – 2010. – № 2. – S. 224-228.
- Szendey G. Anthicholinesterase-Aktivetet-Chemische modelluntersuchungen. Mitt. Symmetrische bisquartare zyklische amine mit starree interquarterer kette / G. Szendey // Arzneimittel-Forsch. – 1972. – Bd. 22, № 10. – S. 1746-1748.
- Vendemiaie G. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease / G.Vendemiaie, I. Grattagliano, E. Altomare // Int. J. Clin. Lab. Res.– 1999.– Vol. 29, № 2.– P. 49–55.
- Monti L. Fapre alenni derivebi tiochinolinici / L. Monti, G. Franchi // Gezz. chim ital. – 1961. – Vol. 91, № 1. – P. 115 – 120.
- Sing T. “Proximal” hydrazine derivatives of 7-chloroquinoline / T. Sing, R. Stein., J. Bill // J. Med. Chem. – 1968. – Vol. 12, №4 – P. 801-803.
- Brazhko O.A. Biologichno aktyvni pohidni hinolinu ta akrydynu z azoto– ta sirkovmisnymy funkcionalnymy grupamy: avtoref. dys. na zdobuttja nauk. stupenja doktora biol. nauk: 02.00.10 / O.A. Brazhko. – Zaporizhzhja, 2005. – 42 s.
- Buchmann G. Uber 5-brom-8-alkylmercaptochinoline / G. Buchmann, R. Schuck // Wiss. Z. Techn. Hochschule Chem. Leune - Merenburg. – 1965. – Bd. 28, № 3-4. – S.141-156.
- Oiry J. Conjugate: A New Potent Antioxidant which Increases the GSH Level in Various Cell Lines \ [J. Oiry, P. Mialocq, J. Puy et al.] // Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, English. – 2001. – V. 11, № 9. – P. 1189 – 1192.
- Gostra toksychnist, antyoksydantna ta ranozagojujucha aktyvnist pohidnyh hinazolinu ta hinolinu / [Bjelenichev I.F., Kovalenko S.I., Brazhko O.A. ta in.] // Visnyk ZDU. – 2001.– № 1.– S.143–147.
- Poisk biologicheski aktivnykh veshchestv sredi proizvodnykh 4–tiokhinolina i 9–tioakridina / [Panasenko T.V., Brazhko A.A., Samura B.A. ta in.] // Vestnik problem biologii i meditsiny.– 1997.– № 4.– S. 11–18.
- Andersag H. Verfahren zur herstellung von 4-(tret-aminoalkylmercapto)-chinolinverbindemgen/ H.Andersag, R. Hiltmann, F. Mietzsch // РЖ Химия. – 1960. – № 21. – P. 859-865.
- Synthesis of N-acridinyl and N-quinolinyl derivatives of radioprotective amino-thiols / [Demonchaux P., Laayoun A., Demeunynck M.et al.] // Tetrahedron, English. – 1989. – V. 45, № 20. – P. 6455 – 6466.
- Gage J.L. N-Acyhydrazones as inhibitors of PDE10A / J.L. Gage, R.R.A. Onrust, K.G.S. Harbol // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2011. – Vol. 21, Is. 14. – P. 4155 – 4159.
- Syntesis and antibacterial activity of new 4-alkoxy, 4-aminoalkyl and 4-alkylthioquinoline derivatives / [Kayirere M.-G., Abdallah M., Chevalier J.et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry, English. – 1998. – V. 33, № 1. – P. 55 – 64.
- Kazi S.A. Synthesis of quinoline thioethers as novel small molecule enhancers of monoclonal antibody production in mammalian cell culture / S.A. Kazi, G.F. Kelso, S. Harris // Tetrahedron. – 2010. – Vol. 66, Is. 48. – P. 9461 – 9467.
- Hematin Polymerization Assay as a High-Throughput Screen for Identification of New Antimalarial Pharmacophores / [Kurosawa Y., Dorn A., Kitsuji-Shirane M. et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy, English. – 2000. – V. 44, № 10. – P. 2638 – 2644.

19. Matias C. Synthesis and Antimalarial Activity of New 4,6-Dialkoxy- and 4,6-Bis(alkylthio)pyrido[3,2-g]quinoline Derivatives / C. Matias, M. Abdallah, J. Barbe // *Heterocycles*, English. – 1996. – V. 43, № 8. – P. 1621 – 1632.
20. Natarajan J.K. 4-N-, 4-S-, and 4-O-Chloroquine Analogues: Influence of Side Chain Length and Quinolyl Nitrogen pKa on Activity vs Chloroquine Resistant Malaria / J. K. Natarajan, J. N. Alumasa, K. Yearick // *Journal of Medicinal Chemistry*, English. – 2008. – V. 51, № 12. – P. 3466 – 3479.
21. Radl S. Priprava nekterych 4-fenoxy- a 4-fenyltooderivatu 1H-pyrazolo[3,4-b]chinolinu s protivirovym ucinkem / S. Radl, V. Zikan, F. Smejkal // *Cs. Farm.* – 1985. – Bd. 34, № 3-4. – S. 119-122.
22. Disulfide S-Monoxides Convert Xanthine Dehydrogenase into Oxidase in Rat Liver Cytosol More Potently Than Their Respective Disulfides / [Sakuma S., Fujita J., Nakanishi M. et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, English. – 2008. – V. 31, № 5. – P. 1013 – 1016.
23. Selvi G. Convenient method for the synthesis of 2-phenyl-4-chloro-3-formylquinoline and its utility for the synthesis of Thieno(3,2-c)-4-phenylquinoline-2- carboxylic acid / G. Selvi, S.P. Rajendran // *Heterocyclic Communications*. – 2009. – Vol. 15, Is. 5. – P. 349 – 350.
24. Avetisyan A.A. Synthesis of 1-[2-Methyl-6(8)-R-quinolin-4-yl]thiosemicarbazides / A.A. Avetisyan, I.L. Aleksanyan, L.P. Ambartsumyan // *Russian Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – Vol. 46, Is. 4 – P. 560 – 564.
25. Sinyak R.S. Sintez i biologicheskie svoistva proizvodnykh 4-geterilmerkaptokhinazolina / R.S. Sinyak, I.A. Mazur, V.R. Stets // *Khim.-farmats. zhurn.* – 1986. – № 2. – S. 168-171.
26. Pat. na korysnu model № 44791 Ukraina (2009) S07D 215/00, Labenska I.B., Brazhko O.A., Omeljanchyk L.O., Zavgorodnij M.P. Dynatrijeva sil N-sukcynoil-S-(6-etoksy-2-metylhinolin-4-il)-L-cysteinu, shho maje gepatoprotektornu aktyvnist, Zajav. 28.05.2009; Opubl. 12.10.2009, Bjul. №19. – 4 s.
27. Omeljanchyk L.O. Vyvchennja antyoksydantnoi ta protyishemichnoi dii 4-tiopohidnyh hinaldynu na modeli gostorogo porushennja mozkovogo krovoobigu /L.O. Omeljanchyk, I.F. Bjelenichev, O.A. Brazhko // *Liky.* – 2000. – № 1– 2. – S. 40–43.
28. Brazhko O.A. Antyoksydantna aktyvnist 4-tiopohidnyh hinolinu u doslidah in vitro / O.A. Brazhko, M.M. Kornet, M.P. Zavgorodnij // *Visnyk DoNU. Ser.A: Pryrodnychi nauky.* – 2009, vyp. 2. – S. 294-298.
29. Brazhko O.A. L-cystein – synton dlja stvorennja biologichno aktyvnyh rehovyn / O.A.Brazhko // *Aktualni pytannja biologii, ekologii ta himii: Elektor. nauk. vyd.* – 2009. – T. 1, № 1 – S. 4 – 15.
30. Brazhko O.A. Doslidzhennja biologichnoi dii 4– tiopohidnyh hinolinu / O.A. Brazhko, L.O. Omeljanchyk, I.F. Bjelenichev // *Medychna himija.* – 2001. – T. 3, № 1. – S. 20–23.
31. Labenska I.B. Doslidzhennja protyzapalnoi aktyvnosti N-acylnykh pohidnyh S-(2-metylhinolin-4-il)-L-cysteinu / I.B. Labenska, L.O. Omeljanchyk, O.A. Brazhko // *Zaporozhskij med. zhurn.* – 2011, T.13, №5. – S.143-145.
32. Pat. na korysnu model 49819 MPK 2009, S07D215/00. Gencheva V.I., Omeljanchyk L.O., Brazhko O.A., Zavgorodnij M.P. Natrijeva sil 2-gidroksy-3-(8-metoksy-2-metylhinolin-4-iltio)propanovoi kysloty, shho maje antyoksydantnu, nejroprotektornu aktyvnist, Zajavl. 30.11.2009, Opubl. 11.05.2010, Bjul. № 9, 2010. – 10 s.
33. Labenska I.B. Zalezhnist biologichnoi aktyvnosti N-acylnykh pohidnyh 6-alkoksy-2-metyl-4-merkaptihinolinu vid pryrody zamisnykiv u shostomu polozhenni geterocyklu / I.B. Labenska, G.S. Shapoval, L.O. Omeljanchyk // *Ukrainskij biohim. zhurn.* – 2010. – T.82, № 3. – S. 49-54.
34. Zavgorodnij M.P. Doslidzhennja antyoksydantnoi ta protyishemichnoi aktyvnosti natrijevnykh solej pohidnyh β -(2-metylhinolin-4-iltio) – molochnoi kysloty v umovah eksperymentalnoi ishemii golovnogogo mozku / M.P. Zavgorodnij // *Visnyk ZDU.* – 2002. – № 3. – S.100–104.
35. Zavgorodnij M.P. Lipofilnist S-pohidnykh nitrogenovmisnykh geterocykliv /M.P. Zavgorodnij, O.A.Brazhko, L.O. Omeljanchyk // *Visnyk ZNU. Ser. Biologichni nauky.* – 2011. – № 2. – S.150-155.
36. Petrusha Ju.Ju. Biologichna aktyvnist dejakykh S-geterylzamishhenykh L-cysteinu ta ih analogiv /Ju.Ju. Petrusha, L.O. Omeljanchyk, O.A. Brazhko // *Ukrainica Bioorganica Acta.* – 2011. – № 2. – S. 46–52.
37. Kompjuternyj prognoz biologichnoi aktyvnosti dejakykh N-acylnykh pohidnyh S-(2-metylhinolin-4-il)-L-cysteinu / [Ulishhenko E.O., Brazhko O.A., Omeljanchyk L.O. ta in.] // *Pytannja bioindykacii ta ekologii.* – 2011. – № 2. – S. 165-179.
38. Brazhko O.A. Bioreguljatory na osnovi N,S-pohidnykh L-cysteinu (ogljad literatury) /O.A.Brazhko, Je.O.Ulishhenko, M.M. Kornet // *Visnyk ZNU.* – 2011. – № 1. – S. 123-132.
39. Antioksidantnye i antitoksicheskie svoistva atsetilsisteina [Elektronii resurs] / Ukrainskii medichnii chasopis. – 1999. – № 6 (14) XI–XII. – Rezhim dostupu do zhurn. <http://www.umj.com.ua/archive/14/1203.html>.
40. Brazhko A.A. Deistvie proizvodnykh (khinaldin–4-iltio)karbonovykh kislot na sodержanie katekholaminov pri stresse / A.A. Brazhko // *Visnyk ZDU.* – 2002. – № 2. – S. 115–117.

