

Міністерство освіти і науки України
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГАГУТ АННА МИКОЛАЇВНА

УДК 574:[597.8+598.162]

ДИСЕРТАЦІЯ
ЕКОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОНОВИХ ГІГРОФІЛЬНИХ
ВИДІВ ГЕРПЕТОФАУНИ ПІВНІЧНО-СТЕПОВОГО ПРИДНІПРОВ'Я

03.00.16 – екологія

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. М. Гагут

Науковий керівник
Гассо Віктор Якович,
кандидат біологічних наук, доцент

Дніпро – 2021

Анотація

Гагут А. М. Еколого-біохімічні особливості фонових гігрофільних видів герпетофауни. північно-степового Придніпров'я – На правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 – екологія. – Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, 2021.

У дисертації розглянуто популяційні особливості озерної жаби *Pelophylax ridibundus* та двох видів вужів: *Natrix tessellata* та *N. natrix*. у різних водних та навколоводних екосистемах долин річок Дніпро та Самара. Досліджено щільність населення та статеву структуру популяцій, що досліджувались, в умовах північно-степового Придніпров'я.

Встановлено значення біохімічних параметрів сироватки крові для особин з популяцій, які мешкають в різних за ступенем техногенного навантаження екосистемах. Статистично значущі відмінності виявлені для білкового складу крові, ферментативної активності та показників загального обміну речовин вужів. У звичайних вужів, які живуть в антропогенно трансформованих екосистемах, зменшується вміст альбуміну в сироватці крові. У них підвищується активність аланінамінотрансферази, але не змінюється активність аспартатамінотрансферази у порівнянні зі зміями контрольних ділянок. Це зумовлює зниження індексу де Рітиса, що може відбивати певні зміни в біохімічних процесах у печінці вужів. Підвищується також активність лужної фосфатази сироватки крові звичайних вужів із урбанізованих екосистем, що вказує на певні зміни фізіологічного стану печінки вужів. У *Natrix tessellata*, що мешкають в забруднених екосистемах в зоні впливу Придніпровської ТЕС, виявлено зміни в співвідношенні альбумінової і глобулінової фракції. Зменшення білкового коефіцієнту крові змій може вказувати на зміни в стані печінки змій. Отримані дані можна використовувати в подальших дослідженнях у якості порівняльних даних для оцінки стану популяцій вужів.

Дослідження екологічних та морфологічних особливостей водяного вужа з природних екосистем, які прилягають до Національного природного парку «Великий Луг» показали середню щільність населення 11 ос./100 м берегової лінії. Визначено біохімічні показники сироватки крові самок, які змінюються під час вагітності, що слід враховувати при біоіндикаційних дослідженнях.

Досліджували вміст і прогностичне значення молекулярного цитоскелетного маркера гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) в мозку *Pelophylax ridibundus*, *Natrix tessellata*, *N. natrix* в умовах впливу промислового забруднення. Вивчено вміст ГФКБ філаментної (цитоскелет) і розчинної (цитозоль) фракцій. Характерне посилення фрагментації ГФКБ відзначено для видів, що досліджували, з популяцій, які мешкають на забруднених територіях. Виявлено значуще підвищення експресії білка гліальних проміжних філаментів, що свідчить про індукований астрогліоз, тобто про функціональну відповідь нейроглії на негативний вплив забруднення навколишнього середовища. Виявлено значну аномалію в співвідношенні розчинної до цитоскелетної фракції ГФКБ у особин, які зазнали впливу забруднювачів. Це може свідчити про значне порушення обміну речовин в нервових клітинах мозку. Крім того, зростання рівня активних форм кисню як основної причини окисного стресу був визначений в мозку змій, які зазнали впливу токсичних речовин навколишнього середовища. Порушення цитоскелету астроцитів пов'язані з окислювально-відновним дисбалансом в мозку, який можуть викликати екотоксиканти. Попри обмежені дані про біологію гліальних клітин у мозку рептилій і амфібій, спостережувані результати доводять, що їх астроцити можуть реагувати на токсичність навколишнього середовища, використовуючи типову астрогліальну відповідь на ушкоджуючі фактори. Тому стан цитоскелету гліальних клітин озерної жаби і вужів може бути використаний в якості надійного та достовірного біомаркера впливу несприятливих факторів навколишнього середовища.

Ключові слова: водяний вуж, звичайний вуж, озерна жаба, щільність популяції, техногенний вплив, сироватка крові, біомаркери, гліальний фібрилярний кислий білок, окислювальний стрес.

Аннотация

Гагут А. Н. Эколого-биохимические особенности фоновых гигрофильных видов герпетофауны. северо-степного Приднепровья – На правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.16 – экология. – Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепр, 2021.

В диссертации рассмотрены популяционные особенности озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* и двух видов ужей: *Natrix tessellata* и *N. natrix*. в различных водных и околоводных экосистемах долин рек Днепр и Самара. Исследовано плотность населения и половую структуру популяций, которые исследовались, в условиях северо-степного Приднепровья.

Установлено значение биохимических параметров сыворотки крови для особей из популяций, проживающих в различных по степени техногенной нагрузки экосистемах. Статистически значимые различия выявлены для белкового состава крови, ферментативной активности и показателей общего обмена веществ ужей. У обыкновенных ужей, которые живут в антропогенно трансформированных экосистемах го, уменьшается содержание альбумина в сыворотке крови. У них повышается активность аланинаминотрансферазы, но не изменяется активность аспаргатаминотрансферазы по сравнению со змеями контрольных участков. Это приводит к снижению индекса де Ритиса, что может отражать определенные изменения в биохимических процессах в печени ужей. Повышается также активность щелочной фосфатазы сыворотки крови обычных ужей из урбанизированных экосистем, что указывает на определенные изменения физиологического состояния печени ужей. У *Natrix tessellata*, обитающих в загрязненных экосистемах в зоне влияния

Приднепровской ТЭС, выявлены изменения в соотношении альбуминовой и глобулиновой фракции. Уменьшение белкового коэффициента крови змей может указывать на изменения в состоянии печени змей. Полученные данные можно использовать в дальнейших исследованиях в качестве сравнительных данных для оценки состояния популяций ужей.

Исследования экологических и морфологических особенностей водяного ужа из природных экосистем, которые прилегают к территории Национального природного парка «Великий Луг» показали среднюю плотность населения 11 ос./100 м береговой линии. Определены биохимические показатели сыворотки крови самок, которые изменяются во время беременности, что следует учитывать при биоиндикационных исследованиях.

Исследовали содержание и прогностическое значение молекулярного цитоскелетного маркера глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в мозге *Pelophylax ridibundus*, *Natrix tessellata*, *N. natrix* в условиях воздействия промышленного загрязнения. Изучено содержание ГФКБ филаментной (цитоскелет) и растворимой (цитозоль) фракций. Характерное усиление фрагментации ГФКБ отмечено видов, которые исследовали, из популяций, обитающих на загрязненных территориях. Выявлено достоверное повышение экспрессии белка глиальных промежуточных филаментов, что свидетельствует об индуцированном астроглиозе, то есть о функциональном ответе нейроглии на негативное влияние загрязнения окружающей среды. Обнаружена значительная аномалия в соотношении растворимой к цитоскелетной фракции ГФКБ у особей, подвергшихся воздействию загрязнителей. Это может свидетельствовать о значительном нарушении обмена веществ в нервных клетках мозга. Кроме того, рост уровня активных форм кислорода как основной причины окислительного стресса был определен в мозге змей, которые подверглись воздействию токсичных веществ окружающей среды. Нарушения цитоскелета астроцитов связаны с окислительно-восстановительным дисбалансом в мозге, который могут

вызывать экотоксиканты. Несмотря на ограниченные данные о биологии глиальных клеток в мозге рептилий и амфибий, наблюдаемые результаты доказывают, что их астроциты могут реагировать на токсичность окружающей среды, используя типичный астроглиальный ответ на повреждающие факторы. Поэтому состояние цитоскелета глиальных клеток озерной лягушки и ужей может быть использовано в качестве надежного и достоверного биомаркера воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды.

Ключевые слова: водяной уж, обыкновенный уж, озерная лягушка, плотность популяции, техногенное воздействие, сыворотка крови, биомаркеры, глиальный фибриллярный кислый белок, окислительный стресс.

Resume

Nahut A. M. Ecological and biochemical characteristics of common hygrophilic herpetofauna species of the north-steppe Dnieper River region – manuscript. Dissertation for the degree of candidate of biological sciences, specialty 03.00.16 – ecology. – Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, 2021.

The dissertation examines the population characteristics of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* and two species of snakes: *Natrix tessellata* and *N. natrix*, living in various aquatic and semiaquatic ecosystems of the Dnieper and Samara Rivers' valleys. The densities and the sex structure of the studied populations were investigated in the conditions of the north-steppe Dnieper River region.

The values of the biochemical parameters of the blood serum of the species from the studied populations in ecosystems with varying degrees of technogenic load have been established. Statistically significant differences were found for the protein composition of the snake blood, enzymatic activity and metabolism indices. In grass snakes that live in anthropogenically transformed ecosystems, the albumin content in blood serum significantly decreases. In grass snakes of the transformed ecosystems, the ALT activity is increased, but the activity of aspartate

aminotransferase does not change in comparison with the snakes of the control sites. All this leads to a decrease in de Ritis ratio, which may reflect certain pathological changes in the snakes' liver. The activity of alkaline phosphatase in the blood serum of snakes from the Dnipro city is also increases, which indicates certain changes in the physiological state of the snake liver in urban areas. Changes in the albumin/globulin ratio for *N. tessellata* caught in the ecosystems polluted by the waste from Prydniprovskya Thermal Power Plant were revealed. A decrease in the protein coefficient of the snake blood may indicate changes in their liver. The data obtained can be used as reference values for the assessment of the snake population state.

The obtained data of the ecological and morphological characteristics of the dice snakes *N. tessellata* inhabited the ecosystems of the National Nature Park "Velykyi Luh" are presented. The average population density was 11 individuals per 100 m of the riverside line. The biochemical parameters of the blood serum of females, which change during pregnancy, have been determined. This should be taken into account in bioindication studies.

The content and prognostic value of the molecular cytoskeletal marker of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the brain of *P. ridibundus*, *N. tessellata* and *N. natrix* under the influence of industrial pollution were studied. The contents of GFAP in the insoluble filament (cytoskeleton) and soluble (cytosol) fractions were studied. A characteristic increase in the fragmentation of the GFAP was noted for the studied species inhabited the contaminated areas. A significant increase in the expression of the glial intermediate filament protein was found. It should indicate an induced astrogliosis, that is a functional response of neuroglia to the negative impact of environmental pollution. A significant anomaly was noted in the ratio of the soluble fraction of GFAP to the cytoskeletal GFAP fraction of individuals exposed to contaminants. This should indicate a significant metabolic disorder in nerve cells of anima's brain. In addition, an increase in the level of reactive oxygen species as an index of oxidative stress has been identified in the brains of snakes exposed to environmental toxicity. Thus, disturbances in the cytoskeleton of

astrocytes are associated with redox imbalances in the brain caused by contaminants. Despite the limited data on the biology of glial cells in the brains of reptiles and amphibians, the observed results suggest that their astrocytes can respond to environmental toxicity using a typical astroglial response. The state of the cytoskeleton of amphibian and reptile glial cells has been proposed as a reliable biomarker of the environmental pollution.

Key words: dice snake, grass snake, marsh frog, population density, technogenic influence, blood serum, biomarkers, glial fibrillary acidic protein, oxidative stress.

Список праць здобувача, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

У фахових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Gasso, V. Y., **Нагут, А. Н.**, Yermolenko, S. V., Hasso, I. A., Agca, C. A., Sukharenko, E. V., & Nedzvetsky, V. S. (2020). Local industrial pollution induces astrocyte cytoskeleton rearrangement in the dice snake brain: GFAP as a biomarker. *Biosystems Diversity*, 28(3), 250–256. doi: 10.15421/021623 (Особистий внесок: збирання матеріалу, обробка отриманих результатів) (Scopus)
2. Гассо, В. Я., **Гагут, А. М.**, & Єрмоленко, С. В. (2016). Біохімічні показники крові звичайного вужа (*Natrix natrix*) з екосистем із різним ступенем антропогенного навантаження. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина* 7(2), 127–131. doi: 10.15421/012033. (Особистий внесок: збирання матеріалу, обробка отриманих результатів, написання статті) (Web of Science)

Публікації у наукових фахових виданнях України:

1. Yermolenko, S. V., **Haгut, A. M.**, & Gasso, V. Ya. (2016). Morphophysiological indices of internal organs of the dice snake *Natrix tessellata* (Reptilia, Colubridae) of the Dnieper river in the Steppe Zone. Збірник праць Зоологічного музею, 20–29. (Особистий внесок: виконання польових досліджень, обробка отриманих результатів)
2. **Гагут, А. М.** (2015). Особливості екології та біохімії крові водяних вужів у репродуктивний період в умовах Каховського водосховища. Питання біоіндикації та екології, 20(1), 226–236.
3. Гассо, В. Я., **Гагут, А. М.**, & Єрмоленко, С. В. (2015). До характеристики популяцій *Natrix natrix* в умовах екосистем з різним антропогенним навантаженням. Питання степового лісознавства та лісової рекультивації земель, 44, 131–138. (Особистий внесок: виконання польових досліджень, обробка отриманих результатів)
4. Гассо, В. Я., Єрмоленко, С. В., & **Гагут, А. М.** (2016). Особенности популяций *Natrix tessellata* (Reptilia, Colubridae) Приднепровья северной степной подзоны. Питання біоіндикації та екології, 21(1–2), 180–193. (Особистий внесок: виконання польових досліджень, обробка отриманих результатів)
5. Гассо, В. Я., Єрмоленко, С. В., Кочет, В. М., **Гагут, А. М.**, & Пахомов, О. Є. (2018). Особливості динаміки герпетофауни природного заповідника «Дніпровсько-Орільський» в умовах кліматичних змін. Ecology and Noospherology, 29(1), 56–61. doi: 10.15421/031810 (Особистий внесок: виконання польових досліджень, обробка отриманих результатів)
6. Єрмоленко, С. В., Гассо, В. Я., **Гагут, А. М.**, Бобильов, Ю. П., & Гассо, І. А. (2019). Роль лісозахисних насаджень у підтриманні біорізноманіття герпетофауни степового Придніпров'я. Питання біоіндикації та екології. 24, 93-101. (Особистий внесок: виконання польових досліджень, обробка отриманих результатів)

7. Єрмоленко, С. В, Гассо, В. Я., Гагут, А. М., Спірна, В. А., & Гассо, І. А. (2019). Біоаккумуляція важких металів у водяного вужа *Natrix tessellata* (Reptilia, Colubridae) з екосистем із різним антропогенним навантаженням в сучасних умовах степового Придніпров'я. *Ecology and Noospherology*, 30(2), 113-117. doi: 10.15421/031919. (Особистий внесок: виконання польових досліджень, відбір проб та їх підготовка до аналізу, статистичний аналіз результатів)
8. Недзвецький В. С., Гассо В. Я., Гагут А. М., & Гассо І. А. (2020). Вплив забруднення кадмієм на гліальні клітини мозку: наслідки та біоіндикаційні можливості. *Питання степового лісознавства та лісової рекультивації земель*. 49, 23–33. (Особистий внесок: виконання досліджень, обробка отриманих результатів)
9. Недзвецький, В. С., Гассо, В. Я., Гагут, А. М., & Гассо, І. А. (2019). Гліальна цитотоксичність низьких доз кадмію як модель впливу забруднення важкими металами на хребетних тварин. *Ecology and Noospherology*, 31(1), 3–10. doi: 10.15421/032001 (Особистий внесок: аналіз літературних даних, обробка отриманих результатів)

Список публікацій, які свідчать про апробацію матеріалів дисертації:

1. Gasso V. Y., Yermolenko S. V., **Hahut A. M.**, & Hasso I. A. (2019). Ecological features of amphibian populations in urban ecosystems of Dnipro city. *Proceedins X Int. Conf. Ukrainian Herpetological Society*. 16-18 Sept. 2019. Kam'yanets-Podilsky. Kyiv, Ukraine. 5–6.
2. Gasso, V., Yermolenko, S., **Hahut, A.**, & Pakhomov, O. (2018) Populational and biochemical response of sand lizard to the influence of metal-working manufacturing. 10th Symposium on the Lacertids of the Mediterranean Basin & 2nd Symposium on Mediterranean Lizards. Tel Aviv, Israel. 61.
3. Nedzvetsky, V., Gasso, V., Holoborodko, K., Loza, I., Seliutina, O., Ermolenko, S., & **Hagut, A.** (2019). Innovative approach to biomonitoring of

- toxic loading on animals in native and artificial ecosystems. 3rd International Conference „Smart Bio“. Abstract book (Kaunas, Lithuania 02-04 May 2019), 288.
4. Nedzvetsky, V., Kirici, M., Gasso, V., Sukharenko, E., Yermolenko, S., **Hahut, A.**, & Hasso, I. (2019). Cadmium cytotoxicity impairs metabolic energy production and glial cytoskeleton stability. *Zoocenosis-2019. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали X Міжнародної наукової конференції, 18–19.11.2019, Дніпро, 54.*
 5. Spirina, V. A., **Hahut, A. M.**, Yermolenko, S. V., & Hasso, I. A. (2019). Glucose and protein in the blood serum of the dice snakes from different ecosystems. Abstracts of the young scientists conference «Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology», 21–22.03.2019, Ukraine, Kiev, 91.
 6. Spirina, V., Yermolenko, S., **Hahut, A.**, & Rubanenko, Y. (2019) Enzymes and lipid profile of the blood serum of *Pelophylax ridibundus* under anthropogenic load. Abstracts of the 14th International Young Scientist's «Biology Conference Biology from a Molecule up to the Biosphere», 27–29.11.2019, Ukraine, Kharkiv, 24–25.
 7. **Гагут, А. М.**, Гассо, В. Я., Єрмоленко, С. В., & Спіріна, В. А. (2018). До біохімічних показників сироватки крові водяних вужів в умовах р. Дніпра. Ecological studies of forest ecosystems of the steppe zone of Ukraine. II International Scientific Conference, 14–15.11.2018, Ukraine, Dnipro, 22–23.
 8. **Гагут, А. М.**, Гассо, В. Я., & Шило, Т. В. (2015). До можливості використання показників стану цитоскелету астроцитів водяного вужа для цілей біомоніторингу. Наукові основи збереження біотичної різноманітності: Матеріали I (XII) Міжнародної наукової конференції молодих учених, 21–22.03.2015, Львів, 165–167.
 9. Гассо, В. Я., **Гагут, А. М.**, & Єрмоленко, С. В. (2018). Розповсюдження «червонокнижних» видів герпетофауни у центрально-степовому Придніпров'ї. Матеріали до 4-го видання Червоної книги України.

Тваринний світ. Серія: «Conservation Biology in Ukraine». Київ, Інститут зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України, 7(1), 178–179.

10. Гасо, В. Я., Гагут, А. М., & Єрмоленко, С. В. (2015). Біохімічні особливості крові звичайного вужа (*Natrix natrix*) в умовах екосистем із різним ступенем антропогенного навантаження. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах. Матеріали VIII міжнародної наукової конференції, 21–23.12.2015, Дніпро, 214–215.

ЗМІСТ

ВСТУП	16
Перелік посилань	22
РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ БІОМАРКЕРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ СТАНУ ПОПУЛЯЦІЙ АМФІБІЙ І РЕПТИЛІЙ В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА ЕКОСИСТЕМИ	25
1.1. Загальна екологічна характеристика <i>Pelophylax ridibundus</i> , <i>Natrix tessellata</i> та <i>N. natrix</i>	25
1.1.1. Екологічні особливості та географічне поширення озерної жаби... 25	
1.1.2. Екологічні особливості та географічне поширення <i>N. tessellata</i> та <i>N. natrix</i>	27
1.2. Оцінка стану навколишнього середовища за допомогою аналізу стану популяцій хребетних тварин.....	34
1.3. Біохімічні показники крові як біомаркери стану популяцій в умовах екосистем з різним антропогенним навантаженням	36
1.4. Гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) як маркер патологічного стану нервової системи об'єктів дослідження	39
Перелік посилань	46
РОЗДІЛ 2. ФІЗИКО-ГЕОГРАФІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНУ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	65
2.1. Географічна та геоморфологічна характеристика території	65
2.1.1. Фізико-географічна характеристика Дніпровського водосховища. 66	
2.2. Вплив екологічно-небезпечних об'єктів – промислових підприємств на навколишнє середовище району досліджень	67
2.3. Клімат та гідрологічні особливості	70
2.4. Ґрунти	72
2.5. Рослинний і тваринний світ	73
2.5.1. Рослинний світ.	73
2.5.2. Тваринний світ.	75
Перелік посилань	78
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	86
3.1. Загальна експериментальна модель	86

3.2. Електрофорез у градієнтному поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію	89
3.3. Імуноблотинг	91
3.4. Метод Лоурі.....	93
3. 5. Методика визначення біохімічних показників крові	94
3.6. Методи статистичної обробки даних	102
Перелік посилань	103
РОЗДІЛ 4. ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПОПУЛЯЦІЙ АМФІБІЙ І РЕПТИЛІЙ В УМОВАХ ЕКОСИСТЕМ З РІЗНИМ АНТРОПОГЕННИМ НАВАНТАЖЕННЯМ.	
4.1. Просторова структура та чисельність популяцій <i>N. tessellata</i> та <i>N. natrix</i>	108
4.2. Статева структура популяцій <i>N. tessellata</i> та <i>N. natrix</i>	114
4.3. Екологічні особливості та статеві структури популяцій <i>Pelophylax ridibundus</i> (Pallas 1771)	117
Висновки по розділу	119
Перелік посилань	120
РОЗДІЛ 5. СТАН БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ПОПУЛЯЦІЙ ЗМІЙ РОДУ <i>NATRIX</i> В УМОВАХ ЕКОСИСТЕМ З РІЗНИМ АНТРОПОГЕННИМ НАВАНТАЖЕННЯМ	
5.1. Біохімічні показники крові звичайного вужа (<i>Natrix natrix</i>).....	123
5.2. Біохімічні показники крові водяного вужа (<i>Natrix tessellata</i>).....	127
Висновки по розділу	130
Перелік посилань	131
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ПРОМИСЛОВОГО ЗАБРУДНЕННЯ ЕКОСИСТЕМ НА АСТРОЦИТИ МОЗКУ ЗМІЙ: ГФКБ ЯК БІОМАРКЕР	
6.1. Стан цитоскелетних молекулярних компонентів мозку <i>Natrix tessellata</i> в умовах промислового забруднення екосистем	134
6.6. Стан цитоскелетних молекулярних компонентів мозку <i>Natrix natrix</i> в умовах промислового забруднення екосистем	143
6.3. Стан цитоскелетного молекулярного маркера гліоцитів мозку водяних вужів в умовах водойм різного ступеня засоленості	148
Висновки по розділу	153

Перелік посилань	154
РОЗДІЛ 7. ЕКОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВОДЯНИХ ВУЖІВ У РЕПРОДУКТИВНИЙ ПЕРІОД В УМОВАХ КАХОВСЬКОГО ВОДОСХОВИЩА.....	159
Висновки по розділу	163
Перелік посилань	164
РОЗДІЛ 8. СТАН БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПОПУЛЯЦІЙ <i>PELOPHYLAX RIDIBUNDUS</i> (PALLAS 1771) В УМОВАХ ЕКОСИСТЕМ З РІЗНИМ АНТРОПОГЕННИМ НАВАНТАЖЕННЯМ	166
8.1. Стан біохімічних показників крові популяцій <i>Pelophylax ridibundus</i> в умовах промислового забруднення екосистем	166
8.2. Стан білкових компонентів мозку <i>Pelophylax ridibundus</i> в умовах промислового забруднення екосистем	168
Висновки по розділу	172
Перелік посилань	172

ВСТУП

Актуальність теми. У сучасних умовах практично всі екосистеми зазнають несприятливого впливу, обумовленого глобальною антропогенною дією на біосферу. У зв'язку з цим існує постійна необхідність в розробці оперативних систем оцінки її стану., її сприятливості для живих істот і для людини.

Зміни у біосистемах проявляються на різних рівнях ієрархії: від молекулярного (зміни біохімічних процесів) до популяційного рівня і біотичного. Всі ефекти в біосистемі починаються саме з хімічних взаємодій на молекулярному рівні. Для оцінки якісних і кількісних параметрів стану навколишнього середовища сучасні програми біологічного моніторингу розширюють використання різних біомаркерів. Для найбільш раннього виявлення негативного впливу ефективними є біохімічні та молекулярні маркери. Вони характеризують зміни стану на самих ранніх етапах (Захаров, Кларк, 1993; Криволуцкий, 1991).

Північна степова підзона України наразі значно трансформована. Степове Придніпров'я зазнало серйозних втрат біологічного та ландшафтного різноманіття (Червона книга, 2011). Це зумовлює необхідність екологічних досліджень у цьому регіоні.

Життєздатність популяцій залежить від впливу різних чинників середовища та пов'язана з внутрішньою просторовою структурою (Царик, 2007). Важлива характеристика існування популяції, особливо у хребетних – її можливості переміщення у просторі (Решетило, 2013). Під час міграції особини виду можуть стикатися з природними або антропогенними перешкодами. За умов зменшення чисельності у популяції виробляються фізіологічні та етологічні захисні механізми, що дозволяють їй існувати у певних межах дії несприятливих (лімітувальних) факторів (Шилова, Шатуновский, 2005). На території України рід *Natrix Laurenti*, 1768 включає два види: вуж звичайний *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) та вуж водяний *N. tessellata* (Laurenti, 1768). Обидва види - екологічно пластичні та за

відповідних умов ландшафту та наявності кормової бази здатні зберігати стабільні популяції навіть у разі антропогенного навантаження на екосистеми. Як наслідок, у популяцій вужів виникають екологічні, фізіолого-біохімічні та морфологічні особливості (Göçmen et al., 2011; Gaebele et al., 2013; Weiperth et al., 2014). Озерна жаба *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) також широко розповсюджений вид, розселення якого зумовлене наявністю придатних для проживання біотопів, в тому числі антропогенно трансформованих екосистем (Кузьмин, 1999; Дуйсебаева и др., 2005; Фоминих 2009; Файзулин, 2010, Фоминых и др., 2010).

Оскільки досліджувані види зустрічається майже в усіх типах водойм та їх прибережних екосистемах, а особини характеризуються незначними добовими міграціями, *Pelophylax ridibundus*, *Natrix tessellata*, *N. natrix* можна використовувати як тест-об'єкт для біомоніторингу навколишнього середовища (Knotkova, 2002).

У зв'язку з наростаючим антропогенним навантаженням на природні екосистеми, незважаючи на певний прогрес у збереженні природи (Пахомов, Бригадиренко, 2005) зростає актуальність розроблення та введення у практику високочутливих методів досліджень і створення бази даних біохімічних показників рептилій.

Відомо, що організм пристосовується до токсичної дії чужорідних речовин, використовуючи для цього механізми знищення та дезінтоксикації. Хімічні речовини, які подолали біологічні бар'єри, піддаються різним біохімічним змінам (біотрансформації) з утворенням менш токсичних сполук. Величезний потік хімічних речовин, тривале напруження захисних біотрансформаційних механізмів захисту може з часом створити сприятливий ґрунт для зриву компенсаторно-пристосувальних процесів в органах і розвитку в них патологічних змін. Біохімічні показники корові характеризують стан організму на більш пізньому етапі токсикації, але можуть бути використані як біомаркери впливу антропогенного навантаження не тільки на організм в цілому а й на конкретні системи

органів (Jacopson et al. 1991, Pages et al. 1992, Raphael et al. 1994, Dickinson et al. 2002, Lopez-Olvera et al. 2003).

Для біохімічної характеристики стану організму в умовах екологічного стресу доцільне вивчення окислювального стресу, який вважається одним з головних індукторів структурно-функціональних порушень в клітинах ЦНС. Основну роль у захисті нервової тканини від фізичних і метаболічних ушкоджень відіграють астрогліальні клітини. Головний структурний компонент астроцитарного цитоскелета є гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ). ГФКБ розглядається як надійний маркер астроцитів, що реагують на ушкоджуючі фактори посиленням синтезу ГФКБ та інтенсивним фібрилогенезом. Шкідливий вплив екологічної токсичності було показано для мозку риб, що зазнали впливу міських та нафтопереробних заводів (Sukharenko et al., 2012). Попередні результати показали все більше доказів успішного застосування нейроспецифічних білків для оцінки шкідливого впливу важких металів, іонів алюмінію та суміші промислових забруднювачів (Недзвецкий и др., 2011; Novitsky et al., 2014; Sukharenko et al., 2017).

Порівняльний аналізу стану гліального цитоскелету вужів екосистем в умовах промислового забруднення - новий напрям екоотоксикологічних досліджень в Україні, що зумовлює актуальність та новизну даної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана як частина державних науково-дослідних робіт Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара: «Зоогенні механізми екосистемних сервісів та розробка екологічних принципів їх збереження і відновлення», № 0115U002382; «Екологічні основи зоопертинентного впливу тварин на процеси оптимізації природних і порушених екосистем в умовах сучасного природокористування», 0117U001207; «Розробка та впровадження інноваційної методики молекулярно-генетичної біоіндикації пестицидного навантаження», № 0120U102258. У всіх НДР здобувач –виконавець.

Мета та завдання дослідження. Визначення еколого-біохімічних особливостей фонових гігрофільних видів герпетофауни північно-степового Придніпров'я в умовах антропогенної трансформації екосистем.

Відповідно до мети було поставлено такі **завдання**:

- проаналізувати щільність та структури популяцій озерної жаби, водяного та звичайного вужів в умовах північно-степового Придніпров'я;
- виявити зміни біохімічних показників сироватки крові цих видів з різних за ступенем техногенного навантаження біотопів ;
- дослідити вплив репродуктивного періоду на екологічні особливості досліджуваних популяцій та стан біохімічних показників.
- дослідити експресію гліального фібрилярного кислого білку (ГФКБ) в мозку вужів із різних за умовами розселення біотопів;
- дослідити експресію біомаркерів цитоскелетних білків в мозку жаби озерної із різних за умовами розселення біотопів;
- оцінити прогностичне значення рівня експресії та стану молекулярного цитоскелетного маркера ГФКБ в мозку рептилій і амфібій в умовах промислового забруднення Придніпровського регіону.

Об'єкт досліджень – особини, популяції *Pelophylax ridibundus*, *Natrix tessellata*, *N. natrix* північно-степового Придніпров'я.

Предмет досліджень – популяційні характеристики озерної жаби, звичайного та водяного вужа: щільність населення, морфометричні показники, статева структура, біохімічні показники сироватки крові, вміст гліального фібрилярного кислого білка астроцитів мозку.

Методи досліджень – методи маршрутного обліку, морфометричні і морфофізіологічні методи, загальноприйняті методи визначення біохімічних показників крові, електрофорез у градієнтному поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію, імуноблотинг, метод Лоурі.

Наукова новизна одержаних результатів. *Уперше:*

– з'ясовано зміни біохімічних показників сироватки крові рептилій і амфібій, що досліджувалися, у різних за ступенем антропогенної трансформації біотопах;

– визначено норми біохімічних показників сироватки крові фонових видів рептилій і амфібій (*Pelophylax ridibundus*, *Natrix tessellata*, *N. natrix*) для подальшого використання їх, як біомаркерів навколишнього середовища;

– проаналізовано рівень експресії та стан молекулярного цитоскелетного маркера гліального фібрилярного кислого білку в мозку двох видів змій та озерної жаби в умовах антропогенного забруднення екосистем;

– визначено стан біохімічних показників видів герпетофауни в періоду їх репродукції у північно-степовому Придніпров'ї.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані здобувачем дані використані у науковій роботі Дніпровсько-Орільського природного заповідника, увійшли до Літопису природи та дозволили запропонувати заходи щодо покращення охорони та збереження плазунів заповідника. Наукові дані з екології плазунів степової зони України увійшли до наукових звітів державних наукових тем України. Дані з екології видів, що досліджувалися, використано для розробки СЕО (стратегічна екологічна оцінка), програм післяпроектного моніторингу та його проведення, для оцінки впливу на довкілля (ОВД) планованої господарської діяльності. Також отримані під час виконання дисертаційної роботи наукові дані можуть використовуватися для оцінки сучасного стану та прогнозування стану та охорони герпетофауни, у біоіндикаційних дослідженнях екосистем та системі біомоніторингу.

Біоетика. Під час виконання дисертаційної роботи автором дотримано всіх вимог біоетики щодо поводження з тваринами. Роботи с тваринами проводили відповідно до вимог Комісії з біоетики Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно опрацював літературу за темою дисертаційної роботи, спланував і провів польові та

експериментальні дослідження, аналіз і статистичну обробку отриманих результатів. Опубліковані у співавторстві матеріали належать авторам відповідно до їх внеску. Для публікацій, включених до наукометричних баз (Scopus, Web of Science Core Collection), та у фахових виданнях України вказаний особистий внесок здобувача.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були схвалені на науково-практичних конференціях: VIII, X Міжнародні наукові конференції «Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах» (Дніпро, 2015, 2019); IX Міжнародна конференція Українського герпетологічного товариства "Читання пам'яті професора Євгена Максимовича Писанця" (Київ, 2017); II International Scientific Conference «Ecological studies of forest ecosystems of the steppe zone of Ukraine» (Dnipro, 2018); XII Міжнародна наукова конференція молодих учених «Наукові основи збереження біотичної різноманітності» (Львів, 2015); 14th International Young Scientist's Biology Conference «Biology from a molecule up to the biosphere» (Kharkiv, 2019); X Міжнародна конференція Українського герпетологічного товариства (Кам'янець-Подільський, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 робіт: з них статей у виданнях, включених до наукометричних баз Scopus та Web of Science Core Collection – 2, а також у фахових виданнях України – 9, 10 статей та тез доповідей. Матеріали дисертації у достатньому обсязі викладено у друкованих працях і апробовані на конференціях і семінарах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 8 розділів з окремим переліком посилань після кожного розділу, висновків. Загальний список використаної літератури складає 340 джерел, з яких 145 латиницею. Основний обсяг дисертації складає 175 сторінок. Робота містить 10 таблиць, 37 рисунків.

Перелік посилань

1. Dickinson, V. M., Jarchow, J. L., & Trueblood, M. H. (2002). Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 143–153.
2. Gaebele, T., Poyto, I., Weiperth, A., Guti, G., & Puky, M. (2013). Abundant prey or optimal microhabitat? *Natrix tessellata* stays hidden in safe areas in a diverse floodplain along the Danube at Göd, Hungary. *North-Western Journal of Zoology*, 9(2), 374–382.
3. Göçmen, B., Çiçek, K., Yildiz, M. Z., Atatür, M. K., Dinçaslan, Y. E., & Mebert, K., (2011). A preliminary study on the feeding biology of the dice snake, *Natrix tessellata*, in Turkey. *Mertensiella* 18, 365–369.
4. Jacobson, E. R., Gaskin, J. M., Brown, M. B., Harris, R. K., Gardiner, C. H., LaPointe, J. L., Adams, H. P., & Reggiardo, C. (1991). Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *Journal of wildlife diseases*, 27(2), 296–316.
5. Knotková, Z., Doubek, J., Knotek, Z., & Hájková, P. (2002). Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). *Acta Veterinaria Brno*, 71(2), 191–198.
6. López-Olvera, J. R., Montané, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J., & Lavín, S. (2003). Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 830–836.
7. Novitskiy, R. A., Sukharenko, Y. V., & Nedzvetskiy, V. S. (2014). Molecular Biomarkers of Al³⁺ Effects on Induction of Oxidative Stress and Cellular Reactivation in Organism of *Lepomis gibbosus* (Pisces: Centrarchidae). *Hydrobiological Journal*, 50(2), 41–50.
8. Pagés, T., Peinado, V. I., & Viscor, G. (1992). Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comp Biochem Physiol A*, (103), 275–278.

9. Raphael, B. L., Klemens, M. W., Moehlman, P., Dierenfeld, E., & Karesh, W. B. (1994). Blood values in free-ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25(1), 63–67.
10. Сухаренко, О. В., Новіцький, Р. О., & Недзвецкий, В. С. (2012). Використання біомаркерів мозку донних риб для оцінки забруднення Керченської протоки Чорного моря. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія, медицина*, 3(2), 81–88.
11. Sukharenko, E. V., Samoylova, I. V., & Nedzvetsky, V. S. (2017). Molecular mechanisms of aluminium ions neurotoxicity in brain cells of fish from various pelagic areas. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 3(8), 461–466.
12. Weiperth, A., Potyo, I., & Puky, M. (2014). Diet composition of the dice snake (*Natrix tessellata* Laurenti, 1768) in the Danube River catchment area. *Acta Zool. Bulg.*, 66, 51–56.
13. Дуйсебаева, Т. Н., Березовиков, Н. Н., Брушко, З. К., Кубыкин, Р. А., & Хромов, В. А. (2005). Озерная лягушка (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) в Казахстане: изменение ареала в XX столетии и современное распространение вида. *Современная герпетология*, (3-4), 29–59.
14. Захаров, В. М., & Кларк, Д. М. (1993). Биотест: интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов. М.: Московское отделение международного фонда «Биотест».
15. Криволуцкий, Д. А. (1991). Биоиндикация и биомониторинг. М.: Наука.
16. Кузьмин, С. Л. (1999). Земноводные бывшего СССР. М.: Т-во науч. изд. КМК.
17. Недзвецкий, В. С., Сухаренко, Е. В., & Неруш, О. П. (2011). Биологическая и социальная значимость использования молекулярных компонентов с целью определения метаболических нарушений, вызванных ионами алюминия. *Ученые записки РГСУ*, (4), 192–196.
18. Пахомов, О. Є., & Бригадиренко, В. В. (2005). Концепція системи заходів з охорони навколишнього природного середовища дніпропетровської області на 2005–2015 роки. *Вісник*

Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. екологія, 13(1), 213–225/

19. Файзулин, А. И. (2010). Анализ кислотности (pH) нерестовых водоемов как параметр экологической ниши бесхвостых земноводных (Anura, Amphibia) Среднего Поволжья. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 12(1), 125–128.
20. Фоминых, А. С. (2009). О северо–восточной границе ареала озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) на Среднем Урале. *Современная герпетология*, 9(1–2), 70–174.
21. Фоминых, А. С., Файзулин, А. И., Юмагулова, Г. Р., Зарипова, Ф. Ф., Яковлева, Т. И., Хабибуллин, В. Ф., & Салихова, Р. Д. (2010). Формирование и состояние ареала озерной лягушки *Rana ridibunda* на территории южного Урала (Республика Башкортостан). Формирование и состояние ареала озерной лягушки *Rana ridibunda* на территории Южного Урала (Республика Башкортостан). Теоретические проблемы экологии и эволюции. Теория ареалов: виды, сообщества, экосистемы (V Любимцевские чтения)–Тольятти: Кассандра, 202–208.
22. Царик, Й. В. (2007). Проблема життєздатності популяцій. Біологічні студії, 1(1), 65–72.
23. Червона книга Дніпропетровської області. (Тваринний світ).(2011). Під редакцією О.Є. Пахомова. Дніпропетровськ:ТОВ «Новий друк».
24. Шилова, С. А., & Шатуновский, М. И. (2005). Эколого–физиологические критерии состояния популяций животных при действии повреждающих факторов. *Экология*, 1, 32–38.

РОЗДІЛ 1

ВИКОРИСТАННЯ БІОМАРКЕРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ СТАНУ ПОПУЛЯЦІЙ АМФІБІЙ І РЕПТИЛІЙ В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА ЕКОСИСТЕМИ

1.1. Загальна екологічна характеристика *Pelophylax ridibundus*, *Natrix tessellata* та *N. natrix*

1.1.1. Екологічні особливості та географічне поширення озерної жаби. Озерна жаба, *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771), розглядалася серед найбільш розповсюджених видів безхвостих амфібій в фауні Західної Палеарктики. Згідно з наявними в другій половині 20-го століття уявленнями, ареал виду «*Rana ridibunda*» охоплював колосальну територію в Північній Африці, Європі, Західній і Центральній Азії.

Дослідження останнього десятиліття показали, що під назвою *Pelophylax ridibundus* ховається цілий «букет» морфологічно подібних видів в якому розрізняють до 9–10 форм видового рангу, раніше віднесених до озерної жаби (Боркин, 1998; Литвинчук и др., 2004; Plötner et al., 2010; Akin et al., 2010; Ермаков и др., 2013; Ермаков и др., 2014; Akin, 2015) Озерна жаба зустрічається в Росії, Грузії, Азербайджані, Туркменії, Узбекистані, Казахстані, Киргизії, Алтаї і на півночі Китаю (Кузьмін, 1999; Дуйсебаева и др., 2005). Розселення виду зумовлене наявністю придатних для проживання біотопів, як природних (при зникненні факторів ізоляції), так і тих, що виникли в результаті господарської діяльності людини (створення меліоративних каналів, гребель, торфорозробок, що призводять до зміни гідрохімічних характеристик водойми, наприклад, рівня рН) (Кузьмін, 1999; Дуйсебаева и др., 2005; Фоминих 2009; Файзулін, 2010, Фоминых и др., 2010).

Веде денний спосіб життя і мешкає в озерах, басейнах чи повільних струмках з великою кількістю рослинності, тримається поблизу води та

обирає низькі рівнини або болота. Найактивнішими є у найбільш теплі періоди доби (з 12 до 17 годин). Полюють здебільшого на суші, по берегах водойм. У воді зазвичай ховається від небезпеки, пірнаючи з берегів, купин або з листя водних рослин. (Düşen, Öz, 2006; Covaciu-Marcov et al., 2006).

Зверху тіло забарвлене в буро-зелений колір з переважанням коричневого, бурого, зеленого або іноді оливкової відтінків. На спині великі темні плями, що розрізняються за кількістю, розміром і формою. Уздовж голови та хребта у більшості особин, буває вздовж спини світла смуга різного ступеня виразності (рис. 1.1). Ступінь антропогенного навантаження може впливати на різноманітність фенотипів (Зарипова и др., 2009). Максимальна довжина тіла досягає майже 10 см. Довжина тіла самців 6 см (5-8 см), самок 5,6 см (3,7- 8,5 см), маса до 200 г. Тіло подовжене, морда трохи загострена, але в цілому овальна.



Рис. 1.1. Озерна жаба, *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771)

У період розмноження самці дуже рухливі й гучноголосі. Парування й ікрометання починається з початку травня. Ікрометання починається в

найбільш нагрітих і захищених від вітру місцях водойм. Не всі жаби одночасно відкладають ікру: період їх розмноження завжди дуже розтягнутий і займає не менше 30-35 днів з піком ікрометання в травні і останніми свіжими кладками в середині-кінці червня. Запліднення у цього виду зовнішнє. Ікра відкладається у вигляді грудки, що утворився в результаті склеювання слизових лицьових оболонок.

Зимують озерні жаби на дні, зазвичай в тих же водоймах, де живуть в теплий період року, проте іноді мігрують в більш глибокі місця, де є ключі (Пикулик, 1985; Denoël, 2007).

Як більшість видів амфібій *P. ridibundus* є поліфагом, що використовує всі доступні об'єкти харчування. Єдиним обмеженням з доступних для споживання об'єктів харчування є розміри здобичі (Файзулин, 2008). Відмінною рисою даного виду є здатність до споживання водних кормів, які недоступні аборигенним видам. Це дозволяє озерній жабі не тільки перейти на харчування гідробіонтами в умовах дефіциту наземних форм здобичі, але і гарантує наявність кормових ресурсів в зимовий час у термальних водоймах. Широко відомі випадки споживання озерною жабою мальків риби (Маркузе, 1964) личинок і цьогорічок інших видів земноводних (Ляпков, 1989; Ruchin, Ryzhov, 2002), канібалізм щодо власної молоді (Писаренко, 1987). У цього виду виявлена добре виражена сезонна зміна складу їжі (Вершинин, Иванова, 2006).

1.1.2. Екологічні особливості та географічне поширення *N. tessellata* та *N. natrix*. У світовій фауні рід вужі (*Natrix*, Laurenti, 1768) налічує приблизно 21 вид, з яких 2 зустрічаються в Україні: вуж звичайний та вуж водяний (Банников и др., 1977). Ці види віддають перевагу різним об'єктам живлення і біогеоценозам, але мають схожі екологічні особливості та є гігрофілами. Оскільки у раціоні водяного вужа переважають представники іхтіофауни, а у раціоні звичайного вужа здебільшого представники батрахофауни, ці види у різному ступені прив'язані до водойм (Löwenborg, et al., 2010; Andjelković, 2016). При цьому у раціоні *N. tessellata* та *N. natrix*

іноді трапляються плазунів, комах, птахів, мікромамалій (Luiselli et al., 2005, Hutines, Mebert, 2011).

Водяний вуж (*Natrix tessellata* Laurenti, 1768) населяє великий ареал, що охоплює простір від Центральної та Південної Європи до Західного Китаю і Південно-Західної Індії (Tuniyev et al., 2011; Werner, Shapira, 2011; Ibrahim, 2012). Північна межа ареалу проживання цього виду, у зв'язку з прогнозованим підвищенням значення середньорічної температури, має тенденцію до просування на північ і проходить через територію України (Kotenko et al., 2011 року; Nekrasova et al., 2013). Даний вид є одним з найрозповсюдженіших видів рептилій центрально-степового Придніпров'я, відповідно, можна відмітити його як фоновий. *N. tessellate* тісно пов'язаний з водоймами, далеко від води їх можна зустріти лише під час міграції між водоймами.

N. tessellata включений до II Додатку Бернської конвенції про охорону європейських видів дикої фауни та їх природних місць мешкання як таких, що підлягають особливій охороні. В умовах Дніпровської області вид охоронного статусу не має (Булахов та ін., 2007).

Довжина тулуба водяного вужа досягає 1400 мм. Луска на тулубі і на хвості з добре вираженими реберцями. Морда загострена. Верхня частина тіла забарвлена в оливковий, оливково-сірий, зеленувато-бурий колір із темними плямами, розташованими у шаховому порядку або з вузькими поперечними смугами. Нижня частина тіла білувато-жовта або рожево-червона з витягнутими поперек темними плямами, частіше прямокутної форми. За головою зазвичай розвинена темна пляма у вигляді перевернутої римської цифри V. Зустрічаються екземпляри без малюнку або меланісти (Щербак, 1966; Гаранин, 1983) (рис. 1.2).

Водяні вужі в набагато більшій мірі, ніж звичайні, пов'язані з водоймами. На суходолі бувають під час міграції на невеликі відстані (до 1 км.) від одної водойми до іншої, до місць зимівлі, парування та відкладання яєць (Neumann, 2011). Зустрічаються також на сильно засолених водоймах.

Віддають перевагу водоймам з кам'янистим дном і берегом. (Пестов и др, 2001; Булахов та ін., 2007; Werner, Shapira, 2011). Вихід із зимових схованок припадає на середину квітня. Спарювання відмічається наприкінці квітня – початку травня поблизу з місцями зимівлі. В цей час водяні вужі збираються парами або в «клубки» (до 15 особин).



Рис. 1.2. Вуж водяний *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768)

Відкладання яєць відбувається у другій половині червня – на початку липня. Іноді, у холодне літо, затримується до початку серпня. Кількість яєць коливається від 6 до 23. Інкубація, за різними даними, триває від 40 до 52 діб. Молоді вужі з'являються у серпні (Бакиев, 2009; Булахов та ін., 2007). За літературними даними статева зрілість настає на 3 – 4 рік життя (Щербак, Щербань, 1980; Тertyшников, 2002; Шляхтин и др., 2005). Спостереження в умовах тераріуму показали, що протягом сезону линяння у дорослих особин відбувається не менше 4 разів (Десятков, 1977). На зимівлю йдуть одночасно зі звичайними вужами наприкінці вересня – у жовтні. Зимують невеликими групами у тріщинах ґрунту, норах гризунів, щілинах між камінням. Іноді у зручних для зимівлі місцях накопичуються декілька сотень особин.

Для водяних вужів характерна денна активність, але полюють переважно вранці та ввечері. Удень гріються на сонці, згорнувшись на заломках очерету, камінні, схилених над водою деревах. У найжаркіший період ховаються в тінь або спускаються в воду, де можуть тривалий час лежати на дні. Уночі обирають різні укриття (Вершинин, Большаков, 2007).

Водяний вуж іхтіофаг. Меншою мірою харчується іншими харчовими об'єктами (комахами, амфібіями, рептиліями, мишевидними гризунами, пташенятами (Бакиев, 2004; Бакиев, Киррилов, 2000; Маркузе, 1964; Шляхтин и др., 2006; Шляхтин и др., 2005; Brecko et al, 2011). Зазвичай водяний вуж полює з засідки, підстерігаючи рибу, сховавшись на дні водойми серед рослинності або каменів. Миттєво хапає жертву та заковтує її під водою або пливе зі здобиччю до берега (Бакиев, 2009).

Природних ворогів у вужів багато. Їх поїдають орли зміїди, лелеки, чаплі, шуліки та багато хижих ссавців (їжаки, єнотоподібні собаки, лисиці, куниці, борсуки) та навіть інші великі змії (каспійський полох). Серйозними ворогами є також щури, що можуть поїдати кладки та молодих вужів. Іноді зустрічі з хижакми не є фатальними і призводять до травматизму. Втрата частини хвоста самцями може призводити до зниження успіху парування (Shine et al, 1999). Захистом від нападників для вужів слугує надзвичайно смердюча жовтувато-біла рідина, яку вони випускають з клоаки. У багатьох випадках піймана змія вдається до прийому «вдаваної смерті», повисаючи із широко розкритою пащею і висунутим язиком. Кусають вужі дуже рідко (Булахов та ін., 2007).

Звичайний вуж – *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) (Reptilia, Squamata) поширений в північно-західній Африці і західній Азії до північно-західної Монголії, півдня Східного Сибіру і прилеглих районів півночі Китаю на сході і південно-західному Ірані на півдні, в Європі (крім Ірландії, північної частини Великобританії, північної частини Скандинавії), (Рябов и др., 2004; Банников и др., 1977; Булахов та ін., 2007; Даревский и др., 1998). Розповсюджений по всій території України, звичайний вуж є фоновим видом

змій фауни степового Придніпров'я (Бобылев, 1989; Гассо, 2005; Яровая, Гассо, 2003; Gasso, 2005). Кількість підвидів – предмет дискусій: 4 (Thorpe, 1975), 7 (Gasc et al., 2004), 9 (Банников и др., 1977). На Дніпровщині представлений двома підвидами: номінативним *N. n. natrix* (Linnaeus, 1758) та персидським або строкатим *N. n. persa* (Pallas, 1814), якого вважають кольоровою аберацією (Аль-Завахра, 1997; Gasc et al., 2004; Табачишин и др., 1996; Щербак, 1966)? стародавнім типом забарвлення (Терентьев, 1961), та атавізмом (Щербак, 1966). *N. n. persa* здебільшого поширений у південно-західній частині України (Кармишев, 2002; Кармышев, Мануилова, 2003, Котенко, 1977; Тарашук, 1987).

N. natrix включений до III Додатку Бернської конвенції про охорону європейських видів дикої фауни та їх природних місць мешкання як таких, що підлягають охороні, експлуатація яких регулюється відповідно до вимог Конвенції. Підвид *N. n. persa* занесений до Червоного списку Дніпропетровської області (категорія 1) (Булахов та ін., 2007).

За морфометричними параметрами цей вид належить до змій середніх і великих розмірів. Довжина тулуба звичайного вужа досягає 1800 мм. Зазвичай самиці звичайного вужа більші за самців. Вуж має короткий хвіст, луска тулуба з добре розвиненими реберцями. Луска хвоста у *Natrix natrix*, на відміну від *Natrix tessellata*, зі слабо розвиненими реберцями (Щербак, 1966; Gasso, 2011; Ворczyk, 2007). Голова різко відокремлена від тулуба шиєю по боках якої є дві помітні жовті, білі, або оранжеві плями формою півмісяця, облямовані спереду та ззаду чорними смугами (Щербак, Щербань, 1980). Отруйних зубів немає. Тіло зверху оливково-сірого, сірого, оливкового, оливково-бурого, або майже чорного кольору, часто з темнішими, розташованими іноді у шаховому порядку плямами або вузькими поперечними смугами (Большаков и др., 2005) (рис. 1.3). Зустрічаються особини без плям і меланісти. Меланісти в різній мірі відмічаються по всьому ареалу розповсюдження (Zadravec, Lauš 2011; Jandzik, 2004). Перевагою даного феномену є більш висока швидкість нагріву і підвищення

середньої температури (Luiselli 1992; Forsman 1995; Bittner et al. 2002; Tanaka 2005; Clusella-Trullas et al. 2008). Недоліком цього явища є більший ризик бути поміченим хижаком (Clusella-Trullas et al., 2008).

Місця існування звичайного вужа різноманітні, але неодмінно достатньо вологі. Особливо чисельні по берегах спокійних річок, озер, ставків, трав'яних боліт, у вологих лісах різного типу, переважно хвойних і широколистяних, узліссях, галявинах, вирубках і вкритих чагарником заплавних луках. Зустрічаються навіть у відкритих степах і горах. Схованками для вужів слугують нори, пустоти під корінням, купи каміння, сіно, щілини між колодами мостів, дамб тощо.

Для звичайного вужа характерна денна активність. Весною та восени змії активні в продовж усього дня, влітку з настанням спеки пік активності носить двовершинний характер.



Рис. 1.3. Вуж звичайний – *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758)

Загалом, на зимівлю вужі йдуть наприкінці вересня – у жовтні, іноді на початку листопада. Зимують невеликими групами або поодиночі у норах

гризунів, тріщинах ґрунту, щілинах між камінням тощо. У зручному для зимівлі місці іноді накопичується до декількох сотень особин. *N. natrix* можуть зимувати разом з іншими видами змій.

За сезон рептилії здійснюють дві-три міграції пов'язаних з виходом з зимівлі та пошуком партнерів для спарювання, пошуком місць для відкладання яєць та з пошуком місць зимівлі (Гордеєв, 2012). Перший вихід з місць зимівлі припадає на кінець березня, але масова поява відмічається в другій половині квітня. Невдовзі після виходу з зимівлі починається шлюбний період. Період спарювання триває з середини квітня до початку травня, в залежності від погодних умов, (Бакиєв и др., 2004; Банников, 1977; Тереньтьєв 1949). В цей період можна спостерігати максимум щільності населення та активності. В літературних джерелах описані також випадки осіннього спарювання вужів (серпень-вересень) (Моднов 2010). Під час парування вужі збираються у клубки по декілька самок і самців. Копуляція триває близько 30 хвилин. У кінці червня – на початку серпня самки звичайного вужа однією порцією відкладають 6 – 30. Яйця дуже нестійкі до висихання, тому змій відкладають їх на глибині 8 – 30 см від поверхні, у вологій, теплій (+ 25 – + 30 °C) схованці. Декілька самок можуть відкладати яйця в одному місці, розташовуючи їх у декілька шарів. Інкубація триває 5 – 8 тижнів. В залежності від кліматичних умов, в період з середини липня до початку вересня з'являються молоді вужі довжиною від 10–18 см (Гаранин, 1983; Масаликін, 1993; Коросов, 1995; Пикулик, 1988). До зимівлі цьоголітки линяють. Статева зрілість настає на третьому – четвертому році життя (Большаков, 2005).

Звичайний вуж виражений батрахофаг і живиться навіть отруйними земноводними (зеленою та сірою жабами, жерлянками). Рідше в раціон входять дрібні рептилії, птахи, ссавці, комахи, риба (Сапожников, 1961; Щербак, 1980; Моднов, 2010; Пикулик, 1988). Полное частіше на березі, ніж у воді, швидко наздоганяє жертву, хапає і заковтує живцем.

За літературними даними для звичайного вужа відомо 25 видів гельмінтів, для водяного – 28. Серед них є специфічні паразити родини вужоподібних змій (*Colubridae*) та ті, для яких вуж є резервуарним хазяїном личинкових стадій і передає паразитів по трофічному ланцюгу (Кириллов, 2011; Кириллов, 2012; Шималов, 2010; Шарпило, 1976; Шарпило, 1983; Евланов и др., 1996).

1.2. Оцінка стану навколишнього середовища за допомогою аналізу стану популяцій хребетних тварин

Сучасні підходи та методи оцінки якості середовища для вирішення комплексу різних завдань повинні забезпечувати можливість для виявлення наслідків будь-яких антропогенних впливів. Головними видами антропогенних чинників є різні хімічні (пов'язані з появою нових хімічних сполук) і фізичні (головним чином, тепловий і радіаційний) впливи.

Оцінка середовища необхідна як в просторі (шляхом виявлення відмінностей між різним місцепроживанням), так і в часі (шляхом дослідження змін в стані середовища в межах однієї території).

Внаслідок екстенсивного розвитку промислового виробництва і хімізації сільського господарства багато різних по природі забруднювачів шкідливо впливають на живі організми. В результаті відбуваються різноманітні зміни в біосистемах на всіх рівнях організації живого. На молекулярному рівні – це модуляція експресії окремих генів і молекулярні перебудови, на клітинному – змін біохімічних процесів та цитоскелетні перебудови, на рівні цілісного організму – зміни фізіологічних та поведінкових реакцій. На популяційному рівні відбуваються зміни структури популяції, як правило, знижується її чисельність та площа зайнятої території. В основі більшості тих чи інших порушень лежать біохімічні та молекулярні процеси. Відхилення від рівноваги в системах на молекулярному рівні, при достатній амплітуді змін, відбиваються на всіх вищих рівнях, в тому числі і на структурно-функціональній організації біогеоценозу (Гассо и др., 2010).

Застосування біохімічних методів в оцінці екологічних стресів без сумніву є багатообіцяним. Практично будь-які зміни в навколишньому середовищі для організмів виявляються в зміні або питомій активності певного ферменту, або стаціонарній концентрації метаболіту, чи модифікації ДНК. Фактично можливе вимірювання величезного числа біохімічних параметрів і кожен з них матиме свої позитивні та негативні сторони з погляду індукції стресу. Деякі з цих параметрів досить чутливі і варіюють при незначних змінах середовища, але при цьому не специфічні. Інші, навпаки, дуже специфічні і змінюються при дії певних чинників. Треті вказують на хронічну дію чинників або відображають небезпечні для життя зміни.

Пошук оптимальних біохімічних параметрів для екологічного біомоніторингу, які б одночасно представляли безперечну наукову цінність і були доступними для широкого застосування, йде постійно. Такі показники повинні бути розумно чутливими до змін в навколишньому середовищі, істотно необхідними для нормального існування організму, їх зміни повинні виявлятися тоді, коли дія екологічних чинників ще не носить необоротний для стану організму характер (Бадтиев, Кулемин, 2001).

Особливість дії екотоксикантів на живі організми в природному середовищі полягає в можливості комбінованого впливу чинників, що мають різноспрямовану (активуючу та пригнічуючу) дію на ензиматичні системи. Яка буде їх дія у результаті передбачити неможливо (Чернышенко и др., 1991).

Перевага використання біоіндикаторів в тому, що вони реагують не тільки на окремі забруднювачі, а й на весь комплекс токсичних речовин. А вплив комплексу забруднювачів на живі організми може сильно відрізнятись від впливу кожного токсиканта окремо. Для локальних оперативних досліджень краще використовувати види тварин, які характеризуються масовістю в природі, доступністю для оперативної оцінки і діагностики, мають індикаторні властивості. Всім цим вимогам відповідають деякі види

амфібій і рептилій (Дробот, Ремизова, 2012; Невмержицкая, Бахарев, 2016; Минеева, Минеев, 2011; Brodeur, Candioti, 2017), у тому числі й *N. tessellata*, *N. natrix* та *P. ridibundus*.

1.3. Біохімічні показники крові як біомаркери стану популяцій в умовах екосистем з різним антропогенним навантаженням

Хімічні речовини, які подолали біологічні бар'єри піддаються різним біохімічним перетворенням (біотрансформації) з утворенням менш токсичних сполук. Знешкодження чужорідних речовин може відбуватися в печінці, шлунково-кишковому тракті, легенях, нирках. За допомогою ферментних систем печінки здійснюється знешкодження хімічних сполук, які потім легше розчиняються у воді і швидко виводяться з організму через нирки і жовчні шляхи. Величезний потік хімічних речовин, тривала напруга захисних біотрансформаційних механізмів захисту може з плином часу створити сприятливий ґрунт для зриву компенсаторно-приспосувальних процесів у органах та розвитку в них патологічних змін (Уэр, 1993).

Біохімічні показники крові характеризують стан внутрішніх органів та організму в цілому. Кров відображає вплив на особину і, опосередковано, на популяцію в цілому, оскільки являє собою інформативний та чутливий індикатор стану організму, що швидко реагує на зміни ендогенних та екзогенних факторів. Таким чином біохімічні показники доцільно використовувати як маркери стану організму рептилій в екосистемах, різних за ступенем антропогенного навантаження (Jacopson et al., 1991; Pages et al., 1992, Raphael et al.; 1994, Dickinson et al., 2002; Lopez-Olvera et al. 2003). Комплекс біохімічних показників крові характеризує кількість та якість живлення, адаптивні можливості видів та інтенсивність дії на них антропогенних факторів. На біохімічні показники сироватки крові можуть впливати багато факторів. Більш сталі внутрішні фактори: вид, стать, стресовий стан (Samour et al. 1998, Wang et al. 1999, Dickinson et al. 2002, Peterson, 2002, Gicking et al. 2004, Metin et al., 2006). Та більш перемінні

зовнішні фактори: екологічні (Pages et al. 1992; Dickinson et al. 2002; Peterson, 2002; Keller et al., 2004; Akbulut et al., 2010).

Розробка та введення у практику високочутливих методів визначення стану організмів і створення бази даних біохімічних показників крові рептилій набуває актуальності у зв'язку зі зростаючим антропогенним навантаженням на природні екосистеми (Lawrence, Hawkey 1986; Gottdenker, Jacopson, 1995; Lopez-Olvera et al., 2003; Pakhomov, Brygadyrenko, 2005).

Білки сироватки крові являють собою гетерогенну групу білків, що включає транспортні білки, ферменти, імуноглобуліни, гормони, білки-інгібітори та багато інших (Герасименко, 2005). Сумарна концентрація альбуміну та глобуліну, що міститься в сироватці крові називають загальним білком. У найбільшій концентрації в плазмі присутній альбумін, синтезований у печінці, який необхідний для підтримання осмотичної рівноваги між навколосудинним простором і кровоносним руслом. Діагностичне значення має білковий коефіцієнт – відношення кількості альбумінів до кількості глобулінів. Потрібно враховувати, що білковий коефіцієнт для холоднокровних тварин значно нижчий, ніж для теплокровних, що пояснюється еволюційно-екологічними особливостями білкового складу крові (Хиггинс, 2008). Збільшення концентрації загального білка сироватки може бути викликано збільшенням концентрації окремих білків, зазвичай присутніх у відносно невисоких концентраціях, наприклад, гострофазових білків і імуноглобулінів при інфекційних процесах. Гіперпротеїнемії може бути обумовлена високим рівнем моноклональних імуноглобулінів при множинній мієломі та інших парапротеїнеміях.

Важкі захворювання печінки також призводять до зниження рівня білка в сироватці. Захворювання нирок, нефротичний синдром і ураження проксимальних каналців в кінцевому підсумку можуть призвести до зменшення рівня загального білка в сироватці (Никулина и др., 2007).

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) – фермент, що виробляється клітинами печінки, скелетних м'язів і серця. . Вивільнення АЛТ у кров відбувається під

час порушення внутрішньої структури гепатоцитів та підвищення проникності мембран. У зв'язку з цим, АЛТ вважають індикаторним ферментом (маркером) порушень функціонування печінки. Підвищення експресії свідчить про руйнування клітин печінки, інфаркт міокарда, руйнування м'язової тканини, токсичну дію на печінку.

Аспартатамінотрансфераза (АСТ) – фермент, що виробляється клітинами серця, печінки, скелетних м'язів і еритроцитами, приймає участь в обміні амінокислот. Підвищення експресії свідчить про пошкодження печінкових клітин, важке фізичне навантаження, серцеву недостатність, інфаркт міокарда, опіки, тепловий удар (Цыганенко и др., 2002; Камышников, 2009).

Глюкоза – універсальне джерело енергії для клітини. До зміни концентрації глюкози можуть призводити важкі отруєння з ураженням печінки, захворювання шлунку та кишківника (порушення всмоктування). Зазвичай зміни кількості глюкози в крові пойкилотермних тварин неспецифічні. Даний показник слід розглядати у комплексі з іншими характеристиками крові.

Азот сечовини крові – це азот у кінцевих продуктах обміну білка, у першу чергу сечовини. Крім сечовини небілковий азот походить також із креатиніну, сечової кислоти та інших сполук. Комплекс цих показників може характеризувати стан нирок у тварин. Сечова кислота – продукт обміну нуклеїнових кислот, виводиться з організму нирками. Підвищення призводить до ниркової недостатності.

Креатинін, як і сечовина, продукт обміну білків, виводиться нирками. На відміну від сечовини залежить не тільки від рівня білка, але від інтенсивності його обміну. При акромегалії і гігантизмі (підвищений синтез білка) його рівень зростає, на відміну від рівня сечовини. В іншому причини зміни рівня ті ж, що для сечовини. Показники загального обміну речовин (загальний кальцій, неорганічний фосфор, сечовина, азот сечовини) за звичай не видоспецифічні (Степаненко, 2013).

В організмі рептилій більшість кальцію міститься в кістках. В крові рівень кальцію тримається у достатньо вузькому діапазоні. у період репродуктивний період рівень кальцію може підвищуватися удвічі – утричі. Метаболізм фосфору та його рівень у крові тісно пов'язаний з кількістю кальцію. При цьому показники фосфору може бути єдиним показником негативних змін у нирках (Tosunoglu, 2011).

Холестерин присутній в крові у вигляді двох фракцій: ЛПНЩ і ЛПВЩ і є основним учасником жирового обміну.

Тригліцериди є найпоширенішою формою складних ефірів гліцерину і відповідають за 95 % накопичення тканинами жиру. Під впливом ліпази й жовчних кислот, тригліцериди гідролізуються в гліцерин і жирні кислоти. Насичені тригліцеридами ліпопротеїни є хіломікронами та ліпопротеїнами дуже низької щільності (ЛПДНЩ). Гідроліз тригліцеридів каталізує ліпаза - фермент, що виробляється рядом органів і тканин.

1.4. Гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) як маркер патологічного стану нервової системи об'єктів дослідження

У сучасних умовах практично всі екосистеми піддані несприятливому впливу, обумовленому глобальним антропогенним впливом на біосферу. У цей час особливу актуальність здобувають дослідження молекулярних процесів, які лежать в основі фізіологічних, репродукційних й інших біологічних процесів (Недзвецкий и др., 2005).

Клітини нервової тканини (астроцити) надзвичайно чутливі до дії ушкоджувальних факторів, мають особливі фізіологічні та метаболічні можливості, життєво важливі для підтримання гомеостазу мозку. Пошкодження різного походження, хімічний та фізичний інсульт викликають характерну реактивну відповідь астроцитів – астрогліоз, який супроводжується підвищеним синтезом специфічного цитоскелетного компонента астроцитів - гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ).

Розвиток нервової системи відбувався шляхом диверсифікації і спеціалізації клітин, що призвело до появи багатьох різних типів нейронів, які в поєднанні з синаптичним механізмом, здатні генерувати та поширювати потенціал дії та забезпечують швидку передачу сигналів в нейронних мережах. Другий клас клітин, які еволюціонували паралельно, представлені гетерогенною нейроглією, що забезпечує гомеостаз та захист нервової системи. Ці два класи нервових клітин розрізняються за біохімією та фізіологією, і все ж вони об'єднуються для формування нервової тканини. Неврологічні захворювання можна розглядати, як порушення гомеостазу. Це визначення підкреслює фундаментальну роль нейроглії, яка захищає нервову систему через різноманітні гомеостатичні механізми здатні до формування еволюційно закріпленої складної реакції, відомої як реактивний гліоз.

Нейроглія в нервовій системі, складається з декількох типів периферичної глії (швановських клітин периферичних нервів, сателітної глії периферичних гангліїв, кишкових гліальних клітин і нюхової оболонкової глії) та гліальних клітин центральної нервової системи (ЦНС). Глія ЦНС ділиться на мікроглію (клітини мієлоїдного походження, які пронизують ЦНС на ранніх стадіях розвитку і забезпечують вроджений імунітет нервової тканини) і макроглію представлену астроглією, олігодендроглією і NG2 глією (Verkhatsky, Butt, 2013).

Астроцити складають значну частину гліальних клітин та розподілені по всій сірій та білій речовині головного і спинного мозку. Вони є найбільш неоднорідними (за формою та функціями) типом нейроглії та відповідають за практично кожну гомеостатичну потребу ЦНС. Всі астрогліальні клітини мають певні фізіологічні особливості, які визначаються їх положенням у різних відділах головного та спинного мозку і виконують різні фізіологічні функції (Verkhatsky et al., 2016; Barres, 1991).

Під час ембріонального розвитку головного мозку астроцитам передують радіальна глія, яка бере участь в міграції нейронів (Anton et al., 1996).

Астроцити підтримують нормальну фізіологію головного мозку шляхом секреції деяких активних з'єднань, формуванні гематоенцефалітичного бар'єру, метаболізму деяких нейротрансмітерів і підтриманні іонного балансу міжклітинного простору. Гліальні клітини також беруть участь в забезпеченні нейрофізіологічних сигналів нейронів, необхідних для їх виживання, проліферації та диференціації (Maxwell et al., 1996; Gomes et al., 1999). Астроцити також сприяють імунологічній реакції ЦНС, оскільки вони синтезують цитокіни (Norenberg, 2005; Farina et al., 2007). Ці клітини видаляють та переробляють нейромедіатори та іони в синаптичних з'єднаннях (Vernadakis, 1988; Wang, Bordey, 2008) регуляції рН (Belanger, Magistretti, 2009), регуляції водного транспорту в ЦНС та захисті нейронів від активних форм кисню, вироблених в результаті метаболізму мозкової тканини (Березин, Белик, 1990; Gonzalez, Salido, 2009; Kirischuk et al., 2012; Nedergaard, Verkhratsky, 2012; Clarke, Barres, 2013; Verkhratsky et al., 2014).

Оскільки ці клітини беруть активну участь в захисних реакціях, патогенез астроцитів слугує ініціатором змін молекулярних і клінічних механізмів, що призводять до порушення нормального процесу виникнення нейральних асамблей та формування зрілої ЦНС (Сухаренко и др., 2015). Пригнічення функцій астроцитів в ранньому онтогенезі можуть бути основною причиною майбутніх патогенетичних подій. При деяких нейродегенеративних захворюваннях зміна морфології та щільності астроцитів головного мозку передують клінічним симптомам, котрі з'являються пізніше астроцитарних порушень (Notarachille et al., 2014; Сухаренко и др., 2015).

Індукована трансформація мікроглії і астроцитів в їх «активному» стані відмічають як «реактивний» гліоз або просто гліоз (накопичення гліальних волокон) (O'Callaghan, Sriram, 2005). Така відповідь характеризується інтенсивним розповсюдженням астроцитів та надлишковою експресією гліального фібрилярного кислого білку (ГФКБ) (Gomes et al., 1999).

Якщо гліоз являє собою доміную та універсальну відповідь на пошкодження нервової системи, то найбільш дослідженим і описаним ключовим біомаркером є ГФКБ. Використання цього білку в гістологічних дослідженнях встановило існування реактивного гліозу, як доміную реакції на багато різноманітних форм пошкоджень мозку (Norton et al., 1992; Little, O'Callaghan, 2001; Sriram, O'Callaghan, 2005; Norenberg, 2005).

Цитоскелет клітин складається з мікрОВОЛОКОН, мікротрубочок та проміжних філаментів. Мікротрубочки та мікрОВОЛОКНА складаються з тубуліну і актину в усіх типах клітин. Проміжні філаменти регулюються онтогенетично для різних тканин. Функціональна основа різноманіття специфічних проміжних філаментів не до кінця зрозуміла. Однак диференціальна експресія білку проміжних філаментів в різних типах клітин означає, що вони мають спеціалізовані ролі в диференціації та функціях цих клітин. Гліальний фібрилярний кислий білок є основним компонентом проміжних філаментів цитоскелету астроцитів.

Цей білок був вперше виділений в 1969 році з церебральних тканин пацієнтів з розсіяним склерозом. Автори описали цей білок, як білок бляшок. У статті опублікованій в 1971 році в Brain Research були детально описані характеристика і методика виділення ГФКБ з фракції нерозчинних у воді білків склеротичних бляшок (Eng et al., 1970; Eng et al., 1971; Jacque et al., 1974; Maunoury et al., 1976; Eng et al., 2000). Остаточна назва цього білку стала відома у 1972 (Bignami et al., 1972). У цьому ж році вперше були отримані ГФКБ специфічні антитіла (Uyeda et al., 1972).

Будова ГФКБ схожа з будовою інших білків проміжних філаментів. Він існує в двох формах – філаментній та розчинній. ГФКБ – амфифільний білок, що має значну спорідненість до гідрофобних радикалів. Його видонеспецифічність підтверджується перехресною імунореактивністю, а також гомологією вивчених окремих амінокислотних послідовностей білку, виділеного з мозку тварин різних видів.

Крім астроглії ЦНС, ГФКБ відкритий у більшості типів периферійної глії, в *pars distalis* і *pars intermedia* гіпофіза, а антиген, імунологічно споріднений ГФКБ, знайдений у культурі людських фібробластів, у куперівських клітинах печінки видів.

Синтез ГФКБ та його фосфорилування у гліальних клітинах стимулюється гормонами (норепінефрином) і різними факторами росту. Фосфорилується ГФКБ Ca^{2+} кальмодулін – залежною протеїназою (Березин, Шевченко, 1987; Березин, Белик, 1990; Бадалян и др., 1997). Показана можливість регуляції фосфорилування ГФКБ глутаматом. Припускають, що активація рецептора глутамата інгібує вхід іонів Ca^{2+} до астроцитів та знижує інтенсивність Ca^{2+} залежного каскаду дефосфорилування. Можливо, глутамат, який вивільняється з синапсів може подавати сигнал про зростання рівню фосфорилування ГФКБ та, відповідно, підвищення кількості астроцитів, які діляться. З іншого боку, показано, що фосфорилування через вплив на динамічну рівновагу ГФКБ, призводить до руйнування сітки гліальних філаментів (ГФ) у мітотичних гліальних клітинах (Фултон, 1987).

Ген, який кодує ГФКБ, складається з 9 екзонів, причому кодуючи послідовності високо гомологічні у різних видів. Були ідентифіковані три типи мРНК, які транскрибують різні ізоформи ГФКБ: α -, β - та γ -ГФКБ. Специфічність експресії ізоформ у різних клітинах свідчить про наявність певних механізмів регуляції. У периферійній нервовій системі β -ГФКБ вважається основною формою, тоді як α -ГФКБ – головна ізоформа у ЦНС. мРНК γ -ГФКБ була знайдена як у ЦНС, а також у нервових тканинах (кістковий мозок, селезінка) (Nedzvetskii et al., 2006).

Розщеплення ГФКБ *in situ* й *in vitro* відбувається Ca^{2+} -залежною протеїназою кальпаїном II. Якщо молекулярна маса нативного ГФКБ дорівнює 50 кДа, то під впливом кальпаїну II з'являється ряд пептидів з $M_r = 28\text{--}47$ кДа. (Ройтбак, 1993).

Показано, що гліальні філаменти (ГФ) пов'язані з деякими білками, які отримали назву білків, асоційованих з ГФ. Особливу увагу привертає білок з масою 48 кДа. Він з'являється на пізніх стадіях розвитку, коли мобільні астробласти перетворюються на нерухомі клітини. Вважають, що подібні білки забезпечують необхідні умови, в яких клітина може змінювати пластичність свого цитоскелету у відповідь на функціональні потреби (Бадалян и др., 1997).

Функціональне значення ГФКБ досі з'ясовується. Слід зазначити про різноманітність функцій ГФКБ. Цей білок приймає участь у таких клітинних процесах як, реорганізація цитоскелету, підтримка мієлінізації, клітинної адгезії та сигнальних шляхів. Таким чином, ГФКБ не є звичайним механічним інтегратором клітинного простору. Скоріше за усе, він забезпечує місця закріплення найважливіших кіназ, які розпізнають основні клітинні субстрати; формує динамічну систему з мікрофіламентами, інтегриновими рецепторами та екстрацелюлярним матриксом.

Пошкодження нервової тканини викликає інтенсивну проліферацію і гіпертрофію астроцитів. Ці реакції супроводжуються прискореним синтезом ГФКБ і фібрилогенезом. Це явище (назване астрогліозом) є основою реактивного гліозу (загальної реакції ЦНС на пошкодження). ГФКБ безпосередньо бере участь в реактивації астроцитів і підтримці їх морфології (Рекну et al., 1998). Встановлено, що цей білок відіграє провідну роль у формуванні гліальних рубців (Рекну et al., 2014). Локалізація ГФКБ в клітинах, які утворюють бар'єр між організмом і навколишнім середовищем свідчить про можливість виконання цим білком інших функцій, відмінних від функцій в нервовій тканині. Відтак, участь ГФКБ у формуванні та підтримці імунологічних та механічних бар'єрів вимагає подальшого дослідження (Тухомуров et al., 2016). ГФКБ є потужним та інформативним показником широкого спектра нейродегенеративних розладів, викликаними різними несприятливими впливами чи захворюваннями. Імунохімічне визначення ГФКБ використовується для ідентифікації типу новоутворень гліального

походження та оцінки рівня тяжкості травмування нервової тканини (Jacque et al., 1978; Schiff et al., 2012; Petzold, 2015).

Гліальний фібрилярний кислий білок може слугувати в якості біомаркеру нейротоксичності (O'Callaghan, Sriram, 2005). При хронічному стресі знижуються рівень експресії ГФКБ, що показує наявність астроцитів в стані спокою, тому що реактивні астроцити показують високий рівень експресії ГФКБ (Middeldorp, Hol, 2011; Araya-Callis et al., 2012). Суміш важких металів стимулює апоптоз та індукує морфологічні зміни у ГФКБ експресуючих кортикальних астроцитів (Rai et al., 2010; Rai et al., 2013).

Визначення вмісту ГФКБ проведено на різних видах тварин (рибах, гризунах, рептиліях, собаках) (Новицкий и др., 2009; Гассо и др., 2010; Malik, 2010; Сухаренко и др. 2011; Arikan, Uysal, 2011; Sukharenko et al., 2012; Сухаренко и др., 2015).

За допомогою експресії проміжної нитки білку (ГФКБ) маркера для астрогліальних клітин можуть бути ідентифіковані пухлинні астроцити. З підвищенням кількості злоякісних астроцитів відбувається прогресивна експресія ГФКБ (Gagliano et al., 2007). ГФКБ – специфічний біомаркер в здорових гліальних клітин і не може бути використаним в якості маркера для негліальних тканин пухлин (Arikan, Uysal, 2011).

Дослідження молекулярних маркерів дозволяє оцінити шкідливі ефекти токсикантів та розробити підхід для компенсації патогенетичних порушень. Тканеспецифічні білки є ключовими, життєво необхідними макромолекулами для всіх хребетних. Саме ці білки надзвичайно чутливі до впливу забруднювальних факторів (Baydas et al., 2003; Новицкий и др., 2009). Білок проміжних філаментів гліальних клітин на сьогодні визначений як надійний специфічний маркер астроцитів, зміни експресії якого показують патогенетичні порушення ЦНС (Недзвецкий та ін., 2001).

Перелік посилань

1. Akbulut, M., Kaya, H., ÇELİK, E. Ş., Odabasi, D. A., Odabasi, S. S., & Selvi, K. (2010). Assessment of surface water quality in the Atikhisar Reservoir and Sariçay Creek (Çanakkale, Turkey). *Ekoloji*, 19(74), 139–149.
2. Akın, Ç., Bilgin, C. C., & Bilgin, M. (2010). Discordance between ventral colour and mt DNA haplotype in the water frog *Rana (ridibunda) caralitana*, 1988 Arkan. *Amphibia-Reptilia*, 31(1), 9–20.
3. Akın, Ç., Can Bilgin, C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S. N., Uzzell, T., Bilgin, M, Hotz, H., Guex, G.-D., & Plötner, J. (2010). Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*, 37(11), 2111–2124.
4. Andjelković, M., Blagojević, V., Tomović, L., & Ivanović, A. (2016). Ontogeny of pileus shape in *Natrix natrix* and *N. tessellata*. *The Herpetological Journal*, 26(1), 3–9.
5. Anton, E. S., Cameron, R. S., & Rakic, P. (1996). Role of neuron–glial junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. *Journal of Neuroscience*, 16(7), 2283–2293.
6. Araya–Callís, C., Hiemke, C., Abumaria, N., & Flugge, G. (2012). Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus. *Psychopharmacology*, 224(1), 209–222.
7. Archibald, R. M., Frame, E. G., & Senesky, D. (1958). Nitrogen by the Kjeldahl method. *Standard methods of clinical chemistry*, 2, 91–99.
8. Arıkan, F., & Uysal, H. (2011). Short communication expression of glial fibrillary acidic protein in some tumors of dogs. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 82(1), 23–27.
9. Barres, B. A. (1991). New roles for glia. *Journal of Neuroscience*, 11(12), 3685–3694.

10. Baydas G. Reiter R. J., Nedzvetskii V. S. (2003). Melatonin protects the central nervous of rats against toluene-containing thinner in-toxication by reducing reactive gliosis. *Toxicology Letters*, 137, 169–174.
11. Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues in clinical neuroscience*, 11(3), 281.
12. Bignami, A., Eng, L. F., Dahl, D., & Uyeda, C. T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain research*, 43(2), 429–435.
13. Bittner, T. D., King, R. B., & Kerfin, J. M. (2002). Effects of body size and melanism on the thermal biology of garter snakes (*Thamnophis sirtalis*). *Copeia*, 2002(2), 477–482.
14. Borczyk, B. (2007). The causes of intraspecific variation in sexual dimorphism in the common grass snake populations, *Natrix natrix* Linnaeus, 1758 (Serpentes, Colubridae): Data from the South Western Poland. *Acta Zoologica Cracoviensia—Series A: Vertebrata*, 50(1–2), 9–13.
15. Brecko, J., Vervust, B., Herrel, A., & Van Damme, R. (2011). Head morphology and diet in the dice snake (*Natrix tessellata*). *Mertensiella*, 18, 20–29.
16. Brodeur, J. C., & Candiotti, J. V. (2017). Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: Potential biomonitor/bioindicator species for the Pampa region of Argentina. In *Ecotoxicology and Genotoxicology*.
17. Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5), 311–321.
18. Clusella-Trullas, S., Terblanche, J. S., Blackburn, T. M., & Chown, S. L. (2008). Testing the thermal melanism hypothesis: a macrophysiological approach. *Functional ecology*, 22(2), 232–238.
19. Covaciu-Marcov, S. D., Sas, I., Kiss, A., Bogdan, H., & Cicort-Lucaciu, A. Ş. (2006). The herpetofauna from the Teuz River hydrographic basin (Arad county, Romania). *North-Western Journal of Zoology*, 2(1), 27–38.

20. Denoël, M. (2007). Drobenkov, S. M., Novitsky, R. V., Kosova, L. V., Ryzhevich, K. K., & Pikulik, M. M. (2006): The amphibians of the Belarus. Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union. *Amphibia–Reptilia*, 28(2), 314–314.
21. Dickinson V. M., Jarchow J. L., Trueblood M. H. (2002). Hematology and plasma biochemistry reference range values for free–ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 38 (1): 143–153.
22. Düşen, S., & Öz, M. (2006). Helminths of the marsh frog, *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura: Ranidae), from Antalya Province, southwestern Turkey. *Comparative Parasitology*, 73(1), 121–129.
23. Eng, L. F., Gerstl, B., & Vanderhaeghen, J. J. (1970). A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans Am Soc Neurochem*, 1, 42.
24. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP – thirty one years (1969–2000). *Neurochemical research*, 25(9–10), 1439–1451.
25. Eng, L., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., & Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain research*, 28(2), 351–354.
26. Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*, 28(3), 138–145.
27. Forsman, A. (1995). Heating rates and body temperature variation in melanistic and zigzag *Vipera berus*: does colour make a difference? *Ann. Zool. Fenn.* 32, 365–374.
28. Gagliano, N., Moscheni, C., Torri, C., Donetti, E., Magnani, I., Costa, F., Nowicky, W., & Gioia, M. (2007). Ukrain modulates glial fibrillary acidic protein, but not connexin 43 expression, and induces apoptosis in human cultured glioblastoma cells. *Anti–cancer drugs*, 18(6), 669–676.
29. Gasc, J.-P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M., & Zuiderwijk A. (2004). Atlas of

Amphibians and Reptiles in Europe, Second edition. Societas Herpetologica Europaea and Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.