41. Kornet M.M. Toksychnist ta antyoksydantna aktyvnist 4-tiopohidnyh hinolinu z potencijnymy radioprotekturnymy vlastyvoztjamy /M.M. Kornet, O.A. Brazhko, O.S. Krugljak // Farmakologija ta likarska toksykologija. – 2011. – №3 (22). – S. 50-56.
42. Brazhko A.A. About interaction of the 2-methyl(phenyl)-4-chloro-quinolines with N(S)-binucleophils /A.A.Brazhko, M.M. Kornet, M.P. Zavgorodnij // Book of Abstracts V International conference „Chemistry of nitrogen containing heterocycles”, Kharkiv, 2009. – P.21.
43. Brazhko O.A. Poshuk biologichno aktyvnyh rehovyn sered amidiv ta gidrazydiv (hinolin–2–iltio– i 4–iltio) karbonovyh kyslot / O.A. Brazhko, L.O. Omeljanchyk, M.P. Zavgorodnij // Zaporozhskij med. zhurn. – 2004.– T. 2, № 1 (22).– S. 39–42.
44. Labenska I.B. Vplyv N-acylnykh pohidnyh S-(2-metylhinolin-4-il)-L-cysteinu na membrany erytrocytiv shhuriv pry toksychnomu gepatyti / I.B. Labenska, L.O. Omeljanchyk, O.A. Brazhko // Visnyk ZNU. Ser. Biologichni nauky. – 2010, №2. – S.111-117.
45. Brazhko A.A. Synthesis and biological activity of derivatives (quinoline-4-thio)carboxylic acids / A.A. Brazhko, M.M. Kornet, M.P. Zavgorodnij // Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles, CNCH-2012. Book of Abstracts. – Kharkiv: Ekskluziv Publ., 2012. – P-67.
46. Ulishhenko E.O. Virtualnyj skryning ta syntezy novykh N-acylnykh pohidnykh S-(2-metylhinolin-4-il)-L-cysteinu yak potencijnykh bioregulyatoriv napravlenoi dii /E.O. Ulishhenko, O.A. Brazhko, L.O. Omeljanchyk //Medychna himija. – 2012. – T. 14, № 3 (52). – 94-99 s.
47. Martynovskii A.A. Sintez i biologicheskaya aktivnost benzoilmetiltioiproizvodnykh piridina, khinolina i akridina / A.A. Martynovskii, A.A. Brazhko, V.G. Bulakh // Khim.–farm. zhurn. – 1991.– № 2.– S. 20–22.
48. Pat. 28789 Ukraina, MKY 7 SO7D 215/36. 2–metyl–6–metoksyhinolil–4–tioacetat natriju, shho proyavljaє protyishemichnu ta antyoksydantnu aktyvnist / Omeljanchyk L. O., Brazhko O. A., Bjelenichev I.F., Zavgorodnij M. P. (Ukraina). – №970947–17; Zajavl. 23. 09. 97; Opubl. 15.05. 02. – Bjul. №5.– S. 3.

УДК 544.723:547.554

ЗВ’ЯЗУВАННЯ АРОМАТОУТВОРЮЮЧИХ РЕЧОВИН ПРОСТИМИ ТА НАПОВНЕНИМИ ДРАГЛЯМИ ЖЕЛАТИНУ

Лашко Н.П., Гасанова Т.А.

*Запорізький національний університет
69600 Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

sliwki93@mail.ru

Вивчені закономірності зв’язування ароматоутворюючих речовин простими та наповненими драглями желатини в присутності неорганічної добавки – натрій хлориду. Під час роботи було експериментально підтверджено вплив гідрофобної поверхні досліджуваних драглів на їхню здатність сорбувати тимол з водних розчинів. Експериментально встановлене зростання сорбції тимола на драглях, що мають фіксовану конформацію. Експериментально підтверджено, що технологічно найбільш перспективними для створення ароматизаторів на основі гідрофобних ароматичних речовин є драглі желатину з високою гідрофобністю.

Ключові слова: тимол, желатина, крохмаль, гідрофобність, гідрофільність, кут змочування, сорбція, десорбція.

СВЯЗЫВАНИЕ АРОМАТООБРАЗУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ПРОСТЫМИ И НАПОЛНЕННЫМИ СТУДНЯМИ ЖЕЛАТИНА

Лашко Н.П., Гасанова Т.А.

*Запорожский национальный университет
69600 Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

sliwki93@mail.ru

Изучены закономерности связывания ароматообразующих веществ простыми и наполненными студнями желатини в присутствии неорганической добавки – натрий хлорида. В ходе работы было экспериментально подтверждено влияние гидрофобной поверхности исследуемых студней на их способность сорбировать тимол из водных растворов. Экспериментально установленный рост

сорбции тимолола на студнях, которые имеют фиксированную конформацию. Экспериментально подтверждено, что технологически наиболее перспективными для создания ароматизаторов на основе гидрофобных ароматических веществ являются студни желатины с высокой гидрофобностью.

Ключевые слова: тимол, желатина, крахмал, гидрофобность, гидрофильность, угол смачивания, сорбция, десорбция.

FASTENING OF SUBSTANCES WHAT CREATE AN FLAVOUR BY SIMPLE AND GAP-FILLING GALANTINES OF GELATIN

Lashko N.P., Hasanova T.A.

National university of Zaporizhzhya

69600 Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky street, 66

sliwki93@mail.ru

Food flavours are one of the most demand among food additives on the actual market of making products. Scientific and technical problems of creation new types of flavours, that provide proof smell and taste to the products the feeds, related to the study of properties to take in of transmitters that link volatile components. Compability of final good depends on the structure of galantines-sorbents and nature of flavours. During the cycle of works was investigated efficiency of native starches of different origin and crioteksturates of corn starch in fastening of odorants of different classes. It was set that fastening of volatiles takes place biopolymeric matrices due to hydrogen connections and co-operative hydrophobic interactions that determined a fastening degree.

The search of new transmitters for creation of effective forms of flavours attracts an attention to gelatin and starch, that is used in the large group of foodstuffs. In connection with this, the aim of our work was a study of conformities to law of fastening of substances which create an with aroma-simple and gap-filling galantines of gelatin in the presence of inorganic addition is a natrium of chloride.

Research objects were: thymol, 20% to gelatin, gelatinous-starched and gelatinous-thymol galantines. All types of galantines were formed in the conditions of high ionic force is a 0,5M natrium of chloride.

The regional corner of moistening of surfaces of investigated galantines was determined on methodology of drop that spreads. For determination of content of thymol in solutions was used a photoelectrocolorimetric method. Also was determined the concentration of thymol in obedience to standard methodology at a wave-length 410 nanometers on photoelectrocolorimetr KFK- 3.

According to the results of research of the general fastening of thymol by hydrophobic surfaces, the amount of adsorbable thymol grew with the time increase of contact of solution with galantines. After 60 min the maximal persorption of thymol was observed on gelatinous galantines. It interestingly to mark, that on gelatinous-thymol galantines a maximum value was arrived at already on the 20 minute of persorption, farther not changing. Ability of persorption of hydrophilic surface of investigated galantines grew in a row: gelatinous-starched < gelatinous-thymol < to gelatin, remaining less on the whole, comparatively with the indexes of hydrophobic surface. This way, the common fastening of gelatinous galantines was less than in 1,8 times, and coefficient of distribution – in 1,4 times. The persorption of thymol arrived at a maximum value the hydrophilic surface of gelatinous-thymol galantines on the 20 minute did not change and farther.

Research of convertibility persorption showed that at extraction water a desorption was maximal in gelatinous galantines (59% from hydrophobic and 20% from a hydrophilic surface). At gelatinous-starched galantines this index was considerably lesser and folded for a hydrophobic surface close 10%, and for hydrophilic – close 6%.

For thermodynamics description of persorption processes of thymol from water solutions there were built isotherms of persorption. The form of isotherms depended on the degree of fastening of thymol galantines. For the hydrophobic surface of all investigational galantines the form of isotherm of S- is similar, that testifies to the high cognation of thymol to this surface. An isotherm has the steepest rise for gelatinous galantines, that answers the maximal cognation of thymol to the sorbent. In all cases of persorption on a hydrophilic surface form of isotherms also S- similar, but there is considerable reduction of their steepness in transition from hydrophobic to the hydrophilic surface.

Thus, influence of hydrophobic surface of investigated galantines on their ability to take in a thymol from water solutions is experimentally confirmed, the experimentally set increase of persorption of thymol is on galantines that have fixed conformation, it is experimentally confirmed, that technologically most perspective for creation of flavours on the basis of hydrophobic aromatizers there are galantines of gelatin with high hydrophobic.

Key words: thymol, gelatin, starch, hydrophobicity, hydrophilicity, corner of moistening, persorption, desorption.

ВСТУП

Харчові ароматизатори є одними з найбільш запитуваних харчових добавок на сучасному ринку виготовлення продуктів. Науково-технічні проблеми створення нових видів ароматизаторів, які забезпечують стійких запах та смак продуктам харчування, пов'язані з вивченням сорбційних властивостей носіїв, що зв'язують леткі компоненти. Найчастіше носіями є біополімери – модифіковані крохмалі, декстрин, гуміарабік [1-3]. Стабільність кінцевого продукту залежить як від структури носіїв – сорбентів, так і природи ароматизатора.

У циклі робіт [4-7] досліджувалась ефективність нативних крохмалів різного походження та кріотекстуратів кукурудзяного крохмалю у зв'язуванні одорантів різних класів. Було встановлено, що зв'язування летких речовин біополімерними матрицями відбувається за рахунок водневих зв'язків та кооперативних гідрофобних взаємодій, які визначали ступінь зв'язування.

Знання механізмів і закономірностей взаємодії одорантів із носієм дозволить створити ряд стабільних харчових ароматизаторів. Сьогодні ці процеси вивчені недостатньо. Кількісні дані отримані тільки для індивідуальних летких органічних речовин або модельних сумішей із використанням як носіїв тільки полісахаридів.