30. Gasso, V. Y. (2005). On the grass snake populations' state in the central steppe Dnieper region (Ukraine). Societas Europaea Herpetologica. 13th Ord. Gen. Meet.–Bonn: A. Koenig Zoological Research Museum, 51–52.
31. Гассо, В. Я. (2011). Характеристика популяцій звичайного вужа лісових біогеоценозів Присамар'я. Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. екологія, 19(2), 136–142.
32. Gicking, J. C., Foley, A. M., Harr, K. E., Raskin, R. E., & Jacobson, E. (2004). Plasma protein electrophoresis of the Atlantic loggerhead sea turtle, *Carretta carretta*. Journal of herpetological Medicine and Surgery, 14(3), 13-18.
33. Gomes, F. C. A., Paulin, D., & Moura Neto, V. (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. Brazilian journal of medical and biological research, 32(5), 619–631.
34. González, A., & Salido, G. M. (2009). Ethanol alters the physiology of neuron–glia communication. International review of neurobiology, 88, 167-198.
35. Gottdenker, N. L., & Jacobson, E. R. (1995). Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). American Journal of Veterinary Research, 56(1), 19–21.
36. Hutinec, B. J., & Mebert, K. (2011). Ecological partitioning between dice snakes (*Natrix tessellata*) and grass snakes (*Natrix natrix*) in southern Croatia. Mertensiella, 18, 225–233.
37. Ibrahim, A. A. (2012). New records of the dice snake, *Natrix tessellata*, in the Suez Canal zone and Sinai. Amphibian and Reptile Conservation, 6(2), 2–4.
38. Jacobson, E. R., Gaskin, J. M., Brown, M. B., Harris, R. K., Gardiner, C. H., LaPointe, J. L., Adams, H. P., & Reggiardo, C. (1991). Chronic upper

- respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *Journal of wildlife diseases*, 27(2), 296–316.
39. Jacque, C. M., Jørgensen, O. S., & Bock, E. (1974). Quantitative studies of the brain specific antigens S-100, GFA, 14-3-2, D1, D2, D3 and C1 in Quaking mouse. *FEBS letters*, 49(2), 264–266.
 40. Jacque, C. M., Vinner, C., Kujas, M., Raoul, M., Racadot, J., & Baumann, N. A. (1978). Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the neurological sciences*, 35(1), 147–155.
 41. Jandzík, D. (2004). Partial melanism in the grass snake *Natrix natrix* (Reptilia: Colubridae) from northeastern Slovakia. *Acta Zoologica Universitatis Comenianae*, 46(2), 75–77.
 42. Keller, J. M., Kucklick, J. R., Stamper, M. A., Harms, C. A., & McClellan-Green, P. D. (2004). Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1074–1079.
 43. Kirischuk, S., Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2012). Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? *Trends in neurosciences*, 35(8), 497–506.
 44. Kotenko, T. I., Shaitan, S. V., Starkov, V. G., & Zinenko, O. I. (2011). The northern range limit of the dice snake (*Natrix tessellata*) in Ukraine and the Don River basin in Russia. *Mertensiella*, 18, 311–325.
 45. Lawrence, K., & Hawkey, C. (1986). Seasonal variations in haematological data from Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*) in captivity. *Research in Veterinary Science*, 40(2), 225.
 46. López-Olvera, J. R., Montané, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J., & Lavín, S. (2003). Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 830–836.

47. Löwenborg, K., Shine, R., Kärvemo, S., & Hagman, M. (2010). Grass snakes exploit anthropogenic heat sources to overcome distributional limits imposed by oviparity. *Functional Ecology*, 24(5), 1095–1102.
48. Luiselli, L. (1992). Reproductive success in melanistic adders: a new hypothesis and some considerations on Andrén and Nilson's (1981) suggestions. *Oikos*, 601–604.
49. Luiselli, L., Filippi, E., & Capula, M. (2005). Geographic variation in diet composition of the grass snake (*Natrix natrix*) along the mainland and an island of Italy: the effects of habitat type and interference with potential competitors. *The Herpetological Journal*, 15(4), 221–230.
50. Малік М. Г. (2010). Використання гліального фібрилярного кислого білка мозку риб у діагностиці стану природного середовища. Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. екологія, 18(1), 92–97.
51. Maunoury, R., Delpech, A., Delpech, B., Vidard, M. N., & Vedrenne, C. (1976). Presence of neurospecific antigen NSA 1 in fetal human astrocytes in long-term culture. *Brain Research*, 112(2), 383–387.
52. Maxwell, G. D., Reid, K., Elefanty, A., Bartlett, P. F., & Murphy, M. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the development of adrenergic neurons in mouse neural crest cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13274–13279.
53. Metin, K., Türkozan, O., Kargin, F., Basumoglu, Y. K., Taskavak, E. R. T. A. N., & Koca, S. (2006). Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle *Emys orbicularis*. *Acta Veterinaria Brno*, 75(1), 49–55.
54. Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, 93(3), 421–443.
55. Nedergaard, M., & Verkhratsky, A. (2012). Artifact versus reality—how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia*, 60(7), 1013–1023.

56. Nedzvetsky, V. S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A. A., & Baydas, G. (2006). Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochemistry (Moscow)*, 71(3), 239–244.
57. Nekrasova, O. D., Gavris, G. G., & Kuybida, V. V. (2013). Changes in the northern border of the home range of the dice snake, *Natrix tessellata* (Reptilia, Colubridae), in the Dnipro basin (Ukraine). *Vestnik zoologii*, 47(5), 67–71.
58. Neumann, C., & Mebert, K. (2011). Migration behavior of endangered dice snakes (*Natrix tessellata*) at the River Nahe, Germany. *Mertensiella*, 18, 39–48.
59. Norenberg, M. D. (2005). The reactive astrocyte. The role of glia in neurotoxicity, 2, 73–93.
60. Notarachille, G., Arnesano, F., Calò, V., & Meleleo, D. (2014). Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1–42. Possible implications for Alzheimer's disease. *Biometals*, 27(2), 371–388.
61. O'Callaghan, J. P., & Sriram, K. (2005). Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert opinion on drug safety*, 4(3), 433–442.
62. Pagés, T., Peinado, V. I., & Viscor, G. (1992). Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comp Biochem Physiol A*, 103, 275–278.
63. Пахомов, О. Є., & Бригадиренко, В. В. (2005). Концепція системи заходів з охорони навколишнього природного середовища дніпропетровської області на 2005–2015 роки. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. екологія*, 13(1), 213-225
64. Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C. L., Kindblom, L. G., Liem, R., Hamberger, A., & Betsholtz, C. (1998). GFAP-Deficient Astrocytes Are Capable of Stellation in Vitro When Cocultured with Neurons and Exhibit a Reduced

- Amount of Intermediate Filaments and an Increased Cell Saturation Density. *Experimental cell research*, 239(2), 332–343.
65. Peterson C. C. (2002). Temporal, Population, and sexual variation in hematocrit of free–living desert tortoises: correlational tests of causal hypotheses. *Canadian Journal of Zoology*, 80, 461–470.
 66. Petzold, A. (2015). Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain research*, 1600, 17–31.
 67. Plötner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Akın, Ç., Bilgin, C. C., Haefeli, C., ... & Litvinchuk, S. N. (2010). Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. In *Evolution in action*. Springer, Berlin, Heidelberg.
 68. Rai, A., Maurya, S. K., Khare, P., Srivastava, A., & Bandyopadhyay, S. (2010). Characterization of developmental neurotoxicity of As, Cd, and Pb mixture: synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. *Toxicological sciences*, 118(2), 586–601.
 69. Rai, A., Maurya, S. K., Sharma, R., & Ali, S. (2013). Down–regulated GFAP α : a major player in heavy metal induced astrocyte damage. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(2), 99–107.
 70. Raphael, B. L., Klemens, M. W., Moehlman, P., Dierenfeld, E., & Karesh, W. B. (1994). Blood values in free–ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 63–67.
 71. Ruchin, A. B., & Ryzhov, M. K. (2002). On the diet of the marsh frog (*Rana ridibunda*) in the Sura and Moksha watershed, Mordovia. *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union*, 7, 197–205.
 72. Samour J. H., Howlett J. C., Silvanose C., Hasbun C. R., Al–Ghais S. M. (1998) Normal Haematology of Free–Living Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*). From the United Arab Emirates. *Comparative Haematology International*, 8, 102–107.

73. Schiff, L., Hadker, N., Weiser, S., & Rausch, C. (2012). A literature review of the feasibility of glial fibrillary acidic protein as a biomarker for stroke and traumatic brain injury. *Molecular diagnosis & therapy*, 16(2), 79–92.
74. Shine, R., Olsson, M. M., Moore, I. T., LeMaster, M. P., & Mason, R. T. (1999). Why do male snakes have longer tails than females?. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1434), 2147–2151.
75. Sukharenko, E. V., Novitsky, R. A., & Nedzvetsky, V. S. (2012). Використання біомаркерів мозку донних риб для оцінки забруднення Керченської протоки Чорного моря. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія, медицина*, 3(2), 81–88.
76. Tanaka, K. (2005). Thermal aspects of melanistic and striped morphs of the snake *Elaphe quadrivirgata*. *Zoological science*, 22(11), 1173–1179.
77. Thorpe, R. S. (1975). Biometric analysis of incipient speciation in the ringed snake, *Natrix natrix* (L.). *Experientia*, 31(2), 180–182.
78. Tosunoglu, M., Yilmaz, N., & Gul, C. (2011). Effects of varying ecological conditions on the blood parameters of freshwater turtles in Canakkale (Turkey). *Ekoloji*, 20(78), 7–12.
79. Tuniyev, B., Tuniyev, S., Kirschey, T., & Mebert, K. (2011). Notes on the dice snake, *Natrix tessellata*, from the Caucasian Isthmus. *Mertensiella*, 18, 343–356.
80. Tykhomyrov, A. A., Pavlova, A. S., & Nedzvetsky, V. S. (2016). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): on the 45th anniversary of its discovery. *Neurophysiology*, 48(1), 54–71.
81. Uyeda, C. T., Eng, L. F., & Bignami, A. (1972). Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Research*, 37(1), 81–89.
82. Verkhratsky, A., & Butt, A. (2013). *Glial physiology and pathophysiology*. John Wiley & Sons.

83. Verkhatsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., & Sofroniew, M. (2014). Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1291–1301.
84. Verkhatsky, A., Zorec, R., Rodriguez, J. J., & Parpura, V. (2016). Pathobiology of neurodegeneration: the role for astroglia. *Opera medica et physiologica*, 1, 1–32.
85. Vernodokis, A. (1988). Neuron–glia interrelations. In *International review of neurobiology*. Academic Press.
86. Wang T., Brauner C. J., Milsom W. K. (1999). The effect of isovolemic anaemia on blood O₂ affinity and red cell triphosphate concentrations in the painted turtle (*Chrysemys picta*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, (122) 341–345.
87. Wang, D. D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology*, 86(4), 342–367.
88. Werner, Y. L., & Shapira, T. (2011). A brief review of morphological variation in *Natrix tessellata* in Israel: between sides, among individuals, between sexes, and among regions. *Turkish Journal of Zoology*, 35(4), 451-466.
89. Zadavec, M., & Lauš, B. (2011). Melanism variations in *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) and *Zamenis longissimus* (L. aurenti, 1768) in Croatia. *Ныла: Herpetological bulletin*, 2011(2), 39–42.
90. Аль-Завахра Х. (1997). К систематике ужа обыкновенного. Чтения памяти Виктора Алексеевича Попова. Казань: Казанский ГУ, 20–24.
91. Бадалян, Л. О., Чехонин, В. П., & Бембеева, Р. Ц. (1997). Специфические белки нервной ткани в оценке проницаемости гематоэнцефалического барьера при коматозных состояниях у детей. *Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова*, 97(1), 41–46.
92. Бадтиев, Ю. С., & Кулемин, А. А. (2001). Методика биоиндикации окружающей природной среды. *Экологический вестник России*, (4), 27-29.

93. Бакиев, А. Г. (2004). Водяной уж *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768). In Змеи Волжско–Камского края. Самара: Изд-во Самарского научного центра РАН.
94. Бакиев, А. Г., & Кириллов, А. А. (2000). Питание и гельминтофауна совместно обитающих в Среднем Поволжье змей *Natrix natrix* и *N. tessellata* (Colubridae). Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2(2). 330–333.
95. Бакиев, А. Г., Маленев, А. Л., Зайцева, О. В., Шуршина, И. В., Розенберг, Г. С., & Поклонцева, А. А. (2009). Змеи Самарской области. Тольятти: ООО "Кассандра"
96. Банников, А. Г., Даревский, И. С., Ищенко, В. Г., Рустамов, А. К., Щербак, Н. Н. (1977). Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М., Изд-во «Просвещение».
97. Березин, В. А., & Белик, Я. В. (1990). Специфические белки нервной ткани. Киев: Наукова думка.
98. Березин, В. А., & Шевченко, Г. М. (1987). Нейроспецифические белки цитоскелета. Украинский биохимический журнал, 59(1), 222–232.
99. Бобылев, Ю. П. (1989). Кадастровая характеристика герпетофауны центрального степного Приднепровья. In Тез. докл. Всесоюзн. совещ. по проблеме кадастра и учета животного мира, 261.
100. Большаков, В. Н., Вершинин, В. Л., & Добринский, Л. Н. (2005). Амфибии и рептилии Среднего Урала. Учреждение Российской академии образования "Уральское отделение".
101. Ананьева Н. Б., Боркин Л. Я. Даревский И. С., Орлов Н. Л. (1998). Отряд бесхвостые – класс амфибии, или земноводные – Amphibia. Земноводные и пресмыкающиеся. Энциклопедия природы России. М, 19-174.
102. Булахов, В. Л., Гассо, В. Я., & Пахомов, О. Є. (2007). Біорізноманіття України, Дніпропетровська область. Земноводні та плазуни (Amphibia et Reptilia). Вид-во Дніпропетр. ун-ту, Дніпропетровськ.

103. Минеева, О. В., & Минеев, А. К. (2011). Нарушения лейкоцитарной формулы крови озёрной лягушки Саратовского водохранилища. Вестник Нижегородского университета им. НИ Лобачевского, (2-2), 94-97.
104. Вершинин, В. Л., & Большаков, В. Н. (2007). Амфибии и рептилии Среднего Урала. Издательство «Сократ».
105. Вершинин, В. Л., & Иванова, Н. Л. (2006). Специфика трофических связей вида–вселенца–*Rana ridibunda* Pallas, 1771 в зависимости от условий местообитаний. Поволжский экологический журнал, (2/3), 119-128.
106. Гаранин, В. И. (1983). Земноводные и пресмыкающиеся Волжско–Камского края. Наука.
107. Гассо, В. Я. (2005). Стан біорізноманіття фауни змій Присамар'я Дніпровського. Типологія лісів степової зони, їх біорізноманіття та охорона. Тези доп. міжнар. конф., 154–156.
108. Гассо, В. Я.; Клименко Е. Ю.; Недзвецкий В. С. (2010). Состояние цитоскелетных молекулярных компонентов мозга прыткой ящерицы как биомаркер нарушений, индуцированных промышленным загрязнением. Екологія та ноосферологія, 21(1–2), 98–104.
109. Герасименко, В. В. (2005). Возрастная динамика содержания общего белка и белковых фракций в сыворотке крови гусей. Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 4(8–1), 101-104.
110. Гордеев, Д. А. (2012). Особенности распространения, биологии, экологии и морфологии ужа обыкновенного *Natrix Natrix* (Linneaus, 1758) Волгоградской области. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 14(1–1), 150-153.
111. Даревский, И. С., Ананьева, Н. Б., & Боркин, Л. Я. (1998). Земноводные и пресмыкающиеся. Энциклопедия природы России. Справочник. М.: Изд–во «АВФ».

112. Десятков, В. Л. (1977). Линька у змей. Вопросы герпетологии.–Л.: Наука, 80–82.
113. Дробот, Г. П., & Ремизова, О. С. (2012). Использование гематологических показателей *Lacerta agilis* L. для оценки антропогенно нарушенных территорий. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 14(1–8).
114. Дуйсебаева, Т. Н., Березовиков, Н. Н., Брушко, З. К., Кубыкин, Р. А., & Хромов, В. А. (2005). Озерная лягушка (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) в Казахстане: изменение ареала в XX столетии и современное распространение вида. Современная герпетология, (3-4), 29-59.
115. Евланов, И. А., Кириллов, А. А., Бакиев, А. Г., & Маленев, А. Л. (1996). Каталог паразитических червей пресмыкающихся бассейна Волги. Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии, (2), 67–72.
116. Ермаков, О. А., Закс, М. М., & Титов, С. В. (2013). Диагностика и распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* sl в Пензенской области (по данным анализа гена COI мтДНК). Вестник российских университетов. Математика, 18(6–1).
117. Закс, М. М., Быстракова, Н. В., Ермаков, О. А., & Титов, С. В. (2013). Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) из Пензенской области. Современная герпетология: проблемы и пути их решения, 86-89.
118. Зарипова, Ф. Ф., Юмагулова, Г. Р., & Файзулин, А. И. (2009). Характеристика состояния популяции озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura, Amphibia) в Республике Башкортостан по полиморфизму рисунка окраски спины. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 11(1–1), 78–82.
119. Захаров, В. М., & Кларк, Д. М. (1993). Биотест: интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов. М.: Московское отделение международного фонда «Биотест».

120. Камышников, В. С. (2009). Справочник по клинико–биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. МЕДпресс-информ.
121. Кармишев, Ю. В. (2002). Плазуны півдня степової зони України (поширення, мінливість, систематика та особливості біології). Автореферат дисертації кандидата біологічних наук. Київ.
122. Кармышев, Ю. В., & Мануилова, О. Н. (2003). Морфологическая изменчивость ужа обыкновенного (*Natrix natrix*) на юге Украины.
123. Кидов, А. А., Матушкина, К. А., & Тимошина, А. Л. (2011). Новые данные по распространению земноводных и пресмыкающихся в Талышских горах и Ленкоранской низменности: некоторые итоги герпетологических экспедиций 2009–2011 гг. Праці Українського герпетологічного товариства. Київ, (3), 56-63.
124. Кириллов, А. А. (2011). Гельминтофауна пресмыкающихся самарской области. сообщение 2. водяной Уж *Natrix Tessellata* L.(Colubridae). Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии, 20(2), . 177-181.
125. Кириллов, А. А. (2012). Гельминтофауна пресмыкающихся Самарской области. Сообщение 1. Обыкновенный уж *natrix natrix* L.(Colubridae). Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии, 21(3), 136-142.
126. Коросов, А. В. (1995). Границы ареалов рептилий в Карелии и определяющие их факторы. Экосистемы Севера: структура, адаптация, устойчивость. М, 114–126.
127. Котенко, Т. И. (1977). Герпетофауна Черноморского заповедника и прилежащих территорий. Вестник зоологии, (2), 55–66.
128. Кузьмин, С. Л. (1999). Земноводные бывшего СССР. М.: Т–во науч. изд. КМК.
129. Литвинчук, С. Н., Боркин, Л. Я., Розанов, Ю. М., & Скоринов, Д. В. (2004). О криптических видах (на примере амфибий). Зоологический журнал, 83(8), 936–960.

130. Ляпков, С. М. (1989). Выедание зелеными лягушками головастиков и сеголеток бурых лягушек. Земноводные и пресмыкающиеся Московской области. М, 156–162.
131. Маркузе, В. К. (1964). Озерная лягушка (*Rana ridibunda* Pall.) и ее значение в нерестово–вырастных хозяйствах дельты Волги. Зоол. журн, 43(10), 1511–1516.
132. Масалыкин, А. И. (1993). Экология земноводных и пресмыкающихся Усманского бора. Труды Биологической учебно–научной базы Воронежского государственного университета, (3), 12–16.
133. Моднов, А. С. (2010). Особенности экологии обыкновенного ужа *natrix natrix* (Linnaeus, 1758) Цнинского лесного массива (Тамбовская область). Вестник российских университетов. Математика, 15(2), 660–164.
134. Невмержицкая, А. В., & Бахарев, В. А. (2016). Пряткая ящерица как биоиндикатор антропогенной нагрузки на биоценозы. Эколого-биологические аспекты состояния и развития Полесского региона: материалы VII Международной заочной научно-практической конференции «Современные экологические проблемы развития Полесского региона и сопредельных территорий: наука, образование, культура». Мозырь. Учреждение образования «Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина», 39-41.
135. Недзвецкий, В. С., Тихомиров, А. А., Кириченко, С. В., Корякина, Ж. А., & Липка, М. В. (2005). Возможности использования молекулярных компонентов с целью сохранения биологического разнообразия в условиях действия неблагоприятных факторов. Экологія та ноосферологія, 16(3–4), 215–221.
136. Недзвецкий В. С., Неруш П. О., Тихомиров А. О. та ін. (2001). Вплив іонізуючого випромінювання і хлориду алюмінію на білок проміжних філаментів глії головного мозку щурів. Нейрофізіологія, 33(1), 33–38.

137. Никулина, А. Ю., Ермаков, А. М., & Токарева, О. И. (2007). Клиническое значение исследования белков крови (общий белок, альбумины, СРБ). Ветеринария Кубани, (4), 28–29.
138. Новицкий, Р. А., Малик, М. Г., Недзвецкий, В. С., & Сухаренко, Е. В. (2009). Использование цитоскелетных молекулярных компонентов в качестве биомаркера состояния гидробионтов (на примере плотвы обыкновенной). Гидробиологический журнал. 45(5), 81–88.
139. Пестов, М. В., Маннапова, Е. И., Ушаков, В. А., Катунов, Д. П., Бакка, С. В., Лебединский, А. А., & Турутина, Л. В. (2001). Амфибии и рептилии Нижегородской области: Материалы к кадастру. Н. Новгород. Международный Социально–экологический союз, Экоцентр «Дронт.
140. Пикулик, М. М. (1985). Земноводные Белоруссии. Наука и техника.
141. Пикулик, М. М., Бахарев, В. А., & Косов, С. В. (1988). Пресмыкающиеся Белоруссии. Наука и техника.
142. Ройтбак, А. И. (1993). Глия и ее роль в нервной деятельности. Наука.
143. Рябов, С. А., Ананьева, Н. Б., & Даревский, И. С. (2004). Атлас пресмыкающихся Северной Евразии (таксономическое разнообразие, географическое распространение и природоохранный статус). Зоологический ин–т. Санкт–Петербург.
144. Сапоженков, Ю. Ф. (1961). Материалы к изучению амфибий и рептилий Белоруссии. Фауна и экология наземных позвоночных Белоруссии.– Минск: Кн. изд–во, 185–194.
145. Степаненко, А. А. (2013). Клинико–биохимические показатели обмена соединительной ткани в сыворотке крови различных видов рептилий. Ветеринарна медицина, (97), 477–478.
146. Сухаренко, Е. В., Недзвецкий, В. С., & Максимов, В. (2015). Возрастные изменения экспрессии глиального фибриллярного кислого белка в мозге крыс при хроническом воздействии кадмия. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 2 (30), 85–93.

147. Сухаренко, Е. В., Недзвецкий, В. С., & Новицкий, Р. А. (2011). Новые молекулярные биомаркеры состояния гидробионтов в условиях антропогенного загрязнения. Рибне господарство України, (6), 49
148. Сухаренко, Е. В., Прищепа, И. В., Недзвецкий, В. С., & Максимов, В. (2015). Влияние низких доз ионов Pb²⁺ на состояние цитоскелета астроцитов мозга крыс в раннем постнатальном периоде. Российский ветеринарный журнал, (2).
149. Табачишин, В. Г., Шляхтин, Г. В., Завьялов, Е. В., Сторожилова, Д. А., & Шепелев, И. А. (1996). Морфометрическая дифференциация и таксономический статус пресмыкающихся сем. *Colubridae* и *Viperidae*. In Фауна Саратовской области, 39–70.
150. Таращук С. В. (1987). Герпетофауна северно–западного Причерноморья и её изменения под действием антропогенных факторов: автореф. Дис. канд. биол. наук. Киев.
151. Терентьев, П. В. (1961). Герпетология: учение о земноводных и пресмыкающихся: допущено... качестве учеб. пособия для гос. университетов. Высшая школа.
152. Терентьев, П. В., & Чернов, С. А. (1949). Определитель пресмыкающихся и земноводных. Советская наука, Москва.
153. Тертышников, М. Ф. (2002). Пресмыкающиеся Центрального Предкавказья. Ставрополь: Ставропольсервисшкола.
154. Уэр, Д. (1993). Проблемы загрязнения окружающей среды и токсикологии. М.: Мир.
155. Файзулин, А. И. (2008). Сезонная динамика трофической ниши популяции озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura, Amphibia) в Среднем Поволжье. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 10(2), 452–455.
156. Файзулин, А. И. (2010). Анализ кислотности (pH) нерестовых водоемов как параметр экологической ниши бесхвостых земноводных (Anura,

- Amphibia) Среднего Поволжья. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 12(1–1), 125–128.
157. Фоминых, А. С. (2009). О северо–восточной границе ареала озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) на Среднем Урале. Современная герпетология, 9(1–2), 70–73.
158. Фоминых, А. С., Файзулин, А. И., Юмагулова, Г. Р., Зарипова, Ф. Ф., Яковлева, Т. И., Хабибуллин, В. Ф., & Салихова, Р. Д. (2010). Формирование и состояние ареала озерной лягушки *Rana ridibunda* на территории южного Урала (Республика Башкортостан). In Теоретические проблемы экологии и эволюции. Теория ареалов: виды, сообщества, экосистемы (V Любищевские чтения), 202–208.
159. Фултон, А., & Розенблат, В. А. (1987). Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки: Пер. с англ. Мир.
160. Хиггинс, Л. (2008). Расшифровка клинических лабораторных анализов. 3–е изд. Пер. с англ. под ред. ВЛ Эммануэля. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний.
161. Цыганенко, А. Я., Жуков, В. И., Мясоедов, В. В., & Завгородний, И. В. (2002). Клиническая биохимия. М.: Триада–Х, 71–145.
162. Чернышенко, С. В., Мисюра, А. Н., & Леонтьева, О. А. (1991). Использование статистических методов в задачах биоиндикации на примере популяций озерной лягушки. In Биоиндикация и биомониторинг, 224–229.
163. Шарпило, В. П. (1976). Паразитические черви пресмыкающихся фауны СССР: систематика, хорология, биология. Наукова думка.
164. Шарпило, В. П. (1983). Рептилии фауны ссср как промежуточные и резервуарные хозяева гельминтов. Паразитология, XVII. (3), 177–184.
165. Шималов, В. В. (2010). Гельминтофауна рептилий в Республике Беларусь. Паразитология, 44(1), 22–29.

166. Шляхтин, Г. В., Табачишин, В. Г., & Завьялов, Е. В. (2006). Водяной уж—
Natrix tessellata (Laurenti, 1768). In Красная книга Саратовской области,
369–370.
167. Шляхтин, Г. В., Табачишин, В. Г., Завьялов, Е. В., & Табачишина, И. Е.
(2005). Амфибии и рептилии: Учебное пособие. Животный мир
Саратовской области. Кн, 4.
168. Щербак, Н. Н. (1966). Земноводные и пресмыкающиеся Крыма:
Herpetologia Taurica. Наукова думка.
169. Щербак, Н. Н., & Щербань, М. И. (1980). Земноводные и
пресмыкающиеся Украинских Карпат. Наукова думка, Киев.
- Яровая, А. О., & Гассо, В. Я. (2003). К вопросу о состоянии фауны змей
Днепропетровской области. In Біологічні основи охорони природи та
раціонального використання тваринного світу. Матер. Всеукр. наук.–
практ. конф.–Д.: Наука і освіта, 27.

РОЗДІЛ 2

ФІЗИКО-ГЕОГРАФІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНУ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Географічна та геоморфологічна характеристика території

Степова зона в межах України сягає до 1000 км довжини, та до 500 км ширини. Географічно в степовій зоні розміщені Одеська, Миколаївська, Херсонська, Дніпропетровська, Запорізька, Донецька, Луганська, південна частина Кіровоградської та Харківської областей і північна частина Криму (рис. 2.1).



Рис 2.1. Степова зона в межах сучасної України

Степова зона України характеризуються не підвищеннями рельєфу, а заглибинами (ярами, байраками). У господарському відношенні, територія степової зони належить до основних: орні землі становлять до 85%, а в деяких районах, – понад 90% від усього земельного фонду. У степовій зоні України переважають зернові культури. Більш як 55 % території області займають вододільно-рівнинні типи місцевості зі звичайними

середньогумусними і малогумусними чорноземами (Бондарчук, 1949; Барановский, 2000).

До складу степової зони України, розташованої на території північно-степової та середньо-степової географічних підзон, входить степове Придніпров'я. Відповідно, головними промисловими та економічними районами степового Придніпров'я є, розташовані у басейні середньої та нижньої течії Дніпра, Дніпропетровська і Запорізька області (Пасічний, 1992). В межах даної зони Дніпро має розгалужену систему приток (Булахов, Пахомов, 2008). Степове Придніпров'я перебуває у межах Українського кристалічного щита, що складається з Придніпровської височини та Дніпровської западини і межує з Донецьким кряжем та Північноукраїнським басейном на півночі і Південноукраїнським та Причорноморським басейнами на півдні (Бельгард, 1950; Пасечный, 1988).

Рельєф степового Придніпров'я утворюють такі геоморфологічні області: Придніпровська та Причорноморська низовини, Придніпровська височина. Степова область Придніпровської низовини відрізняється значним розвитком долинно-заплавних, надзаплавно-терасових, піщано-борових і лісостепових типів місцевостей. Вони в цілому складають близько 22 % території області. Височини та западина об'єднані в мережу з балок і ярів, утворених дією епейрогенічних процесів, які тривають і досі (Соболев, 1939; Белова, Травлєев, 1999). Звичайні для Придніпровської височини ерозійні процеси відіграють важливу роль в утворенні яружно-балкової системи. Формування таких типів ландшафту зумовлене дією Риського льодовика (Клеопов, 1935; Соболев, 1948).

2.1.1. Фізико-географічна характеристика Дніпровського водосховища. На території Дніпропетровської та Запорізької адміністративних областей знаходиться Дніпровське (Запорізьке) водосховище, споруджене у результаті побудови греблі Дніпрогес на порожистій та середній частинах р. Дніпро у 1931 – 1934 рр. Знизу водосховище обмежене греблею Дніпрогесу у м. Запоріжжя, зверху –

греблею Дніпродзержинської ГЕС у м. Дніпродзержинськ (Жадин, Герд, 1961). Правий берег водосховища знаходиться у степовій зоні Придніпровської височини, в той самий час Лівобережжя водосховища знаходиться у степовій зоні Придніпровського пониззя (Попов и др., 1968). У районі водосховища серед головних геоморфологічних елементів виділяють тераси річних долин, водно-ерозійні форми рельєфу (балки, яри, водороздільні плато, зсуви) (Селегей, Селегей, 1978). Створення Запорізького водосховища призвело до корінного перетворення гідрологічного, гідрохімічного режиму водоймища, а також до зміни якості води (Федоненко и др., 2012).

Негативно на санітарний стан водосховища впливає зростання витрати води для потреб комунального господарства, промислового і сільськогосподарського виробництва. Оскільки на берегах розташовано багато населених пунктів, зокрема великі індустріальні центри – м. Дніпро, м. Запоріжжя, найбільше антропогенне навантаження зазнають верхня ділянка водосховища та впадаючі у неї ріки, внаслідок скидів неочищених або недостатньо очищених стічних вод (Дворецкий и др., 2000, 2001; Дворецкий, 2005).

2.2. Вплив екологічно-небезпечних об'єктів – промислових підприємств на навколишнє середовище району досліджень

Одними з найбільш індустріально розвинених регіонів України є Дніпропетровська область, на території якої розташовано більш як 500 промислових підприємств, і Запорізька область, основу промисловості якої складають металургійний та енергетичний комплекси. Концентрація промислових потужностей області перевищує середній рівень по Україні у 2 рази (Марушевський, 2014). Основними джерелами забруднення атмосферного повітря є стаціонарні джерела, тобто великі промислові підприємства, насамперед енергетичного та металургійного комплексів. Одним із найбільших забруднювачів довкілля на загальнодержавному рівні у Дніпропетровській області є ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат»

м. Кам'янське (рис. 2.2). Правобережну частину цього міста півколом оточують промислові підприємства, без санітарно-захисних зон, і при будь-якому напрямку вітру викиди промислових підприємств потрапляють у приземний шар атмосфери житлових масивів (Тимошенко, Ус, 2016).



Рис. 2.2. ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат»

Робота теплових електростанцій (ТЕС) пов'язана з використанням значної кількості ресурсів і утворенням великого об'єму небезпечних відходів, (Bose, 2010). В атмосферу, у результаті згорання палив, потрапляють: газоподібні продукти неповного згорання палива суспендовані тверді частинки, які містять важкі метали та радіонукліди, сірчистий і сірчаний ангідриди, оксиди азоту, тощо (Крижанівський, Кошлак, 2016). У свою чергу, багато токсикантів мають здатність накопичуватись у компонентах навколишнього середовища (Серебряков и др., 2008). Навколо ТЕС та відвалах золи накопичуються канцерогенні, сорбовані у дрібнодисперсних аерозолях, вуглеводні і важкі метали. (Каніло, Сарапіна, 2012). Серед усіх сконцентрованих підприємств різного профілю м. Дніпра надзвичайно велику частку шкідливих сполук у повітряний вносить Придніпровська ТЕС (рис. 2.3).

Діяльність Придніпровської ТЕС пов'язано скидами стічних вод, з викидами в атмосферу, експлуатацією золо- та шлаковідвалів. Характерною

особливістю цієї ТЕС є те, що джерелом водопостачання електростанції є річка Дніпро, яка одночасно слугує і приймачем теплообмінних зворотних вод (Bilyaev, Rusakova, 2016).



Рис. 2.3. Придніпровська ТЕС із прилеглою санітарно-захисною зоною

На території м. Запоріжжя розташовано десять великих підприємств металургійного комплексу, що належать до об'єктів підвищеного екологічного ризику, та вплив яких на навколишнє середовище підлягає особливому контролю. Одним з відомих у всьому світі металургійних комплексів є відкрите акціонерне товариство Запорізький металургійний комбінат «Запоріжсталь» (Нечаєва, 2011; Беренда та ін., 2013) (рис. 2.4).

Оскільки металургійний комбінат розташовано безпосередньо в житловій зоні міста, це, не зважаючи на систему газоочищення, приводить до постійної задимленості практично всіх районів. Захисна ізоляційна смуга Запорізького металургійного комбінату «Запоріжсталь» має ширину 65 м, що за даної щільності насаджень не забезпечує захисну функцію (Скляренко, Бессонова, 2015).



Рис. 2.4. Запорізький металургійний комбінат «Запоріжсталь»

Функціонування комбінату супроводжується викидами в атмосферу діоксидів вуглецю, діоксидів та інших сполук сірки, оксидів вуглецю, сполук азоту, зважених твердих частинок, метану і багато інших речовин (Волкова та ін., 2015).

2.3. Клімат та гідрологічні особливості

Степова зона виділяється найбільшими тепловими ресурсами й найменшою зволоженістю у порівнянні з іншими природними зонами країни, тому клімат степів найбільш континентальний з поміж інших екотопів України. Континентальність збільшується із південного заходу на північний схід. Це підтверджується збільшенням амплітуди добових і річних температур повітря (Прихотько, Бабиченко, 1967).

На процеси формування клімату Придніпров'я впливають повітряні маси, які надходять з Арктичного басейну або сформувалися над територіями Євразії та належить до басейну Атлантичного океану.

У цілому клімат характеризується відносно прохолодною зимою і жарким літом. Середньомісячна липнева температура повітря змінюється від 20,5 до 21,5°C. Максимальні температури повітря підіймаються до 38–39°C.

Середньомісячна температура січня змінюється від 5,5 до 6,5°C. Середньодобові температури січня дуже непостійні. Вони можуть коливатися від 8 ° вище нуля, до 28 ° нижче нуля. Абсолютний мінімум зафіксований – 38°C (Высоцкий, 1962; Маринич та ін., 1982)

Перехід середньодобових температур через +5° восени спостерігається 25–30 жовтня. Загальна тривалість вегетаційного періоду 200 – 210 днів. Тривалість періоду з середньодобовими температурами вище 10° складає 160–170 днів: весняний перехід середньодобових температур повітря через +10° спостерігається 20–25 квітня, осінній – 5– 10 жовтня. Початок літа доводиться на середину травня, кінець – на 10 – 15 вересня. Тривалість літнього періоду з температурою повітря вище 15° складає 120–125 днів. Річна сума температур вище 10° складає 2800 – 3000°.

Середньорічна кількість опадів 450 – 510 мм. Найбільші суми опадів 700 – 770 мм, найменші 250 – 300 мм. За теплий період (IV – X місяці) випадає 60–70% річної суми опадів. Максимум – в червні - липні. За період квітень – червень випадає опадів в середньому близько 200 мм. Поєднання недостатнього зволоження з високими температурами в літній період обумовлює сухість повітря, що збільшує дефіцит вологості та випаровуваності.

15 – 20 % опадів випадає у вигляді снігу. Стійкий сніжний покрив формується в третій декаді грудня і зберігається приблизно до березня. Число днів із сніжним покривом 80–85. Середня висота сніжного покриву за зиму складає 20 см.

Температура ґрунту в січні - лютні під сніжним покривом на глибині 20 см опускається до 1 – 2 ° нижче нуля (Булахов та ін., 2008).

Рівнинність території степу, відкритість її жарким тропічним і холодним арктичним вітрам є причиною ранніх весняно-осінніх приморозків і суховіїв, небезпечних пилових бур («чорні бурі»), що руйнують та зносять родючий шар ґрунту. Особливо часті суховії в липні — серпні, часто зумовлюють посухи.

У зв'язку з недостатністю атмосферних опадів густота річкової мережі незначна. Річки степів, особливо влітку, маловодні, у верхів'ях вони часто пересихають. Найбільші річки є транзитними: Дністер, Дніпро, Сіверський Донець, Південний Буг, Дунай із притоками. Притоки Дніпра — Самара, Інгулець, Оріль, а також Інгул, Кальміус, Молочна, Берда повністю формують свій стік у межах зони. Людська діяльність веде до деградації більшості річок, що впливає на біорізноманіття (Кочет та ін., 2011).

Заплавні озера – найбільш поширений тип озерних систем степового Придніпров'я. Умови різноманіття флори і фауни залежать від їх розташування: в долинах великих, середніх та малих річок. За останні роки рівень води в ході повені знизився, що може зумовити зникнення багатьох заплавних озер (Барановский и др., 2003).

Річкові та ґрунтові води високомінералізовані (Травлєєв, 1975; Травлєєв, 1981). Боліт мало, переважно заплавні. Важливу роль у підтриманні екологічного стану ґрунтів відіграє режим ґрунтових вод (Белова и др., 2006).

2.4. Ґрунти

Особливостями геоморфологічного профілю та біоценозу зумовлене різноманіття ґрунтів степової зони (Бельгард, 1971). До головних умов ґрунтоутворення степової зони України відносять недостатнє зволоження, теплий континентальний клімат, ґрунтотворні материнські породи, які найчастіше складені лесами та лесоподібними суглинками, гуматний тип обміну, насиченість поглинального комплексу (Белова, Травлєєв, 1999). Під зональною степовою рослинністю на плакорних ділянках привододільно-балкового, придолинно-балкового та привододільно-терасового ландшафтів формуються чорноземи звичайні, середньовилужені, малогумусні, середньосуглинисті ґрунти (Белова, Травлєєв, 1999).

В результаті особливої чутливості ґрунтовірних біокомпонентів до критичних для степової зони факторів зволоження та засолення, ґрунтовому

комплексу степу притаманні висока комплексність та мінливість. В межах порівняно невеликої хвилястої ділянки степу утворюються варіації та різноманітні сполучення ґрунту: солонцюваті, лучні, вилугувані, осолоділі, глеюваті зональні ґрунти (Бекаревич, 1966; Маринич та ін., 1985).

В умовах штучних лісових насаджень формуються лісополіпшені чорноземи, які відрізняються від зональних чорноземних ґрунтів кращими фізичними властивостями, більшим умістом гумусу, більш глибоким вимиванням карбонатів, більшою ємністю поглинання (Соловьев, 1967; Белова, Травлеев, 1999).

На основі лучних, лучночорноземних, болотних ґрунтів утворюються лучно-чорноземно-лісові, лучно-лісові, чорноземно-лучно-лісові ґрунти різних градацій гумусності, вилуженості, осолонцювання. (Травлеев, 1972; Лоза, 2000).

2.5. Рослинний і тваринний світ

2.5.1. Рослинний світ. Степове Придніпров'я розміщене в двох підзонах справжнього степу: все лівобережжя та більша частина правобережжя знаходяться у підзоні різнотравно-типчаково-ковилового степу, крайній південний захід правобережжя – у підзоні типчаково-ковилового степу. Понад 80 % степового Придніпров'я займають розорані землі сільськогосподарського призначення (Бельгард, Кириченко, 1938; Булахов та ін., 2002; 2002).

Флора Лівобережного степового Придніпров'я налічує 1601 видів, Правобережного Придніпров'я – 1714 вид (Мойсієнко, 2013). В результаті антропогенного впливу на природні фітоценози відбулися поява нових, не типових для цієї місцевості, видів та збіднення регіональної флори (Лисогор, 2016). Ділянки досліджень знаходяться у межах дерновинно-злакових багато різнотравних степів із переважанням вузьколистих щільнодернинних злаків (Лавренко, 1980). На території степу домінують багаторічні мікротермні ксерофільні дерновинні трав'янисті рослини. У покритті травстою степів

найбільш поширені такі види: келерія гребінчаста (*Koeleria cristata* (L.) Pers., ковила волосиста (*Stipa capillata* L.), костриця валіська (*Festuca valesiaca* Gaud.) тощо (Бельгард, 1950).

Ліси ростуть, на території степової зони, переважно у долинах річок, байраках, глибоких ярах, де в умовах малої кількості атмосферної вологи, шляхом стоку річок та прибалкових схилів формується відповідний мікроклімат (Шевчук, Приходько, 2002). За класифікацією О. Л. Бельгарда (1950) у північно-степовій підзоні України ліси поділяються на чотири групи: дубові (діброви); вербові (вербняки); соснові (бори); тополеві (осокірники). залежно від тривалості повеней, заплавні ліси поділяють на короткозаплавні (приурочені до заплів Самари, Орілі тощо) та тривалозаплавні (приурочені до заплави Дніпра) (Бельгард, 1950). Рослинність короткозаплавних лісів представлена переважно лісовими видами: копитняку європейського (*Asarum europaeum* L.), зірочника ланцетоподібного (*Stellaria holostea* L.), медунки темної (*Pulmonaria obscura* Dum.) тощо (Барановський та ін., 2015).

На солонцево-солончакових та заплавних терасах річок степового Придніпров'я локалізуються, сформовані в умовах значної мінералізації ґрунтового розчину, галофітні діброви. Чагарниковий ярус погано розвинений та може взагалі бути відсутнім і представлений з бузини червоної (*Sambucus racemosa* L.), жостера проносного (*Rhamnus cathartica* L.), клена татарського (*Acer tataricum* L.), бересклет європейський (*Euonymus europaea* L.), бруслини бородавчастої (*Euonymus verrucosa* Scop.), ліщини звичайної (*Corylus avellana* L.), тощо. Деревний ярус представлений дубом черешчатим (*Quercus robur* L.), берестою (*Ulmus minor* Mill), в'язом шорстким (*Ulmus glabra* Huds.), іноді до складу порід входить ясен звичайний (*Fraxinus excelsior* L.), груша звичайна (*Pyrus communis* L.). (Гамуля, 2001; Барановський та ін., 2015). Трав'яний покрив солонців і солончаків переважно складається з галофітів та галофітоїдів: полин сантонінський (*Artemisia santonica* L.), айстра солончакова (*Tripolium vulgare* Nees), солонець європейський (*Salicornia europaea* L.), кермек південнобузький (*Limonium*

hypanicum Klok.), содник солончаковий (*Suaeda salsa* Pall.), подорожник солончаковий (*Plantago salsa* Pall.), покiсниця розставлена (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.) тощо (Слинько, Бригадиренко, 2008).