Пошук нових носіїв для створення ефективних форм ароматизаторів привертає увагу до желатини і крохмалю, які використовуються при виготовленні великої групи продуктів харчування. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було вивчення закономірностей зв'язування ароматоутворюючих речовин простими та наповненими драглями желатини в присутності неорганічної добавки – натрій хлориду.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були: тимол, 20 % желатинові, желатиново-крохмальні та желатиново-тимолові драгли. Усі види драглів формувалися в умовах високої іонної сили – 0,5 М натрій хлориду.

Драгли 20% желатини готували за такою методикою: у хімічний стакан місткістю 300 мл поміщали 20 г желатини, додавали 80 мл води та 2,3 г очищеного натрію хлориду для створення 0,5 М розчину і залишали на 20 хв. Після набухання желатини ставили стакан на водяну баню і нагрівали при температурі 90°C протягом 40 хв при інтенсивному перемішуванні. Потім розплавлену желатину переливали в чашку Петрі та охолоджували протягом 18 год. при температурі 5°C.

Крохмально-желатинові драгли готували так: у хімічний стакан місткістю 300 мл поміщали 20 г желатини та 2,3 г очищеного натрію хлориду для створення 0,5 М розчину і замочували у 70 мл води на 20 хв., після чого додавали 10 г крохмалю і нагрівали при температурі 90°C протягом 40 хв. при інтенсивному перемішуванні. Потім переливали в чашку Петрі і охолоджували протягом 18 год. при температурі 5°C.

Желатиново-тимолові драгли готували так: у хімічний стакан місткістю 300 мл поміщали 20 г желатини та 2,3 г очищеного натрію хлориду для створення 0,5 М розчину і замочували у 70 мл 0,05% водного розчину тимолу на 20 хв. Після набухання желатини ставили стакан на водяну баню і нагрівали при температурі 90°C протягом 40 хв. при інтенсивному перемішуванні. Потім розплавлену желатину переливали в чашку Петрі і охолоджували протягом 18 год. при температурі 5°C. Далі драгли промивали 500 мл дистильованої води (5 × 100 мл.) для видалення сорбованого тимолу.

Крайовий кут змочування поверхонь досліджуваних драглів визначали за методикою краплі, що розтікається [8].

Концентрацію тимолу визначали фотометричним методом згідно з методикою [9] при довжині хвилі 410 нм.

Адсорбцію тимолу з 0,1% водних розчинів проводили таким чином: 50 мл 0,1 % водного розчину тимолу з додаванням 2 г сорбенту струшували протягом 60 хв. Кожні 10 хв. відбирали 1 мл розчину і визначали концентрацію тимолу в ньому.

Адсорбцію тимолу з водних розчинів характеризували загальним зв'язуванням (R,%) та коефіцієнтом розподілення (D), які розраховували відповідно за формулами (1, 2):

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100, \quad (1)$$

де: C_0 – початкова концентрація розчину тимолу, моль/л;
 C – концентрація розчину тимолу через деякий час, моль/л.

$$D = \frac{R}{100 - R} \cdot \frac{V}{m}, \quad (2)$$

де: V – об'єм аналізованого розчину, мл;
 m – маса сорбенту, г.

Для побудови ізотерми сорбції створювали концентраційний ряд розчинів тимолу з концентраціями 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125%, 0,00625% і 0,003125%. Потім у колбу поміщали по 1 г драглів та додавали 25 мл розчину тимолу певної концентрації і струшували розчин протягом 60 хв. Далі відбирали 1 мл розчину і визначали в ньому концентрацію тимолу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати експериментального визначення величини крайового кута змочування поверхні драглів представлені в таблиці 1.

Згідно з результатами, особливістю всіх досліджених драглів, поверхня яких сформувалась у контакті з повітрям, є висока гідрофобність. Крайовий кут змочування гідрофобної поверхні змінювався від 108° до 119°. Поверхня драглів, що сформувалась із розчину, у всіх випадках була гідрофільною. Найбільш гідрофільний характер мала поверхня желатиново-крохмальних драглів (крайовий кут змочування 13,7°).

Експериментальні результати визначення загального зв'язування тимолу з водних розчинів (R, %) та коефіцієнтів розподілення (D) залежно від часу сорбції представлені на рисунках 1, 2 та в таблиці 2.

Таблиця 1 – Крайовий кут змочування поверхонь желатинових, желатиново-крохмальних та желатиново-тимолових драглів (P=0,95, n=3)

Вид драглів	Поверхня	Величина кута, градус			Середня величина кута	Квадратичне відхилення	Довірчий інтервал	Середня величина кута ±ε
		X ₁	X ₂	X ₃	X _{сер.}	S _n	ε	X _{сер.} ±ε
Желатинові	Гідрофобна	110	108	111	109,7	1,53	3,8	109,7±3,8
	Гідрофільна	30	33	29	30,7	2,08	5,2	30,7±5,2
Желатиново-крохмальні	Гідрофобна	119	119	118	118,7	0,58	1,4	118,7±1,4
	Гідрофільна	13	14	14	13,7	0,58	1,4	13,7±1,4
Желатиново-тимолові	Гідрофобна	110	113	112	111,7	1,53	3,8	111,7±3,8
	Гідрофільна	40	38	41	39,7	1,53	3,8	39,7±3,8

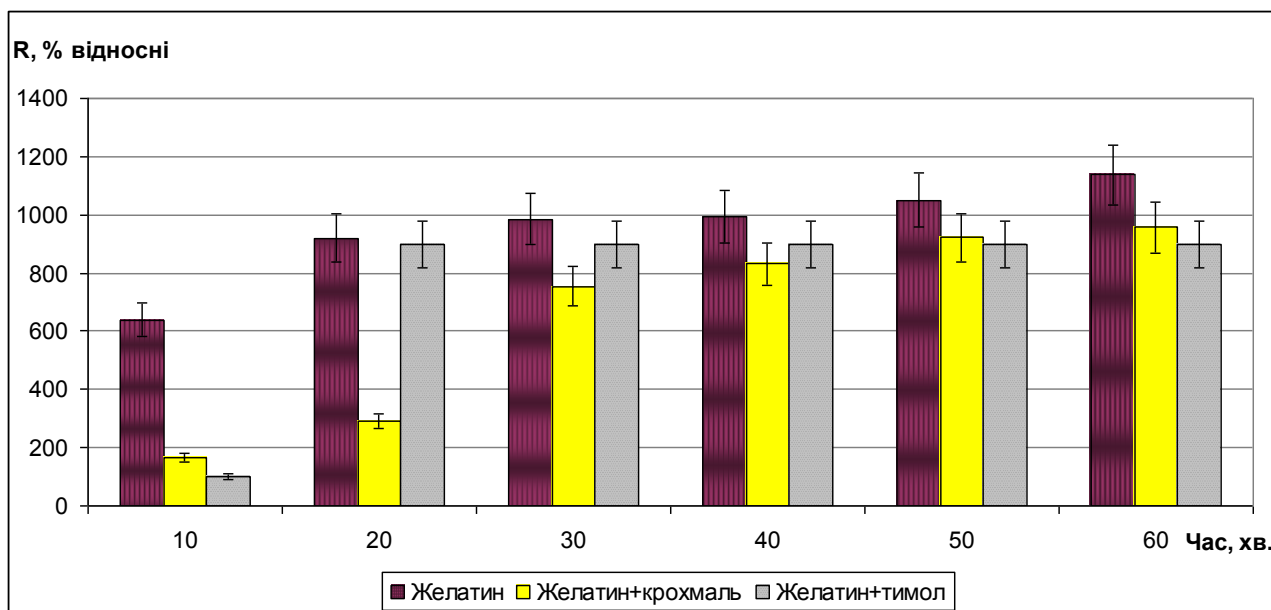


Рис. 1 Загальне зв'язування тимолу гідрофобними поверхнями драглів залежно від часу

Згідно з результатами, кількість адсорбованого тимолу зростала зі збільшенням часу контакту розчину з драглями. Через 60 хв. після початку сорбції спостерігалась максимальна сорбція тимолу на гідрофобній поверхні желатинових драглів, загальне зв'язування складало 1138 % відносн., а коефіцієнт розподілення – 10,22. У той же час сорбція тимолу на гідрофобній поверхні желатиново-крохмальних драглів була меншою, загальне зв'язування становило 956% відносн., а коефіцієнт розподілення – 8,06. В обох випадках кількість сорбованого тимолу далі практично не змінювалась. Адсорбційна рівновага встановлювалась через 2 години.

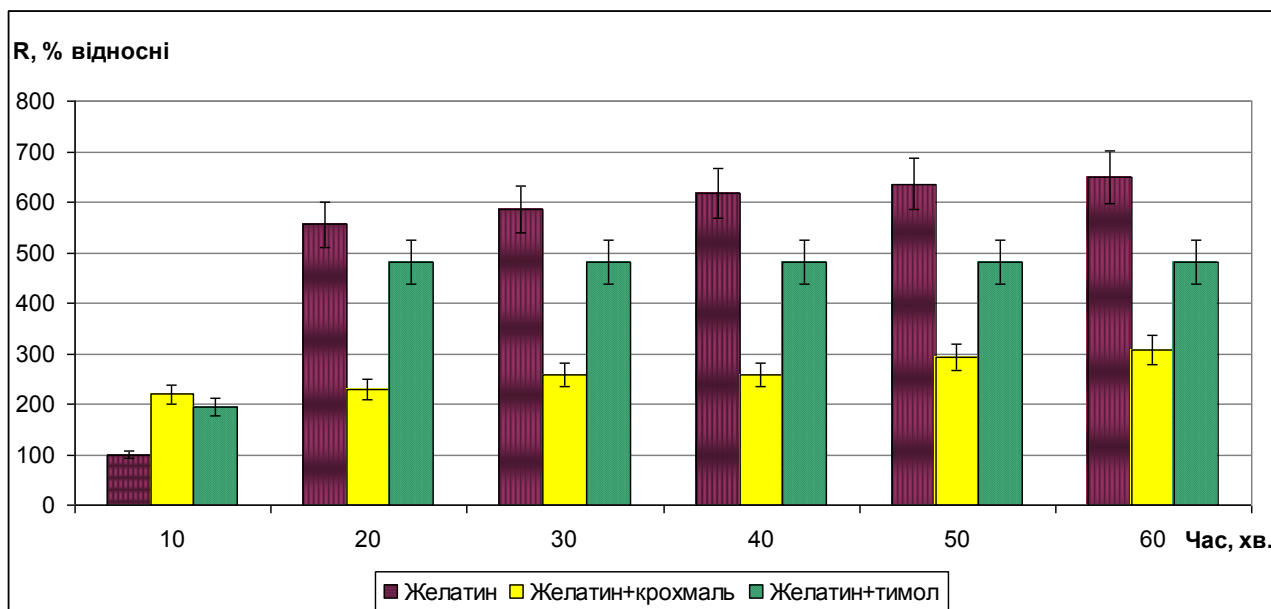


Рис. 2 Загальне зв'язування тимолу гідрофільними поверхнями драглів залежно від часу

Цікаво відмітити, що на гідрофобній поверхні желатиново-тимолових драглів граничне значення зв'язування тимолу становило 900% відносн. (коефіцієнт розподілення 7,45) та досягалося вже на 20 хвилині сорбції, далі не змінюючись.