В межах (арени) другої тераси утворюються степові бори, де зони псамофільного степу чергуються із березняками, сосняками, вільшаниками та суборами. У рослинному покриві борів домінують оліго- та мезотрони. Тра'яний покрив арени, де відсутній деревинний ярус (узлісся та галявини), предсталений рослинами піщаного степу: ковила пірчаста (*Stipa pennata* L.), волошка піщана (*Centaurea borysthenica* Grun.), ковила піщана (*Stipa pennata* subsp. *sabulosa* (Pacz.) Tzvelev), тонконіг сизий (*Koeleria glauca* (Spreng.) DC), типчак Беккера (*Festuca veckeri* Hack.) та ін. Серед чагарникових і деревних порід представлені: крушина ламка (*Frangula alnus* Mill.), осика звичайна (*Populus tremula* L.), верба попільняста (*Salix cinerea* L.), сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.), тощо (Бельгард, 1971; Тарасов, 2005; Барановський та ін., 2015).

Лісові рекультиваційні насадження, лісові смуги, тощо) складаються переважно з таких видів дерев: клена польового (*Acer campestre* L.), клена гостролистого (*Acer platanoides* L.), гледичії колючої (*Gleditsia triacanthos* L.), в'язу граболистого (*Ulmus carpinifolia* Rupp. ex G. Suckow), дуба звичайного (*Quercus robur* L.), клена ясенелистого (*Acer negundo* L.), липи європейської (*Tilia europaea* L.); робінії звичайної (*Robinia pseudoacacia* L.); ясена звичайного (*Fraxinus exelsior* L.) тощо. Зустрічаються наступні чагарники: бузиною чорно (*Sambucus nigra* L.), бруслиною європейською (*Euonymus europaea* L.), жовтою акацією (*Caragana arborescens* Lam.), та ін. (Бельгард, 1950, 1971; Белова, Травлєєв, 1999; Тарасов, 2005).

2.5.2. Тваринний світ. На території степоого Придніпров'я досить зустрічаються понад 12 000 безхребетних тварин (Апостолов, 1970). Комахи складають найчисленнішу групу, серед яких є види що приносять велику шкода сільському і лісовому господарству (Барсов и др., 1984; Барсов, Карнаухова, 1993). Тут перш за все необхідно вказати перелітну сарану

(*Locusta migratoria* L.), озиму совку (*Agrotis segetum* L.), луговий метелик (*Loxostege sticticalis* L.), і багато інших (Бельгард, 1971).

Понад 500 видів входять до складу безхребетних гідробіонтів. Серед бентофауни та зоопланктону домінують нематоди, інфузорії, коловертки, молюски, ракоподібні тощо (Яковенко, Федоненко, 2006; Зуб, 2010).

Іхтіофауна водойм степового Придніпров'я представлена одним видом круглоротих та приблизно 75 видів риб, які мешкають переважно у водосховищах та притоках р. Дніпро. Розповсюджені види – короп звичайний (*Cyprinus carpio* (L.)), лящ (*Abramis brama* (L.)), плоскирка (*Abramis bjoerkna* (L.)), карась срібний (*Carassius auratus* (L.)), плітка звичайна (*Rutilus rutilus* L.), окунь річковий (*Perca fluviatilis* L.), верховодка звичайна (*Alburnus alburnus* (L.)) Щука (*Esox lucius* (L.)), сом європейський (*Silurus glanis* L.), судак (*Stizostedion lucioperca* L.), бичок-пісочник (*Neogobius fluviatilis* Pallas) тощо (Новицкий; 2005; Новіцький, Христов, 2006). Створення каскаду водосховищ спричинило спрощення біорізноманіття іхтіофауни і поповнюється переважно за рахунок вселення видів фітофагів: карася срібного (*Carassius auratus* L.), товстолобика білого (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) тощо (Новицкий и др., 2005) та інвазій чужорідних видів: бичок-головань (*Neogobius kessleri* G.), сонячний окунь звичайний (*Lepomis gibbosus* L.), пуголовка гола (*Benthophilus nudus* Berg), тощо (Семенченко и др., 2013).

До ґрунтової фауни належать 150 видів ґрунтових безхребетних і найпростіших, які відносяться до 5 класів, 9 рядів, 32 родин, 86 родів (Булик, 1972; Пилипенко, Фатовенко, 1972; Жуков, Шаталін, 2016).

До представників герпетофауни належать: вуж звичайний (*Natrix natrix* L.), вуж водяний (*Natrix tessellata* L.), мідянка звичайна (*Coronella austriaca* Laur.), полоз сарматський (*Elaphe sauromates* Pallas); полоз жовточеревий (*Coluber jugularis* L.), степова гадюка (*Vipera renardi* Bon.), прудка ящірка (*Lacerta agilis* L.); зелена ящірка, ящірка живородна (*Zootoca vivipara* Jac.),

ящурка піщана (*Eremias arguta* Pallas), черепаха болотна (*Emys orbicularis* L.) (Булахов и др. 2007; Гассо, 2009).

Амфібії степового Придніпров'я представлені 9 видами: тритона звичайного (*Lissotriton vulgaris* L.), ропухи зеленої (*Bufo viridis* Laur.), ропухи сірої (*Bufo Bufo* L.), жаби озерної (*Pelophylax ridibundus* Pal.), жаби ставкової (*Pelophylax esculenta* L.), жаби гостромордої (*Rana arvalis* N.), землянки звичайної (*Pelobates fuscus* Laur.), кумки червоночервої (*Bombina bombina* L.), райки деревної (*Hyla arborea* B.), (Писанец, 2006; Писанец, 2007).

Орнітофауна степового Придніпров'я налічує понад 300 видів, серед яких переважають представники ряду Горобцеподібних (58,9–0,1% різноманіття місцевої орнітофауни): Горобець хатній (*Passer domesticus* L.) , сорока звичайна (*Pica pica* L.), Синиця велика (*Parus major* L.) тощо (Булахов, Губкин, 1996; Булахов и др., 2015). Менша частина налічує ще 22 ряди : ряд гусеподібні (огар (*Tadorna ferruginea*, P.), чирянка мала (*Anas crecca*, L.), гуска сіра (*Anser anser* L.), ряд соколоподібних, (шулі ка чорний (*Milvus migrans* B.), болотний лунь (*Circus aeruginosus* L.), малий яструб (*Accipiter nisus* L.), зимняк (*Buteo lagopus* P.)), ряд куроподібні (перепілка (*Coturnix coturnix* L.), фазан (*Phasianus colchicus* L.) тощо (Вернер, Бредбір, 2007; Булахов та ін., 2008).

У степовому Придніпров'ї мешкають приблизно 60 видів ссавці, серед них: сліпак звичайний (*Spalax microphthalmus* Guld.), сліпачок степовий (*Ellobius talpinus* Pall.), миша хатня (*Mus musculus* L.), миша польова (*Apodemus agrarius* Pall.), нориця звичайна (*Microtus arvalis* Pall.), заєць сірий (*Lepus europaeus* Pall.), лилик пізній (*Eptesicus serotinus* Schreb.), кріт європейський (*Talpa europeae* L.), їжак звичайний (*Erinaceus europaeus* L.), вовк (*Canis lupus* L.), лис звичайний (*Vulpes vulpes* L.), борсук європейський (*Meles meles* L.), куна кам'яна (*Martes foina* Erx.), кабан (*Sus scrofa* L.), тхір степовий (*Mustela eversmanni* Less.), вивірка звичайна (*Sciurus vulgaris* L.),

козуля європейська (*Capreolus capreolus* L.) тощо (Булахов, Пахомов, 2008; Булахов та ін., 2009).

Перелік посилань

1. Bilyaev, N. N., & Rusakova, T. I. (2016). Дослідження техногенного впливу на довкілля газових викидів Придніпровської ТЕС. Вісник Дніпровського університету. Серія: Механіка, 24(5), 53–60.
2. Bose, V. K. (2010). Global warming: Energy, environmental pollution, and the impact of power electronics. *IEEE Industrial Electronics Magazine*, 4(1), 6–17.
3. Апостолов Л. Г. (1970). Вредная энтомофауна в лесных биогеоценозах юго-восточной Украины: автореф. дисс. на соискание уч. степени д-ра биол. наук, Харків.
4. Барановский, Б. А. (2000). Растительность руслового равнинного водохранилища. Д.: Вид-во ДНУ, 17–29.
5. Барановський, Б. О., Масюк, О. М., Орищенко, Д. В. (2015). Характеристика флори лісів Приорілля, як складової частини лісової рослинності Північного Степу. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції, Дніпропетровськ, 7–8.
6. Барсов, В. А. Пилипенко, А. Ф., & Шимкина, М. А. (1984). Структура почвенной энтомофауны лесных биогеоценозов степного Присамарья и её связь с наземными энтомокомплексами. Проблемы почвенной зоологии: III Всесоюз. совещ.: тез. докл., 31–32.
7. Барсов, В. А., & Карнаухова, Н. В. (1993). Оценка характеристик наземной энтомофауны для индикации загрязнения степных экосистем. Вестник Днепропетровского университета. Серія: Биология и экология, 1, 50.
8. Бекаревич, Е. Н. (1966). Почвы Днепропетровской области. Почвы Днепропетровской области и пути их рационального использования.—Д.: Промінь, 12–31.

9. Белова, Н. А., & Травлеев, А. П. (1999). Естественные леса и степные почвы (экология, микроморфология, генезис). ДГУ. Днепропетровск.
10. Белова, Н. А., Балалаев, А. К., & Яковенко, В. Н. (2006). Особенности генезиса порового пространства почв лесных биогеоценозов в условиях Степного Приднепровья. *Грунтознавство*, 7, (1–2), 69–79.
11. Бельгард, А. Л. (1950). Лесная растительность юго–востока УССР. Издво КГУ, Киев.
12. Бельгард, А. Л. (1971). Степное лесоведение. Лесная пром–сть, Москва.
13. Бельгард, О. Л., & Кириченко, Т. Ф. (1938). До типології заплавних лісів Середнього Дніпра. Збірник робіт біологічного факультету Дніпропетровського університету, 129–141.
14. Беренда, Н. В., Василенко, Т. Г., & Дришлюк, Т. В. (2013). Проблеми забруднення атмосфери м. Запоріжжя викидами металургійних підприємств. *Металургія*, (1), 149–156.
15. Бондарчук, В. Г. (1949). Геоморфологія УРСР (геологічний розвиток рельєфу УРСР). К.: Радянська школа.
16. Булахов, В. Л., & Губкин, А. А. (1996). Современное состояние орнитофауны Днепропетровщины. *Праці Укр. орнітол. товариства*, 1(1), 3–18.
17. Булахов, В. Л., & Пахомов, О. Є. (2006). Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Ссавці (Mammalia). Дніпропетровськ: Вид–во Дніпропетр. ун–ту.
18. Булахов, В. Л., & Пахомов, О. Є. (2008) Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Ссавці (Mammalia). Вид–во Дніпропетр. унту, Дніпропетровськ.
19. Булахов, В. Л., Гассо, В. Я, & Пахомов, О. Є. (2007) Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Земноводні та плазуни (Amphibia et Reptilia). Вид–во Дніпропетр. ун–ту, Дніпропетровськ.
20. Булахов, В. Л., Губкін, А. А., Пономаренко, О. Л., & Пахомов, О. Є. (2008). Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область.

- Птахи: Негоробцеподібні (Aves: Non-Passeriformes) Вид-во Дніпропетр. ун-ту, Дніпропетровськ.
21. Булахов, В. Л., Губкін, А. А., Пономаренко, О. Л., & Пахомов, О. Є. (2015). Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Птахи: Горобцеподібні (Aves: Passeriformes). Вид-во Дніпропетр. ун-ту, Дніпропетровськ.
 22. Булахов, В. Л., Пахомов, О. Є., & Рева, О. А. (2009). Зміни різноманіття ссавців у ХХ сторіччі в умовах промислового степового Придніпров'я. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали ІХ Міжнародної наукової конференції, 319–320.
 23. Булахов, В. Л., Рева, О. А., & Пахомов, О. Є. (2002). Классификация уровней трансформации современного состояния окружающей природной среды в промышленном степном Приднепровье. Екологічні проблеми довкілля та шляхи їх вирішення: ІХ Карашинські читання. Матер. Міжнар. наук.-практ. конф., 41–43.
 24. Булахов, В. Л., Рева, О. А., & Пахомов, О. Є. (2002). Стан біорізноманіття ссавців у природних та антропогенних екосистемах промислового степового Придніпров'я. Екологічні проблеми довкілля та шляхи їх вирішення: дев'яті Карашинські читання. Матер. Міжнар. наук.-практ. конф., 115–116.
 25. Булик, И. К. (1972). Биоэкологическая характеристика почвенных простейших биогеоценозов Присамарья. Вопросы степного лесоведения, 3, 101–107.
 26. Вернер, В. В., & Бредбір, П. (2007). Характеристика фауни денних хижих птахів Дніпропетровської області. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія, 15(1), 15–20.
 27. Волкова, Ю. В., Федорченко, Р. А., Волкова, Ю. В., & Федорченко, Р. А. (2015). Анализ загрязнения атмосферного воздуха г. Запорожье в 2014 году.
 28. Высоцкий, Г. Н. (1962). Избранные труды. Сельхозгиз, Москва.

29. Гамуля, Ю. Г. (2001). Біогеоценологічна характеристика галофітних дібров степового Придніпров'я, їх охорона, поновлення і раціональне використання. Автореферт, ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16.«Екологія».
30. Гассо, В. Я. (2009). Біогеоценологічні особливості розподілу плазунів в умовах степових лісів Присамар'я Дніпровського. Екологія та ноосферологія, 20(3–4), 102–109.
31. Дворецкий, А. И., Рябов, Ф. П., Емец, Г. П., Галинский, В. Л., & Загубиженко, Н. И. (2000). Запорожское водохранилище. Днепропетровск: Днепропетр. нац. ун–т.
32. Дворецкий, А. И. (2005). Сучасний гідроекологічний стан екосистеми Дніпровського водосховища. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун–ту. Сер. Біол. Спец. вип. Гідроекологія, (3), 26.
33. Дворецкий, А. И., Цегельник, Л. И., Мурзина, Е. А., & Белоконь, А. С. (2001). Современное гидроэкологическое состояние Днепровского водохранилища при влиянии антропогенных факторов. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун–ту. Сер. Біол. Спец. вип. Гідроекологія, (3), 14.
34. Жадин, В. И., & Герд, С. В. (1961). Реки, озера и водохранилища СССР, их фауна и флора. Гос. учебно–педагог. изд–во.
35. Жуков, О. В., & Шаталін, Д. Б. (2016). Еколого–морфологічні особливості дощових черв'яків степового Придніпров'я. Вісник Дніпропетровського державного аграрно–економічного університету, 4(13), 14–22.
36. Зуб, Л. М. (2010). Споруди берегоукріплення дніпровських водоймищ як резервати біотичного різноманіття гідробіонтів. Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія, 18, 238–242.
37. Канило, П. М., & Сарапина, М. В. (2012). Анализ энергоэкологических показателей тепловых электростанций. Проблемы машиностроения, 15(3–4), 100–106.

38. Клеопов, Ю. Д. (1935). Про геоморфологічні мотиви розвитку рослинного вкриття. Журн. ін-ту ботаніки АН України, 13–74.
39. Кочет, В. М., Христов, О. А., Марченкова, Ю. А., & Бондарев, Д. Л. (2011). Ретроспективний огляд формування іхтіокомплексу р. Оріль. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія.–Вип, 19, 76–85.
40. Крижанівський, Є. І., & Кошлак, Г. В. (2016). Екологічні проблеми енергетики. Нафтогазова енергетика, 25(1), 80–90.
41. Лавренко, Е. М. (1980). Степи. Растительность европейской части СССР. Наука, Ленинград.
42. Лисогор, Л. П. (2016). Аналіз адвентивної фракції перелогів Правобережного степового Придніпров'я. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія, (1), 29–32.
43. Лоза, І. М. (2000). Еколого–біологічна характеристика осиковоберезових кілків Придніпров'я, їх охорона та раціональне використання: Автореф. дис... канд. біол. наук. ДДУ, Дніпропетровськ.
44. Маринич, А. М., Пащенко, В. М., & Шищенко, П. Г. (1985). Природа Украинской ССР. Ландшафты и физико–географическое районирование. Наук. думка, Киев.
45. Маринич, О. М. Ланько, А. І., Щербань, М. І., Шищенко, П. Г. (1982). Фізична географія Української РСРК. Вища школа, Київ.
46. Марушевський, Г. (2014). Стратегічна екологічна оцінка стратегії регіонального розвитку (на прикладі Дніпропетровської області). Державне управління та місцеве самоврядування, (4), 51–61.
47. Мойсієнко, І. І. (2013). Флористичне багатство та систематична структура флори Північного Причорномор'я. Чорноморський ботанічний журнал, 9(1), 41–56.

48. Нечаєва, І. А. (2011). Вплив металургійної галузі на сталий розвиток промислового регіону. Вісник Запорізької державної інженерної академії, 111-117.
49. Новицкий, Р. А., Христов, О. А., Кочет, В. Н., & Бондарев, Д. Л. (2005). Аннотированный список рыб днепровского (Запорожского) водохранилища и его притоков. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія, 13(1), 185–201.
50. Новіцький, Р. О., & Христов, О. О. (2006). Сучасний стан раціонального використання водних живих ресурсів у водоймищах степового Придніпров'я. Сучасні проблеми геоекології та раціонального природокористування лівобережної України: матер. Всеукр. наук.–практ. конф. СумДПУ, Суми, 236–241.
51. Пасечный, Г. В. (1988). Физическая география Днепропетровской области. Изд-во ДГУ, Дніпропетровськ.
52. Пасічний, Г. В. (1992). Фізична та економічна географія Дніпропетровської області. Изд-во ДГУ, Дніпропетровськ.
53. Пилипенко, А. Ф. Фатовенко, М. А. (1972). Фауна почв лесных биогеоценозов Присамарья. Вопросы степного лесоведения, 3, 75–78
54. Писанец, Е. М. (2006). Фауна амфибий Украины: вопросы разнообразия и таксономии. Сообщение 2. Бесхвостые амфибии (Anura), Збірник працьзоологічного музею, 38(1), 44–79.
55. Писанец, Е. М. (2007). Амфибии Украины. Зоологический музей ННПМ НАН Украины, Киев.
56. Попов, В. П., Маринич, А. М., & Ланько, А. И. (Eds.). (1968). Физико–географическое районирование Украинской ССР. Изд-во Киевского гос. ун-та.
57. Прихотько, Г. Ф., & Бабиченко, В. Н. (Ред.). (1967). Климат Украины. Л.: Гидрометеиздат.
58. Селегей, В. В., & Селегей, Т. С. (1978). Гидрометеорологический режим озер и водохранилищ СССР. Телецкое озеро. Л.: Гидрометеиздат.

59. Семенченко, В. П., Сон, М. О., Новицкий, Р. А., Квач, Ю. В., & Панов, В. Е. (2013). Чужеродные макробеспозвоночные и рыбы в бассейне реки Днепр. *Российский журнал биологических инвазий*, 7(4), 76–96.
60. Серебряков, П. В., Рушкевич, О. П., Луценко, Л. А., Антошина, Л. И., & Карташев, О. И. (2008). Профессиональный канцерогенный риск на горнорудных и металлургических предприятиях Заполярья. *Уральский медицинский журнал*, 11, 67–71.
61. Скляренко, А. В., & Бессонова, В. П. (2015). Видовий склад та стан зелених насаджень санітарно–захисної зони Запорізького металургійного комбінату "Запоріжсталь". 86–104.
62. Слинько, В. О., & Бригадиренко, В. В. (2008). Екоморфічна структура карабідофауни навколоводних амфіценозів Дніпропетровської області. *Екологія та ноосферологія*, 19(3–4), 72–79.
63. Соболев, С. С. (1939). Геоморфологические четвертичные залежи и грунтовые воды р. Самары Днепровской. ВУАН, Киев.
64. Соболев, С. С. (1948). Развитие эрозионных процессов на территории Европейской части СССР и борьба с ними. Изд–во АН СССР, Москва.
65. Соловьев, П. Е. (1967). Влияние лесных насаждений на почвообразовательный процесс и плодородие степных почв. Изд–во МГУ, Москва.
66. Тарасов, В. В. (2005). Флора Дніпропетровської та Запорізької областей. Судинні рослини. Біолого–екологічна характеристика видів. ДНУ, Дніпропетровськ.
67. Тимошенко, Л. В., & Ус, О. М. (2016). Еколого–економічні аспекти оцінювання та прогнозування забруднення атмосферного повітря у промисловому місті; Environmental and economic aspects of evaluation and prediction of air pollution in industrial city. *Науковий журнал Економічний вісник Національного гірничого університету; Научный журнал Экономический вестник Национального горного университета; Scientific journal Economic Bulletin of the National Mining University*. 156–168.

68. Травлеев, А. П. (1972). Материалы к номенклатуре и классификации лесных почв подзоны настоящих степей. Вопросы степного лесоведения, (3), 16–22.
69. Травлеев, Л. П. (1981). Водно–физические свойства и водный режим почвогрунтов пристенных лесных биогеоценозов Присамарья. Биогеоценологические особенности лесов Присамарья и их охрана, (12), 82–103.
70. Травлєєв, Л. П. (1975). До питання характеристики гігротопів за допомогою локальних коефіцієнтів зволоження. Біогеоценологічні дослідження на Україні, 38–41.
71. Федоненко, О. В., Єсіпова, Н. Б., Шарамок, Т. С., Ананьєва, Т. В., Яковенко, В. О., & Жежеря, В. А. (2012). Сучасні проблеми гідробіології: Запорізьке водосховище: довідник.
72. Шевчук, О. М., & Приходько, С. А. (2002). Збереження біорізноманітності байрачних дібров у Степовій Україні. Основи збереження біотичної різноманітності, (4), 122–126.
73. Яковенко, В. О., & Федоненко, О. В. (2006). Динаміка біопродукції зоопланктону Запорізького (Дніпровського) водосховища в умовах антропогенного впливу. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія, 14(1), 218–221.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Загальна експериментальна модель

Досліджували озерних жаб *Pelophylax ridibundus* та два види вужів: *Natrix tessellata* та *N. natrix*. Всього досліджено озерних жаб – 98, водяних вужів – 73, звичайних вужів – 36. Для біохімічних досліджень використано озерних жаб – 14, водяних вужів – 32, звичайних вужів – 24.

Вивчали популяції озерної жаби, які займають екосистеми, що межують з біотопами природного заповідника «Дніпровсько-Орільський» (48.5230°N, 34.8253°E), антропогенно трансформовані екосистеми Монастирського острова (зона рекреації, м. Дніпро) (48.4667°N, 35.0767°E) та екосистеми, які знаходяться під впливом викидів ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат» (м. Кам'янське) (48.5304°N, 34.6655°E) (рис. 3.1).

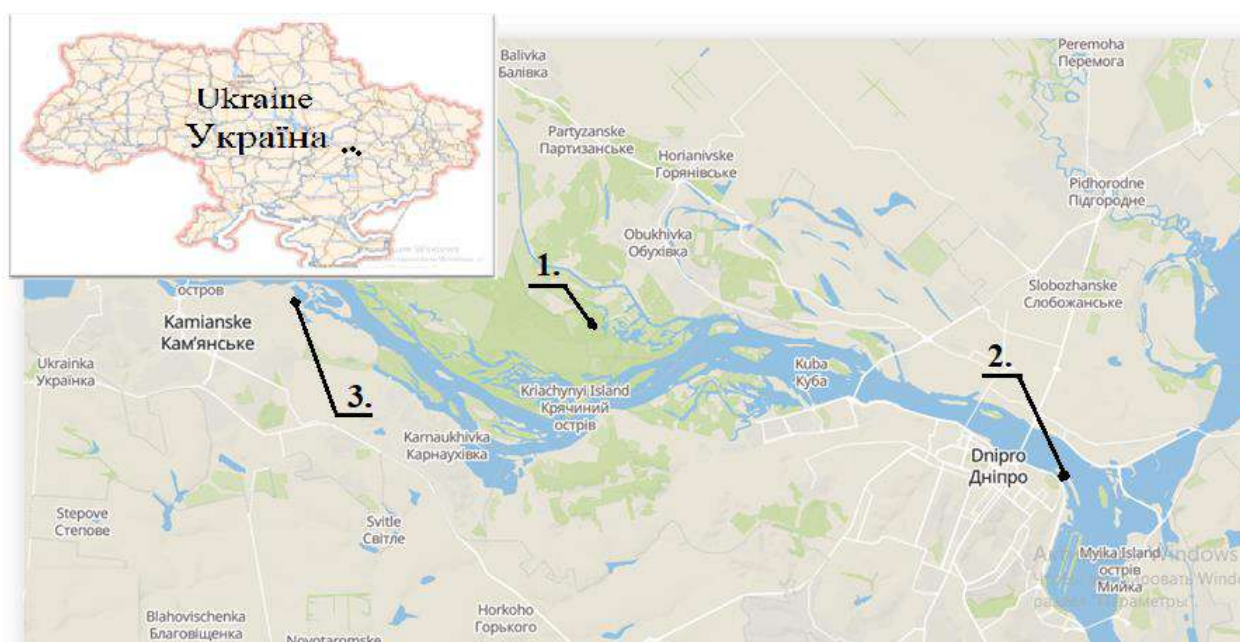


Рис. 3.1. Райони досліджень популяцій *Pelophylax ridibundus*: 1 – природний заповідник «Дніпровсько-Орільський»; 2 – зона рекреації (Монастирський острів, м. Дніпро); 3 – зона забруднення (місця скидів ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат» (р. Дніпро, м. Кам'янське).

Популяції водяного вужа досліджували в антропогенно трансформованих екосистемах, які знаходяться під впливом викидів

металургійного комбінату «Запоріжсталь» (47.877620°N, 35.119959°E), в санітарній захисній зоні (СЗЗ) Придніпровської ТЕС (48.400716°N, 35.113721°E); та в природних екосистемах, що межують з територією Національного природного парку «Великий Луг» (47.4476°N, 35.1338°E), природних екосистемах Майорової балки (48.2627°N, 35.1690°E) та біотопах, що межують з територією Тилігульського регіонального ландшафтного парку (Миколаївська область) (46.8990°N, 31.0962°E) (рис. 3.2).

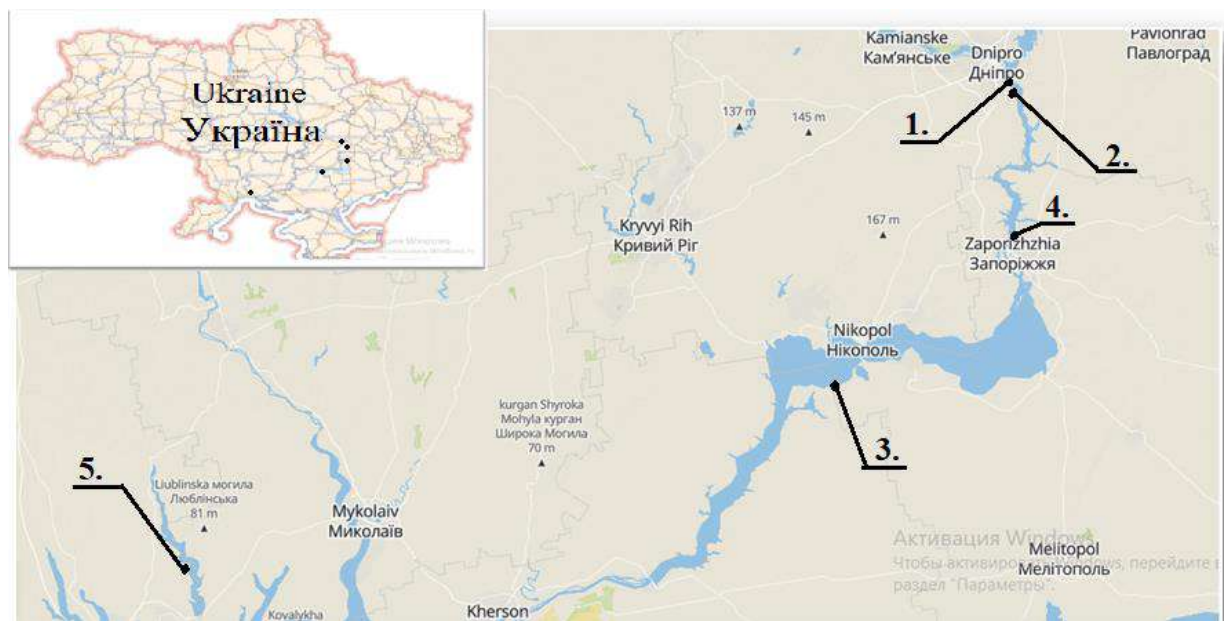


Рис. 3.2. Райони досліджень популяції *N. tessellata*: 1 – зона забруднення (санітарно-захисна зона (СЗЗ) Придніпровської ТЕС, р. Дніпро); 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область); 3 – природні екосистеми р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг»); 4 – зона забруднення (місця скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь», р. Дніпро); 5 – Тилігульський лиман (Миколаївська область).

Особини звичайного вужа виловлені на територіях, що межують з заплавами екосистемами правого берега р. Дніпро, представлених системою озер і островів (найбільший із них – о-в Болгарський), що прилягають до вулиці Набережна Заводська (48.487942°N 34.901590°E). Ці екосистеми перебувають під впливом розташованих вище за течією промислових підприємств м. Дніпро та м. Кам'янське. Як контроль обрано біотопи природних лісових екосистем Присамарського міжнародного біосферного

стаціонару ім. О. Л. Бельгарда (ПМБС ім. О. Л. Бельгарда) (48.7648°N, 35.4336°E) (рис. 3.3).

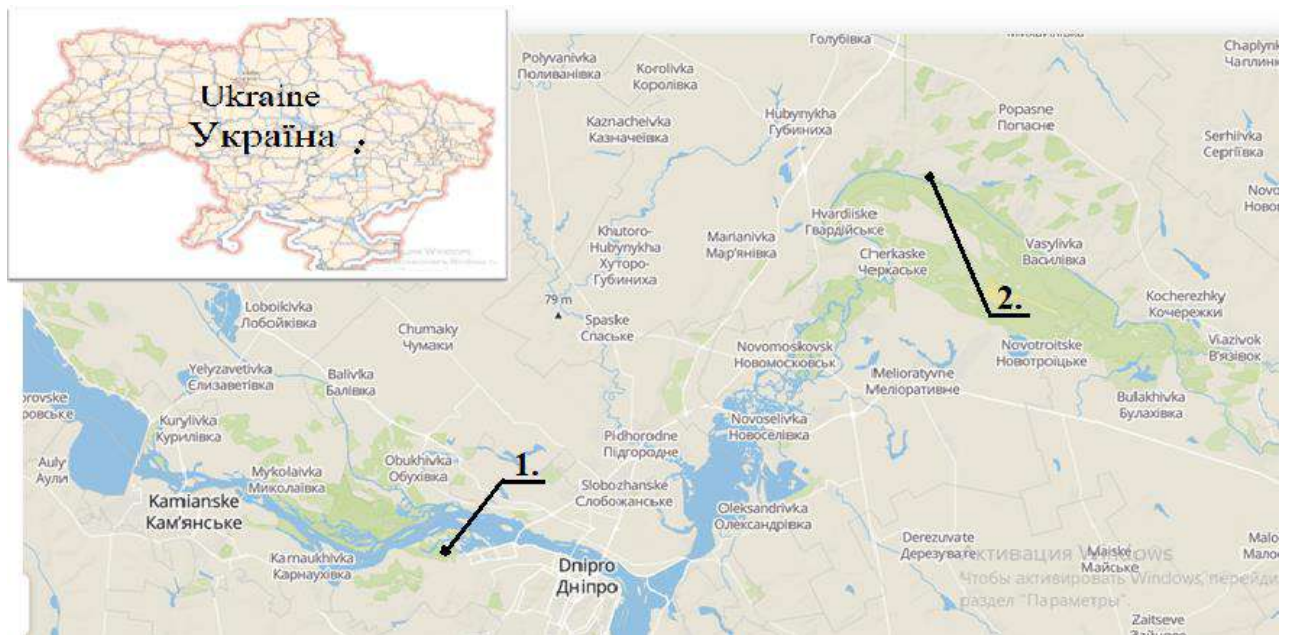


Рис. 3.3. Райони досліджень популяцій *N. Natrix*: 1 – антропогенно трансформовані екосистеми (м. Дніпро, р. Дніпро); 2 – Самарський ліс (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар (ПМБС) ім. О. Л. Бельгарда).

Тварини були відібрані відповідно до загальноприйнятих методів збору впродовж 2012–2016 рр. Для отримання біологічного матеріалу використовували метод, прийнятий для роботи з дрібними тваринами – декапітація (Булахов, та ін., 2007; Tykhomyrov, et al., 2008; Гассо, и др., 2010).

Після декапітації виймали головний мозок та проводили відбір крові. Отримані проби крові центрифугували для відділення клітин крові від плазми. Зразки по 0,1 г тканини мозку гомогенізували в 2,5 мл 0,025 М трис-буферу (рН 8,0), до якого додавали 2 мМ ЕДТА, 1 мМ 2-меркаптоетанолу, 0,1 мМ PMSF і 10 мкг/мл соєвого інгібітора трипсину. Гомогенат центрифугували при 30 000 g протягом 60 хв. Супернатант S1 містив розчинну форму білка гліальних філаментів. Осад ресуспендували в 1,0 мл 4,0 М розчину сечовини на тій же буферній системі. Супернатант S2, який

отримували після другого центрифугування, містив у собі нерозчинну (філаментну) форму ГФКБ. Кількість розчинної та філаментної форм ГФКБ визначали за допомогою імуноблотингу. Вміст загального білка в екстрактах визначали за допомогою методу Лоурі в модифікації Міллера та за методом Бредфорда. Для визначення поліпептидного складу проміжних філаментів глії використовували метод імуноблотингу із застосуванням моноспецифічної антисироватки (Виноградова и др., 1983; Недзвецкий , 1990; Новицкий и др., 2009).

3.2. Електрофорез у градієнтному поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію

Диск-електрофорез запропонований Л. Ортштейном і Б. Девісом у 1964 р. За допомогою цього методу макромолекули розподіляються по їх загальному електричному заряду, за молекулярною масою та за формою.

Під дією електричного поля білкові зони мігрують у гель із розмірами пор, які зменшуються до деякого кінцевого положення, що зумовлене опором середовища. Таким чином, відстань пройдена зоною білка, пов'язана з молекулярною масою, яку можна визначити шляхом порівняння з поведінкою білків-маркерів. Використання двошарового носія з різним розміром пор і пари буферів, що відрізняються між собою за складом і за значенням рН, забезпечує концентрування досліджуваних речовин у вузькій стартовій зоні. Це і є істотним для чіткого розподілу компонентів суміші. Крім того, відпадає необхідність у попередньому концентруванні розведених зразків (Виноградова и др., 1983).

Електрофорез проводили на пластині РААГ (мм) завтовшки 1 мм відповідно з методикою, описаною Leamli (1970), із модифікаціями. Поліакриламідний гель володіє багатьма якостями ідеального носія. Маючи властивості молекулярного сита, він забезпечує електрофоретичний поділ білкових сумішей не тільки по заряду, але і за розміром і формою частинок. При електрофорезі в РААГ великі молекули, розміри яких порівнянні з діаметром пір гелю, рухаються повільніше, а дрібні молекули вільно і

швидко проходять через пори гелю (Сова, Кусайкин, 2006; Стручкова, Кальясова, 2012). З метою підвищення дозволяючої здатності електрофорезу, використовували розділювальний гель з лінійним градієнтом акриламідів $T = 7 - 18 \%$ і перехресною зшивкою $C = 2 \%$. Гелі з градієнтного змішувача подавалися в зазор між двома скляними пластинами за допомогою перистальтичного насоса (Laemmli, 1970).

Склад розподіляючого гелю: $T = 7-18 \%$ і $C = 0,8-2,5 \%$; $0,375 \text{ M}$ трис – *HCl* буфер, $\text{pH} = 8,8$; $0,1 \%$ SDS; $0,025 \%$ TEMED; $0,025 \%$ персульфат амонію; $0,025 \%$ рибофлавін. В 18% гель додавали гліцерин до кінцевої концентрації 5% для запобігання нерівномірного набрякання гелю при фарбуванні і знебарвленні.

Після заливання розділювального гелю зверху на нього обережно нашарували воду, щоб верхній шар гелю не підсохнув. Через $20 - 30 \text{ хв.}$ з моменту полімеризації розподіляючого гелю заливали концентруючий гель так, щоб відстань між нижньою межею концентруючого гелю і дном «кишені» для нанесення зразка складало не більше 15 мм.

Склад концентруючого гелю: $T = 4,5 \%$, $C = 6 \%$; 125 mM трис – *HCl* буфер, $\text{pH} = 6,8$; $0,1 \%$ SDS; $0,025 \%$ TEMED; $0,025 \%$ персульфат амонію; $0,025 \%$ рибофлавін.

Після полімеризації концентруючого гелю в лунки вносили проби, що містять $62,5 \text{ mM}$ трис – *HCl* буфер, $\text{pH} = 6,8$; 2% SDS; 2% дитіотриетол; 1% - меркаптоетанол; 10% гліцерин; $0,001\%$ бромфеноловий синій. Загальна концентрація білку не перевищувала 100 мкг на одну лунку. Перед нанесенням проби занурювали на $2 - 3 \text{ хв.}$ у киплячу водяну баню.

У якості верхнього електродного буферу використовували буфер, що містив $0,025 \text{ M}$ трис – *HCl*; $0,192 \text{ M}$ гліцерин; $0,1\%$ SDS ($\text{pH} 8,3$). Його можна використовувати двічі, додаючи в нього SDS до кінцевої концентрації ($0,1 \%$), після чого верхній буфер використовується тільки в якості нижнього (Eng et al., 2000).

В ході концентрування (1,5 – 1,8 години) струм не перевищував 15-20 мА при $U = 299$ В для того, щоб білок із, можливо, меншою конвекцією входив у гель. Після того, як зона бромфенолового синього проходила межу розподілу між гелями, струм збільшували до 35 – 43 мА при $U = 299$ В. Як тільки барвник досягав нижнього краю пластини, струм виключали, пластину РААГ витягали і фіксували протягом 12 – 16 годин при кімнатній температурі у розчині 5 % ТХУ. Електрофореграми фарбували в 0, 1% розчині кумассі яскраво-синього Р – 250 в 96% етанолі і 70 % оцтовій кислоті протягом 12 – 16 годин. Знебарвлення проводили в розчині, що містив 96 % етанол і 70 % оцтову кислоту.

Гель висушували між двома целофановими плівками потоком повітря.

3.3. Імуноблотинг

Імуноблотинг являє собою різновид гетерогенного імуноаналізу. Його суть лежить у переносі молекул досліджуваної речовини з одного твердого носія на інший, забезпечуючи ефективність їх специфічного виявлення за допомогою імуногістохімічної реакції.

Щоб отримати блот необхідно максимально зберегти нативність білкових молекул. Перенесення білків із гелю на нітроцелюлозу, яка найбільш розповсюджена серед сорбентів, відбувається пасивно, шляхом дифузії, чи активно під дією електричного поля. Останній спосіб є найшвидшим та ефективним.

Імуноблотинг білків ПФ мозку проводили за методикою, запропонованою Towbin (1979). Після електрофорезу на пластину РААГ накладали листи нітроцелюлозної мембрани (розмір пор 0,27 мкм) і розміщували між стопками вологого фільтрувального паперу. Отриманий “сендвіч” вкладали між двома поролонними прокладками та затискали між жорсткими плексигасовими пластинками, що мають отвори для вільного доступу електроліту до гелю, і проходження струму через систему, і розташовували між електродами.

Для перенесення білків із РААГ на нітроцелюлозу використовували буфер такого складу: 0,1975 М β – гліцин, 0,0125 М трис – *HCl*, 30 % етанол, 2 М сечовина. Перенесення здійснювали протягом 75 – 90 хвилин при $U = 299$ В і $I = 130 - 150$ мА.

Після завершення переносу мембрани відмивали, в трьох змінах забуференого фізрозчину (ЗФР), що містив 0,025 % Tween – 80 , для видалення сечовини, спирту і SDS.

Оскільки білки на нітроцелюлозу сорбуються неспецифічно, виникає необхідність перед подальшим їх імунохімічним виявленням, заблокувати вільні місця зв'язування, що залишилися. Загальною вимогою, що пред'являється до блокувального агента, є те, що він повинен бути імуноінертним. У даному експерименті блокування проводили за допомогою розведеної в ЗФР із 0,025 % Tween – 80 сироватки крові бика у співвідношенні 1:4 протягом 12–16 годин при $t = 4$ °С або 3–5 годин при кімнатній температурі.

Після блокування мембрани промивали один раз ЗФР із 0,025 % Tween – 80 й інкубували 2–3 години при кімнатній температурі та 24 – 48 годин при 4°С з розведеною (1:2000) специфічною кролячою антисироваткою проти білка гліальних ПФ (anti GFAP - 29). Далі нітроцелюлозу промивали в п'ятьох змінах ЗФР із 0,025 % Tween – 80, після чого інкубували 30 хвилин при кімнатній температурі та 45 хв. при 37 °С з розведеними (1:2000) антитілами, міченими пероксидазою, з імуноглобулінами кроля. Неспецифічно сорбовані антитіла знову відмивали в п'ятьох змінах ЗФР із 0,025 % Tween – 80.

Для виявлення імуних комплексів нітроцелюлозну мембрану занурювали на 10 – 15 хв. при кімнатній температурі в 50 мМ трис – *HCl* буфер (рН 7,4), що містив 0,01 % діамінобензидин і 0,02%-вий перекис водню. Мембрани висушували током повітря (Ленинджер, 1985; Nedzvetsky et al., 2006; Романенко, 2007).

Для визначення вмісту реплікаційного білка (РПА) білки після поділу переносили на полівініліденфторидну (ПВДФ) мембрану, промивали фетальною бичачою сироваткою та протягом 60 хв інкубували в блокувальному буфері (3%-вий бичачий сироватковий альбумін). Мембрани після блокування інкубували протягом 10 год (+4 °C) з відповідними первинними антитілами – анти-RPA1 (SantaCruz, sc-48425, розведення 1:1000) і анти- β -актину (Abcam, ab8226, розведення 1:3000). Мембрану тричі промивали Трісбуферним фізіологічним розчином, що містить 0,05 % Твін 20 (TBS-T) після інкубації з первинними антитілами. Промиті мембрани інкубували протягом 60 хв за кімнатної температури з мишачими вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому (HRP). Візуалізацію проводили результатів вестернблот методом хемілюмінесценції з використанням автоматичного рентгенівського апарата (Carestream Health Inc., США). Для сканування фотоплівок використовували систему візуалізації BIO-RAD. Результати оцінювали, з використанням програми IMAGE-J, методом денситометрії (Alegria-Schaffer et al., 2009).

3.4. Метод Лоурі

Загальний білок визначений за методом Лоурі, оскільки, в цьому випадку, це найбільш ефективний метод. При здобуванні фракції мембранних білків використовували 2 % тритон X-100, який заважає при визначенні загального білка. Метод Лоурі дозволяє позбутися цього детергенту.

Метод заснований на колориметричному визначенні продуктів відновлення фосфорномолібденового фосфорновольфрамового реактиву мідно-білковим комплексом. Метод поєднує біуретову реакцію (на пептидні зв'язки) та реакцію Фоліна (на тирозин і триптофан). Чутливість метода - 0.2 мкг білка в 0.005 мл. але відповідний внесок дають деякі інші амінокислоти - триптофан, гістидин, цистеїн, а також пептидні зв'язки (Геворгиз и др., 2017).

Інтенсивність фарбування визначається природою білку, а її залежність від концентрації лише приблизно лінійна у діапазоні 15-40 мкг (30-80 мкг

при збільшеному вдвічі об'ємові реагентів). Багато широко використовуваних біохімічних реагентів заважають кількісному визначенню білка, посилюючи фон або нівелюючи фарбування з білком. До них відносять тирозин, триптофан, фенольні сполуки, буфери (трис, гліцин, гістидин, цитрат), цукри (глюкоза, сахароза), гліцерин, сполуки, що використовують для створення градієнту (фікол, метрізамід, полівінілпіролідон), тіольні сполуки, відновники, ЕДТА, сульфат амонію, тритон X-100 (у концентрації 0.1 - 0.2 % тритон X-100 викликає утворення осаду), тому в деяких випадках доцільно проводити попереднє осадження білку трихлороцтовою кислотою з наступним розчиненням у лужному розчині, очищення шляхом діалізу або гельфільтрація на сефадексі G-25. Слід пам'ятати, що ні один з колориметричних методів не може гарантувати отримання коректних результатів з усіма білками: впливає індивідуальна природа білка та у деяких випадках наявність забруднень-детергентів, ліпідів та інших забруднювачів, привнесених у процесі виділення білку (Miller, 2003).

Обробку отриманих даних проводили методами математичної статистики для малих виборок (Кокунин, В. А. 1975).

3. 5. Методика визначення біохімічних показників крові

Для отримання сироватки кров забирають в пробірку з активатором згортання. Після взяття матеріалу, пробірку обережно перевертають декілька разів для забезпечення перемішування крові і активатора; далі витримують пробірку у вертикальному стані протягом 10-30 хвилин при кімнатній температурі. Пробірку зі згорнутої кров'ю центрифугують 20 хвилин зі швидкістю 2000 об / хв.

Визначення загального білка сироватки крові за біуретовою реакцією. Білки в лужному середовищі реагують з сульфатом міді з утворенням комплексних сполук, пофарбованих у фіолетовий колір. За інтенсивністю фарбування, яке пропорційне кількості білка, визначають вміст його в сироватці крові.

Визначення вмісту білка в сироватці, одержаної в вакуумних системах з розділювальним гелем і без нього, дає відповідні результати.

Для дослідження не слід використовувати гемолізовану сироватку, оскільки гемоглобін також є білком і буде вступати в біуретову реакцію, що призведе до помилкового завищення результатів аналізу.

Небажано використовувати хілезну сироватку, оскільки вона через каламутність буде оптично змінювати результати визначення, а отже призведе до помилкового завищення результатів (Doumas, 1981)

Проведення аналізу. Для одноканалового напівавтоматичного біохімічного аналізатора. Готують реакційні суміші в таких кількостях (Кінцеве співвідношення зразка до робочого розчину 1:50). Проби перемішують і інкубують 10 хв. при 37°C. Вимірюють проби при довжині хвилі 540 нм відповідно до керівництва користувача біохімічного аналізатора. Для калібрування використовують відповідну реакційну суміш.

Розрахунок ведуть по каліброваному графіку, на основі якого для зручності складають таблицю перерахунку або за допомогою експериментально отриманого коефіцієнта (Меньшиков, 1973; Колб, Камышников, 1982; Мейер, Харви, 2007; Малинин, 2008)

Альбумін в кислому середовищі в присутності детергенту утворює з барвником бромкрезоловий зеленим забарвлений комплекс синьо-зеленого кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту альбуміну в досліджуваній пробі. Обладнання і матеріали: спектрофотометр, фотоелектроколориметр, аналізатори відкритого типу різних виробників, дозатори, що дозволяють відбирати обсяг 0,01 мл і 1,0 мл, секундомір, пробірки, місткістю 5-10 мл, штатив. Аналіз проводили при довжині хвилі 628 (570-640) нм. та кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм. Температура проведення реакції 18-25 °C. Робочий реагент додають в однаковій кількості 0,01 мл в 1мл дослідної, калібрувальної та холостої проби. Проби ретельно перемішують, уникаючи піноутворення, витримують при кімнатній температурі протягом 5 хв. і вимірюють оптичну щільність

дослідної проби (Е_{досл.}) і калібрувальної проби (Е_{кал.}) щодо холостий проби. Розраховують за формулою:

$$C_{оп} = E_{досл.} / E_{кал.} \times C_{ст} \text{ (г/л)},$$

$C_{ст}$ – концентрація стандарту

Концентрацію глобулінів визначають розрахунковим шляхом: різниця вмісту загального білка та концентрації альбумінів в сироватці крові (Young, 1995; Young, Friedman, 2001).

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) каталізує реакцію переамінування між L-аланін і α -кетоглутаровою кислотою з утворенням пірувату. Піруват в лужному середовищі реагує з 2,4-ДНФГ (дінітрофенілгідразіном) з утворенням забарвлених продуктів реакції гідразонів пірувату. Інтенсивність забарвлення реакційного середовища пропорційна активності АЛТ (кількості утворилися гідразонів) і визначається фотометричним при довжині хвилі 537 (500-560) нм.

У пробірку вносять 0,1 мл субстратного розчину і 0,02 мл досліджуваної сироватки. Пробірку ставлять у термостат при 37⁰С на 30 хв. Додають 0,1 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і витримують 20 хв. при кімнатній температурі. Потім додають 1 мл 0,4 М NaOH, перемішують і залишають на 10 хв при кімнатній температурі для розвитку забарвлення. Інтенсивність забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі при зеленому світлофільтрі ($\lambda = 546$ нм) у кюветі з товщиною шару 10 мм проти контрольної проби.

Контрольна проба: у пробірку вносять 0,1 мл субстратного розчину, 0,02 мл сироватки і 0,1 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину і витримують 20 хв. при кімнатній температурі. Потім додають 1 мл 0,4 М NaOH і далі все виконують аналогічно дослідній пробі.

Калібрувальні проби проводять так само як і дослідні, але замість сироватки додають розведені калібрувальні розчини. Вимірюють проти холостої проби, в яку замість калібрувальних розчинів додають воду. Визначивши оптичну густину розчинів будують калібрувальний графік,

відкладаючи на осі абсцис активність ферменту, а на осі ординат – значення оптичної густини. Калібрувальна крива лінійна до величини оптичної густини 0,3. Кількість утвореної піровиноградної кислоти (у мкг) знаходять за калібрувальним графіком.

Активність АЛАТ вираховують за формулою:

$$\text{АЛАТ} = X \times 2 \times 10 / 88$$

де: X – кількість піровиноградної кислоти, знайденої за калібрувальним графіком або за формулою ($X = D / 0,09$) мкг; 2 – коефіцієнт перерахунку на 1 год інкубації; 10 – коефіцієнт перерахунку на 1 мл сироватки; 88 – маса 1 мкмоль піровиноградної кислоти (Tietz, 1991).

Аспаратамінотрансфераза (АСТ) каталізує реакцію переамінування між L-аспартат і α -кетоглутаровою кислотою з утворенням оксалоацетата. Оксалоацетат в лужному середовищі реагує з 2,4-ДНФГ (дінитрофенілгідразіном) з утворенням забарвлених продуктів реакції гідразонів оксалоацетата. Інтенсивність забарвлення реакційного середовища пропорційна активності АСТ (кількості утворилися гідразонів) і визначається фотометрично при довжині хвилі 537 (500-560) нм.

Приготування дослідної та калібрувальної проб відбувається аналогічно концентраціям в методиці визначення активності АЛАТ.

Активність ферменту розраховують за формулою

$$X = E \times 133 \text{ од/мл,}$$

де – X – активність ферменту;

E – екстинкція;

133 – - коефіцієнт перерахунку.

1 мкг ПВК – 0,015 од. E; 1 од. E – 133 мкг ПВК, або за калібрувальним графіком. Активність виражають в умовних одиницях з розрахунку на 1 мл сироватки. 1 од. АсАТ відповідає такій активності ферменту, яка здатна за даних умов утворювати 1 мкг піровиноградної кислоти. При обчисленні активності ферменту необхідно враховувати і розведення сироватки:

$$X = a \times 10,$$

де X – одиниця ферменту;

10 – перерахунок на 1 мл;

a – кількість ПВК, визначена за калібрувальним графіком, мкг.

За співвідношенням активності сироваткових АСТ (аспартатамінотрансферази) і АЛТ (аланінамінотрансферази) розраховують Коефіцієнт де Ритіса, який був відкритий італійським вченим Фернандо Де Ритісом, саме він вивів, що в організмі важливо не тільки зміст речовин аспартатамінотрансферази і аланінамінотрансферази крові, але і їх співвідношення один до одного в сироватці. Розраховується коефіцієнт Ритіса за формулою: Коефіцієнт де Ритіса = Аспартатамінотрансфераза (АСТ) / Аланінамінотрансфераза (АЛТ), вимірюється в од / л. (Тиц, 1997; Меньшиков, 2003; Бабак, 2006).

В основі методу визначення місту глюкози лежить ферментативне окислення киснем повітря при участі ферменту глюкозооксидази. При цій реакції утворюється перекис водню в кількості еквімолярних окисленої глюкози. Перекис водню в присутності пероксидази крові окисляє доданий σ -толуїдін, який набуває синє забарвлення. Інтенсивність виникла забарвлення прямо пропорційна концентрації глюкози і визначається на фотоелектроколориметрі. Метод специфічний для глюкози. Для проведення аналізу на КФК в пробірки внесли 2,0 мл робочого розчину і додали по 0,2 мл надосадкової рідини, калібрувальної суміші та дистильованої води для кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм, і по 0,4 мл - для кювети з довжиною оптичного шляху 5 мм.

Проби ретельно перемішували і інкубували протягом 15 хв при + 37°C (водний термостат) або протягом 25 хв при 18-25°C. Через 5-10 хв після початку інкубації пробірки з пробами інтенсивно струшували вручну.

Після інкубації вимірювали величину оптичної щільності дослідної та калібрувальної проб проти холостої проби в кюветах з довжиною оптичного шляху 5 або 10 мм при довжині хвилі 500 (490-540) нм. Забарвлення проб зберігає стабільність протягом більше 4-х годин після закінчення інкубації.

Концентрації глюкози в пробах провести за формулою:

$$C = E_0 / E_{CT} \times 10$$

де C – концентрація глюкози, моль / л; E_0 – оптична щільність дослідної проби, од.опт.щільності; E_{CT} – оптична щільність калібрувальної проби, од.опт.щільності; 10 - концентрація глюкози в калібраторі, моль / л (Teuscher, Richterich, 1971).

Для визначення неорганічного фосфору вносять 2,5 мл центрифугату, 0,5 мл молібденого реактиву та 1мл ІД розчину аскорбінової кислоти й 6 мл дистильованої води. Одночасно ставлять стандартну пробу і контрольну. Через 10 хв. проби фотометрують при довжині хвилі 340 нм у діапазоні 0-0,1 од.опт.щільності. Розрахунок проводять по формулі (Burtis, Bruns, 2014):

$$X = E_X / E_K \times 10, \text{ де:}$$

X - кількість фосфору в досліджуваній сироватці, мг / 100мл,

E_X - екстенція досліджуваної проби,

E_K - екстенція стандарту.

Принцип методу визначення лужної фосфатази базується на наступній реакції: активований хлоридом магнію, фермент повинен розщеплювати p -нітрофенілфосфат. У результаті реакції формується фосфат і p -нітрофенол. Останній у лужному середовищі має жовте забарвлення. За інтенсивністю кольору визначається активність ферменту (Меньшиков, 2003). Довжина хвилі 405 (400-425) нм. Кювета з довгим оптичним шляхом 10 мм. Температура проведення реакцій 37°C. Активність (А) ЛФ при 405 нм розраховують за формулою:

$$A = 704 \times E,$$

де E - оптична щільність дослідної проби.

Дослідження вмісту калію і натрію проводили іонселективним методом на аналізаторі «К, Na - 2» фірми «Radiometer» (Данія) [24].

Визначення концентрації кальцію в сироватці та плазмі крові виконували уніфікованим калориметричним методом окрезолфталеїн – комплексом (Кондрашева, 2009).

Визначення сечовини в сироватці крові по кольоровій реакції з діацетілмонооксिमом (Медведев, Волчек, 1995).

Сечовина в кислому середовищі утворює з діацетілмонооксिमом в присутності тіосемікарбазіда і солей заліза забарвлені сполуки, інтенсивність забарвлення яких прямо пропорційна змісту сечовини в сироватці крові та в сечі.

Реактиви: 1) 10 % розчин трихлороцтової кислоти; 2) 2,5 % водний розчин діацетілмонооксіма (реактив стійкий); 3) 0,25 % водний розчин тіосемікарбазіда або 0,32 % водний розчин хлориду тіосемікарбазіда; обидва реактиву стабільні при зберіганні в темному посуді при кімнатній температурі; 4) основний 5 % розчин хлорного заліза (5 г хлорного заліза розчиняють в 100 мл дистильованої води і підкисляють додаванням 1 мл концентрованої сірчаної кислоти); з основного розчину готують робочий розчин (1 мл основного розчину доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою, потім додають 8 мл концентрованої сірчаної кислоти і 1 мл 85 % ортофосфорної кислоти); зберігають у темному місці; придатний протягом 2 тижнів, 5) кольоровий реактив (до 30 мл робочого розчину хлорного заліза додають 20 мл дистильованої води, 1 мл 2,5 % розчину діацетілмонооксіма і 0,25 мл 0,25 % розчину тіосемікарбазіда); готують кожен раз перед вживанням; 6) стандартний розчин сечовини (1 г сечовини розчиняють в 100 мл розчинника). Як розчинник можна використовувати дистильовану воду або 0,2 % розчин бензойної кислоти. Стандарт, приготовлений на основі бензойної кислоти, більш стабільний, ніж водний. При роботі обидва розчини повинні давати невеликі коливання екстинкції. В іншому випадку слід виготовити новий стандартний розчин. 1 мл стандартного розчину містить 1 мг сечовини.

Хід визначення в сироватці крові. В центрифужну пробірку вносять 0,8 мл дистильованої води, 0,2 мл сироватки і 1 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти, перемішують. Через 15-20 хв суміш центрифугують. У чисту пробірку вносять 0,5 мл надосадової рідини і 5 мл кольорового реактиву.

Пробірку витримують у киплячій водяній бані протягом 20 хв, потім охолоджують 2-3 хв під водопровідною водою. Вимірювання проводять на ФЕКе при довжині хвилі 500-560 нм (зелений світлофільтр) проти контрольної проби в кюветі з товщиною шару 10 мм. Контрольну пробу ставлять так же, як досвідчену, але замість надосадової рідини беруть 0,5 мл дистильованої води. У стандартну пробу вносять замість сироватки 0,2 мл стандартного розчину сечовини, далі визначення проводять як дослідне. Розрахунок проводять за формулою.

Визначення креатиніну в сироватці крові та сечі по кольоровій реакції Яффе.

Креатинін в лужному середовищі реагує з пікриновою кислотою з утворенням забарвлених сполук. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації креатиніну.

Реактиви: 1) насичений розчин пікринової кислоти (2 г пікринової кислоти розчиняють в 100 мл гарячої дистильованої води на водяній бані при температурі 70-80 °С; розчин залишають на 24 год, періодично помішуючи, після чого фільтрують); реактив стійкий; зберігають в темному посуді. Пікринова кислота містить 15-20 % води, але сушити її не слід, вибухонебезпечно; 2) основний стандартний розчин креатиніну (100 мг креатиніну розчиняють в 100 мл 0,1 н. Розчину хлористоводневої кислоти); зберігають у холодильнику в посуді з притертою пробкою. Робочий стандартний розчин отримують розведенням основного розчину дистильованою водою в 100 разів; 1 мл робочого розчину містить 0,01 мг креатиніну; реактив нестійкий; 3) 10 % розчин їдкого натру; 4) 0,1 і. розчин хлористоводневої кислоти.

Хід визначення в сироватці крові. Змішують в пробірці 2 мл сироватки з 6 мл насиченого розчину пікринової кислоти. Через 5 хв пробірку поміщають на 15-20 хв в киплячу водяну баню, а потім центрифугують (або фільтрують).

До 4 мл центрифугата додають 0,2 мл 10 % розчину лугу і ретельно перемішують. Іноді після підлугування розчин каламутніє внаслідок

випадання фосфатів. В такому разі його слід ще раз відцентригувати. Потім розчин доводять до об'єму 10 мл дистильованою водою. Через 10 хв пробу фотометрують при зеленому світлофільтрі (довжина хвилі 500-560 нм) в кюветі з товщиною шару 20 мм проти контрольної проби. Інтенсивність забарвлення не змінюється протягом години. Контрольна проба. 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти і 0,2 мл розчину гідроксиду натрію доводять до об'єму 10 мл дистильованою водою.

Тригліцериди гідролізуються ліпазою до гліцерину і жирних кислот. Гліцерин фосфорилується в гліцерол-3-фосфат, який потім окислюється до фосфат дигідроксиацетону і перекису водню. Перекис водню вступає в реакцію з 4-аміноантипірином і 4-хлорфенолом, утворюючи барвник хінонімін. Поглинання отриманого кольору вимірюють при 510 nm. Активність ліпази визначали за допомогою ферментативного гідролізу. Ліпази є ферментами поверхневої дії і активізуються, лише перебуваючи на поверхні суперсубстрату, нерозчинного у воді. Рівень ЛПНЩ вимірювали безпосередньо за допомогою ультрацентрифугування, селективним ферментним методом (Voerma G. J. M. et al., 1986).

3.6. Методи статистичної обробки даних

Отримані результати обробляють методами математичної статистики для малих вибірок (Кокунин, 1975). Розраховували показники середнього значення (\bar{x}), середньоквадратичного відхилення (SD), коефіцієнта варіації (CV, %), мінімальне і максимальне значення (Min–Max) (Корнеев, Кричевец, 2011). Значущі відмінності між досліджуваними вибірками оцінювали за допомогою U-критерію Манна–Уїтні, виконаних у пакеті Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA, 2011). Відмінності вважали значущими за $P < 0,05$. Цей метод застосовується для оцінки відмінностей за показниками будь-якої ознаки між двома незв'язними (незалежними) вибірками. Кількість елементів в порівнюваних вибірках може бути неоднаковим, але не менше трьох. На відміну від методу Стьюдента, цей метод не вимагає наявності нормального розподілу порівнюваних сукупностей.

Підрахунок U-критерію Манна-Уїтні заснований на підрахунку тих елементів однієї вибірки, які мають схожі елементи іншої вибірки. Формула обчислення критерію Манна - Уїтні:

$$U = n_1 \times n_2 + n_x \times (n_x + 1) / 2 - T_x$$

де n_1 і n_2 - обсяги першої і другої вибірок відповідно; n_x - обсяг вибірки з більшою сумою рангів; T_x - більша з двох рангових сум (Бондарева, Стеценко, 2017).

Також використали непараметричний метод Краскела-Уолліса (Statistica 12.0) та критерій Дана (Excel, Microsoft office) для попарного порівняння груп. Критерій Краскела-Уолліса використовується для порівняння трьох або більше вибірок, і перевіряє нульові гіпотези, згідно з якими різні вибірки були взяті з одного і того ж розподілу, або з розподілів з однаковими медіанами. Розрахунок критерію Краскела-Уолліса виконується наступним чином:

1. Всі змінні порівнюваних груп об'єднуються і після цього ранжуються від найменшого до найбільшого значення (Що збігається значенням присвоюється середній ранг тих місць, які займають однакові значення).

2. Обчислюються суми рангів по кожній з порівнюваних груп окремо ($R_1, R_2, R_3 \dots R_i$).

3. Розраховується статистика критерію Краскела-Уолліса за формулою:

$$H = 12 / N \times (N + 1) \times (R_1^2 / n_1 + R_2^2 / n_2 + R_3^2 / n_3 + \dots + R_i^2 / n_i) - 3 \times (N + 1)$$

де R - сума рангів кожної з порівнюваних груп,

n - кількість спостережень в кожній групі,

N - загальна кількість спостережень в об'єднаній вибірці (Гржибовский и др., 2016).

Перелік посилань

1. Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., & Vatter, K. (2009). Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods in Enzymology*, 463, 573–599.

2. Boerma G.J.M., Jansen A.P., Jansen R.T.P. et al. (1986) Minimizing interlaboratory variation in routine assays of serum cholesterol through the use of serum calibrators. *Clin. Chem.*,(32), 943–947.
3. Boussiba, S., & Richmond, A. E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120(2), 155–159.
4. Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2014). *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*—e—book. Elsevier Health Sciences.
5. Doumas, B. T., Bayse, D. D., Carter, R. J., Peters Jr, T., & Schaffer, R. (1981). A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clinical chemistry*, 27(10), 1642–1650.
6. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP—thirty—one years (1969–2000). *Neurochemical research*, 25(9–10), 1439–1451.
7. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680–685.
8. Miller, G. L. (2003). Protein determination of large numbers of samples. *Analytical Chemistry*, 31(5), 964–964.
9. Nedzvetsky, V. S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A. A., & Baydas, G. (2006). Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochemistry (Moscow)*, 71(3), 239–244.
10. Teuscher, A., & Richterich, R. (1971). New Swiss guidelines for the diagnosis of diabetes mellitus. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 101(11), 390.
11. Tietz, N. W. (1991). *Clinical guide on clinical laboratory tests*.
12. Tykhomyrov, A. A., Nedzvetsky, V. S., Klochkov, V. K., & Andrievsky, G. V. (2008). Nanostructures of hydrated C60 fullerene (C60HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals. *Toxicology*, 246(2–3), 158–165.
13. Young, D. S. (1995). *Effects of drugs on Clinical Lab*. AACC Press 4.

14. Young, D. S., & Friedman, R. B. (2001). Effects of disease on clinical laboratory tests (Vol. 1). Amer Assn for Clinical Chemistry.
15. Бабак, О. Я. (2006). Клиническое значение и диагностическая тактика при повышении уровня трансаминаз в сыворотке крови при отсутствии клинических проявлений. Медицинский журнал " Искусство лечения. Мистецтво лікування, (8), 25–32.
16. Бондарева, Е. В., & Стеценко, Н. В. (2017). Статистическая обработка малых выборок в адаптивной физической культуре с использованием критерия Манна–Уитни. Математическая физика и компьютерное моделирование, 4 (41), 39–42.
17. Булахов, В. Л., Гассо, В. Я., & Пахомов, О. Є. (2007). Біорізноманіття України, Дніпропетровська область. Земноводні та плазуни (*Amphibia et Reptilia*). Вид–во Дніпропетр. ун–ту, Дніпропетровськ.
18. Виноградова, Р. П., Цудзевич, Б. А., & Храпунов, С. Н. (1983). Физико–химические методы в биохимии: Допущено Министерством высшего образования УССР в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей вузов. Вища школа.
19. Гассо, В. Я. (2010). Состояние цитоскелетных молекулярных компонентов мозга прыткой ящерицы как биомаркер нарушений, индуцированных промышленным загрязнением/Гассо ВЯ, Клименко ЕЮ, Недзвецкий ВС. Екологія та ноосферологія, 21(1–2), 98–104.
20. Кокунин, В. А. (1975). Статистическая обработка данных при малом числе опытов. Укр. биохим. журн, 47(6), 776–790.
21. Колб, В. Г., & Камышников, В. С. (1982). Справочник по клинической химии. Минск: беларусь.
22. Кондрашева, Е. А. (2009). Инвитро диагностика. под ред. Е. А. Кондрашевой, А. Ю. Островского, Invitro.
23. Корнеев, А. А., & Кричевец, А. Н. (2011). Условия применимости критериев Стьюдента и Манна–Уитни. Психологический журнал, 32(1), 97–110.

24. Ленинджер, А. (1985). Основы биохимии: пер. с англ. в 3-х т. Т. 2. под редакцией акад. В. А. Энгельгардта и проф. Я. М. Варшавского. Москва, «Мир».
25. Малинин, М. Л. (2008). Использование стандартного метода определения общего белка при исследовании сыворотки крови животных. Успехи современного естествознания, (3). 105–106.
26. Медведев, В. В., & Волчек, Ю. З. (1995). Клиническая лабораторная диагностика: Справочник для врачей. СПб.: Гиппократ.
27. Мейер, Д., & Харви, Д. (2007). Ветеринарная лабораторная медицина.
28. Меньшиков, В. В. (1973). Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования. Медицина, (4), 1111-1113.
29. Меньшиков, В. В. (2003). Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. М-во здравоохранения РФ. Моск. мед. акад. им. И. М. Сеченова. Науч.-метод. центр по клин. лаб. диагностике; Под ред. В. В. Меньшикова.
30. Недзвецкий, В. С. (1990). Характеристика белков промежуточных филаментов нервной ткани в норме и при различных видах патологии. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Д.: ДГУ.
31. Новицкий, Р. А., Малик, М. Г., Недзвецкий, В. С., & Сухаренко, Е. В. (2009). Использование цитоскелетных молекулярных компонентов в качестве биомаркера состояния гидробионтов (на примере плотвы обыкновенной). Гидробиологический журнал, 45 (5), 81-88.
32. Романенко, Л. А. (2007). Влияние малых доз ионизирующего излучения на состояние глиальных промежуточных филаментов. Морфология, 1(4), 82–85.
33. Сова, В. В., & Кусайкин, М. И. (2006). Выделение и очистка белков. Методическое пособие по курсу «Химия и биохимия белков и ферментов». Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та.

34. Стручкова, И. В., & Кальясова, Е. А. (2012). Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле: Электронное учебно–методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 60.
35. Тиц, Н. У. (1997). Энциклопедия клинических лабораторных тестов под ред. проф. НУ Тица; перевод с английского под ред. проф. ВВ Меньшикова.
36. Харькова, О. А., & Гржибовский, А. М. (2014). Сравнение двух несвязанных выборок с использованием пакета статистических программ STATA: непараметрические критерии. Экология человека, (4), 60–64.

РОЗДІЛ 4

ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПОПУЛЯЦІЙ АМФІБІЙ І РЕПТИЛІЙ В УМОВАХ ЕКОСИСТЕМ З РІЗНИМ АНТРОПОГЕННИМ НАВАНТАЖЕННЯМ.

4.1. Просторова структура та чисельність популяцій *N. tessellata* та *N. natrix*

Natrix natrix є гігрофільним видом та зустрічається на території північно-степового Придніпров'я у вологих біотопах із наявністю об'єктів живлення – представників батрахофауни.

Для популяцій звичайного вужа притаманний широкострічковий тип просторової структури, що показує екологічні особливості цього виду. У біотопах, що досліджувалися виявлено широкострічкову розірвану просторову структуру (рис. 4.7). Даний вид меншою мірою екологічно прив'язаний до водойм, ніж водяний вуж (Булахов и др., 2001).

У біотопах Самарського лісу зафіксована висока щільність населення звичайних вужів по берегах р. Самара та берегах заплавлених озер (оз. Княгиня та ін.) (Гассо, 2011, Єрмоленко, 2018). У антропогенно трансформованих екосистемах (м. Дніпро, р. Дніпро) *N. natrix* мешкає у навколоводних та водних екосистемах, де має можливість знайти їжу, укриття та місця для баскінгу (рис. 4.1). З іншого боку, цей вид меншою мірою залежить від наявності водойми, ніж *N. tessellata*, оскільки іхтіофауна – не є основним об'єктом харчування. Для звичайного вужа характерний позитивний термо- та фототаксис (Желанкин, 2013).

Біотопи, які займає популяція водяного вужа, характеризуються наявністю засобів існування, а саме забезпечення кормовими ресурсами, належними умовами розмноження, захисту тощо. Використання ресурсів простору повною мірою залежить як від екологічних особливостей так і чисельності популяції. З урахуванням екологічної ємності та рівня забезпечення сприятливих умов розвитку, які б відповідали вимогам популяції, різним екосистемам притаманний різний розподіл організмів. На

просторовий розподіл істотно впливає різномірність структури екосистеми (Булахов та ін., 2007, Єрмоленко, 2018).



Рис. 4.1. Характерні біотопи проживання звичайного вужа в умовах екосистем північного степового Придніпров'я

Просторова структура популяції показує характер розміщення організмів у певній екосистемі, перебування організмів у стані агрегації у межах певної популяції. Головними чинниками, що зумовлюють просторовий розподіл гігрофільних видів в екосистемі, є ступінь обводненості біотопів та затіненість території.

Різні представники герпетофауни здатні відповідати на вплив техногенного забруднення або інших антропогенних чинників зміною типу просторової структури популяції (Флинт, 1971; Булахов, 2001; Булахов, Губанова, 2004). Антропогенні трансформації біотопів можуть призводити до змін біотопічних характеристик (вологості, температури тощо), які мають значення для проживання представників герпетофауни і, таким чином,

впливають на просторову структуру популяцій. Такі зміни зумовлені пошуком представниками виду найсприятливіших біотопів для існування.

Загалом, зі збільшенням рівня антропогенного навантаження просторова структура популяцій змій роду *Natrix* може змінюватися від стрічкового суцільного типу – до стрічкового розірваного типу (Булахов та ін., 2007, Булахов и др., 2001).

В межах біотопів, що досліджувалися, *N. tessellata* зустрічається уздовж кам'янистих берегів р. Дніпро та Тилігульського лиману, покритих деревами та кущами, а також в по берегах невеликих заплавах (рис. 4.2). Такі території надають вужам надійні укриття і місця для баскінгу. Водяний вуж пов'язаний з водними екосистем і є облігатним гігрофілом. Такі особливості зумовлені трофікою даного виду (Гассо, 2011).

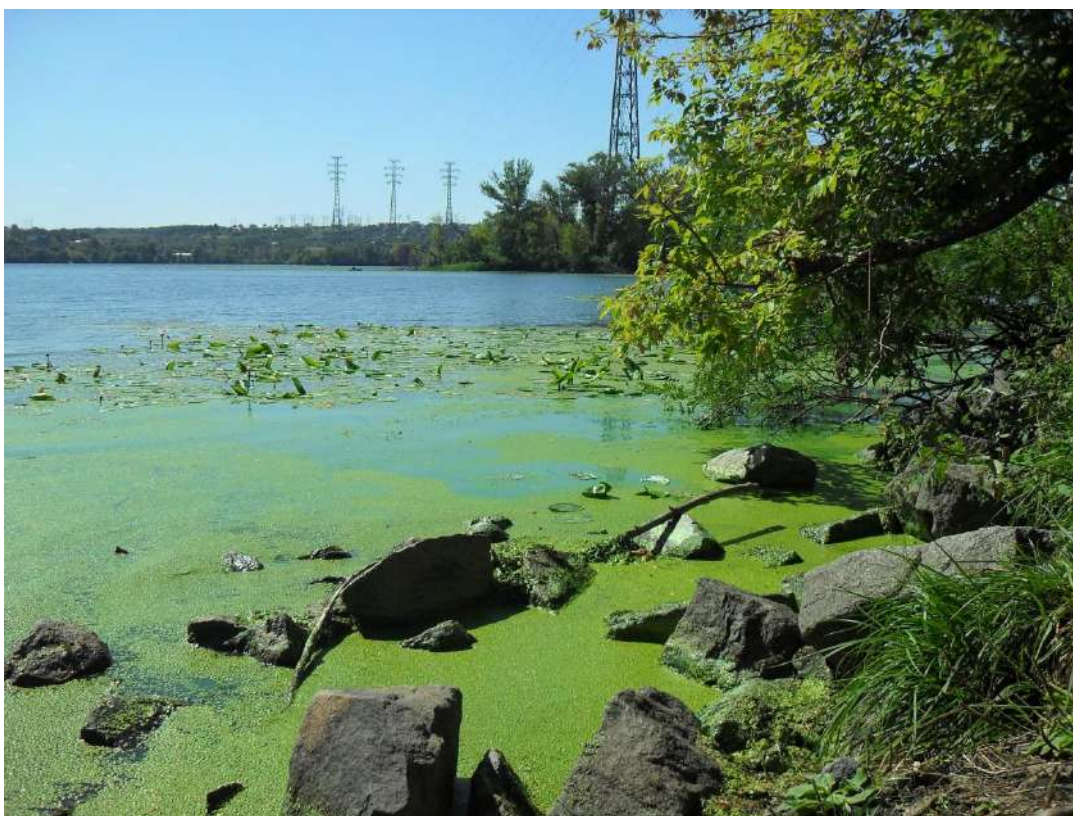


Рис. 4.2. Характерні прибережні біотопи мешкання водяного вужа

Популяціям водяного вужа, що досліджувалися, притаманний вузькострічковий тип просторової структури. У місцях із найбільш

оптимальними умовами, а саме кам'янистих берегах з густою дерев'янистою рослинністю, виявлено скупчення вужів групами до 8–11 особин. У малотрансформованих природних екосистемах р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг») та по берегах Тилігульського лиману на придатних для проживання територіях просторова структура популяції вузькострічкова суцільна. В антропогенно трансформованих екосистемах санітарно-захисної зони Придніпровської ТЕС та зони забруднення (місця скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь» – вузькострічкова розірвана, що може бути зумовленим наявністю певного антропогенного навантаження. Для вужів з біотопів природних екосистем р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область) характерний загалом суцільний вузькострічковий тип просторової структури, але є ділянки, де змії трапляються нечасто.

Показники щільності населення популяцій водяного вужа протягом досліджуваних періодів активності, суттєво не змінюються.

У весняний період (травень - початок червня) щільність популяцій *N. tessellata* у середньому складає: $10,5 \pm 0,65$ ос./100 м на території Тилігульського лиману, $10,25 \pm 0,48$ ос./100 м у біотопах природних екосистем р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область) та $11 \pm 0,63$ ос./100 м на територіях природних екосистем р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг»). У порівнянні з перерахованими вище територіями, виявлено значуще зменшення щільності популяцій водяного вужа для територій під впливом металургійного комбінату «Запоріжсталь» ($7,75 \pm 0,48$ ос./100 м) та Придніпровської ТЕС ($7,5 \pm 0,65$ ос./100 м) (рис. 4.3).

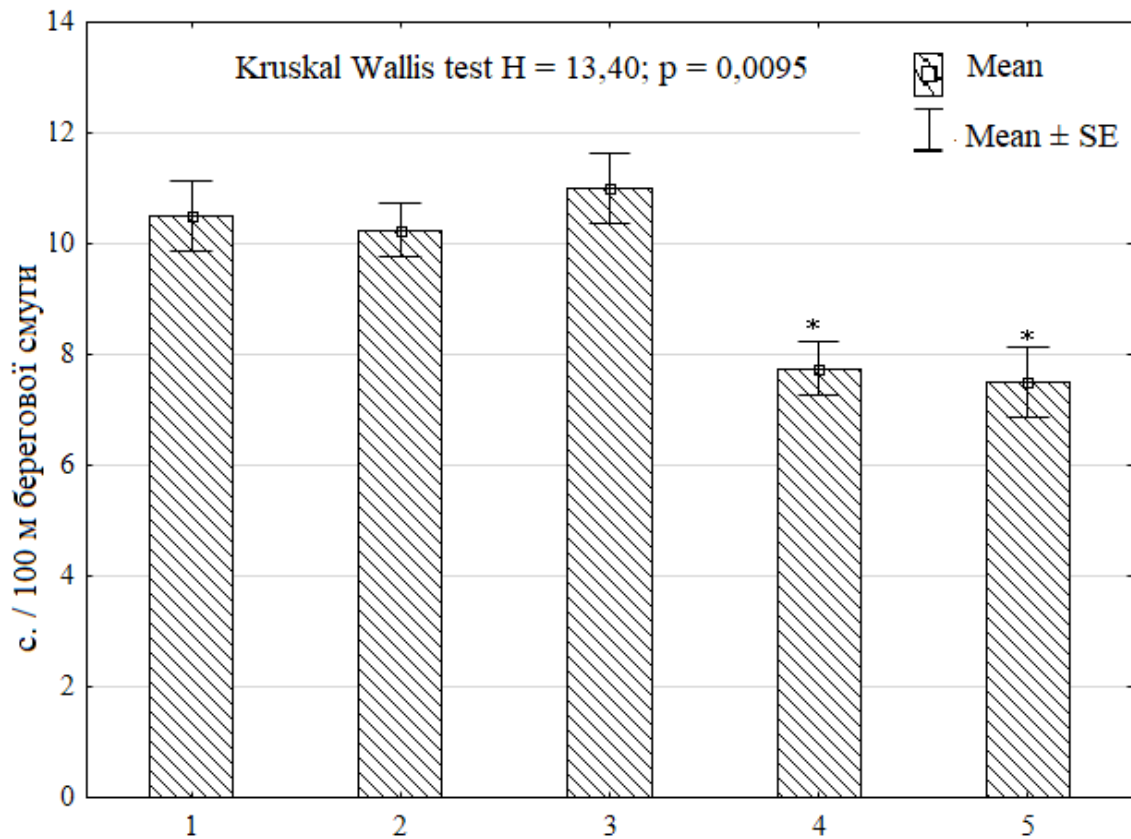


Рис. 4.3. Щільність населення популяцій *N. tessellata* в період травень – початок червня: 1 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область); 3 – природні екосистеми р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг»); 4 – зона забруднення (місця скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь», р. Дніпро); 5 – зона забруднення (санітарно-захисна зона (СЗЗ) Придніпровської ТЕС, р. Дніпро).

Подібна тенденція відмічена і для періоду кінець серпня – початок вересня. На територіях СЗЗ Придніпровської ТЕС та місць скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь» зафіксована чисельність водяного вужа $7,0 \pm 0,57$ та $6,65 \pm 0,62$ ос./100 м відповідно, що значуще менше, у порівнянні з територіями Тилігульського лиману ($10,25 \pm 0,48$ ос./100 м), природних екосистем Майорої балки $10,35 \pm 0,75$ ос./100 м) та природних екосистем р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг») ($10 \pm 0,41$ ос./100 м) (рис. 4.4).

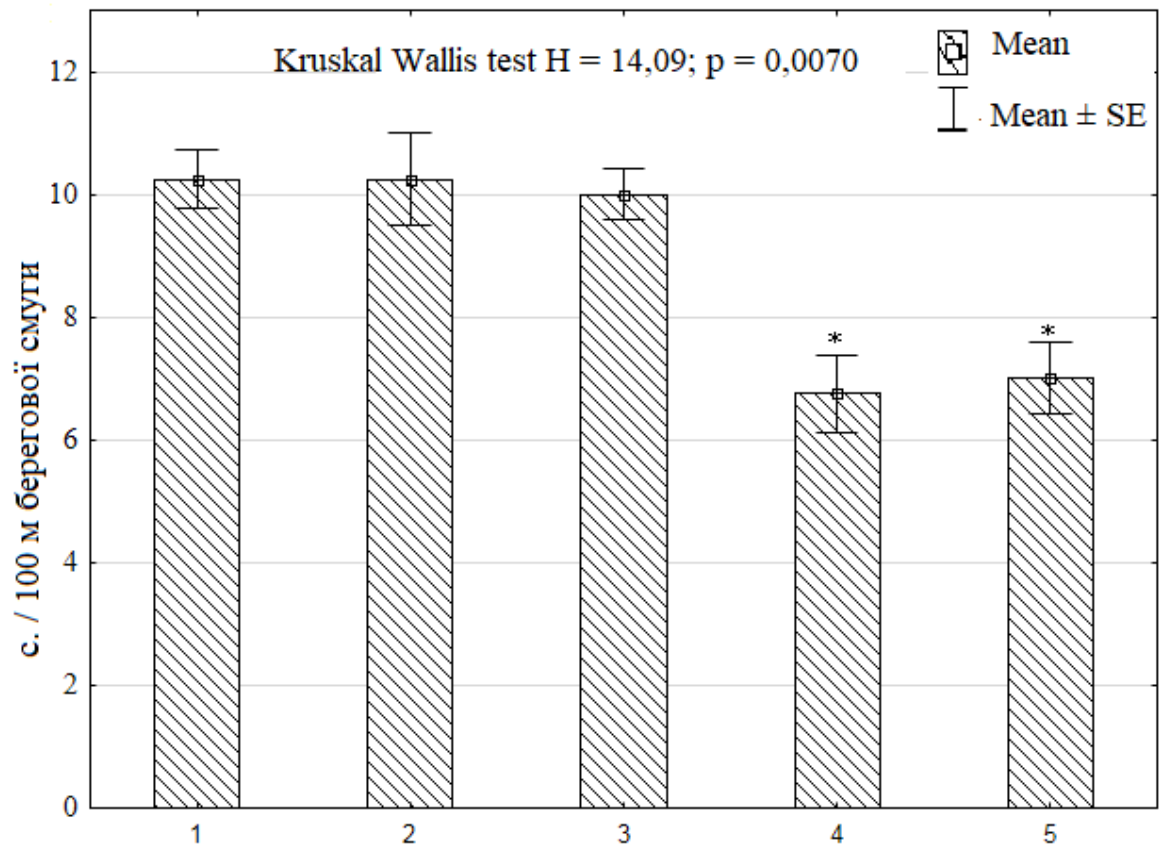


Рис. 4.4. Щільність населення популяцій *N. tessellata* в період серпень – кінець вересня: 1 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область); 3 – природні екосистеми р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг»); 4 – зона забруднення (місця скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь», р. Дніпро); 5 – зона забруднення (санітарно-захисна зона (СЗЗ) Придніпровської ТЕС, р. Дніпро).

Щільність населення популяцій звичайного вужа для територій Самарського лісу (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар (ПМБС) ім. О. Л. Бельгарда) та антропогенно трансформованих екосистем (м. Дніпро, р. Дніпро) протягом травня – початку червня та кінця серпня – початку вересня статистично не відрізняється (рис. 4.5).

Оскільки *N. natrix* є досить пластичним видом, він здатен підтримувати свою чисельність в умовах антропогенно трансформованих біотопів.