Сорбційна здатність гідрофільної поверхні досліджуваних драглів зростала в ряду: желатиново-крохмальні < желатиново-тимолові < желатинові, залишаючись загалом меншою, порівняно з показниками гідрофобної поверхні. Так, загальне зв'язування

желатинових драглів було менше в 1,8 разу, а коефіцієнт розподілення – у 1,4 разу. Сорбція тимолу гідрофільною поверхнею желатиново-тимолових драглів досягала граничного значення на 20 хвилині і далі не змінювалась (загальне зв'язування 482% відносно., коефіцієнт розподілення 4,07).

Таблиця 2 – Коефіцієнт розподілення тимолу залежно від часу ($P=0,95$, $n=3$)

Тривалість сорбції (Г), хв.	Коефіцієнт розподілення тимолу, D					
	Желатинові драгли		Желатиново-крохмальні драгли		Желатиново-тимолові драгли	
	Поверхня		Поверхня		Поверхня	
	Гідрофобна	Гідрофільна	Гідрофобна	Гідрофільна	Гідрофобна	Гідрофільна
10	4,86±0,44	0,90±0,08	1,09±0,10	2,07±0,19	0,65±0,06	1,82±0,16
20	7,67±0,69	6,01±0,54	1,09±0,11	2,18±0,20	7,45±0,67	5,05±0,45
30	8,40±0,76	6,43±0,58	5,95±0,54	2,47±0,22	7,29±0,66	5,05±0,44
40	8,48±0,76	6,85±0,62	6,72±0,60	2,47±0,23	7,07±0,64	4,14±0,37
50	9,15±0,82	7,13±0,64	7,69±0,69	2,85±0,26	6,99±0,63	4,00±0,36
60	10,22±0,92	7,30±0,66	8,06±0,73	3,00±0,27	6,99±0,64	4,07±0,37

Дослідження оберненості сорбції показало, що при екстракції водою десорбція була максимальною в желатинових драглях (59% із гідрофобної та 20% із гідрофільної поверхні). У желатиново-крохмальних драглів цей показник був значно меншим і складав для гідрофобної поверхні близько 10%, а для гідрофільної – близько 6%.

Для термодинамічної характеристики процесів сорбції тимолу з водних розчинів були побудовані ізотерми сорбції в координатах: концентрація сорбованого тимолу (Г, моль на 1 г сорбенту) – рівноважна концентрація тимолу (С, моль/л). Форма ізотерм залежала від ступеня зв'язування тимолу драглями. Ізотерми сорбції тимолу гідрофобною поверхнею досліджуваних драглів представлені на рисунках 3-5.

Для гідрофобної поверхні всіх досліджених драглів форма ізотерми S-подібна. Така форма свідчить про те, що енергія взаємодії адсорбент-адсорбат більша за енергію взаємодії адсорбат-адсорбат, тобто тимол має високу спорідненість до гідрофобної поверхні досліджуваних драглів. Ізотерма сорбції тимолу желатиновими драглями має найбільш крутий підйом, що свідчить про максимальну спорідненість тимолу до сорбенту. Так, загальне зв'язування тимолу поверхнею цих драглів більше, в середньому, у 1,5 разу.



Рис. 3 Ізотерма сорбції тимолу на гідрофобній поверхні желатинових драглів



Рис. 4 Ізотерма сорбції тимолу на гідрофобній поверхні желатиново-крохмальних драглів

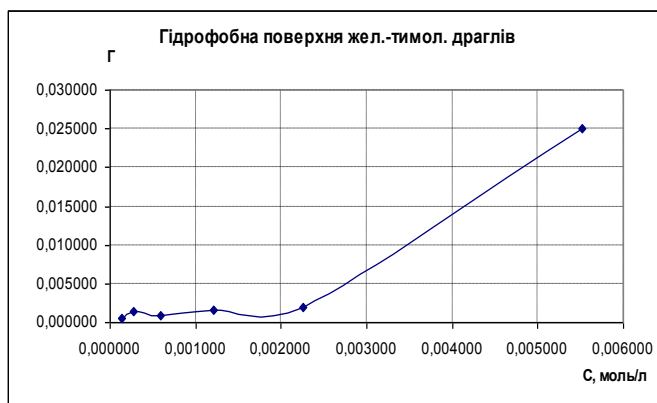


Рис. 5 Ізотерма сорбції тимолу на гідрофобній поверхні желатиново-тимолових драглів

Ізотерми сорбції тимолу гідрофільними поверхнями досліджуваних драглів представлені на рисунках 6, 7.



Рис. 6 Ізотерма сорбції на тимолу гідрофільній поверхні желатинових драглів

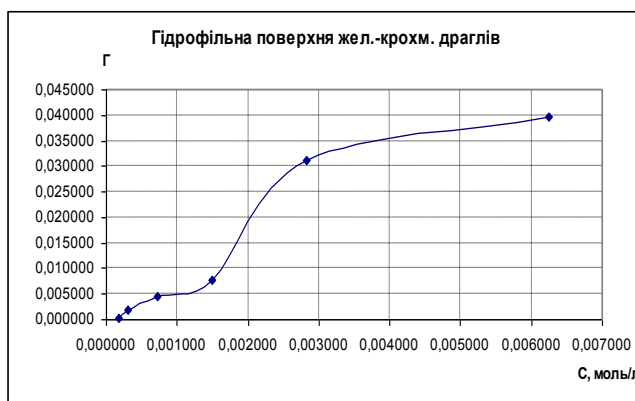


Рис. 7 Ізотерма сорбції тимолу на гідрофільній поверхні желатиново-крохмальних драглів

У всіх випадках форма ізотерм S-подібна, що свідчить про достатньо високу спорідненість тимолу й сорбентів. При порівнянні ізотерм спостерігається зменшення їх крутизни при переході від желатинових до желатиново-крохмальних драглів. Це свідчить про зниження ефективності сорбції тимолу з водних розчинів у ряду желатинові – желатиново-тимолові – желатиново-крохмальні драглі, що підтверджують експериментальні дані. Так, ступінь загального зв'язування тимолу в наведеному вище ряді драглів змінювався відповідно: 650, 482 і 307 % відносно.

Одержані результати дозволяють припустити, що слабо поляризоване бензойне кільце тимолу переважно адсорбується з розчинів на гідрофобній поверхні желатинових та желатиново-тимолових драглів, які мають достатньо жорстку просторову сітку за рахунок конформаційного переходу желатину в умовах формування драглів від клубка (+40°C) до спіралі (+5°). Сорбція в цьому випадку відбувається, в основному, за рахунок гідрофобної взаємодії.

Той факт, що в перші 10 хв від початку сорбції загальне зв'язування тимолу складало на гідрофобній поверхні желатинових драглів більше 600% відн., а на гідрофільній тільки 100% відн., може також свідчити про перевагу поверхневої сорбції на гідрофобній поверхні. Але молекула тимолу пласка, тому закриває адсорбційні центри на поверхні для інших молекул, і значення сорбції зростає тільки до 1138% відн. в кінці експерименту.

Уведення в структуру желатинових драглів тимолу з подальшим вилученням останнього шляхом десорбції не призвело до значного зростання загального зв'язування тимолу.

Імовірно, значна кількість тимолу зв'язувалась желатиново-тимоловими драглями ще при їх формуванні незворотно, що підтверджують експериментальні дані. У зв'язку з цим сорбція тимолу з водних розчинів саме тільки на желатиново-тимолових драглях досягала граничного значення уже на двадцятій хвилині експерименту та далі не змінювалась.

Адсорбція тимолу на гідрофільній поверхні сорбенту відбувається, переважно, за рахунок водневих зв'язків між гідроксильною групою тимолу та гідроксильними групами сорбенту (желатину, крохмалю). Незворотна сорбція тимолу в цьому випадку зростає до 90%, що свідчить, імовірно, про утримання тимолу за рахунок утворення комплексів включення [10]. Але недостатньо високі показники саме цієї сорбції, на наш погляд, можуть бути пояснені конкуренцією тимолу з великою кількістю води в драглях, яка також може утворювати водневі зв'язки з гідроксильними групами крохмалю та желатину. Той факт, що в желатиново-крохмальних драглях сорбція тимолу на гідрофільній поверхні в 2,8 разу нижча порівняно з гідрофобною, може свідчити про перевагу сорбції за рахунок утворення гідрофобних зв'язків між тимолом та сорбентом при більш жорстко фіксованій конформації біополімерної матриці.

Перспективою подальшого дослідження сорбції ароматоутворюючих речовин на біополімерних матрицях є практичне впровадження одержаних результатів для створення ряду стійких твердих харчових ароматизаторів.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально підтверджено вплив гідрофобної поверхні досліджуваних драглів на їхню здатність сорбувати тимол з водних розчинів.
2. Експериментально встановлене зростання сорбції тимолу на драглях, що мають фіксовану конформацію.
3. Експериментально підтверджено, що технологічно найбільш перспективними для створення ароматизаторів на основі гідрофобних ароматичних речовин є драгли желатину з високою гідрофобністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Голубев В.Н. Пищевые и биологически активные добавки: учеб. для студ. высш. учеб. завед. / В.Н. Голубев, Л.В. Чичева-Филатова, Т.В. Шленская. – М.: Академия, 2003. – 208 с.
2. Сарафанова Л.А. Пищевые добавки / Сарафанова Л.А. – С.-П.: ГИОРД, 2004. – 808 с.
3. Сарафанова Л.А. Применение пищевых добавок / Сарафанова Л.А. – С.-П.: ГИОРД, 2002. – 233 с.
4. Головня Р.В. Газохроматографические определения сорбции ароматообразующих веществ криогубками крахмала / Р.В. Головня, Т.А. Мишарина // Известия Академии Наук. Серия химическая. – 1998. – №2. – С. 310-313.
5. Теренина М.Б. Связывание компонентов смеси эфирных масел криотекстуратами кукурузного крахмала / М.Б. Теренина, Т.А. Мишарина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. – № 4. – С. 463-468.
6. Андриенков В.А. Пищевая промышленность №10. Связывание компонентов эфирных масел различными нативными крахмалами / В.А. Андриенков, А.Н. Полшков, Т.А. Мишарина. – М.: ООО “Аромарос – М”, 2010. – С. 63-65.
7. Связывание ароматических соединений полисахаридами кукурузного крахмала / Н.И. Крикунова, М.Б. Теренина, Е.Л. Ручкина, Т.А. Мишарина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – №3. – С. 379-382.

8. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, 2010. – 288 с.
9. Коренман Ч.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / Коренман И.М. – М.: Химия, 1980. – 488 с.
10. Связывание ароматических соединений полисахаридами кукурузного крахмала / Н.И. Крикунова, М.Б. Теренина, Е.Л. Ручкина, Т.А. Мишарина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – № 3. – С. 379-382.

REFERENCES

1. Golubev V.N. Pishhevye i biologicheski aktivnye dobavki: ucheb. dlya stud. vyssh. ucheb. zaved. / V.N. Golubev, L.V. Chicheva-Filatova, T.V. Shlenskaya. – М.: Akademiya, 2003. – 208 s.
2. Sarafanova L.A. Pishhevye dobavki / Sarafanova L.A. – S.-P.: GIORD, 2004. – 808 s.
3. Sarafanova L.A. Primenenie pishhevyyh dobavok / Sarafanova L.A. – S.-P.: GIORD, 2002. – 233 s.
4. Golovnya R.V. Gazoxromatograficheskie opredeleniya sorbcii aromatoobrazuyushhih veshhestv kriogubkami krahmala / R.V. Golovnya, T.A. Misharina // Izvestiya akademii nauk. Seriya himicheskaya. – 1998. – №2. – S.310-313.
5. Terenina M.B. Svyazyvanie komponentov smesi efirnyh masel krioteksturatsami kukuruznogo krahmala / M.B. Terenina, T.A. Misharina // Prikladnaya bioximiya i mikrobiologiya. – 2005. – Т. 41. – №4. – S. 463-468.
6. Andrienkov V.A. Pishhevaya promyshlennost №10. Svyazyvanie komponentov efirnyh masel razlichnymi nativnymi krahmalami / V.A. Andrienkov, A.N. Polshkov, T.A. Misharina. – М.: ООО “Aromaros – М”, 2010. – S. 63-65.
7. Svyazyvanie aromaticeskikh soedinenij polisaxaridami kukuruznogo krahmala / N.I. Krikunova, M.B. Terenina, E.L. Ruchkina, T.A. Misharina // Prikladnaya bioximiya i mikrobiologiya. – 2006. – Т. 42. – № 3. – S. 379-382.
8. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza / А.М. Егоров, А.П. Осипов, В.В. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Vysshaya shkola, 2010. – 288 s.
9. Korenman Ch.M. Fotometricheskij analiz. Metody opredeleniya organicheskix soedinenij / Korenman I.M. – М.: Химия, 1980. – 488 s.
10. Svyazyvanie aromaticeskikh soedinenij polisaxaridami kukuruznogo krahmala / N.I. Krikunova, M.B. Terenina, E.L. Ruchkina, T.A. Misharina // Prikladnaya bioximiya i mikrobiologiya. – 2006. – Т. 42. – №3. – S. 379-382.

УДК 633.72:547.56 (477)

ДИНАМІКА ЗМІН ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ЧАЇ ПРИ ЙОГО ЗБЕРІГАННІ

Лашко Н.П., Таран А.С.

Запорізький національний університет

69600 Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

nastenka_taran94@mail.ru

Вивчена динаміка зміни вмісту фенольних сполук, що володіють Р-вітамінною активністю, та вітаміну С у зелених та чорних чаях різного строку зберігання. За результатами органолептичного аналізу найкращим у групі зелених чаїв виявився чай «Грінфілд» 2014 р., у групі чорних чаїв жоден не відповідав вимогам ДСТУ. Експериментально показано, що найвищий показник вмісту вітамінів Р і С був у зеленому чаї «Грінфілд» 2014 р. Експериментально підтверджено, що термін зберігання найбільш відчутно впливає на динаміку змін вмісту вітамінів Р і С у групі зелених чаїв порівняно з чорними.

Ключові слова: динаміка зміни вмісту фенольних сполук, Р-вітамінна активність, вітамін С.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЧАЕ ПРИ ЕГО ХРАНЕНИИ

Лашко Н.П., Таран А.С.

Запорожский национальный университет
69600 Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66
nastenka_taran94@mail.ru

Изучена динамика изменения содержания фенольных соединений, которые обладают Р-витаминной активностью, и витамина С в зеленых и черных чаях разного срока хранения. По результатам органолептического анализа лучшим в группе зелёных чаёв стал чай «Гринфилд» 2014 г., а в группе черных чаёв ни один не отвечал требованиям ДСТУ. Экспериментально показано, что самый высокий показатель содержания витаминов Р и С был в зелёном чае «Гринфилд» 2014 г. Экспериментально подтверждено, что срок хранения наиболее заметно влияет на динамику изменения содержания витаминов Р и С в группе зелёных чаёв в сравнении с черными.

Ключевые слова: динамика изменения содержания фенольных соединений, Р-витаминная активность, витамин С.

DYNAMIC PATTERN OF THE CONTENTS OF PHENOL COMPOUNDS IN TEA UPON STORAGE

Lashko N.P., Taran A.S.

Zaporizhzhya National university
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky street, 66
nastenka_taran94@mail.ru

Tea is one of the most popular beverages in Ukraine. The diversity of tea sorts – black, green, red, white – doesn't mean that they are different teas – they are different methods of processing the same tea leaves.

Healing characteristics of tea are secured by the content of valuable alkaloids (caffeine, theobromine, theophylline), phenol compounds (tannins, catechins), aspic oils, vitamins and mineral substances.

Phenol compounds (tannins) are the main and the most important structural elements of tea extractives. Essential tannins in tea leaves are trioxybenzoic acid and bioflavonoids, known as possessing P-vitamin activity.

Vitamins P and C are synergists, they prevent disrupting of hyaluronic acid which strengthens and 'cements' vessel cells. Owing to that the structure of capillary is secured, its strength increases, capillary permeability lowers, thus preventing bruises. Vitamin P is a very powerful antioxidant. Green tea catechins are capable of restoring cellular structure. This is secured by their ability to trap free radicals of oxygen and to incapacitate them. Being powerful natural antioxidants, bioflavonoids protect cells from the harmful impact of free radicals, thus preventing insenescence, dysimmunity, different diseases.

There are slow chemical changes observed in composition of tea leaves under storage. Those changes are activated by moisturizing tea and lead to aspic oils decomposing, to change in number of extractive substances and to tea deterioration.

Taking this into consideration, we have stated the aim of our research – to investigate the influence of shelf life of tea on the dynamic pattern of the contents of phenol compounds and vitamin C which determine not only organoleptic and physicochemical characteristics of tea, but also its physiological value.

As objects of research black and green tea leaves of various brands with different expiry dates have been selected. They are green tea leaves Java (manufactured in 2010 and 2013) and Greenfield (manufactured in 2012 and 2014), and black tea leaves Askold (manufactured in 2010 and 2014) and Greenfield (manufactured in 2010 and 2014).

Organoleptic analysis of tea has been performed according to the method GOST 32572-2013. Among green tea leaves the best organoleptic figures (pleasant rich and astringent flavor) were demonstrated by Greenfield of 2014. Among black tea leaves it was impossible to single out any leaders as all samples had many defects. The worst organoleptic figures among green tea leaves were demonstrated by Java of 2010, and among black tea leaves by Greenfield of 2010. With the expanding of storage term the flavor of tea leaves has become considerably worse: their saturation and astringency have got lesser.

The content of dry and extractive substances in tea leaves has been defined with the help of methods GOST 1572-2013 and GOST 28551-90. According to the results the contents of dry substances has changed in the range of 91-95%, and the contest of tea extractives has changed in the range of 35-46% notwithstanding the tea brand and its shelf life. It is necessary to highlight that tea extractives include water-soluble components – caffeine, bioflavonoids, carbohydrates, nitrogen compounds and mineral

substances. The more is the amount of extractives, the higher is the tea grade. There is a connection between the contents of dry and extractive substances. For example, the biggest amount of dry and extractive substances has been found in Greenfield green tea leaves of 2011 – 95,33% of dry substances and 46,68% of extractive substances. Greenfield black tea leaves of 2014 have shown the smallest figures of these characteristics – 91,33% of dry substances and 36,76% of extractives correspondingly.

The content of vitamin C has been defined according to the method GOST 24556-89. The research proved that green tea leaves have the highest content of vitamin C. Maximum concentration of vitamin C among green tea leaves has been found in Greenfield of 2014 (41,69 mg/100g) and among black tea leaves – in Askold of 2014 (18,59 mg/100g). Among researched samples minimum concentration of vitamin C has been found in Greenfield black tea leaves of 2010 (9,61 mg/100g). Such discrepancy is definitely connected with the difference in technology of manufacturing black and green tea. However, the comparison of dynamic pattern of vitamin C contents in one and the same group of tea samples reveals that the impact of shelf life is very dramatic. For instance, storage of Greenfield green tea during 3 years decreases the contents of vitamin C from 41,69mg/100g to 26,4mg/100g – at the average of 1,7 times. Storage of green tea Java decreases vitamin C contents from 37,4mg/100g to 26,4mg/100g. The same tendency of vitamin C contents decrease can be observed in black tea leaves as well: for Greenfield it has decreased from 14,82mg/100g to 9,61mg/100g, and for Askold – from 18,59mg/100g to 13,67 mg/100 g.

To perform quantitative estimation of vitamin P (substances that possess P-vitamin activity) in tea leaves a modified Levental's method was used. According to the investigation results the contents of vitamin P in black tea leaves is 2,2 times lower than in green tea leaves. Among green tea leaves the highest concentration of vitamin P is observed in Greenfield of 2014 – 598,75 mcg/cm³, and the lowest concentration is observed in Java of 2010 – 193,74 mcg/cm³. Among black tea samples the highest figures have been found in Greenfield of 2014 – 266,25 mcg/cm³, and the lowest figures have been found in Askold of 2010 – 200,5 mcg/cm³.