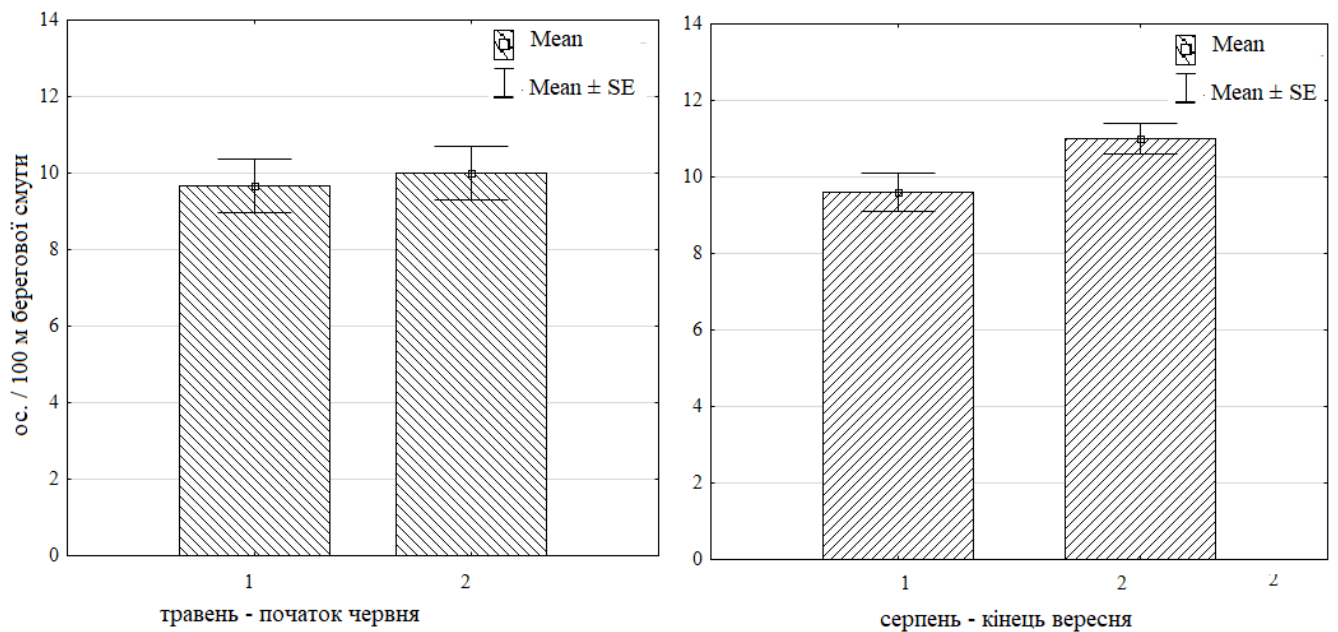


Рис. 4.5. Щільність населення *N. natrix* в умовах північно-степового Придніпров'я: 1 – Самарський ліс (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар (ПМБС) ім. О. Л. Бельгарда); 2 – антропогенно трансформовані екосистеми (м. Дніпро, р. Дніпро).

Середня щільність населення популяцій звичайного вужа восени в екосистемах що досліджувалися значуще не змінюється порівнянні з весняними обліками. При цьому, чисельність звичайного вужа в умовах екосистем, що досліджувалися, відповідає більшості літературних даних (Бакиев и др., 2001; Бакиев и др., 2004; Банников и др., 1956; Булахов та ін., 2007; Гордеев, 2012; Гуськов и др., 1983; Пикулик и др., 1988; Woczyk, 2007).

4.2. Статева структура популяцій *N. tessellata* та *N. natrix*

На результати досліджень статевої структури популяції вужів впливає саме активність особин різної статі. Це зумовлено тим, що у певні сезони самці й самиці можуть надавати перевагу різним біотопам (Гассо, 2011; Parker, 2002).

Відповідно літературним даним у період травень-червень частіше трапляються самиці звичайного вужа через їх більшу денну активність внаслідок необхідності кращого прогрівання у період формування яєць.

Відносна активність самиць знову знижується після відкладання яєць (Гассо, 2011; Гордеев, 2012; Madsen, 1984).

Виявлено наступне співвідношення статей у репродуктивний період між популяціями з різних екосистем, що досліджувалися: в екосистемах Самарського лісу (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар (ПМБС) ім. О. Л. Бельгарда) самиці (у середньому 64 %) переважають над самцями (36 %), в антропогенно трансформованих екосистемах (м. Дніпро, р. Дніпро) для періоду травень-початок червня також характерне переважання самиць (75 %) над самцями (25 %). У період серпень-початок вересня для територій Самарського лісу та антропогенно трансформованих екосистем м. Дніпро характерне відносне вирівнювання співвідношення статей: самці 42,6 %, самиці 57,4 % та самці 53,5 %, самиці 46,5 % відповідно (рис. 4.6).

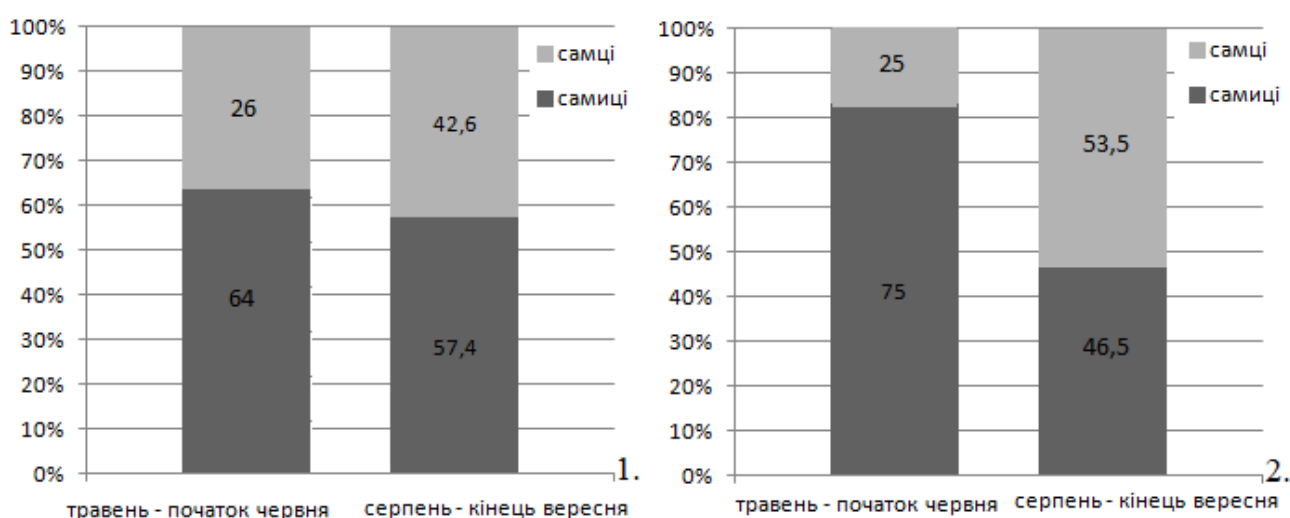


Рис. 4.6. Статева структура популяцій *N. natrix* в умовах північно-степового Придніпров'я: 1 – Самарський ліс (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар (ПМБС) ім. О. Л. Бельгарда); 2 – антропогенно трансформовані екосистеми (м. Дніпро, р. Дніпро).

Для водяного вужа у репродуктивний період усіх досліджуваних екосистем крім територій біля межі Національного природного парку «Великий Луг» характерне переважання самиць над самцями (рис. 4.7).

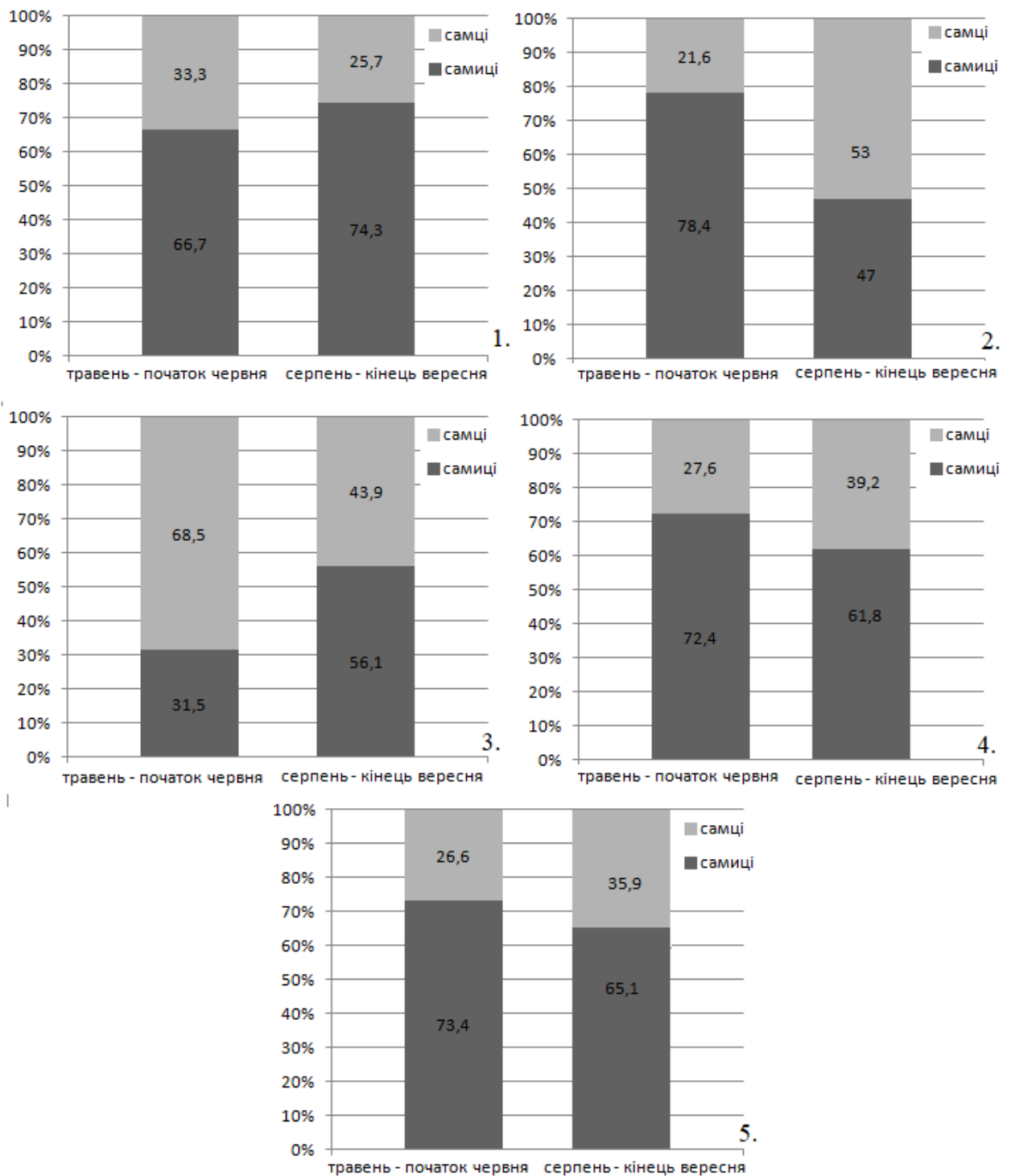


Рис. 4.7. Статеву структуру популяцій *N. tessellata*: 1 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область); 3 – природні екосистеми р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг»); 4 – зона забруднення (місця скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь», р. Дніпро); 5 – зона забруднення (санітарно-захисна зона (СЗЗ) Придніпровської ТЕС, р. Дніпро).

Для біотопів Тилігульського лиману, зони забруднення (місць скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь», р. Дніпро) та зони забруднення СЗЗ Придніпровської ТЕС відмічене переважання самиць протягом усього періоду активності з більш значним у період протягом травня – початку червня. Неприятливі умови можуть змінювати статеву структуру популяцій в сторону домінування самиць, що відображає потребу в підтриманні чисельності. Для популяції з природних екосистем р. Дніпро (біля межі Національного природного парку «Великий Луг») простежується зворотна тенденція: протягом періоду травень-початок червня частка самців переважає, співвідношення відносно вирівнюється у період серпень-початок вересня. Для біотопів природних екосистем р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область) характерне значне переважання самиць у репродуктивний період з поступовим вирівнюванням у період серпень-початок вересня.

4.3. Екологічні особливості та статева структура популяцій *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771)

Щільність населення озерної жаби у природному заповіднику Дніпровсько-Орільському за період досліджень змінюється у межах від 16 до 93 особин на 100 м берегової лінії до появи постметаморфічних особин.

Активність дорослих тварин найвища у квітні, в період нересту. Щільність популяцій закономірно стрибкоподібно збільшується під час закінченню метаморфозу у липні-серпні під час масового виходу цьогорічок, і становить 28–233 особини на 100 м берегової смуги. Популяція характеризується високим рівнем поповнення. У цей період цьогорічки становлять 31,1% популяції за середніх розмірів постметаморфічних особин 2,6 см з вагою 2,8 г.

Щільність населення озерної жаби у місцях скиду промислових під впливом викидів приватного акціонерного товариства (ПАТ) «Дніпровський

металургійний комбінат». за період досліджень змінюється у межах від 7 до 57 особин на 100 м берегової лінії.

Щільність популяцій закономірно стрибкоподібно збільшується під час закінченню метаморфозу у липні- серпні під час масового виходу цьогорічок, і становить 16–103 особини на 100 м берегової смуги. Популяція характеризується невисоким рівнем поповнення. У цей період цьогорічки становлять лише 24,3% популяції. Середні розміри постметаморфічних особин 2,3 см з вагою 2,4 г.

Щільність населення озерної жаби у рекреаційній зоні м. Дніпро (о-в Монастирський) за період досліджень змінюється у межах від 12 до 68 особин на 100 м берегової лінії.

У липні-серпні під час масового виходу цьогорічок щільність населення становить 27–93 особини на 100 м берегової смуги. Середні розміри постметаморфічних особин 2,5 см з вагою 2,6 г.

Дослідження показали відносно рівномірне статеве співвідношення досліджуваних популяцій озерної жаби (рис 4.8).

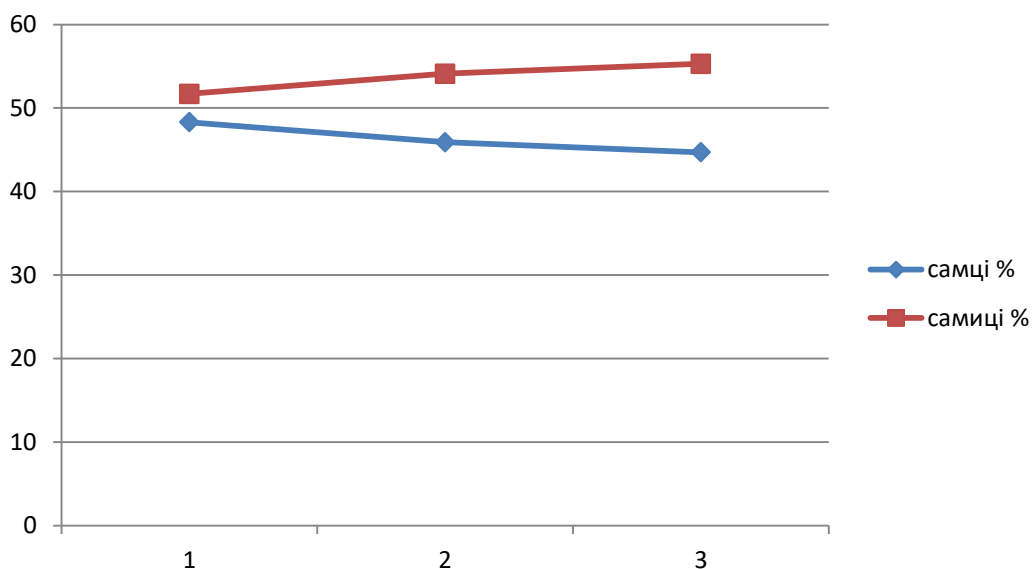


Рис. 4.8. Аналіз міжпопуляційних відмінностей статевої структури популяцій *Pelophylax ridibundus*: 1 – біотопи природного заповідника «Дніпровсько-Орільський»; 2 – антропогенно трансформованих екосистем Монастирського острова (м. Дніпро); 3 – екосистем під впливом викидів ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат» (м. Кам'янське).

Висновки по розділу

1. В умовах північно-степового Придніпров'я щільність популяцій звичайного вужа досягає 9–11 особин на 100 м маршруту, що відповідає більшості літературних даних (Бакиев и др., 2004; Булахов та ін., 2007; Гордеев, 2012; Woczyk, 2007).

2. Щільність популяцій озерної жаби в умовах північно-степового Придніпров'я досягає 12 – 93 особин на 100 м маршруту, та закономірно стрибкоподібно збільшується під час закінченню метаморфозу у липні - серпні під час масового виходу цьогорічок.

3. Щільність популяцій *N. tessellata* на берегах Тилігульського лиману, природних екосистем р. Дніпро (Майорова балка, Дніпропетровська область та біля межі Національного природного парку «Великий Луг») складає 10 – 11 особин на 100 м маршруту. Цей показник значуще вищий ніж в антропогенно трансформованих екосистемах санітарно-захисної зони Придніпровської ТЕС та місць скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь» як навесні (травень – початок червня) так і восени (кінець серпня – початок вересня).

3. Щільність популяцій *N. natrix* в екосистемах р. Дніпро (м. Дніпро) та Самарського лісу (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар ім. О. Л. Бельгарда) значуще не відрізняється протягом року, що може свідчити про відносну екологічну пластичність цього виду та відносно невелике антропогенне навантаження на біотопи в межах міста, що досліджувалися.

4. Для *N. natrix* виявлено широкострічкову розірвану популяційну структуру в обох екосистемах, що досліджувалися. Для *N. tessellata* відмічена залежність просторової структури від антропогенного тиску на екосистему. У біотопах Тилігульського лиману, природних екосистемах р. Дніпро (Майорова балка та біля межі Національного природного парку «Великий Луг») просторова структура популяції вузькострічкова суцільна, а у зонах

забруднення (ділянки скидів металургійного комбінату «Запоріжсталь» та СЗЗ Придніпровської ТЕС, р. Дніпро) – вузькострічкова розірвана.

6. Для біотопів Тилігульського лиману та екосистем зон забруднення («Запоріжсталь» та СЗЗ Придніпровської ТЕС, р. Дніпро) відмічене переважання самиць протягом усього періоду активності. Таке співвідношення статей у популяціях наземних хребетних часто вважають одним з популяційних механізмів адаптації до несприятливих чинників навколишнього середовища. Висока чисельність самиць порівняно з самцями дозволяє збільшувати потенційну народжуваність у популяції (Вершинин, 1997; Пескова, 2000). У *P. ridibundus* ця залежність підтверджується. Найбільша частка самців *N. tessellata* визначена в популяції водяного вужа з природних екосистем р. Дніпро (біля межі НПП «Великий Луг»). Найбільша частка самиць виявлена в популяціях Тилігульського лиману (Миколаївська область).

7. Для статевої структури популяції вужів відомі сезонні відмінності (весна – осінь) зі збільшення частки самиць з переходом від весни до літа і поступовим вирівнюванням співвідношення статей восени. Для популяцій *N. tessellata* з біотопів Тилігульського лиману, та природних екосистем біля межі Національного природного парку «Великий Луг» визначені такі зміни у співвідношенні статей: переважання частки самців у весняний період (Національний природний парк «Великий Луг») та поступове збільшення частки самиць восени в обох екосистемах.

Перелік посилань

1. Borczyk, B. (2007). The causes of intraspecific variation in sexual dimorphism in the common grass snake populations, *Natrix natrix* Linnaeus, 1758 (Serpentes, Colubridae): Data from the South Western Poland. *Acta Zoologica Cracoviensia. Series A: Vertebrata*, 50(1–1), 9–13.
2. Madsen, T. (1984). Movements, home range size and habitat use of radiotracked grass snakes (*Natrix natrix*) in southern Sweden. *Copeia*, 707–713.

3. Parker, W., & Plummer, V. (1987). Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. The Blackburn Press, New Jersey.
4. Булахов, В. Л. (2001). Общие закономерности формирования и распределения населения земноводных в степных лесах Украины. Вопросы герпетологии: Матер. 1-го съезда Герпетол. о-ва им. А. М. Никольского (Пушино–на–Оке, 4–7 дек. 2000 г.). Ред. Н. Б. Ананьева, И. С. Даревский, Е. А. Дунаев и др. Пушино. Москва, 48–50.
5. Булахов, В. Л., & Губанова, Н. Л. (2004). Закономірності біогеоценотичного розподілу риючої форми земноводних – часникової жаби (*Pelobates fuscus*) в лісових біогеоценозах Присамар'я. Сучасні проблеми зоологічної науки: Мат. Всеукр. наук. конф., присвяч. 170-річчю заснування кафедри зоології та 100-річчю з дня народження проф. О. О. Кістяківського. КНУ, Київ, 22–24.
6. Булахов, В. Л., Гассо, В. Я., & Пахомов, О. Є. (2007). Біорізноманіття України, Дніпропетровська область. Земноводні та плазуни (*Amphibia et Reptilia*). Вид-во Дніпропетр. ун-ту, Дніпропетровськ.
7. Вершинин, В. Л. (1997). Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий. Автореф. дисс. канд. биол. наук, Екатеринбург.
8. Гассо, В. Я. (2011). Характеристика популяцій звичайного вужа лісових біогеоценозів Присамар'я. Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія, 19(2), 136–142.
9. Гордеев, Д. А. (2012). Особенности распространения, биологии, экологии и морфологии ужа обыкновенного *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) Волгоградской области. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 14(1), 150–153.
10. Єрмоленко С. В. (2018). Екологічні особливості змій роду *Natrix* в умовах степового Придніпров'я. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Дніпр. нац. ун-т ім. Олеся Гончара.

11. Желанкин, Р. В. (2013). Влияние различных условий освещенности на некоторые аспекты поведения обыкновенного ужа (*Natrix natrix*) в лабораторном эксперименте. Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки, 18(6), 3002–3005.
12. Моднов, А. С. (2010). Особенности экологии обыкновенного ужа *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) Цнинского лесного массива (Тамбовская область). Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки, 15(2), 660–664.
13. Пескова, Т. Ю. (2000). Половая структура популяций земноводных при обитании в чистых и загрязненных пестицидами водоемах. Современная герпетология, 1, 26–35.
14. Флинт, В. Е. (1971). Пространственная структура популяций мелких млекопитающих. Наука, Москва.

РОЗДІЛ 5

СТАН БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ПОПУЛЯЦІЙ ЗМІЙ РОДУ *NATRIX* В УМОВАХ ЕКОСИСТЕМ З РІЗНИМ АНТРОПОГЕННИМ НАВАНТАЖЕННЯМ

В екосистемах, різних за ступенем антропогенного навантаження, як маркери стану організму рептилій можна використовувати біохімічні показники сироватки крові, які дозволяють отримати суттєві дані щодо впливу забруднення довкілля на тварин. Кров являє собою чутливий та інформативний індикатор стану організму, що швидко реагує на зміни екзогенних та ендогенних факторів та показує вплив на особину і, опосередковано, на популяцію в цілому. У комплексі біохімічні параметри крові можуть характеризувати кількість та якість живлення, адаптивні можливості змій та інтенсивність дії на них антропогенних факторів (Pages et al., 1992; Zakharov, Clarck, 1993; Raphael et al., 1994; Lopez-Olvera et al., 2003).

5.1. Біохімічні показники крові звичайного вужа (*Natrix natrix*)

Оскільки вуж звичайний *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) характеризуються незначними добовими міграціями, є одним із найпоширеніших видів змій Євразії та Північної Африки (Ananjeva et al., 2006), цей вид можна використовувати як тест-об'єкт для біомоніторингу навколишнього середовища (Knotkova, 2002). *Natrix natrix* зустрічається майже в усіх типах водойм та їх прибережних екосистемах і поширений на всій території України (Gasso, 2011).

Дослідження біохімічних параметрів крові статевозрілих особин вужа звичайного з біотопів у межах заплавної екосистем правого берега р. Дніпро, що прилягають до вулиці Набережна Заводська та біотопів Самарського лісу (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар імені О.Л. Бельгарда (Новомосковський район, Дніпропетровська область) показали наступні результати:

Загальна кількість білка крові змій, виловлених із біотопів, які перебувають під впливом техногенного навантаження, еквівалентна кількості білку крові вужів з умовно чистого регіону. Відмінності не спостерігаються і для кількості альбумінової та глобулінової фракцій (табл. 5.1). Разом із тим білковий коефіцієнт сироватки крові особин з урбанізованої території значуще знижується на 30% у порівнянні зі зміями, виловленими в контрольних біотопах.

Таблиця 5.1

Вміст білка у сироватці крові вужа звичайного з екосистем Придніпров'я з різним ступенем антропогенної трансформації ($x \pm SD$)

Показник	Самарський ліс, n = 13	м. Дніпро, n = 11
Загальний білок, г/л	46,1 ± 9,4	46,6 ± 3,8
Альбумін, г/л	18,4 ± 2,0	21,3 ± 1,2
Глобулін, г/л	29,5 ± 4,9	26,1 ± 2,5
Білковий коефіцієнт, од.	0,59 ± 0,08	0,82 ± 0,04*

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;

* – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана – Уїтні).

Певне діагностичне значення має білковий коефіцієнт – відношення кількості альбумінів до кількості глобулінів. Слід мати на увазі, що білковий коефіцієнт для холонокровних тварин значно нижчий, ніж для теплокровних, що пояснюється еволюційно-екологічними особливостями білкового складу крові (Хиггинс, 2008)

Кількість альбумінів і глобулінів сироватки крові змій варіює та залежить від багатьох факторів (Samour et al., 1998; Wang et al., 1999; Dickinson et al., 2002; Peterson, 2002), а отримані результати відповідають наведеним діапазнам значень даного показника для інших видів рептилій (Lisičić et al., 2013; Степаненко, 2013).

Активність аланінамінотрансферази у сироватці крові вужів із забрудненого регіону підвищується майже на 76% порівняно з контрольними

показниками, що цілком може свідчити про порушення активності печінки та про інші патологічні процеси (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Активність АЛТ та АСТ у сироватці крові вужа звичайного з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації ($x \pm SD$)

Показник	Самарський ліс, n = 13	м. Дніпро, n = 11
АСТ, од./л	103 \pm 13	155 \pm 14*
АЛТ, од./л	42,0 \pm 10,2	77,5 \pm 37,3*
Індекс де Рітіса, од.	2,71 \pm 1,16	1,92 \pm 0,92

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;

* – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана – Уїтні).

Активність АСТ у сироватці крові також збільшується у змій із зони, що піддається антропогенному навантаженню. Цей показник перевищує значення, відомі для рептилій (Васильєв, 2002, 2006; Степаненко, 2013).

Кількість сечовини у крові змій, виловлених в екосистемах р. Дніпро в межах м. Дніпро, зменшується майже на 81,8% у порівнянні з контролем (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Біохімічні показники сироватки крові вужа звичайного з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації ($x \pm SD$)

Показник	Самарський ліс, n = 13	м. Дніпро, n = 11
Сечовина, ммоль/л	2,16 \pm 0,23	1,11 \pm 0,52*
Азот сечовини, мг/л	3,82 \pm 1,11	2,03 \pm 0,82*
Лужна фосфатаза, од./л	50,3 \pm 6,4	68,4 \pm 7,2*
Глюкоза, ммоль/л	3,66 \pm 0,24	3,81 \pm 2,30

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;

* – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана – Уїтні).

Активність АСТ являє собою чутливий показник, який змінюється у випадку некрозу м'язів, патології печінки, а також зазвичай підвищується за

ураження нирок. Виявлене підвищення цього показника для обох регіонів, що досліджували, може також свідчити про паразитарні захворювання. Ріст активності трансаміназ виявлений раніше також у прудкої ящірки в умовах промислового забруднення екосистем (Klymenko, Gasso, 2009).

Подібне зменшення (на 90%) спостерігали також для кількості азоту сечовини. Такі зміни рівнів продуктів азотистого обміну у крові рептилій можуть указувати на зниження інтенсивності процесів обміну. Концентрація глюкози в сироватці крові змії із двох місць мешкання не має значущих відмінностей. Рівень глюкози крові рептилій варіює залежно від сезонної активності, тому зміни цього параметра можна оцінювати як неспецифічні та непоказові саме для антропогенного впливу, а зміну рівня глюкози слід розглядати в комплексі з іншими показниками. Враховуючи широкий діапазон норми цього показника, наведений для різних видів рептилій, отримані результати можна вважати такими, що відповідають нормі (Tosunoglu, 2011).

Значуще підвищення (на 27%) відмічене для активності лужної фосфатази. Найбільша кількість цього ферменту спостерігається у печінці та кістках. Достовірне підвищення активності лужної фосфатази свідчить про фізіологічні зміни органів, у клітинах яких вона міститься. Отримані дані (табл. 4.3) перебувають у межах фізіологічної норми (Knotek et al., 2002; Васильев, 2006; Степаненко, 2013, Гулиев и др., 2014). Відомо, що показники загального обміну речовин (загальний кальцій, неорганічний фосфор, сечовина, азот сечовини) не видоспецифічні (Степаненко, 2013). Кількість неорганічного фосфору в сироватці крові вужів, виловлених на антропогенно трансформованих територіях, зменшується на 31% (табл. 5.4).

Відповідно до змін концентрацій фосфору та незмінного рівня кальцію, співвідношення Ca / P достовірно підвищується майже на 30% у вужів з антропогенно трансформованих екосистем. Рівень кальцію у сироватці крові

самиць рептилій може значно підвищуватися (втричі – учетверо) лише в період репродуктивної активності.

Таблиця 5.4

Вміст кальцію та фосфору у сироватці крові вужа звичайного з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації ($x \pm SD$)

Показник	Самарський ліс, n = 13	м. Дніпро, n = 11
Загальний кальцій, ммоль/л	3,06 ± 0,13	3,19 ± 0,11
Фосфор неорганічний, ммоль/л	2,12 ± 0,45	1,63 ± 0,20*
Відношення Ca/P	1,43 ± 0,22	2,19 ± 0,31*

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;
* – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана – Уїтні).

Метаболізм фосфору та його рівень у крові тісно пов'язаний із метаболізмом кальцію. Більшість рептилій мають концентрацію фосфору в сироватці крові у діапазоні 1,0–3,0 ммоль/л. Вміст кальцію та фосфору у крові звичайного вужа з досліджених районів перебуває в межах фізіологічної норми.

5.2. Біохімічні показники крові водяного вужа (*Natrix tessellata*)

Дослідження проводилося на 16 статевозрілих особинах *Natrix tessellata*, які були виловлені з біотопів, що межують з територією Національного природничого парку «Великий Луг», біотопів Майорової балки (с. Майорка) та антропогенно трансформованій території санітарно-захисної зони Придніпровської ТЕС.

Значущих відмінностей концентрації загального білка між досліджуваних груп не виявлено, але у вужів з території СЗЗ Придніпровської ТЕС вміст глобулінів значущо нижчий, а альбуміну

більший, ніж у двох інших групах. Ці зміни чітко відображені в білковому коефіцієнту – у *Natrix tessellata*, які були виловлені у НПП «Великий Луг» та Майоровій балці значення цього показника більше, а у тварин з найбільш антропогенно трансформованої території менше (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Вміст білка у сироватці крові *Natrix tessellata* з екосистем Придніпров'я з різним ступенем антропогенної трансформації ($x \pm SD$)

Показник	НПП «Великий Луг», n = 7	Майорова балка, n = 8	СЗЗ Придніпровської ТЕС, n = 6	P
Загальний білок, г/л	51,4 ± 1,12	50,0 ± 1,86	51,0 ± 1,52	0,7933
Глобулін, г/л	28,0 ± 1,05	27,5 ± 0,92	23,0 ± 0,71	0,0092
Альбумін, г/л	23,4 ± 1,03	22,5 ± 1,05	28,0 ± 0,89	0,0124
Білковий коефіцієнт, од.	1,21 ± 0,08	1,22 ± 0,04	0,82 ± 0,02	0,0070

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;
 $P < 0,05$ – (за методом Крускала-Уолліса).

Активність АСТ та лужної фосфатази не мають значущих відмінностей між особинами з різних екосистем, але в сироватці крові вужів з НПП «Великий Луг» виявлена підвищена активність АЛТ відносно інших досліджуваних груп. Особини з СЗЗ Придніпровської ТЕС мають майже у 3 рази значуще вищий рівень глюкози, ніж вужі інших груп. Значуща різниця концентрації загального кальцію в сироватці крові виявлена між рептиліями з СЗЗ Придніпровської ТЕС та Майорової балки, при цьому різниці між цими двома групами та НПП «Великий Луг» при статистичній обробці не виявлено (табл. 5.6).

У зв'язку з залежністю температури тіла пойкилотермних тварин від навколишнього середовища система гомеостатичного контролю біохімічного складу крові має менш жорсткі обмеження, ніж у теплокровних організмів. Тобто склад певних аналітів сироватки може коливатися в широких межах в залежності від стану середовища.

Таблиця 5.6

Вміст білка у сироватці крові *Natrix tessellata* з екосистем Придніпров'я з різним ступенем антропогенної трансформації ($x \pm SD$)

Показник	НПП «Великий Луг», n = 7	Майорова балка, n = 8	СЗЗ Придніпровської ТЕС, n = 6	P
АСТ, од./л	77,8 ± 18,2	52,5 ± 13,4	72,4 ± 15,3	0,362
АЛТ, од./л	87,4 ± 15,9	40,0 ± 4,64	35,4 ± 4,20	0,008
Лужна фосфатаза, од./л	104,2 ± 15,54	96,2 ± 9,97	80,00 ± 6,93	0,595
Глюкоза, ммоль/л	2,3 ± 0,08	2,52 ± 0,10	6,20 ± 1,40	0,004
Загальний кальцій, ммоль/л	3,37 ± 0,23	4,20 ± 0,78	3,21 ± 0,95	0,005
Фосфор неорг., ммоль/л	1,78 ± 0,17	1,50 ± 0,16	1,48 ± 0,11	0,256

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;
 $P < 0,05$ – (за методом Крускала-Уолліса).

Відомо, що у деяких видів рептилій підвищення температури викликає збільшення рівню глюкози. Зважаючи на ці данні можна висунути припущення, що збільшення рівня глюкози у *Natrix tessellate* виловлених біля СЗЗ Придніпровської ТЕС може бути пов'язане з тепловим забрудненням. Але є данні щодо сезонного коливання рівня глюкози рептилій та зниженої концентрації у *Natrix natrix* при постійному освітленні упродовж 24 годин та стабільній температурі (Skoczylas, Sidorkiewicz, (1974). Тому дана гіпотеза потребує подальших лабораторних та польових досліджень.

Підтримка сталого осмотичного тиску є однією з основних функцій альбуміну в крові теплокровних тварин. У рептилій визначають білок,

аналогічний за характеристиками (молекулярна маса, розчинність, ізоелектрична точка тощо). Але роль даного аналіту в осмомолярності крові сильно варіює в залежності від виду та середовища існування. Найвищі концентрації відмічають у рухливих видів, які живуть у посушливому та жаркому навколишньому середовищі, але інформації про прямий вплив температури на внутрішньовидові зміни вмісту альбуміну в крові немає.

Активність печінкових ферментів у рептилій може збільшуватися неспецифічно (Eshar et al., 2018), тому ефективність визначення аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази та лужної фосфатази для діагностики стану печінки у *Natrix tessellate* потребує уточнення. У досліджуваних особин з НПП «Великий Луг» були виявлені гельмінтози печінки, що ймовірно призвело до підвищення активності АЛТ у два рази відносно двох інших груп. При цьому значущі зміни активності АСТ та ЛФ не виявлені, що може вказувати на низьку чутливість та діагностичну цінність даних аналітів у водяних вужів.

Первинне та вторинне порушення мінерального обміну є типовими метаболічними хворобами рептилій. Зміни циркуляції кальцію та фосфору можуть бути викликані патологіями нирок, кишково-шлункового тракту, ендокринної системи тощо. Зважаючи на приблизно однаковий рівень фосфору у всіх трьох групах, підвищений рівень кальцію можливо розцінювати як свідчення початку патологічних процесів, так і варіацією нормальних значень, оскільки значущі відмінності є тільки між антропогенно трансформованими ділянками.

Висновки по розділу

1. У *Natrix natrix*, виловлених на урбанізованій території, відмічене підвищення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лужної фосфатази, що вказує на певні порушення фізіологічного стану тварин. Для показників вмісту сечовини, азоту сечовини, неорганічного фосфору, співвідношення Ca / P, білкового коефіцієнта та активності лужної фосфатази спостерігаються відмінності між популяціями. Але отримані для

цих показників значення перебувають у межах, в цілому відомих для плазунів. Активність трансаміназ у сироватці крові вужів дещо підвищена, особливо у змій з антропогенно трансформованих екосистем р. Дніпро.

2. Виявлено відмінності деяких біохімічних параметрів крові для *Natrix tessellata* виловлених в біотопах, що знаходяться під впливом Придніпровської ТЕС. Зміни відбулися в співвідношенні альбумінової і глобулінової фракції. Хоча кількість білків кожної фракції знаходиться в межах фізіологічної норми, проте білковий коефіцієнт крові у змій з забруднених біотопів зменшується, що може вказувати на зміни фізіологічного стану печінки тварин. Отримані дані можуть використовуватися надалі в якості референсних значень для дослідження популяцій цих видів.

3. Біохімічні показники сироватки крові вужів, що мешкають в зоні забруднення, не завжди повною мірою характеризують стан популяції та показують значущі відмінності. До того ж кров це дуже динамічна система, яка може швидко змінюватися. Це спонукає на пошук і використання біомаркерів, які б характеризували зміни в організмі на самих ранніх етапах екотоксичного впливу.

Перелік посилань

1. Ananjeva, N. B., Orlov, N. L., Khalikov, R. G., Darevsky, I. S., Ryabov, I. S., & Barabanov, A. V. (2006). The Reptiles of North Eurasia. Taxonomic Diversity, Distribution, Conservation Status [this comprises the territory of the former Soviet Union and Mongolia]. Pensoft Series Faunistica, (470), 250.
2. Dickinson V. M., Jarchow J. L., Trueblood M. H. (2002). Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 38 (1), 143–153.
3. Eshar, D., Ammersbach, M., Shacham, B., Katzir, G., & Beaufrère, H. (2018). Venous blood gases, plasma biochemistry, and hematology of wild-caught common chameleons (*Chamaeleo chamaeleon*). *Canadian Journal of Veterinary Research*, 82(2), 106–114.

4. Gasso, V. Y. (2011). Kharakteristika populyatsiy zvychainogo vuzha lisovyh biogeotsenoziv Prysamar'ia [Grass snake populations' features of the forest biogeocoenoses in the Samara River area]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ecol*, 19(2), 136–142.
5. Klymenko, O. Y., & Gasso, V. Y. (2009). Активність трансаміназ у сироватці крові прудкої ящірки під впливом промислового забруднення. *Biosystems Diversity*, 17(1), 100–105.
6. Knotková, Z., Doubek, J., Knotek, Z., & Hájková, P. (2002). Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). *Acta Veterinaria Brno*, 71(2), 191–198.
7. Lisičić, D., Đikić, D., Benković, V., Knežević, A. H., Oršolić, N., & Tadić, Z. (2013). Biochemical and hematological profiles of a wild population of the nose-horned viper *Vipera ammodytes* (Serpentes: Viperidae) during autumn, with a morphological assessment of blood cells. *Zoological Studies*, 52(1), 11.
8. López-Olvera, J. R., Montané, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J., & Lavín, S. (2003). Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 830–836.
9. Pagés, T., Peinado, V. I., & Viscor, G. (1992). Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comp Biochem Physiol A*, 103, 275–278.
10. Peterson C. C. (2002). Temporal, Population, and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoises: correlational tests of causal hypotheses. *Canadian Journal of Zoology*, (80), 461–470.
11. Raphael, B. L., Klemens, M. W., Moehlman, P., Dierenfeld, E., & Karesh, W. B. (1994). Blood values in free-ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 63–67.
12. Samour, J. H., Hewlett, J. C., Silvanose, C., Hasbun, C. R., & Al-Ghais, S. M. (1998). Normal haematology of free-living green sea turtles (*Chelonia*

mydas) from the United Arab Emirates. *Comparative Haematology International*, 8(2), 102–107.

13. Skoczylas, R., & Sidorkiewicz, E. (1974). Studies on the blood sugar level in the grass snake (*Natrix natrix* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 48(3), 439–456.

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ПРОМИСЛОВОГО ЗАБРУДНЕННЯ ЕКОСИСТЕМ НА АСТРОЦИТИ МОЗКУ ЗМІЙ: ГФКБ ЯК БІОМАРКЕР

6.1. Стан цитоскелетних молекулярних компонентів мозку *Natrix tessellata* в умовах промислового забруднення екосистем

Аналіз активних форм кисню (АФК) проводили для виявлення окисно-відновного дисбалансу в мозку водяних вужів, що спричинений забрудненням навколишнього середовища. Результати відносного рівня АФК у мозку тварин продемонстрували значуще збільшення АФК у мозку змій з обох забруднених регіонів: поблизу Придніпровської ТЕС та меткомбінату «Запоріжсталь» у 1,6 та 1,7 рази відповідно (рис. 6.1).

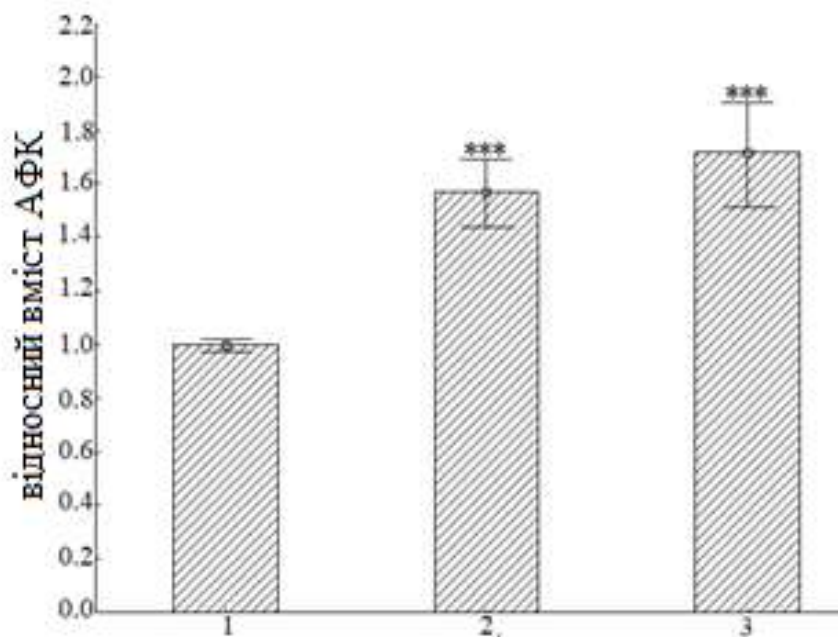


Рис. 6.1. Активні форми кисню в мозку *Natrix tessellata* як відносна інтенсивність флуоресценції, нормалізована до контролю (середнє значення вибірки та SD): 1 – контроль – природні біотопи (Майорова балка, n = 6); 2 – зона забруднення (ССЗ Придніпровської ТЕС, n = 6); 3 – зона забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь» р. Дніпро, n = 6); *** - P < 0,001

Тому змії, які є мешканцями обох забруднених місць, характеризуються високими показниками окисного стресу в тканинах мозку.