The impact of storage upon the dynamic pattern of contents of vitamin P is characteristic mostly of green tea leaves where vitamin P concentration decreases at average of 1,4 times. For example, storage of Greenfield tea leaves during 3 years decreases the contents of vitamin P from 598,75mcg/cm³ to 437mcg/cm³, with Java tea leaves these figures decrease from 275,5mcg/cm³ to 193,75mcg/cm³. For black tea leaves during 4 years of storage the concentration of vitamin P decreases at average of 1,2 times. Thus, with Greenfield black tea leaves this concentration decreases from 266,25mcg/cm³ to 223,75mcg/cm³, and with Askold tea leaves – from 233,75mcg/cm³ to 200,5mcg/cm³.

So, the difference of vitamins P and C contents in separate groups of tea leaves is by all means connected with technological peculiarities of their manufacturing. Shelf life is a common factor that influences the change of vitamin P and C concentration both in black and green tea leaves. The most dramatic influence on dynamic pattern of the contents of vitamin C and P is observed with green tea leaves, while with black tea leaves this influence is not that dramatic.

Thus, according to the results of organoleptic analysis the best tea among green tea samples is Greenfield of 2014, while none of black tea samples corresponds to the demands of State Standard of Ukraine. It is experimentally demonstrated that the highest concentration of vitamin P and C is found in Greenfield green tea leaves of 2014. It is experimentally proved that storage dramatically influences the dynamic pattern of the contents of vitamin P and C in green tea leaves in comparison to black ones.

Key words: phenol compounds, P-vitamin activity, vitamin C.

ВСТУП

Чай є одним із найбільш поширених в Україні напоїв. При всьому різноманітті видів чаю – чорний, зелений, червоний, білий – це не різні сорти, а лише різні способи його обробки [1]. Цілющі властивості чаю зумовлені вмістом цінних алкалоїдів (кофеїну, теоброміну, теофіліну), фенольних сполук (танінів, катехінів), ефірних олій, вітамінів і мінеральних речовин [2]. Фенольні сполуки (дубильні речовини) є основною, найбільш важливою складовою частиною екстрактивних речовин чаю. Основними представниками дубильних речовин у чайному листі є галова кислота і біофлавоноїди, які, як відомо, наділені Р-вітамінною активністю [3].

Вітаміни Р і С є синергістами, вони перешкоджають руйнуванню гіалуронової кислоти, яка зміцнює і "цементує" клітини судин між собою. Завдяки цьому зберігається структура капілярів, підвищується їх міцність, знижується проникність стінок судин, попереджаючи появу синців. Вітамін Р є потужним антиоксидантом. Катехіни зеленого чаю здатні

відновлювати клітинну структуру, в основі дії яких лежить їх властивість перехоплювати вільні радикали кисню і знешкоджувати їх. Будучи потужними природними антиоксидантами, біофлавоноїди оберігають клітини нашого організму від руйнівного впливу вільних радикалів, запобігаючи старінню організму, порушенню імунітету, виникненню різних захворювань [4].

Під час зберігання сухого чаю доволі повільно відбуваються хімічні зміни складу. Вони посилюються при зволоженні чаю та призводять до розкладання ефірних масел, зміни кількості екстрактивних речовин та до зниження якості чаю [5].

У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення впливу строку зберігання чаю на динаміку зміни вмісту фенольних сполук та вітаміну С, які визначають як органолептичні, фізико-хімічні показники якості чаю, так і фізіологічну цінність напою.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження було вибрано чорні та зелені листові чаї різного строку зберігання від провідних виробників, а саме зелені чаї Ява 2010 р. і 2013 р. виробництва і Грінфілд 2012 р. і 2014 р. виробництва; та чорні чаї Аскольд 2010 р. і 2014 р. виробництва і Грінфілд 2010 р. і 2014 р. виробництва.

Органолептичний аналіз чаю проводився за методикою ГОСТ 32572-2013 [6].

Вміст сухих та екстрактивних речовин у чаї визначали за допомогою методик ГОСТ 1572-2013 [7] та ГОСТ 28551-90 [8] відповідно.

Вміст вітаміну С у чаї визначали за допомогою методики ГОСТ 24556-89 [9].

При кількісному визначенні вітаміну Р (речовин, що володіють Р-вітамінною активністю) у чаї використовували видозмінену методику Левенталю. Цей метод кількісного визначення рутину ґрунтується на його здатності окислюватись перманганатом калію. Як індикатор використовували індигокармін, який вступає в реакцію з KMnO_4 після того, як окислиться весь рутин. Для приготування розчину індигокарміну 0,25 г індикатора розтерли, пересипали в мірну колбу на 250 см^3 , додали $12,5 \text{ см}^3$ концентрованої сірчаної кислоти та довели до мітки дистильованою водою.

Наважки чаю масою 100 мг поміщали в термостійкі колби, заливали 50 см^3 гарячої дистильованої води та кип'ятили впродовж 5 хв. Отриманий екстракт охолоджували, відібрали по 10 см^3 та перенесли в інші колби, додавши до екстракту ще 10 см^3 дистильованої води та 1 см^3 розчину індигокарміну. Вміст колби ретельно перемішували та титрували 0,01 М розчином перманганату калію до появи стійкого жовтого забарвлення. Паралельно проводили титрування контрольного розчину, де замість екстракту в колбу вносили 10 см^3 дистильованої води. Різниця між дослідним і контрольним титруванням складає число $\text{см}^3 \text{ KMnO}_4$, що затрачений на окислення рутину.

Вміст вітаміну Р –W(P) у мкг/мл розраховували за формулою 1:

$$W(P) = q * V * V_0 / V_1 * m, \quad (1)$$

де: q – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування (1);

V – об'єм розчину перманганату калію, що був затрачений на титрування, см^3 ;

V_0 – об'єм вихідного розчину, у якому була розчинена взята для аналізу наважка, см^3 ;

V_1 – об'єм розчину, взятого на титрування, см^3 ;

m – маса наважки чаю, г.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Органолептичний (сенсорний) аналіз є одним із найважливіших методів при визначенні товарного сорту чаю. Для оцінки основних показників – смаку та аромату, було обрано, в

середньому, 6 дескрипторів, за якими були створені органолептичні профілі чаїв, представлені на рисунках 1-2:

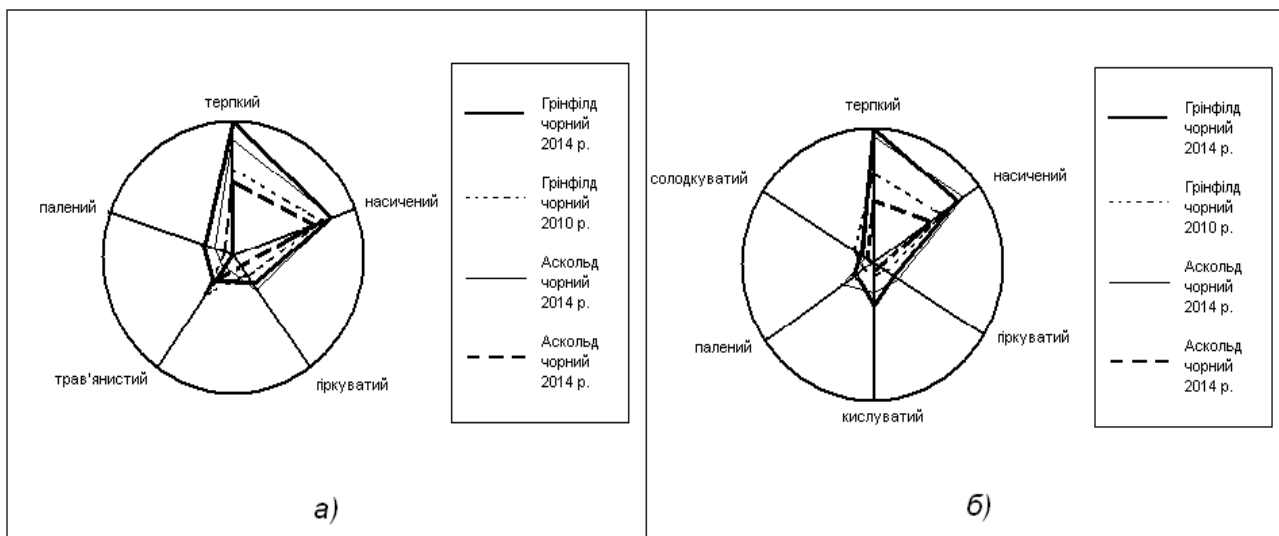


Рис. 1 Органолептичний профіль смаку (а) та аромату (б) чорних чаїв

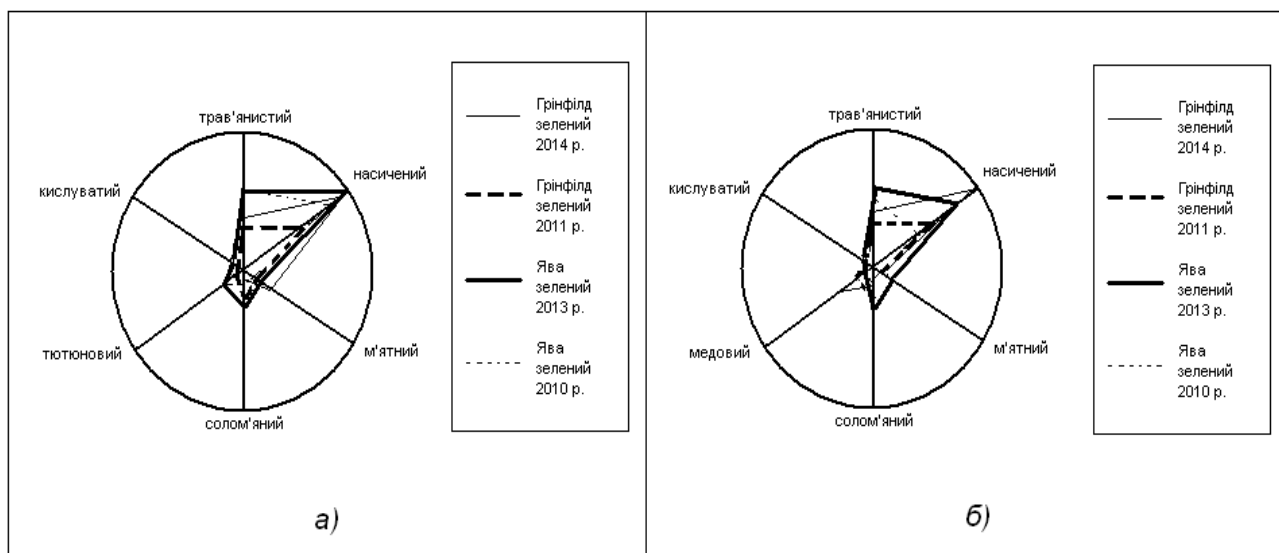


Рис. 2 Органолептичний профіль смаку (а) та аромату (б) зелених чаїв

Серед зелених чаїв найкращі органолептичні показники, а саме приємний насичений терпкий смак та аромат, мав чай «Грінфілд» 2014 р., серед чорних чаїв лідерів виділено не було, оскільки всі зразки мали багато недоліків. Найгірші органолептичні показники мали чаї «Ява» 2010 р. серед зелених, а серед чорних – чай «Грінфілд» 2010 р. Зі зростанням строку зберігання погіршувався смак та аромат чаїв: відчутно слабшали насиченість та терпкість.