Для оцінки негативного впливу промислового забруднення на мозок змій проведено порівняльний аналіз експресії ГФКБ та його фрагментації в мозку тварин. Відмінності виявлені для окремих досліджуваних фракцій: цитоскелетної та цитозольної (розчиненої). У склад цитоскелетної фракції входить основна кількість ГФКБ. Розчинна фракція складається в основному з субодиниць, які після синтезу в ендоплазматичному ретикулумі не встигли включитися у склад проміжних філаментів. Після полімеризації розчинних субодиниць у філаментних структурах, ГФКБ втрачає розчинність і можуть бути солюбілізованими за допомогою буфера з 2-4 М сечовини. У якості адекватного показника стану цитоскелету астроцитів розглядається співвідношення розчинної та цитоскелетної фракцій.

У порівнянні з рептиліями, виявленими в контрольній зоні, у тканинах мозку змій, відібраних у промислово забруднених районах, було виявлено статистично значущий більший вміст ГФКБ. Виявлені суттєві відмінності у вмісті ГФКБ для обох досліджуваних фракцій: нерозчинних цитоскелетних та розчинних цитозольних.

Вміст ГФКБ у філаментній цитоскелетній (нерозчинній) фракції (фГФКБ), виявленій у мозку групи змій із забруднених біотопів, суттєво збільшився порівняно з особинами, відібраними як контрольна популяція (рис. 6.2).

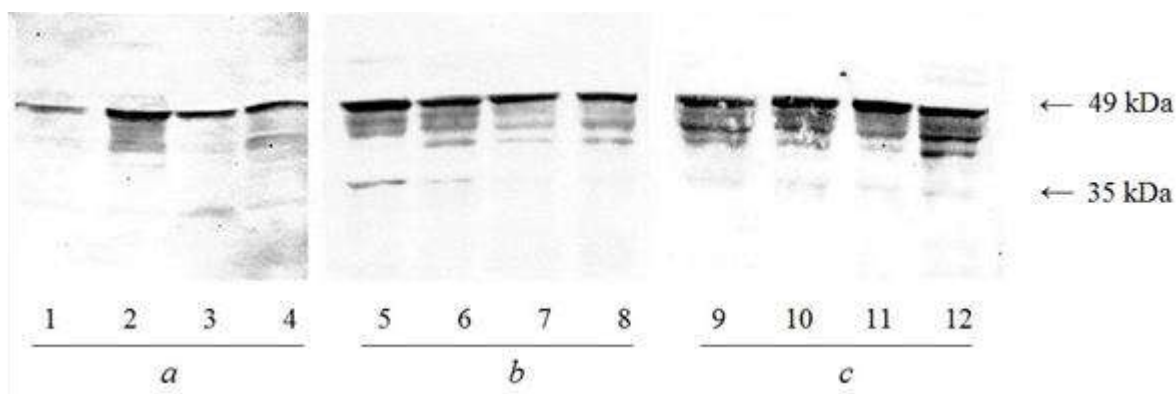


Рис. 6.2. Імуноблотинг цитоскелетної білкової фракції ГФКБ мозку *N. tessellata*: а – контроль – природні біотопи (Майорова балка); б – зона забруднення (Придніпровська ТЕС); с – зона забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь», р. Дніпро)

Подібне збільшення фГФКБ спостерігалось в мозку вужів як в зоні під впливом викидів Придніпровської ТЕС, так і на забруднених територіях під впливом меткомбінату «Запоріжсталь». Зокрема, порівняно з контролем, кількість фГФКБ у мозку *N. tessellata* із зон під впливом Придніпровської ТЕС та меткомбінат «Запоріжсталь» збільшується у 1,7 та 2,2 рази відповідно (рис. 6.3).

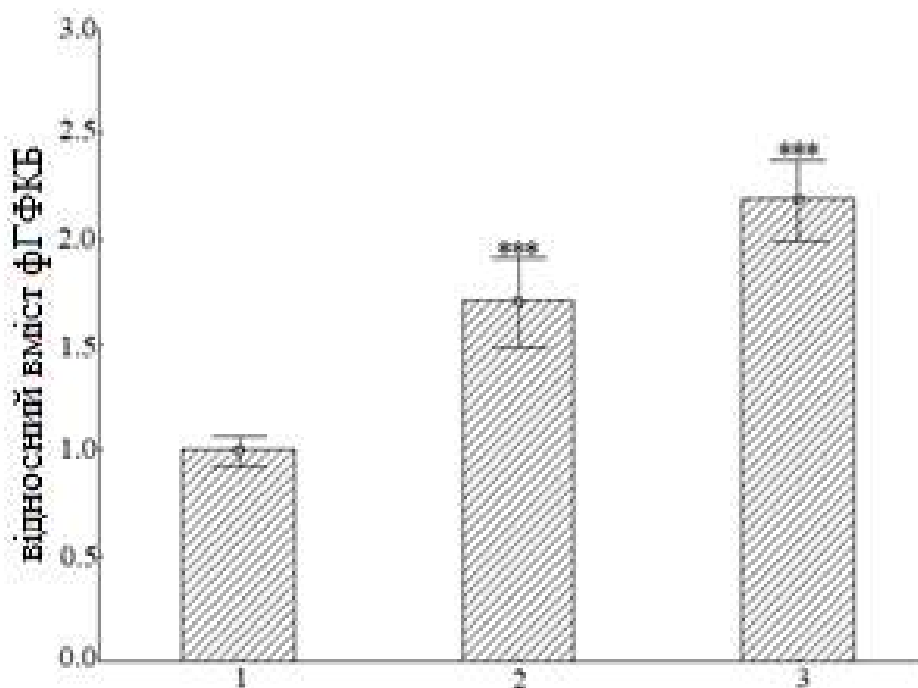


Рис. 6.3. Відносний вміст ГФКБ у цитоскелетній фракції білка мозку *N. tessellata*, (середнє значення вибірки та SD): 1 – контроль – природні біотопи (Майорова балка, n = 6); 2 – зона забруднення (ССЗ Придніпровської ТЕС, n = 6); 3 – зона забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь» р. Дніпро, n = 6); *** - P < 0,001

Найбільш значущі зміни ГФКБ виявлені для цитозольної розчинної фракції (рГФКБ) (рис. 6.4). Вміст рГФКБ у *N. tessellata*, виловлених в санітарно-захисній зоні Придніпровської ТЕС, збільшується в 3,8 рази в порівнянні з контрольною популяцією. Подібна тенденція була виявлена і для змії, виловлених у забруднених біотопах в зоні забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь», р. Дніпро). Ці змії характеризуються

підвищенням рівня рГФКБ у 5,6 разів у порівнянні з даними, отриманими для рептилій із Майорової балки (рис. 6.5).

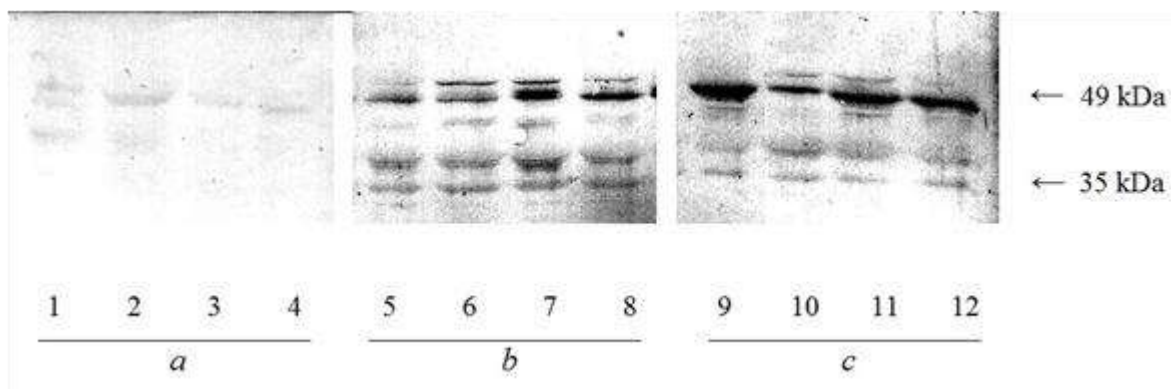


Рис. 6.4. Імуноблотинг цитозольної білкової фракції ГФКБ мозку *N. tessellata*: а – контроль – природні біотопи (Майорова балка); б – зона забруднення (Придніпровська ТЕС); с – зона забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь», р. Дніпро).

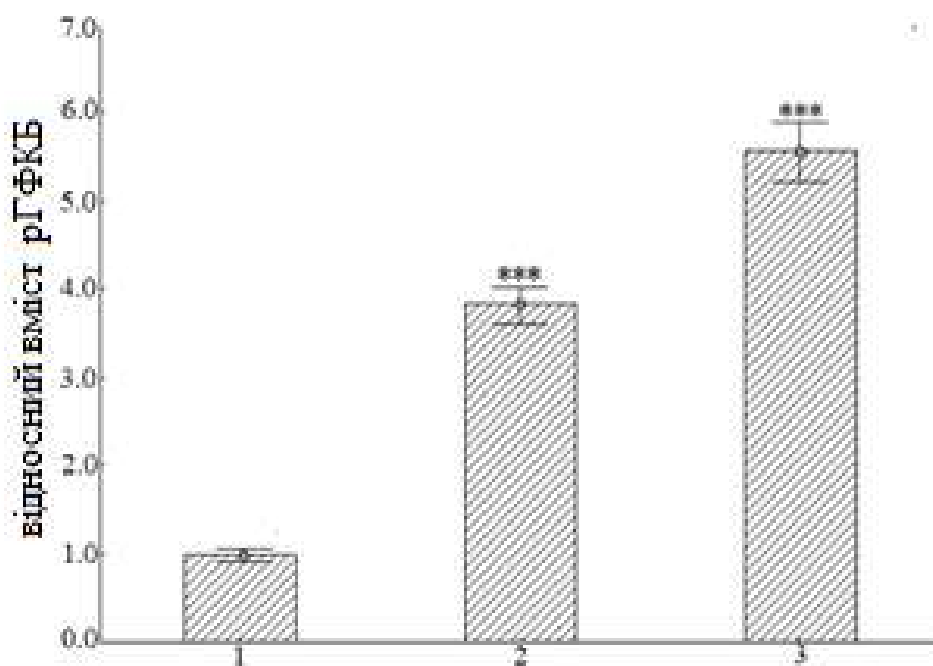


Рис. 6.5. Відносний вміст ГФКБ у цитозольній фракції білка мозку *N. tessellata*, (середнє значення вибірки та SD): 1 – контроль – природні біотопи (Майорова балка, n = 6); 2 – зона забруднення (ССЗ Придніпровської ТЕС, n = 6); 3 – зона забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь» р. Дніпро, n = 6); *** - P < 0,001

Значуще підвищення форми рГФКБ свідчить про підвищену регуляцію експресії білків проміжних філаментів та вивільнення окремих субодиниць з філаментних структур. Астрогліальна реакція супроводжується активною реорганізацією гліального цитоскелета (Nedzvetsky et al., 2006, Pekny et al., 2014).

Також виявленні значущі зміни у відношенні розчинної фракції ГФКБ до цитоскелетної у мозку змій, під впливом промислового навантаження. Подібне збільшення цього співвідношення було виявлено в обох групах вужів, що населяли забруднені території, у порівнянні з контролем (рис. 6.6).

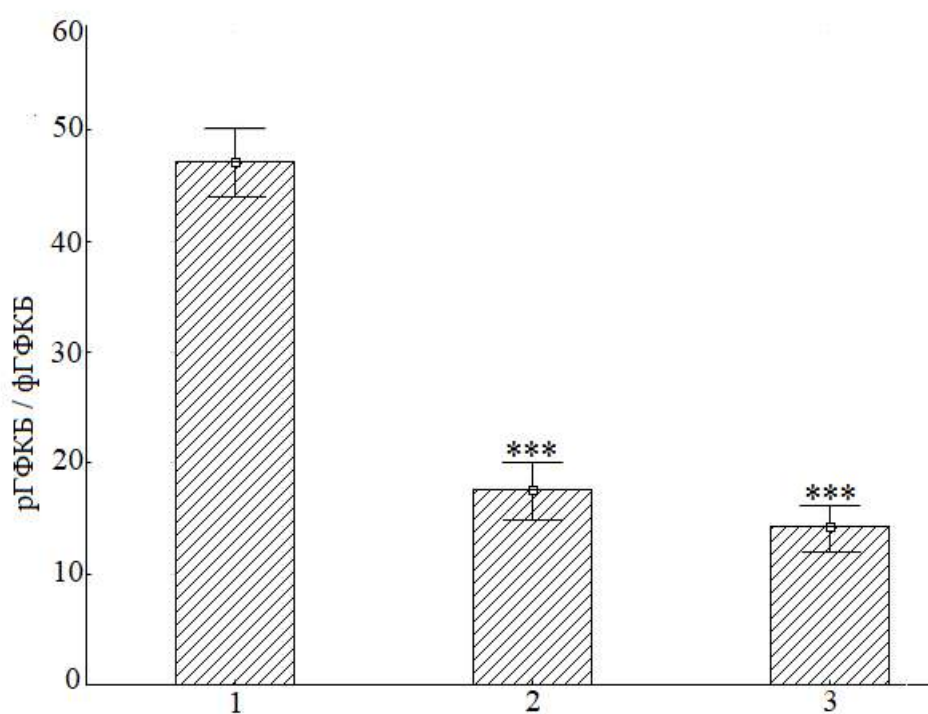


Рис. 6.6. Співвідношення цитоскелетної та розчинної фракцій ГФКБ мозку *N. tessellata*, (середнє значення вибірки та SD): 1 – контроль – природні біотопи (Майорова балка, n = 6); 2 – зона забруднення (ССЗ Придніпровської ТЕС, n = 6); 3 – зона забруднення (меткомбінат «Запоріжсталь» р. Дніпро, n = 6); *** - P < 0,001

рГФКБ / фГФКБ у особин, виловлених в санітарно-захисній зоні Придніпровської ТЕС, збільшився у 5,1 раза. Відповідне збільшення (в п'ять разів) характерне і для змій виловлених в м. Запоріжжя.

Незважаючи на високу стабільність проміжної структури філаментів у більшості еукаріотичних клітин, гліальні проміжні філаменти являють собою високодинамічну систему, яка бере участь у клітинній реакції на різні пошкодження нервової тканини (Eng et al., 2000). Отримані дані свідчать про те, що промислове забруднення спричиняє значні порушення в цитоскелетних структурах астроцитів мозку рептилій. Відмічене збільшення фГФКБ свідчить про інтенсивний синтез ГФКБ та фібрилогенез. Подібна активація характерна для індукованого астрогліозу, реактивації астроцитів у відповідь на дію несприятливих факторів. Астрогліоз являє собою адекватну реактивацію мозку, спрямовану на підтримку та захист нейронів та функціональну стабільність мозку в цілому (Yang, Wang, 2015).

Основний вміст ГФКБ, який екстрагується сечовиною, присутній в астроцитах у вигляді полімеризації в ниткоподібні нерозчинні структури цитоскелета. Розчинна фракція, як правило, складається з субодиниць, які були синтезовані в ендоплазматичному ретикулумі, але не брали участі в безпосередній полімеризації для побудови проміжних філаментів цитоскелета. Після полімеризації розчинних субодиниць у філаментні структури ГФКБ втрачає розчинність і може бути розчинений буфером з 4 М сечовиною. Співвідношення розчинної та цитоскелетної фракцій ГФКБ розглядається як адекватний молекулярний біомаркер стану цитоскелета астроцитів (David et al., 1997, Eng et al., 2000, Nedzvetsky et al., 2012).

Диференціальна оцінка розчинних та нерозчинних філаментних форм ГФКБ має головне значення для характеристики динамічної пластичності цитоскелета, яка сприяє реакції клітин на токсичні фактори, включаючи забруднення навколишнього середовища. Переробка розчинних субодиниць ГФКБ остаточно не зрозуміла; попри те, що спочатку GFAP був описаний як розчинний кислий білок, отриманий з гліальних клітин (Eng et al., 2000). Після синтезу розчинних субодиниць проміжні філаменти надзвичайно швидко поєднуються в структуру цитоскелета без витрат метаболічної енергії (Aebi et al., 1988). Фактори, що викликають ураження астроцитів,

посилюють експресію білків проміжних філаментів, що спричиняє динамічну перебудову цитоскелета. Необхідний баланс при перебудові цитоскелета може супроводжуватися видаленням окремих субодиниць з філаментної структури.

Значні зміни, що проявляються у збільшенні розчинної цитозольної фракції порівняно з філаментною, підтверджують також зменшення швидкості полімеризації субодиниць рГФКБ. Збільшення кількості розчинних фрагментів свідчить про активізацію реорганізації цитоскелета з подальшими морфологічними змінами в клітині. Подібний процес супроводжується відносним зменшенням відсотка нерозчинних білків цитоскелету до загальної кількості ГФКБ, як це було виявлено для рептилій, виловлених на забруднених ділянках.

На основі отриманих результатів імуноблотингу ми можемо зробити висновок про значну фрагментацію ГФКБ на чисельні фрагменти молекулярною масою 49–35 кДа як для фракцій рГФКБ, так і для фГФКБ. Характерне збільшення фрагментації ГФКБ відмічено для змій з обох досліджуваних забруднених територій. Беручи до уваги, що кожна проміжна філаментна структура, а також її субодиниці є високостійкими до спонтанної дисоціації, отримані результати свідчать про необхідну активацію протеолізу та наслідкові цитоскелетні перебудови в тканині мозку водяних вужів. Обмежений протеоліз може супроводжуватися розщепленням кальпаїнів і каспаз, що супроводжує патологію клітин (Gray et al., 2006, Chen et al., 2013). Крім того, Девід та співавтори повідомили, що збільшення вмісту розчинної ГФКБ в мозку людини пов'язане з порушенням мозкових функцій (David et al., 1997). Крім того, було встановлено, що Т-клітини-помічники виділяють гранзим В при контакті з астроцитами та викликають фрагментацію ГФКБ (Stopnicki et al., 2019). Отже, виявлена в нашому дослідженні фрагментація ГФКБ може бути визнана показником як виснаження астроцитів, так і послаблення мозкових функцій у змій, постраждалих від промислового забруднення.

Зростання рівня АФК у мозку змії з обох забруднених регіонів супроводжувалась збільшенням фрагментації ГФКБ. Точні механізми розщеплення проміжних філаментів поки точно не вивчені. Однак нещодавно Smerjas та співавтори продемонстрували індуковану карбонілюванням протеосомну деградацію білків цитоскелету (Smerjas et al., 2018). Карбонілювання – це неферментативна модифікація білків з додаванням альдегідів та / або кетонів. Ця модифікація є одним з основних наслідків, спричинених окислювальним стресом, і призводить до незворотного виснаження функціонування білка (Miksík, Deyl, 1997). Таким чином, виявлене в нашому дослідженні фрагментація ГФКБ може бути ініційована карбонілюванням гліальних проміжних ниток, яке відбувається як одна з аномалій, спричинених окислювальним стресом. З іншого боку, астроцити здатні реагувати своєю реакційною здатністю проти метаболічних порушень наступною адаптацією до хронічної токсичності (Volanos, 2016).

Крім того, нещодавно вивчалася важливість фрагментів ГФКБ в ідентифікації патології мозку людини (Zhang et al., 2014). Вплив фрагментації ГФКБ на мозок екзотермічних хребетних тварин, під впливом несприятливих факторів навколишнього середовища, залишається невідомим. Однак, враховуючи наші дані, ми можемо припустити, що промислове забруднення може пригнічувати функції астроцитів за допомогою регульованої фрагментації ГФКБ.

Попри велику кількість досліджень, що стосуються ролі ГФКБ у мозку деяких видів хребетних, існує обмежена кількість звітів про оцінку ГФКБ та його фрагментацію в мозку рептилій під токсичним впливом забруднювачів (Gasso et al. , 2010, Гассо и др., 2012). Експресія ГФКБ та перестановка гліальних проміжних філаментів безпосередньо пов'язана з астроцитами та функціонуванням мозку (Eng et al., 2000). Динамічний оборот ГФКБ є критично важливим для просування специфічної морфології у формі зірки, рухливості клітин та реактивності астроцитів у відповідь на різні типи токсичності. Більше того, ГФКБ є головним молекулярним біомаркером як

стану цитоскелета астроцитів, так і його реакційної здатності у формі астрогліозу. Астрогліоз підтверджується як явище, яке виникає через метаболічні, регуляторні та структурні порушення, спричинені різними стресовими факторами (Рекну et al., 2014). Астрогліоз спрямований головним чином на локалізацію пошкодження та підтримку життєвих сил ушкоджених нейронів.

Беручи до уваги, що астроцити відповідають за життєво важливі процеси в мозку ссавців, включаючи підтримку та відновлення пошкодження нейронів, отримані результати свідчать, що астроцити змії можуть виконувати подібну функцію при дії токсичності навколишнього середовища (Nedzvetsky et al., 2006; Lohren et al., 2015). Ми вивчали сукупний ефект реальної суміші та доз промислових забруднювачів, представлених у природних річкових біотопах, та його здатність ініціювати порушення нервових клітин. Незважаючи на чітку макроскопічну структуру та цитоархітектуру гліальних клітин рептилій у порівнянні з глією ссавців, отримані дані підтверджують гіпотезу про консервативну еволюційну роль клітин глії, включаючи клітинну реакцію на екзогенну токсичність (Miller, O'Callaghan, 2003). Більш того, астроцити деяких плазунів мають подібні біохімічні та фізіологічні властивості, як і у ссавців (Kálmán, Pritz, 2001; Baydas et al., 2003).

Порівняльний аналіз експресії ГФКБ у різних видів показав її присутність у основних ділянках мозку риб, ссавців та рептилій (Chiu, 1994; Nedzvetskii et al., 2001; Гассо и др., 2010; Малик, 2010; Каас, 2016). Дійсно, представництво та локалізація астроцитів мають специфічні для класу особливості (Miller, 2018). Незважаючи на різні фенотипи астроцитів, ГФКБ у всіх хребетних є надзвичайно консервативним за структурою та виконуваними функціями (Norenberg, 1994; Nedzvetsky et al., 2006; Tykhomyrov et al., 2000). Таким чином, отримані в результаті нашого дослідження докази того, що нейроглія рептилій, як і інших видів, можуть відігравати життєво важливу роль у підтримці та забезпеченні

функціонування нейронів завдяки астрогліозу та регуляції ГФКБ. Місцеве промислове забруднення ініціювало надмірне вираження ГФКБ, що могло б бути біомаркером згубного впливу несприятливих факторів. Нейрогліальні клітини життєво необхідні для підтримання гомеостазу мозку через захист від пошкоджень, спричинених різними цитотоксичними агентами. Як правило, астрогліоз супроводжується підвищеною регуляцією ГФКБ, великою перебудовою цитоскелету та гіпертрофією астроцитів (Рекну et al., 2014; Hol, Рекну, 2015). Гіпертрофія астроцитів вимагає підвищеного фібрилогенезу, який є основним показником реактивної реакції на токсичну травму мозку. Крім того, астроцити мають різні рецептори, що сприяють надзвичайно високій чутливості та реактивності проти множинних ефектів токсикантів (Sofroniew, Vinters, 2010).

У нашому дослідженні відмічене генерування АФК у мозку змії супроводжувалось активацією синтезу ГФКБ. Отже, окислювальний стрес може бути одним із стимуляторів астрогліозу в мозку змії. Крім того, порівняльний аналіз показав суттєві відмінності як рівня АФК, так і вмісту ГФКБ у мозку тварин, що населяють забруднені території, у порівнянні зі зміями з контрольної ділянки. Підвищена експресія та регуляція ГФКБ при хронічному впливі місцевого промислового забруднення дозволяють використовувати його як біомаркер промислового забруднення.

Попередні результати продемонстрували зв'язок рівня окисного стресу та активності астрогліозу в мозку щурів. Однак зв'язок між рівнем АФК та астрогліозом у мозку змії, під впливом промислових забруднень, представлений вперше.

6.6. Стан цитоскелетних молекулярних компонентів мозку *Natrix natrix* в умовах промислового забруднення екосистем

Дослідження вмісту ГФКБ у різних за фізико-хімічними властивостями білкових фракцій мозку статевозрілих особин *Natrix natrix* з біотопів заплавних екосистем правого берега р. Дніпро (м. Дніпро) та природних

лісових екосистем Присамарського міжнародного біосферного стаціонару ім. О. Л. Бельгарда показали загальну закономірність зростання всіх субодиниць - розчинних у буфері з низькою іонною силою та екстрагованих сечовиною. Вміст ГФКБ збільшується в групах тварин, що мешкають у зоні промислового забруднення (м. Дніпро) у порівнянні з тваринами з біотопів Присамарського міжнародного біосферного стаціонару ім. О. Л. Бельгарда.

Вміст нерозчинної філаментної фракції (фГФКБ) у мозку змій з забруднених біотопів підвищується у порівнянні з контрольною групою умовно чистих екосистем (рис. 6.7). фГФКБ мозку вужів, виловлених на території м. Дніпро, підвищений на 14,3% у порівнянні з тваринами з Самарського лісу (Присамарського міжнародного біосферного стаціонару ім. О. Л. Бельгарда). Збільшення фракції екстрагованої сечовиною свідчить про більш інтенсивний синтез ГФКБ та фібрилогенез. Подібна активація характерна для індукованого астрогліозу, реактивації астроцитів у відповідь на дію несприятливих факторів. Астрогліоз представляє собою адекватну реакцію мозку, спрямовану на підтримку та захист нейронів та функціональну стабільність організму в цілому.

Значущі зміни ГФКБ виявлені для цитозольної розчинної фракції (рГФКБ). Кількість рГФКБ змій виловлених на забрудненій території збільшується на 53,2% у порівнянні з умовно чистими екосистемами (рис. 6.8).

Значуще підвищення вмісту розчинної форми ГФКБ свідчить про інтенсивну експресію білка проміжних та вивільненні окремих субодиниць з філаментних структур. У ході астрогліального реактивного відбору відбувається активна реорганізація цитоскелета.

Аналіз співвідношення розчинної фракції до цитоскелетної показав статистично достовірні відмінності між досліджуваними популяціями (рис. 6.9). співвідношення рГФКБ / фГФКБ особин виловлених на території м. Дніпро збільшується на 44,1%.

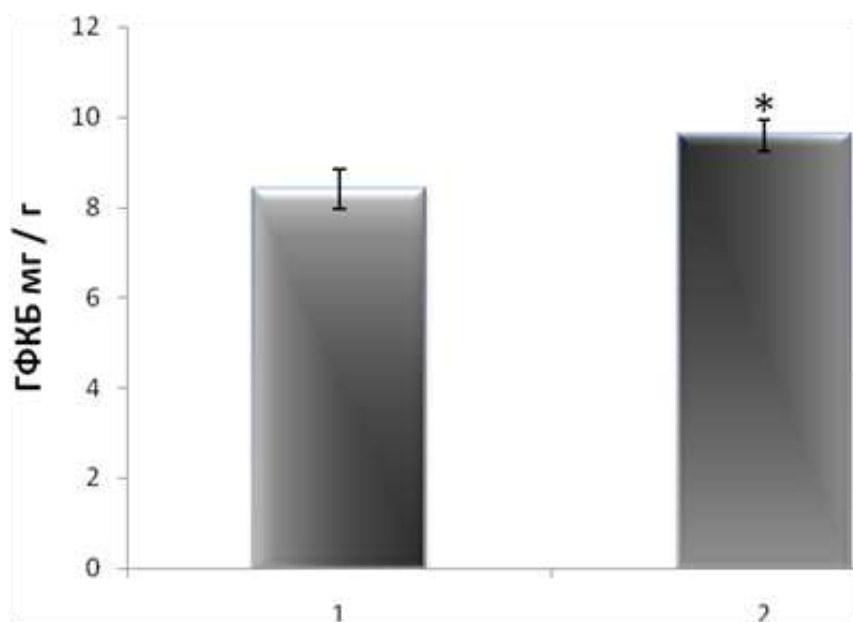


Рис. 6.7. Вміст ГФКБ в цитоскелетній фракції білка мозку *Natrix natrix*: 1 – Самарський ліс (ПМБС ім. О. Л. Бельгарда); 2 – зона забруднення (р. Дніпро, м. Дніпро): * – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана–Уїтні з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення)

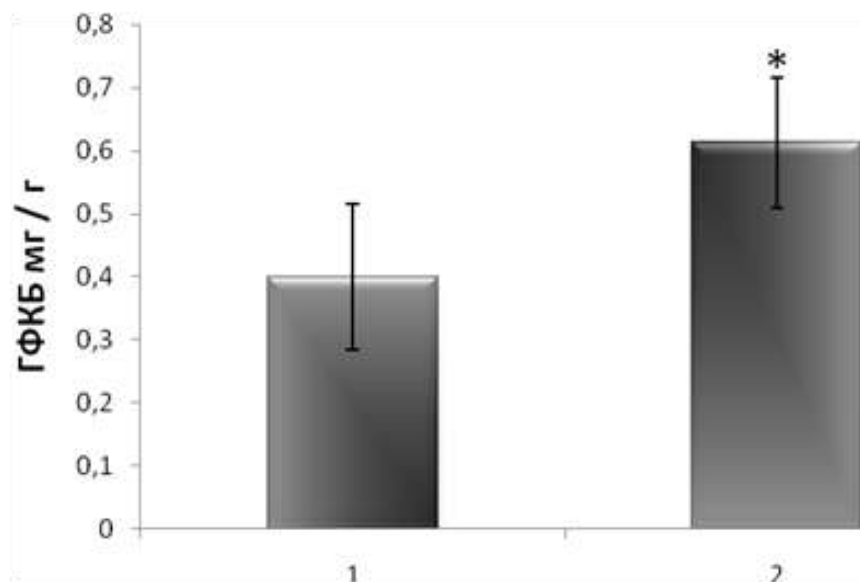


Рис. 6.8. Вміст ГФКБ в розчинній фракції білка мозку *Natrix natrix*: 1 – Самарський ліс (ПМБС ім. О. Л. Бельгарда); 2 – зона забруднення (р. Дніпро, м. Дніпро): * – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана – Уїтні з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення)

Відмінності у підвищенні цитозольної фракції в порівнянні з філаментною свідчить також про зменшення швидкості полімеризації субодиниць рГФКБ. Відомо, що після синтезу розчинних субодиниць, проміжні філаменти надзвичайно швидко включаються до складу цитоскелетних структур. При дії ушкоджуючих факторів відбувається підвищення експресії білків проміжних філаментів з активною реорганізацією цитоскелета, що забезпечується визволенням окремих суб'єктів з філаментних структурами. Таке підвищення вмісту розчинних фрагментів свідчить про активацію цитоскелетних перебудов та морфологічних змін. Подібний процес забезпечує відповідне зниження вмісту ГФКБ у фракції нерозчинних цитоскелетних білків, що було виявлено у рептилій виловлених із забрудненого регіону.

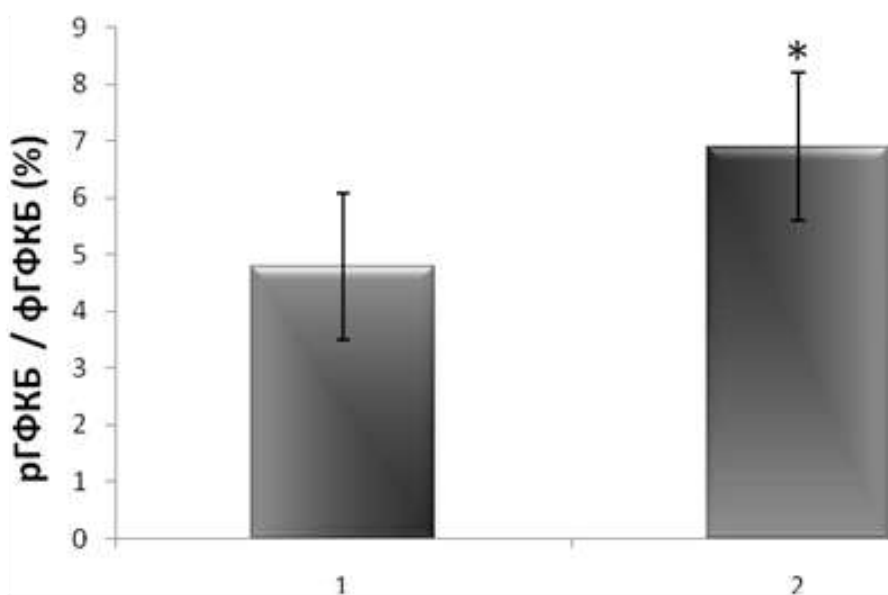


Рис. 6.9. Співвідношення розчинної та цитоскелетної фракцій ГФКБ мозку *Natrix natrix*: 1 – Самарський ліс (ПМБС ім. О. Л. Бельгарда); 2 – зона забруднення (р. Дніпро, м. Дніпро): * – $P < 0,05$ (за U-критерієм Мана–Уїтні з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення).

Результати імуноблотингу (рис. 6.10) демонструють збільшення поліпептидних фрагментів з молекулярною масою 49–35 кДа для окремих

фракцій. Отримані дані свідчать про цитоскелетні перебудови в головному мозку звичайного вужа.

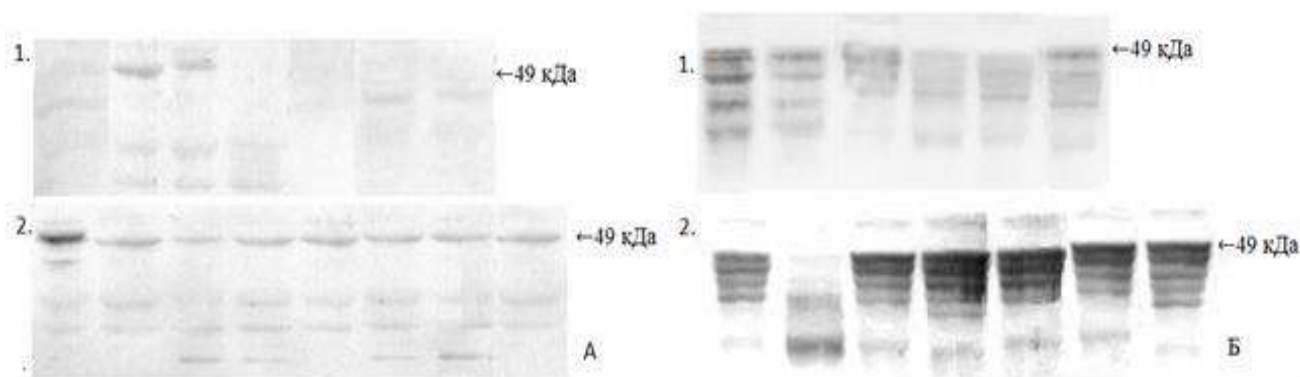


Рис. 6.10. Результати імуноблотингу цитозольної (А) та цитоскелетної (Б) фракції білків головного мозку *Natrix natrix*: 1 – Самарський ліс (Присамарський міжнародний біосферний стаціонар ім. О. Л. Бельгарда); 2– зона забруднення (р. Дніпро, м. Дніпро).

Збільшення вмісту білка гліальних філаментів свідчить про збільшення кількості субпопуляцій окремих гліоцитів, у першу чергу, за рахунок диференціації гліальних попередників у зрілих астроцитах. Під час диференціації в астроцитах активізується експресія білки гліальних проміжних філаментів (Norton et al., 1992). Астроцити - спеціалізовані гліальні клітини, число яких більше ніж у п'ять разів перевищує кількість нейронів у ЦНС. Вони щільно, подібно черепиці, покривають поверхню нейронів і виконують багато важливих складних функцій. Астроцити відповідають на всі форми інсультів через посередництво характерного процесу, який отримав назву «астрогліоз» (Ridet et al., 1997; Kálmán, Szabó, 2001; Clements et al., 2009, Недзвецкий и др., 2011). Астрогліоз індукується різними за природою факторами, являє собою ознаку патогенетичних та структурних пошкоджень ЦНС.

6.3. Стан цитоскелетного молекулярного маркера гліоцитів мозку водяних вужів в умовах водойм різного ступеня засоленості

Визначення вмісту ГФКБ мозку вужів з біотопів Тилігульського лиману (Миколаївська область), біотопів, що прилягають до території Національного природного парку «Великий Луг» та Майорової балки (с. Майорка, Дніпро район, Дніпропетровська область) показало значущі відмінності між всіма трьома групами. Відмінності виявленні для цитоскелетної та розчинної фракцій. В той же час, в мозку вужів усіх груп не визначено достовірної різниці за вмістом загального білка в цих же фракціях (рис. 6.11). Таким чином, загальний метаболізм білків не відрізняється в усіх досліджених групах тварин.

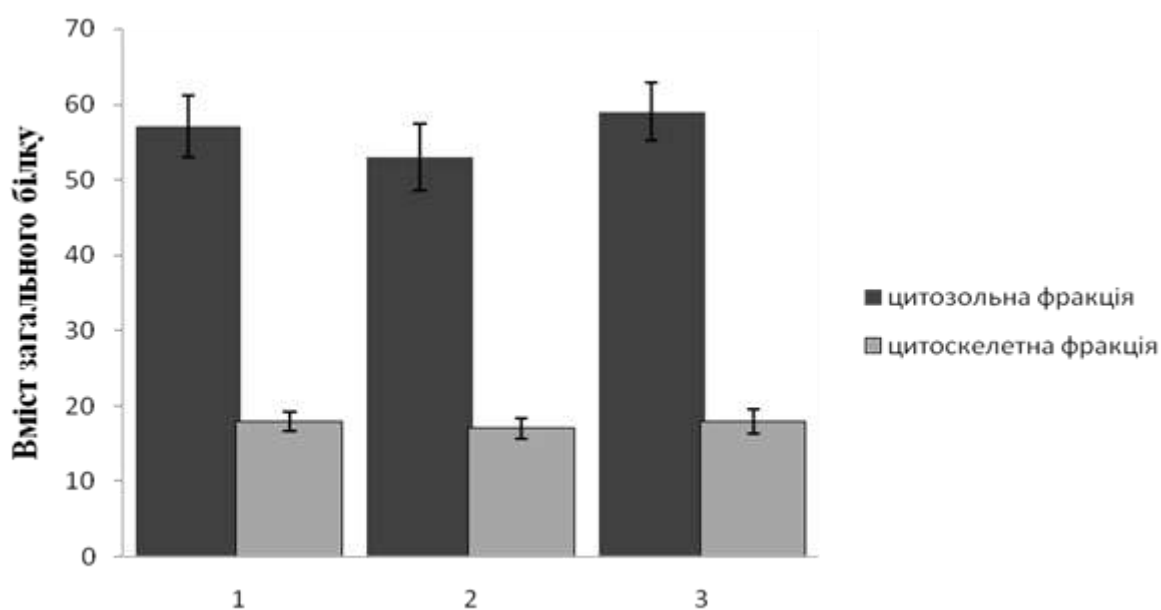


Рис. 6.11. Вміст загального білку цитозольної та цитоскелетної фракцій: 1 – Національний природний парк «Великий Луг»; 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка); 3 – Тилігульський лиман (Миколаївська область).

Дослідження специфічних молекулярних маркерів мозку вужів із різних біотопів виявило, що відносний вміст цитозольної розчинної фракції (рГФКБ) мозку вужа водяного із Тилігульського лиману достовірно

підвищується у порівнянні з особинами взятими з біотопів Національного природного парку «Великий Луг» та . Майорової балки (рис. 6.12).

Збільшення розчинної форми ГФКБ може бути наслідком як інтенсивної експресії білка проміжних філаментів, так і вивільнення окремих субодиниць з філаментних структур. У ході астрогліальної реактивної відповіді відбувається активна реорганізація цитоскелету і, ймовірно, реалізуються обидва ці шляхи (Гассо и др., 2012).

Надмірне підвищення вмісту цих деградованих поліпептидів ГФКБ, котрі утворюються в результаті протеолітичного розщеплення цитоскелетних структур, свідчить про активацію цитоскелетних перебудов, порушення стану цитоскелету, морфологічних та функціональних клітин нервової тканини.

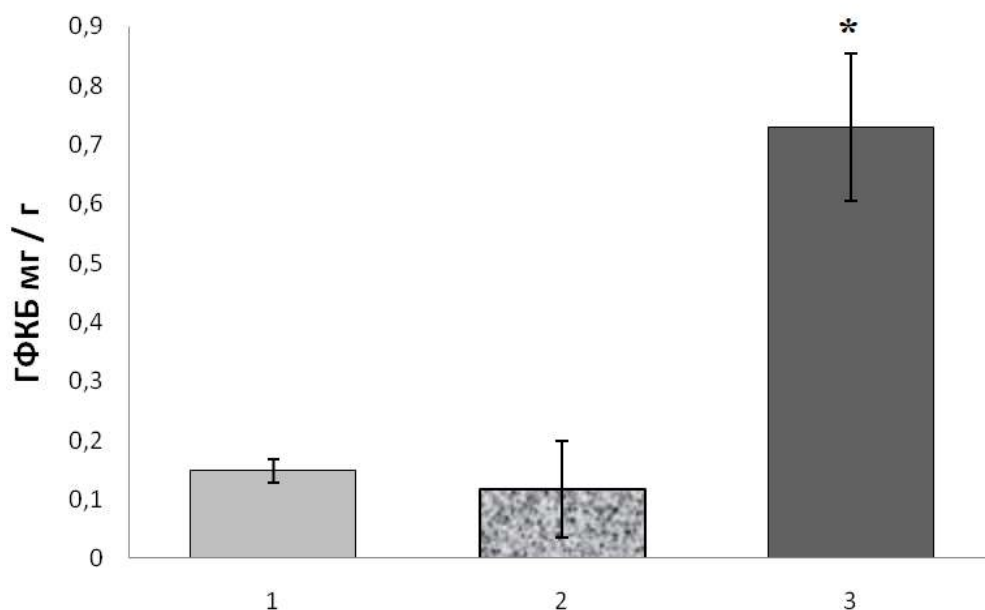


Рис. 6. 12. Порівняльний вміст розчинної фракції ГФКБ в мозку *N. tessellata*: 1 – Національний природний парк «Великий Луг»; 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка); 3 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); * – $P < 0,05$ (за методом Крускала-Уолліса з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення).

Відносний вміст цитоскелетного маркера філаментної (нерозчинної) фракції (фГФКБ) мозку вужів з Тилігульського лиману (Миколаївська

область) значуще підвищувався у порівнянні з особинами взятими з біотопів Національного природного парку «Великий Луг» та . Майорової балки (с. Майорка, Дніпропетровський район, Дніпропетровська область) (рис. 5.13). Разом з тим, вміст (фГФКБ) мозку вужів з НПП «Великий Луг» значно підвищується у порівнянні зі зміями, виловленими на території с. Майорка.

Підвищення вмісту білку в фракції екстрагованої сечовиною свідчить про більш інтенсивну експресію ГФКБ, а також фібрилогенез, який є головним показником реактивної відповіді астроцитів на пошкодження різної природи. Астрогліоз є адекватною реакцією мозку, яка спрямована на захист та підтримання нейронів і функціональної стабільності всього організму. Подібна активація характерна для індукованого астрогліозу, тобто реактивації астроцитів у відповідь на дію несприятливих ушкоджуючих чинників.