Результати визначення вмісту сухих та екстрактивних речовин в чаї представлені в таблиці 1.

Згідно з одержаними результатами вміст сухих речовин змінювався в інтервалі 91-95%, екстрактивних – 35-46% не залежно від виду чаю та терміну зберігання. Необхідно відмітити, що до екстрактивних речовин відносяться водорозчинні компоненти чаю – кофеїн, біофлавоноїди, цукриди, азотвмісні сполуки та мінеральні речовини. Чим більший вміст екстрактивних речовин, тим вищий сорт чаю. Між вмістом сухих та екстрактивних речовин існує зв'язок. Так, найбільший вміст сухих та екстрактивних речовин мав зелений чай «Грінфілд» 2011 р. – 95,33% сухих речовин, 46,68% екстрактивних. Найгірші ці показники в чорному чаї «Грінфілд» 2014р. – 91,33% та 36,76% відповідно.

Таблиця 1 – Вміст сухих та екстрактивних речовин у чаю

Чай			Вміст сухих речовин, %	Вміст екстрактивних речовин, %
Вид	Виробник	Рік		
Чорний	Грінфілд	2014	91,33	36,76
		2010	92	40,99
	Аскольд	2014	92,67	38,05
		2010	94	42,73
Зелений	Грінфілд	2014	91,33	42,68
		2011	95,33	46,68
	Ява	2013	92	41,01
		2010	92,67	34,57

Результати визначення вітаміну С наведені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Вміст вітаміну С в досліджуваних зразках чаїв (P = 0,95; n = 3)

Чай			Вміст вітаміну С \pm ϵ , мг/100г
Вид	Виробник	Рік	
Чорний	Грінфілд	2014	14,82 \pm 1,25
		2010	9,61 \pm 1,25
	Аскольд	2014	18,59 \pm 1,20
		2010	13,67 \pm 1,25
Зелений	Грінфілд	2014	41,69 \pm 2,49
		2011	24,34 \pm 2,29
	Ява	2013	37,4 \pm 1,25
		2010	26,4 \pm 2,16

Згідно з результатами дослідження найбільший вміст вітаміну С в зелених чаюх. Максимальне значення концентрації вітаміну С серед зелених чаїв у «Грінфілді» 2014 р. (41,69 мг/100 г), серед чорних чаїв – у «Аскольді» 2014 р. (18,59 мг/100 г). Мінімальне значення концентрації вітаміну С серед досліджуваних зразків виявлено в чорному чаї «Грінфілд» 2010 р. (9,61 мг/100 г). Така різниця в показниках, безумовно, пов'язана з відмінностями в технології виготовлення зелених та чорних чаїв. Але, якщо порівняти динаміку зміни вмісту вітаміну С в одній і тій же групі чаїв, то вплив терміну зберігання дуже відчутний. Так, при зберіганні зеленого чаю «Грінфілд» протягом 3 років вміст вітаміну С зменшується від 41,69 мг/100 г до 24,32 мг/100 г – у середньому в 1,7 разу. У зеленому чаї «Ява» від 37,4 мг/100 г до 26,4 мг/100 г – у середньому в 1,4 разу. Схожа тенденція в динаміці падіння вмісту вітаміну С і в чорних чаюх: у «Грінфілді» з 14,82 мг/100 г до 9,61 мг/100 г, у «Аскольді» – з 18,59 мг/100 г до 13,67 мг/100 г.

Результати визначення вмісту вітаміну Р представлені в таблиці 3. Згідно з результатами дослідження вміст вітаміну Р у 2,2 разу нижчий у чорних чаюх у порівнянні з зеленими. Серед зелених чаїв максимальний показник концентрації вітаміну Р мав чай «Грінфілд» 2014 р. – 598,75 мкг/см³, мінімальний – у чаї «Ява» 2010 р. – 193,75 мкг/см³. У групі чорних чаїв найвищий показник був у чаї «Грінфілд» 2014 р. – 266,25 мкг/см³, найнижчий у «Аскольді» 2010 р. – 200,5 мкг/см³.

Таблиця 3 – Вміст вітаміну Р у досліджуваних зразках чаїв (P = 0,95; n = 3)

Чай			Вміст вітаміну Р ± ε , мкг/см ³
Вид	Виробник	Рік	
Чорний	Грінфілд	2014	266,25±6,82
		2010	223,75±6,21
	Аскольд	2014	233,75±6,45
		2010	200,5±3,58
Зелений	Грінфілд	2014	598,75±6,21
		2011	437±3,58
	Ява	2013	275,5±3,58
		2010	193,75±6,21

Вплив строків зберігання на динаміку зміни вмісту вітаміну Р найбільш відчутний у групі зелених чаїв, де концентрація вітаміну Р знижується, у середньому, в 1,4 разу. Так, при зберіганні протягом 3 років концентрація вітаміну Р у зеленому чаї «Грінфілд» знижується з 598,75 мкг/см³ до 437 мкг/см³, у чаї «Ява» з 275,5 мкг/см³ до 193,75 мкг/см³. У групі чорних чаїв, у середньому, вміст вітаміну Р за 4 роки знижується у 1,2 разу. Так, у чорному чаї «Грінфілд» концентрація знижується з 266,25 мкг/см³ до 223,75 мкг/см³, у «Аскольді» з 233,75 мкг/см³ до 200,5 мкг/см³.

Отже, різниця у вмісті вітамінів Р та С в окремих групах чаїв, безумовно, пов'язана з технологічними особливостями їх виготовлення. Термін зберігання є загальним фактором, який впливає на зміну концентрації вітамінів Р та С і в чорних, і в зелених чаях. Найбільш відчутний вплив на динаміку змін вмісту вітамінів Р і С відбувається в групі зелених чаїв, у групі ж чорних чаїв цей вплив не такий значний.

ВИСНОВКИ

1. За результатами органолептичного аналізу найкращим в групі зелених чаїв виявився чай «Грінфілд» 2014 р., у групі чорних чаїв жоден не відповідав вимогам ДСТУ.
2. Експериментально показано, що найвищий показник вмісту вітамінів Р і С був у зеленому чаї «Грінфілд» 2014 р.
3. Експериментально підтверджено, що термін зберігання найбільш відчутно впливає на динаміку змін вмісту вітамінів Р і С в групі зелених чаїв порівняно з чорними.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кістанова С. Чайні варіації на Цейлонських плантаціях / С. Кістанова // Напитки плюс. – 2010. – № 8. – С. 30-35.
2. Скурихин І.М. Усе про їжу з погляду хіміка / І.М. Скурихин, О.П. Нечаєв. – К. : Вища школа, 1991. – 288 с.
3. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений. / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск, 1990. С 5–12.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. / Машковский М.Д. 7 – 15-е изд. – М. : Новая Волна, 2005. – 1200 с.
5. Батьківщина Т.Г. Сенсорний аналіз продовольчих товарів / Батьківщина Т.Г. – К. : Академія, 2004. – 207 с.

6. Чай. Органолептический анализ: ГОСТ ISO 32572:2013 – ГОСТ ISO 32572:2013. – [Дата введения 2015-07-01]. – М. : Стандартиформ, 2014. – 5 с. – (Межгосударственный стандарт).
7. Чай. Метод приготовления измельченной пробы и определения содержания сухого вещества: ГОСТ ISO 1572:2013 – ГОСТ ISO 1572:2013. – [Дата введения 2014-01-01]. – М.: Стандартиформ, 2014. – 7 с. – (Межгосударственный стандарт).
8. Чай. Метод определения водорастворимых экстрактивных веществ: ГОСТ ISO 28551:90 – ГОСТ ISO 28551:90. – [Дата введения 1991-05-01].– М.: Стандартиформ, 2005. – 6 с. – (Межгосударственный стандарт).
9. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С: ГОСТ ISO 24556:89. – ГОСТ ISO 24556:89. – [Дата введения 1990-01-01]. – М. : Издательство стандартов, 2003. – 10 с. – (Межгосударственный стандарт).

REFERENCES

1. Kistanova S. Chayni variatsiyi na Tseylonskih plantatsiyah / S. Kistanova // Napitki plyus. – 2010. – № 8. – S. 30-35.
2. Skurihin I.M. Use pro yizhu z poglyadu himika / I.M. Skurihin, O.P. Nechaev. – М.: Vischa shkola, 1991. – 288 с.
3. Georgievskiy V.P. Biologicheski aktivnyie veschestva lekarstvennyih rasteniy. / V.P. Georgievskiy, N.F. Komissarenko, S.E. Dmitruk. – Novosibirsk, 1990.
4. Mashkovskiy M. D. Lekarstvennyie sredstva. / Mashkovskiy M.D. – 15-e izd. – М.: Novaya Volna, 2005. – 1200 s.
5. BatkIvschina T.G. Sensorniy analIz prodovolchih tovarIv / BatkIvschina T.G. – К.: AkademIya, 2004. – 207 с.
6. Chaj. Organolepticheskiy analiz: GOST ISO 32572:2013 – GOST ISO 32572:2013. – [Data vvedeniya 2015-07-01]. – М.: Standartinform, 2014. – 5 s. – (Mezhgosudarstvennyj standart).
7. Chaj. Metod prigotovleniya izmelchennoj proby i opredeleniya sodержaniya suxogo veshhestva: GOST ISO 1572:2013 – GOST ISO 1572:2013. – [Data vvedeniya 2014-01-01]. – М.: Standartinform, 2014. – 7 s. – (Mezhgosudarstvennyj standart).
8. Chaj. Metod opredeleniya vodorastvorimyx ekstraktivnyx veshhestv: GOST ISO 28551:90 – GOST ISO 28551:90. – [Data vvedeniya 1991-05-01].– М.: Standartinform, 2005. – 6 s. – (Mezhgosudarstvennyj standart).
10. Produkty pererabotki plodov i ovoshhej. Metody opredeleniya vitamina С: GOST ISO 24556:89 – GOST ISO 24556:89. – [Data vvedeniya 1990-01-01]. – М.: Izdatelstvo standartov, 2003. – 10 s. – (Mezhgosudarstvennyj standart).

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ СТАТЕЙ У “ВІСНИК ЗАПОРІЗЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ” (СЕРІЯ “БІОЛОГІЧНІ НАУКИ”)

До друку приймаються статті українською, російською та англійською мовами, що відповідають тематиці серії видання й містять нові наукові результати, не опубліковані раніше.

За структурою стаття має відповідати вимогам, затвердженим постановою президії ВАК України від 15.01.2003 р. № 7-05/1 «Про підвищення вимог до фахових видань, внесених до переліків ВАК України», тобто містити такі необхідні елементи:

- **постановка проблеми** у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями;
- **аналіз останніх досліджень і публікацій**, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор;
- **виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми**, котрим присвячується означена стаття;
- **формулювання цілей статті**;
- **виклад основного матеріалу дослідження** з повним обґрунтуванням отриманих наукових результатів;
- **висновки** з даного дослідження і **перспективи подальших досліджень** у даному напрямку.

Виклад матеріалу статті має бути послідовним, логічно завершеним, із чіткими формулюваннями, що виключають подвійне тлумачення або неправильне розуміння інформації; мова тексту має відповідати літературним нормам, бути професійною і лаконічною. Автор зобов'язаний забезпечити високий науковий рівень викладеного матеріалу, повноту і системність висвітлення питання, достовірність результатів і даних, що наводяться, правильність цитування та посилань на літературні джерела. Статті публікуються мовою оригіналу.

1. МАКЕТ СТОРІНКИ

Для оригінал-макета використовується формат А4 з полями з усіх боків – 2 см. Для виділення окремих елементів статті застосовуються такі гарнітури, розміри шрифтів та начертання:

- для **УДК**, заголовку статті: Times New Roman, – 14 пт, усі прописні;
- для **підзаголовків** – 12 пт, напівжирний, усі прописні;
- для прізвищ, ініціалів авторів, назв і адрес організацій: Times New Roman, – 12 пт, *курсивом*, усі строчні;
- адреси електронної пошти: Times New Roman, – 12 пт, усі строчні;
- для анотацій, ключових слів: Times New Roman, – 10 пт, *ключові слова* – *курсивом*;
- основного тексту, виносок, посилань, підписів до рисунків та надписів над таблицями: Times New Roman, – 12 пт.

Інтервал між абзацами – 6 пт, міжрядковий інтервал – одинарний.

У разі необхідності для шрифтових виділень у таблицях і рисунках дозволяється застосовувати шрифт Courier New. Для стилістичного виділення фрагментів тексту вживаються начертання: курсив, напівжирний, напівжирний курсив зі збереженням гарнітури, розміру шрифту та інтервалу абзацу.

2. ТИПОГРАФСЬКІ ПОГОДЖЕННЯ ТА СТИЛІ

УДК вказується в першому рядкові сторінки і вирівнюється за лівим краєм.

Заголовок статті набирається в наступному за **УДК** рядкові і вирівнюється по центру.

У третьому рядку з вирівнюванням по центру зазначаються **прізвища, ініціали авторів**.

У наступному рядку розміщується інформація щодо повної **адреси та назви організації, де працює (навчається) автор**, яка також вирівнюється по центру (*курсивом*).

Четвертий рядок містить *адресу електронної пошти авторів*, розташовану по центру.

Далі розміщуються **анотації** (по 5 речень кожна) **українською та російською мовами** з ключовими словами. *Першою* слід розміщувати анотацію мовою оригіналу, *перед наступною*

анотацією повинна бути вказана назва статті, прізвища та ініціали авторів, повна адреса та назва установи, адреса електронної пошти авторів/автора.

Із наступного абзацу послідовно набираються і вирівнюються по центру заголовки статті **англійською мовою**, транслітеровані прізвища, ініціали авторів, назви і адреси організацій, які повинні бути представлені англійською мовою, у тому числі країна і місто, за винятком назви вулиці, яка подається транслітерацією.

Із наступного рядка розміщується розширена (**1,5 сторінки**) анотація з ключовими словами англійською мовою.

При поданні статті англійською мовою, анотації англійською, українською та російською мовами повинні бути однакові та інформативні. Їх обсяг повинен бути не більше п'яти речень.

Після анотацій з абзацу викладається основний текст статті.

Основний текст статті повинен мати такі розділи: **ВСТУП, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ, РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ, ЛІТЕРАТУРА, REFERENCES.**

Заголовки наукових статей повинні бути інформативними та містити тільки загальноприйняті скорочення. У перекладі заголовків статей англійською не повинно бути ніяких транслітерацій, окрім неперекладних назв власних імен, приладів та інших об'єктів, що мають власні назви; також не використовується неперекладний сленг. Це стосується також анотацій і ключових слів.

Наприкінці розділу **ВСТУП** потрібно зазначити мету дослідження, а наприкінці розділу **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** – перспективи подальших досліджень.

Ілюстрації мають бути оригінальними рисунками або фотографіями. Фотографії скануються у 256 градаціях сірого. Ілюстрації розташовуються у відповідних місцях тексту статті (по можливості угорі сторінки) і повинні бути підписані та послідовно пронумеровані арабськими цифрами: Рис.1, Рис. 2. Номер рисунку та підпис розташовуються безпосередньо під рисунком. Кожен рисунок та підписи до нього включаються до тексту публікації. Створення графічних об'єктів може здійснюватися будь-яким графічним редактором у форматі BMP файлів. Виконання рисунків засобами Microsoft Word здійснюється через використання команд панелі «Рисование». Підписи здійснюються командою «Надпись». Усі графічні компоненти рисунка і підписи об'єднуються командою «Группировать» (меню «Действия» на панелі «Рисование») і подаються у вигляді одного графічного об'єкта, прив'язаного до тексту з обтіканням зверху і знизу. Ілюстрації мають бути підготовані та масштабовані таким чином, щоб розміри букв тексту на ілюстраціях не перевищували розмір букв основного тексту статті більш ніж на 50 %.

Таблиці розташовуються у відповідних місцях тексту статті (по можливості угорі сторінки) і повинні мати назву та бути послідовно пронумеровані арабськими цифрами: Таблиця 1, Таблиця 2. Номер та назва таблиці розташовуються безпосередньо над таблицями.

Посилання на літературні джерела послідовно нумеруються арабськими цифрами в порядку появи в тексті статті і зазначаються у квадратних дужках, в яких вказуються порядковий номер джерела. Перелік літературних джерел мовою оригіналу подається в порядку їх нумерації після основного тексту статті з підзаголовком: «**ЛІТЕРАТУРА**», який вирівнюється по центру. Список літератури оформлюється відповідно до ДСТУ ГОСТ 7.1:2006 «Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Бібліографічний запис. Бібліографічний опис. Загальні вимоги та правила складання».

Із наступного абзацу подається перелік літературних джерел латиницею з підзаголовком: «**REFERENCES**», який вирівнюється по центру.

Анотації, ключові слова, основний текст статті, перелік літературних джерел мовою оригіналу та латиницею вирівнюються за лівим та правим краями.

При оформленні статті не допускається:

- підкреслювання в заголовках, підписах і надписах;
- початок сторінки незавершеним рядком;

- переноси слів у тексті статті;
- закінчення сторінки одним або декількома порожніми рядками, за винятком кінця статті та випадків, спричинених необхідністю уникнення висячих підзаголовків та початку абзацу в кінці сторінки;
- часте використання виносок, які повинні розглядатися як виняток і вживатися тільки у випадку дійсної необхідності).

Прийом статей до друку здійснюється редакційною колегією Вісника ЗНУ при наявності наступних документів:

- **текст статті** (електронний (у форматі **RTF**) та роздрукований варіанти за підписом автора (авторів), оформлений відповідно до встановлених вимог: електронний варіант статті подається на диску і/або надсилається електронною поштою. На диску мають бути два файли, назви яких повинні містити транслітероване прізвище першого автора: перший – із текстом статті, анотаціями та ключовими словами (наприклад: *Ivanov_stattya.rtf*); другий – із відомостями про авторів (наприклад: *Ivanov_avtor.doc*));
- **витяг із протоколу** засідання кафедри/відділу/лабораторії з рекомендацією статті до друку;
- **відомості про автора** (авторів), що містять таку інформацію: прізвище, ім'я, по батькові; місце роботи або навчання; посада, науковий ступінь, вчене звання; назва розділу збірника в якій подається стаття; адреса для листування; контактні телефони з кодом міста; адреса електронної пошти.

Документи подаються авторами відповідальному редакторові відповідної серії журналу або надсилаються за адресою: 69000, м. Запоріжжя, МСП-41, вул. Жуковського, 66, Запорізький національний університет, редакційна служба науково-дослідної частини.

Оплата за публікацію здійснюється після прийняття рішення редакційної колегії про рекомендацію статті до друку.

Статті, рекомендовані до друку редакційними колегіями, проходять редагування, коригування та технічну верстку згідно з видавничим форматом і шаблонами видання.

Нагадуємо:

До публікації приймаються статті, що відзначаються високим науковим рівнем підготовки, містять глибокий самостійний аналіз сучасних проблем розвитку науки.

У статтях і повідомленнях висловлені погляди їхніх авторів, які не завжди збігаються з поглядами редакції.

Автор несе відповідальність за достовірність фактичних даних та інформації, що містяться в статтях, чіткість викладу тексту, цитування, а також за мовностилістичний рівень написання матеріалів.

Редакційна колегія здійснює зовнішнє та внутрішнє рецензування статей та залишає за собою право відмовляти в їх опублікуванні, у разі коли статті не відповідають вимогам.

Адреса редакції: Україна, 69600, м. Запоріжжя, МСП-41, вул. Жуковського, 66

Довідки за телефонами:

Відповідальний редактор – Задорожня Вікторія Юліївна – 098-549-01-09
097-166-25-85

Електронна пошта: zadorovic@rambler.ru; inna-kolomoec0@rambler.ru

Місцезнаходження редакційної ради біологічного факультету: вул. Гоголя, 62

(III корпус ЗНУ), к. 107

ДЛЯ НОТАТОК

Збірник наукових праць

Вісник Запорізького національного університету
Біологічні науки

№ 2, 2014

Технічний редактор *А.І. Юрченко*

Верстка, дизайн-проробка, оригінал-макет і друк виконані
в редакційно-видавничому відділі Запорізького національного університету
тел. (061) 228-75-47

Підписано до друку 15.12.2014. Формат 60х90/8.
Папір Data Copy. Гарнітура “Таймс”.
Друк цифровий. Ум. друк. арк. 32.
Замовлення № 361. Наклад 100 прим.

Запорізький національний університет
69600, м. Запоріжжя, МСП-41
вул. Жуковського, 66

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції
ДК № 2952 від 30.08.2007 р.