Виявлення змін в експресії ГФКБ свідчить про значні метаболічні порушення, викликані дією стресових факторів в нервовій системі.

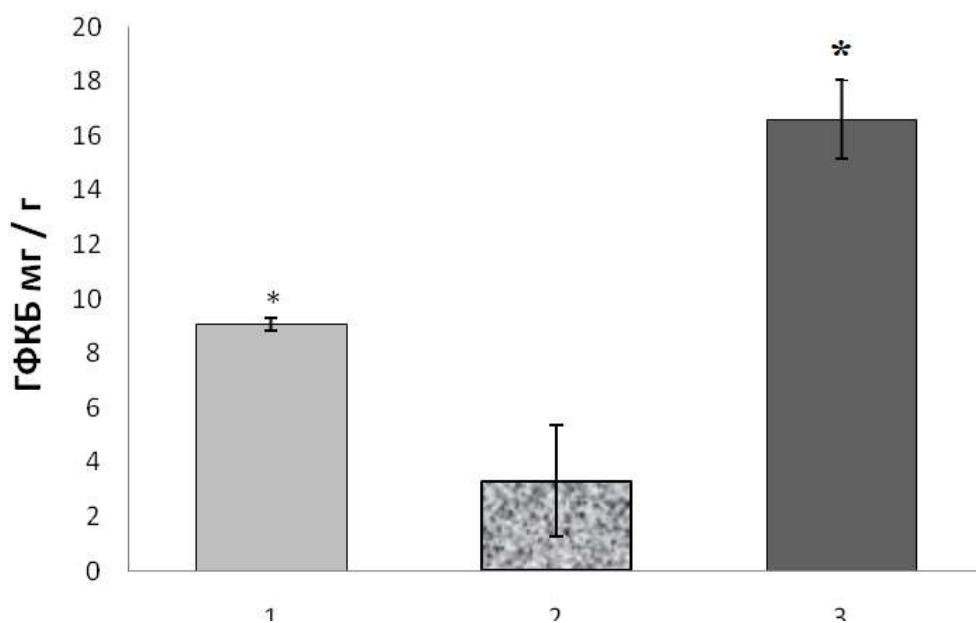


Рис. 6.13. Порівняльний вміст філаментної форми ГФКБ в мозку *N. tessellata*: 1 – Національний природний парк «Великий Луг»; 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка); 3 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); * – $P < 0,05$ (за методом Крускала-Уолліса з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення).

Таким чином, стан гліального цитоскелету розглядається, як показник токсичного впливу певних чинників. Отримані дані дозволяють розглядати стан цитоскелету гліальних клітин в якості надійного маркера негативного впливу факторів навколишнього середовища.

Дослідження співвідношення розчинної фракції до цитоскелетної показали значущі відмінності в експресії ГФКБ мозку *N. tessellata* взятих з біотопів Тилігульського лиману в порівнянні з іншими регіонами (рис. 6.14). Для даного біотопу відмічене відносне збільшення кількості рГФКБ з одночасним зменшенням фГФКБ.

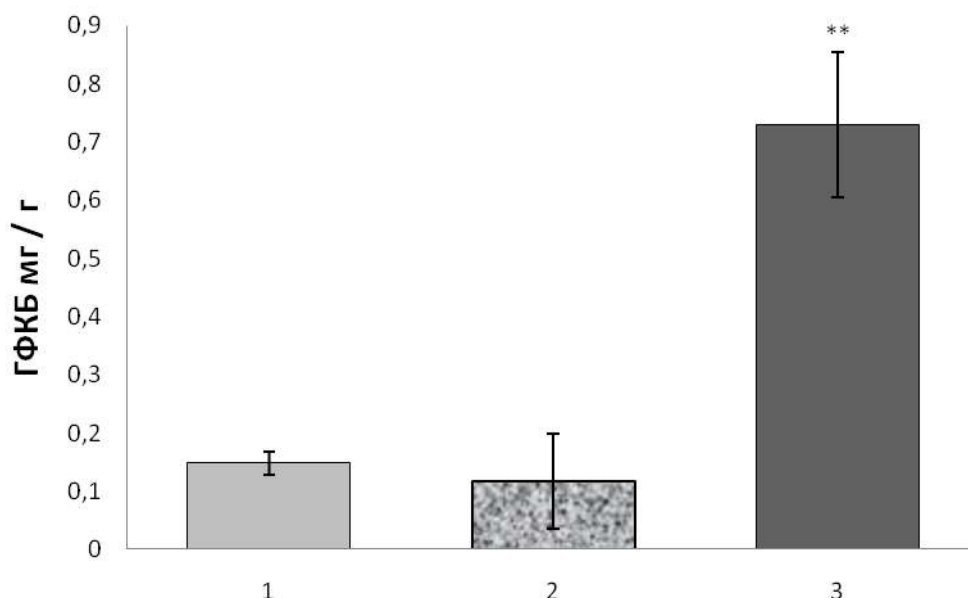


Рис. 6.14. Відношення вмісту ГФКБ цитозольної та цитоскелетної фракцій в мозку *N. tessellata*: 1 – Національний природний парк «Великий Луг»; 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка); 3 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); * – $P < 0,05$ (за методом Крускала-Уолліса з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення).

Враховуючи, що після синтезу розчинних субодиниць проміжні філаменти, надзвичайно швидко включаються в склад цитоскелетних структур, можна припустити наступні варіанти. При дії несприятливих

факторів збільшується інтенсивність експресії білка проміжних філаментів з активною реорганізацією цитоскелету з вивільненням окремих субодиниць з філаментних структур. Можливо припустити, що додатково відбувається ініціювання підвищення вмісту цитозольної фракції ГФКБ за рахунок зменшення швидкості їх полімеризації.

На основі даних імуноблотингу (рис. 6.15.) можна заключити, що як для зразків рГФКБ, так і для фГФКБ мозку змії з біотопів Тилігульського лиману, відмічене збільшення поліпептидних фрагментів з молекулярною масою 49–35 кДа. Отримані результати свідчать про суттєву активацію протеолізу та цитоскелетних перебудов в головному мозку водяних вужів.

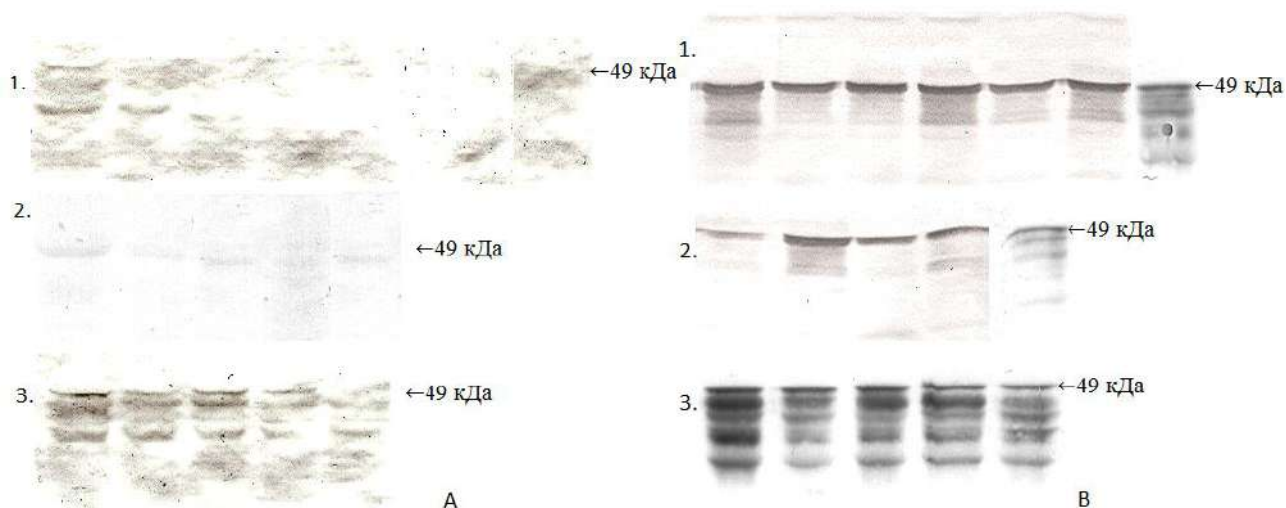


Рис. 6.15. Результати імуноблотингу цитозольної (А) та цитоскелетної (В) фракції білків головного мозку водяного вужа: 1 – Національний природний парк «Великий Луг»; 2 – природні екосистеми р. Дніпро (Майорова балка); 3 – Тилігульський лиман (Миколаївська область); * – $P < 0,05$ (за методом Крускала-Уолліса з використанням середнього значення та середньоквадратичного відхилення).

Перебудова проміжних філаментів астроглії може бути необхідною умовою для адекватного функціонування гліальних клітин при впливі ушкоджуючих факторів. Отримані результати дозволяють передбачити, що на підвищення вмісту білку гліальних проміжних філаментів в обох фракціях

в мозку вужів відібраних з біотопів Тилігульського лиману вплинула солоність даного водойму. Надлишок різних іонів (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , Br^-) в організмі змій потрапляє при заковтуванні здобичі.

Так само, як і в інших біологічних видів, у рептилій нейроглія грає життєво важливу роль у підтримці та забезпеченні функціонування нейронів. Особливо важливі клітини нейроглії для підтримки гомеостазу в мозку, репарації ушкоджень, захисту нейронів від різних впливів. На сьогоднішній момент описані множинні функції головних клітин нейроглії – астроцитів. Дані клітини очищають позаклітинний простір від надлишку медіаторів та іонів, від токсичних сполук, сприяючи чистоті проведення нервового імпульсу. Крім того, астроцити самі виробляють цілий спектр активних сполук (медіатори, трофічні фактори) (Chiu, 1994). Особливо важлива роль відводиться астроцитам у процесах відновлення пошкоджених частин ЦНС. Астроцити регулюють локально рН і іонний баланс. При наявності шкідливого чинника відзначається збільшення проліферації астроцитів і посилення фіброліза (Norenberg, 1994). Астроцити експресують широкий набір рецепторів, що пояснює їх надзвичайно високу чутливість і реактивність на великий спектр різних факторів (Sofroniew, Vinters, 2010).

Висновки по розділу

1. Виявлено цитоскелетні перебудови в гліальних клітинах мозку змій, які мешкають в екосистемах, що піддаються негативному впливу промислових забруднювачів.

2. Високий рівень експресії ГФКБ астроцитів характеризує важливу частину клітинної відповіді ЦНС, швидку реакцію астроцитів на дію ушкоджуючих факторів. Цитоскелетні перебудови супроводжуються ферментативним протеолізом, активацією синтезу ГФКБ і збільшенням вмісту деградованих поліпептидів. Це дозволяє розглядати ГФКБ як надійний та достовірний маркер токсичного впливу хімічних забруднювачів навколишнього середовища, за допомогою якого можна оцінити пошкодуючі ефекти на ранніх етапах їх проявів.

3. Незважаючи на обмежені дані щодо біології гліальних клітин мозку рептилій, спостережувані результати доводять, що астроцити змії можуть реагувати на токсичний вплив навколишнього середовища, використовуючи типову астрогліальну реакцію. Узагальнюючи представлені дані, можемо констатувати, що експресія ГФКБ та його фрагментація у *N. tessellata* є дійсними біомаркерами впливу промислового забруднення на організми і популяції.

4. Стан гліального цитоскелета, який розглядається як показник токсичного впливу хімічних забруднювачів довкілля та вважається перспективним для використання у біомоніторингу, може піддаватися впливу інших хімічних чинників, які не вважаються забруднювачами. Виявлено, що солоність водойм може викликати збільшення вмісту молекулярних маркерів ураження нервової тканини мозку у вужів. Тому розуміючи, що стан цитоскелету гліальних клітин є надійним маркером негативного впливу факторів навколишнього середовища, необхідно враховувати можливий вплив інших несприятливих для виду екологічних факторів при використанні показників ГФКБ для ранньої діагностики екотоксичних впливів на тварин.

Перелік посилань

1. Aebi, U., Häner, M., Troncoso, J., Eichner, R., & Engel, A. (1988). Unifying principles in intermediate filament (IF) structure and assembly. *Protoplasma*, 145(2–3), 73–81.
2. Baydas, G., Reiter, R. J., Nedzvetskii, V. S., Yaşar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., & Canatan, H. (2003). Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicology letters*, 137(3), 169–174.
3. Bolaños, J. P. (2016). Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, 139(Suppl. 2), 115–125.
4. Chen, M. H., Hagemann, T. L., Quinlan, R. A., Messing, A., & Perng, M. D. (2013). Caspase cleavage of GFAP produces an assembly-compromised

- proteolytic fragment that promotes filament aggregation. *ASN Neuro*, 5(5), AN20130032.
5. Chiu, S. Y., & Kriegler, S. (1994). Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. *Glia*, 11(2), 191–200.
 6. Clements, W. H., & Rohr, J. R. (2009). Community responses to contaminants: Using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1789–1800.
 7. David, J. P., Ghozali, F., Fallet-Bianco, C., Watzet, A., Delaine, S., Boniface, B., Di Menza, C., & Delacourte, A. (1997). Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neuroscience Letters*, 235(1–2), 53–56.
 8. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP—thirty—one years (1969–2000). *Neurochemical Research*, 25(9–10), 1439–1451.
 9. Gray, B. C., Skipp, P., O'Connor, V. M., & Perry, V. H. (2006). Increased expression of glial fibrillary acidic protein fragments and mu-calpain activation within the hippocampus of prion-infected mice. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 1), 51–54.
 10. Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, (32), 121–130.
 11. Kaas, J. H. (2016). *Evolution of Nervous Systems*. Academic Press, Cambridge.
 12. Kálmán, M., & Pritz, M. B. (2001). Glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of a Crocodylian, *Caiman crocodylus*, and its bearing on the evolution of astroglia. *Journal of Comparative Neurology*, 431(4), 460–480.
 13. Kálmán, M., & Szabó, A. (2001). Immunohistochemical investigation of actinanchoring proteins vinculin, talin and paxillin in rat brain following lesion: A moderate reaction, confined to the astroglia of brain tracts.

Experimental Brain Research, 139(4), 426–434.

14. Lohren, H., Blagojevic, L., Fitkau, R., Ebert, F., Schildknecht, S., Leist, M., & Schwerdtle, T. (2015). Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, (32), 200–208.
15. Miksik, I., & Deyl, Z. (1997). Post-translational non-enzymatic modification of proteins. II. Separation of selected protein species after glycation and other carbonyl-mediated modifications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 699(1–2), 311–345.
16. Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2003). Elevated environmental temperature and methamphetamine neurotoxicity. *Environmental Research*, 92(1), 48–53.
17. Miller, S. J. (2018). Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 401.
18. Nedzvetskii, V. S., Nerush, P. A., Tikhomirov, A. A., & Romanenko, L. A. (2001). Effects of ionizing radiation and aluminum chloride on protein of glial intermediate filaments in the rat brain. *Neurophysiology*, (33), 28–33.
19. Nedzvetsky, V. S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A. A., & Baydas, G. (2006). Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochemistry (Mosc)*, 71(3), 239–244.
20. Norenberg, M. D. (1994). Astrocyte responses to CNS injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 53(3), 213–220.
21. Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F. C., & Brosnan, C. F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochemical research*, 17(9), 877–885.
22. Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, (565), 30–38.
23. Ridet, J. L., Privat, A., Malhotra, S. K., & Gage, F. H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in neurosciences*, 20(12), 570–577.

24. Smerjac, S. M., Zheng, J., Hu, C. L., & Bizzozero, O. A. (2018). The role of calpain and proteasomes in the degradation of carbonylated neuronal cytoskeletal proteins in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochemical Research*, 43(12), 2277–2287.
25. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35.
26. Stopnicki, B., Blain, M., Cui, Q. L., Kennedy, T. E., Antel, J. P., Healy, L. M., & Darlington, P. J. (2019). Helper CD4 T cells expressing granzyme B cause glial fibrillary acidic protein fragmentation in astrocytes in an MHCII-independent manner. *Glia*, 67(4), 582–593.
27. Tykhomyrov, A. A., Nedzvetsky, V. S., Klochkov, V. K., & Andrievsky, G. V. (2008). Nanostructures of hydrated C60 fullerene (C60HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals. *Toxicology*, 246(2–3), 158–165.
28. Yang, Z., & Wang, K. K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364–374.
29. Zhang, Z., Zoltewicz, J. S., Mondello, S., Newsom, K. J., Yang, Z., Yang, B., Kobeissy, F., Guingab, J., Glushakova, O., Robicsek, S., Heaton, S., Buki, A., Hannay, J., Gold, M. S., Rubenstein, R., Lu, X. C., Dave, J. R., Schmid, K., Tortella, F., Robertson, C. S., & Wang, K. K. (2014). Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *PLoS One*, 25, 9(3), e92698.
30. Гассо, В. Я., Клименко, Е. Ю., & Недзвецкий, В. С. (2010). Состояние цитоскелетных молекулярных компонентов мозга прыткой ящерицы как биомаркер нарушений, индуцированных промышленным загрязнением. *Экология та ноосферология*, 21(1–2), 98–104.
31. Гассо, В. Я., Клименко, О. Ю., Сухаренко, Е. В., & Недзвецкий, В. С. (2012). Оценка негативного эффекта загрязнения биогеоценозов с использованием нейроспецифического цитоскелетного белка прыткой

ящерицы. Экология и ноосферология, 23(1-2), 58–66.

32. Малик, М. Г. (2010). Використання гліального фібрилярного кислого білка мозку риб у діагностиці стану природного середовища. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія, 18(1), 92–97.
33. Недзвецкий, В. С., Сухаренко, Е. В., Неруш, О. П. (2011). Биологическая и социальная значимость использования молекулярных компонентов с целью определения метаболических нарушений, вызванных ионами алюминия. Ученые записки РГСУ, (4), 192–196.

РОЗДІЛ 7

ЕКОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВОДЯНИХ ВУЖІВ У РЕПРОДУКТИВНИЙ ПЕРІОД В УМОВАХ КАХОВСЬКОГО ВОДОСХОВИЩА

На біотопах що межують з територією Національного природного парку «Великий Луг» по берегу Каховського водосховища водяні вужі зустрічаються уздовж кам'янистих берегах. Максимальна щільність відмічена на ділянках кам'янистих берегів з деревною рослинністю, а також в невеликих заводях – до 10 особин на м². Такі місця надають зміям надійне укриття та оптимальні умови для полювання і баскінгу. Середня чисельність *N. tessellata* на території НПП «Великий Луг» становить 15,2 ос./100 м берегової лінії. Статева структура популяції в період дослідження характеризується переважанням самців – 64%.

Дослідження показали, що загальна довжина тіла та вага самиць достовірно переважають показники самців – на 26,5% та 144% (визначається вагітністю) відповідно (табл. 7.1).

Таблиця 7.1.

Розмірно-вагова характеристика популяції водяного вужа

Показник ¹	Lim		x ± SD		t
	♂♂	♀♀ вагітні	♂♂	♀♀ вагітні	
L.corp., см	33,5 – 71,5	63,7 – 75,5	52,9±9,4	66,9±5,5	*2,7
L.cd., см	8,0 – 17,5	14,3 – 16,0	14,1±2,3	14,7±0,9	1,1
L.total., см	41,0 – 89,0	78,0 – 90,5	67,0±11,7	81,6±6,4	2,2
L.corp./L.cd.	3,7 – 4,2	4,5 – 4,7	3,9±0,1	4,6±0,1	*6,1
m, г	16,6 – 165,2	90,7 – 213,0	67,0±33,7	163,6±49,2	*3,1
A	1,9 – 2,6	2,4 – 3,2	2,4±0,2	2,9±0,2	*3,6

Примітка: L.corp, - довжину тулуба, (L.cd -довжину хвоста, L.total - загальна довжина тіла; m - маса тіла; A - показник вгодованості ($A = m / L.total^3 \times 10^4$); x –

середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення; * – $P < 0,05$ (за t-критерію Стьюдента).

При цьому спостерігається достовірно вищий (на 21 %) коефіцієнт «вгодованості» самок у порівнянні з самцями. Такі зміни також закономірні в силу збільшення ваги самиць під час вагітності.

Співвідношення $L.\text{corp.}/L.\text{cd.}$ самок достовірно ($p < 0,01$) вище (на 16 %) ніж у самців, що можна оцінювати як статевий диморфізм (Булахов, 2007).

Представлені параметри водяного вужа перебувають у межах показників, описаних для інших біотопів даного виду (Прилипко, 2014; Werner, Sharira, 2011).

Підтверджена позитивна кореляція між розмірами самиць і плодючістю: $r = 0,842$ (рис. 7.1). Найбільша самка ($L.\text{corp.} = 755$ мм) мала 16 сформованих яєць. Найменше число яєць (11) знайдено у самиці довжиною тіла 637 мм. Подібна кореляція відмічена також для самок звичайного вужа (Гаранин, 1983; Моднов, 2010).

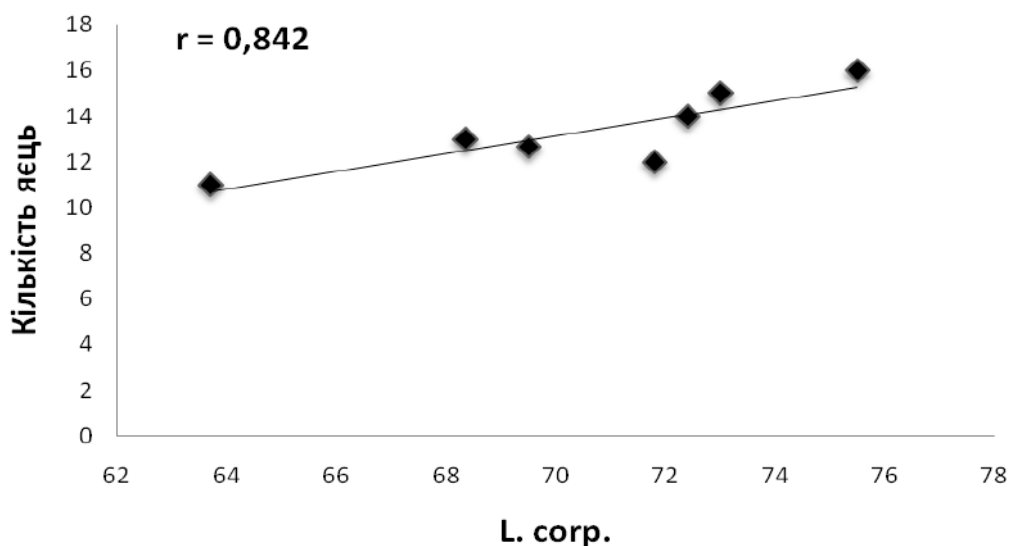


Рис. 7.1. Кореляція довжини тулуба ($L.\text{corp.}$, см) і плодючості самок *N. tessellata*.

Визначення біохімічних показників сироватки крові водяного вужа в період репродуктивної активності показали цілу низку відмінностей у

вагітних самиць. У них кількість загального білка значуще підвищується на 64,7 %. При цьому кількість альбумінів збільшується на 73,3 %, а глобулінів – на 33 %. Відповідно певні зміни відбулися й у значенні білкового коефіцієнту (збільшення на 80 %) (табл.7.2).

Таблиця 7.2.

Характеристика біохімічних показників сироватки крові водяного вужа
в репродуктивний період

Показник	Lim		x ± SD	
	♂♂♀♀	♀♀ вагітні	♂♂♀♀	♀♀ вагітні
Загальний білок, г/л	48,0 – 55,0	74,0 – 95,0	51 ± 1,7	84 ± 5,5*
Альбуміни, г/л	26,0 – 31,0	36,0 – 62,0	30 ± 2,0	52 ± 8,0*
Глобуліни, г/л	21,0 – 26,0	21,0 – 38,0	24 ± 1,9	32 ± 5,5*
Білковий коеф.	0,4 – 1,3	0,9 – 2,9	1 ± 0,2	1,8 ± 0,6
Сечовина, ммоль/л	0,1 – 6,0	0,4 – 0,8	3,2 ± 1,3	0,5 ± 0,13*
Азот сечовини, мг/дл	0,2 – 11,5	0,7 – 1,5	6,1 ± 2,4	1,0 ± 0,2*
Креатинін, мкмоль/л	8,0 – 16,0	1,0 – 3,0	9,0 ± 2,7	1,7 ± 0,67*
АСТ, од/л	49 – 143	59 – 269	53 ± 32,2	144 ± 62,5
АЛТ, од/л	56 – 143	77 – 197	72 ± 28,1	149 ± 36,1
Індекс де Рітіса, од.	0,3 – 1,7	0,3 – 3,5	0,8 ± 0,5	1,5 ± 1,02
Лужна фосфатаза, од/л	74 – 157	52 – 75	87 ± 28,2	66 ± 7,17
Загальний Са, ммоль/л	2,54 - 3,81	2,49 - 3,17	3,56 ± 0,4	19,0 ± 1,45*
Фосфор неорг., ммоль/л	1,4 - 4,47	16,01 - 20,5	1,8 ± 0,9	2,7 ± 0,22
Співвідношення Са : Р	0,9 - 2,3	4,5 - 9,1	1,9 ± 0,4	6,7 ± 1,2*
Холестерол, ммоль/л	4,9 - 8,59	2,3 - 3,5	7,79 ± 1,00	3,0 ± 0,3*
Сечова кислота, мкмоль/л	7,72 - 958	12,13 - 16,17	461 ± 271,6	13,7 ± 1,3*

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення;
* – P < 0,05 (за U-критерієм Мана – Уїтні).

Виявилося, що під час вагітності кількість сечовини, азоту сечовини, сечової кислоти та рівень креатиніну в крові самок зменшується відповідно на 80 %, 84 %, 97 % та 83%. Рівень кальцію у самок рептилій в період

вагітності значно підвищується – більш ніж у п'ять разів. Разом з тим, кількість неорганічного фосфору в крові самиць достовірно не збільшується. Відповідно індекс Са : Р підвищується (у 3,5 рази). За іншими показниками достовірних відмінностей не виявлено. Попередні дослідження вужів показали, що достовірних статевих відмінностей у біохімічних показниках крові, що досліджувалися, не виявлено. Тому показники самців та невагітних самиць можна об'єднати.

Біохімічні показники крові рептилій можуть використовуватися для оцінки впливу навколишнього середовища (Jacopson et al., 1991; Pages et al., 1992; Raphael et al., 1994). Однак на їхнє значення можуть впливати різні зовнішні та внутрішні фактори (Dickinson et al., 2002; Knotková et al., 2002; Lopez-Olvera et al., 2003; Keller et al., 2004; Metin et al., 2006). До значущих зовнішніх факторів можна віднести температуру, сезонність, забруднення (Peterson, 2002; Akbulut et al., 2010).

В ході дослідження вмісту ГФКБ мозку самців та самиць *N. tessellata* взятих з біотопів Національного природного парку «Великий Луг» не виявлено достовірних відмінностей для обох фракцій (рис. 7.2). Відношення вмісту ГФКБ цитозольної та цитоскелетної фракцій самиць водяного вужа також статистично не відрізняється від даних показників у самців.

Основну кількість ГФКБ складає цитоскелетна фракція. Розчинна фракція являє собою субодиниці, які після синтезу в ендоплазматичному ретикулумі ще не встигли включитись до складу проміжних філаментів. Після полімеризації розчинних субодиниць в філаментні структури, ГФКБ втрачає розчинність і може бути екстрагований за допомогою буферу з 2-4 М сечовини. Співвідношення вмісту цитоскелетної та розчинної фракції розглядається як адекватний показник стану цитоскелету астроцитів (Клименко, Гассо, 2009).

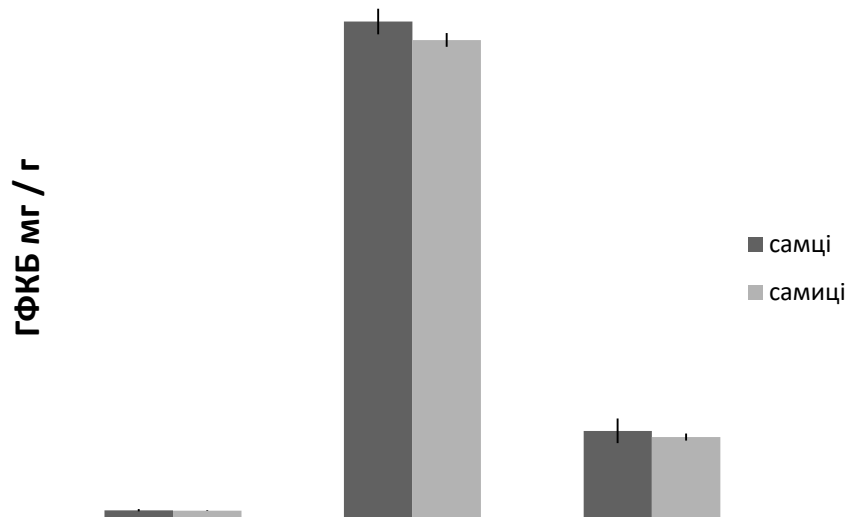


Рис. 7.2. Порівняльний вміст ГФКБ в мозку *N. tessellata*: 1 – цитозольна розчинна фракція; 2 – цитоскелетна нерозчинна фракція; 3 – відношення вмісту ГФКБ цитозольної та цитоскелетної фракцій.

Висновки по розділу

1. Дані обліків свідчать, що популяція водяного вужа в біотопах, що прилягають до території НПП «Великий Луг», чисельна і не вимагає спеціальних заходів охорони за умови збереження стану природних екосистем.
2. Екологічні та морфологічні характеристики відповідають закономірностям, обумовленим репродуктивною активністю. Плодючість пропорційно залежить від розмірів тіла самок водяного вужа.
3. У період репродуктивної активності значення біохімічних показників сироватки крові значно змінюються у вагітних самиць водяних вужів. Це необхідно враховувати при використанні цих параметрів для біоіндикації впливу негативних факторів навколишнього середовища
4. Зміни в організмі водяних вужів під час репродуктивного періоду не впливають на вміст ГФКБ. Отже, стан цитоскелету гліальних клітин можна розглядати в якості надійного і достовірного маркера несприятливого впливу факторів навколишнього середовища на організм водяних вужів.

Перелік посилань

1. Akbulut, M., Kaya, H., ÇELİK, E. Ş., Odabaşı, D. A., Odabaşı, S. S., & Selvi, K. (2010). Assessment of surface water quality in the Atikhisar Reservoir and Sariçay Creek (Çanakkale, Turkey). *Ekoloji*, 19(74), 139–149.
2. Dickinson, V. M., Jarchow, J. L., & Trueblood, M. H. (2002). Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 143–153.
3. Jacobson, E. R., Gaskin, J. M., Brown, M. B., Harris, R. K., Gardiner, C. H., LaPointe, J. L., ... & Reggiardo, C. (1991). Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *Journal of wildlife diseases*, 27(2), 296–316.
4. Keller, J. M., Kucklick, J. R., Stamper, M. A., Harms, C. A., & McClellan-Green, P. D. (2004). Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environmental health perspectives*, 112(10), 1074–1079.
5. Кlymenko, O. Y., & Gasso, V. Y. (2009). Активність трансаміназ у сироватці крові прудкої ящірки під впливом промислового забруднення. *Biosystems Diversity*, 17(1), 100–105.
6. Knotková, Z., Doubek, J., Knotek, Z., & Hájková, P. (2002). Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). *Acta Veterinaria Brno*, 71(2), 191–198.
7. López-Olvera, J. R., Montané, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J., & Lavín, S. (2003). Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 830–836.
8. Metin, K., Türkozan, O., Kargin, F., Basumoglu, Y. K., Taskavak, E. R. T. A. N., & Koca, S. (2006). Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle *Emys orbicularis*. *Acta Veterinaria Brno*, 75(1), 49–55.

9. Pagés, T., Peinado, V. I., & Viscor, G. (1992). Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 103(2), 275–278.
10. Peterson, C. C. (2002). Temporal, population, and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoises: correlational tests of causal hypotheses. *Canadian Journal of Zoology*, 80(3), 461–470.
11. Raphael, B. L., Klemens, M. W., Moehlman, P., Dierenfeld, E., & Karesh, W. B. (1994). Blood values in free-ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 63–67.
12. Werner, Y. L., & Shapira, T. (2011). A brief review of morphological variation in *Natrix tessellata* in Israel: between sides, among individuals, between sexes, and among regions. *Turkish Journal of Zoology*, 35(4), 451–466.
13. Булахов, В. Л., Гассо, В. Я., & Пахомов, О. Є. (2007). Біорізноманіття України, Дніпропетровська область. Земноводні та плазуни (*Amphibia et Reptilia*). Вид-во Дніпропетр. ун-ту, Дніпропетровськ.
14. Гаранин, В. И. (1983). Земноводные и пресмыкающиеся Волжско-Камского края. Наука.
15. Моднов, А. С. (2010). Особенности экологии обыкновенного ужа *natrix natrix* (Linnaeus, 1758) Цнинского лесного массива (Тамбовская область). *Вестник российских университетов. Математика*, 15(2), 660-664.
16. Прилипко, С. К. (2014). Анализ изменчивости морфологических признаков водяного ужа (*Natrix tessellata*) Волгоградской области. *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки*, (2), 6-12.

РОЗДІЛ 8

СТАН БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПОПУЛЯЦІЙ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (PALLAS 1771) В УМОВАХ ЕКОСИСТЕМ З РІЗНИМ АНТРОПОГЕННИМ НАВАНТАЖЕННЯМ

8.1. Стан біохімічних показників крові популяції *Pelophylax ridibundus* в умовах промислового забруднення екосистем

Обсяг циркулюючої крові у амфібій залежить від багатьох факторів: виду, сезонних змін, стану здоров'я, зовнішніх стресових факторів (Abbas et al., 1991; Zhelev et al., 2013; Arikan, Cicek, 2014; Аджиев и др., 2018).

Такі параметри крові, як лейкоцитарне співвідношення (формула крові), еритроцитарний профіль, біохімічні показники сироватки крові і показники генетичного пошкодження можуть бути у комплексі використані в якості набору біомаркерів для швидкого, раннього виявлення стресу амфібій та, в цілому, для оцінки якості середовища проживання (Metin et al., 2006; Дробот и др., 2011; Valbona et al., 2012).

Відомостей про клітинний та біохімічний склад крові амфібій відносно мало.

Виявлено значуще зниження кількості холестерину, ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) та ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) в плазмі крові особин вилучених з біотопів ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат» в порівнянні з жабами з Природного заповідника Дніпровсько-Орільський. Для показників кількості ЛПВЩ та ЛПНЩ також виявлено статистично значущі відмінності для особин вилучених з біотопів Природного заповідника Дніпровсько-Орільський в порівнянні з *Pelophylax ridibundus* з територій м. Дніпро (о-в Монастирський) (табл. 8.1).

Відносні зміни даних показників можуть вказувати на вплив техногенного навантаження на ліпідний обмін в організмі популяції амфібій. Відносне одночасне зниження кількості показників ліпідного обміну у сироватці крові озерної жаби вказує на збідніння харчової бази в межах антропогенно трансформованих екосистем.

Біохімічні показники ($x \pm SD$) ліпідного обміну *Pelophylax ridibundus* з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації

Показник	Природний заповідник Дніпровсько-Орільський, n = 6,	м. Дніпро (о-в Монастирський), n = 4	ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат», n = 4	P
Ліпаза, од/л	35,05 ± 10,17	26,33 ± 1,34	20,75 ± 15,05 ^b	0,236
Холестерин, ммоль/л	3,31 ± 0,89	1,29 ± 0,38	1,25 ± 1,15	0,015
Тригліцериди, ммоль/л	0,31 ± 0,15	0,45 ± 0,14	0,30 ± 0,06	0,207
ЛПВЩ, ммоль/л	0,67 ± 0,14	0,34 ± 0,16	0,34 ± 0,28	0,03
ЛПНЩ, ммоль/л	2,50 ± 0,78	0,75 ± 0,16	0,78 ± 0,89	0,015

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення; P – (за методом Краскела-Уолліса).

Для показників аланінамінотрансферази (АЛТ) плазми крові досліджуваних тварин характерне статистично значиме підвищення в групі амфібій з біотопів Природного заповідника Дніпровсько-Орільський в порівнянні з особинами з територій м. Дніпро (о-в Монастирський). Разом з тим, рівень креатиніну плазми крові жаб з територій м. Дніпро (о-в Монастирський) значуще знижується в порівнянні з іншими групами, що досліджувались (табл. 8.2).

Зміни показнику рівня креатиніну можуть бути пов'язані з різним ступенем рухливості особин *Pelophylax ridibundus* з біотопів, що досліджувалися. Відомо, що підвищення рухової активності (наприклад пошук корму), супроводжується збільшення концентрації креатиніну в сироватці крові. Восени креатинфосфорна кислота максимально використовується в процесах енергетичного обміну, пов'язаного з

перебудовою обміну речовин до зимового періоду. Це супроводжується підвищенням кількості креатиніну.

Таблиця 8.2

Біохімічні показники ($x \pm SD$) у сироватці крові *Pelophylax ridibundus* з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації

Показник	Природний заповідник Дніпровсько-Орільський, n = 6	м. Дніпро (о-в Монастирський) n = 4	ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат», n = 4	P
Лужна фосфатаза, од/л	67,30 ± 45,53	94,65 ± 43,35	110,78 ± 68,60	0,4
АЛТ, од/л	133,38 ± 35,90	64,35 ± 0,07	73,23 ± 34,65	0,02
Креатинін, мкмоль/л	32,43 ± 1,91	18,80 ± 1,98	34,98 ± 2,12	0,009
Загальний кальцій, ммоль/л	2,75 ± 0,48	2,16 ± 0,29	2,40 ± 0,37	0,07
Фосфор неорг., ммоль/л	4,02 ± 0,47	3,45 ± 0,08	4,19 ± 0,33	0,075

Примітка: x – середнє значення, SD – середньоквадратичне відхилення; P – (за методом Краскела-Уолліса).

Рівень загального кальцію і фосфору неорганічного у сироватці крові амфібій мають тенденцію змінюватися залежно від сезонності.

8.2. Стан білкових компонентів мозку *Pelophylax ridibundus* в умовах промислового забруднення екосистем

В екстрактах мозку тварин з відносно забруднених ділянок виявлені значущі зміни вмісту цитоскелетних білків, тубуліну і ГФКБ у порівнянні з контролем (рис. 8.1).

Всі системи цитоскелету беруть участь у регуляції життєво важливих клітинних процесів, включаючи міграцію, внутрішньоклітинний транспорт,

проліферацію, регуляцію і трансформацію різних морфологічних типів клітинної відповіді.

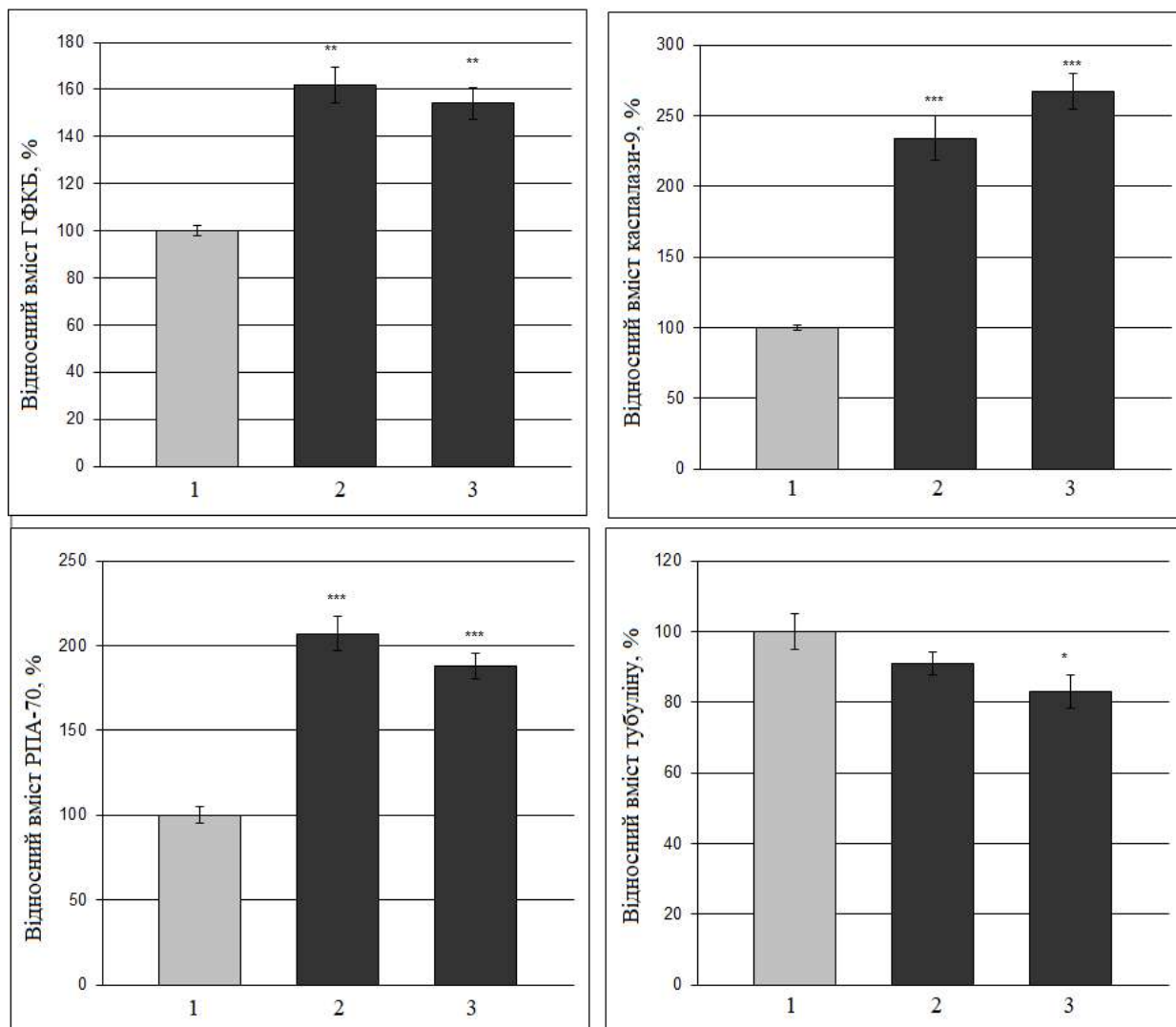


Рис. 8.1. Характеристика біохімічних показників клітин нейроглії мозку *Pelophylax ridibundus* з екосистем із різним ступенем антропогенної трансформації. 1 – Природний заповідник Дніпровсько-Орільський; забр. 2 – м. Дніпро (о-в Монастирський); забр. 3 – ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат», * – $P < 0,05$ (за методом Краскела-Уолліса).

Мікротрубочки, мікрофіламенти і проміжні філаменти досить детально вивчені в різних типах клітин і широко використовуються в якості біомаркерів патогенетичних порушень. Враховуючи критичну роль цитоскелета в підтримці гомеостазу і специфічних функцій клітин нервової тканини, показані в експерименті зміни цитоскелета можуть відобразитися

як у зниженні функцій ЦНС, так і життєздатності клітин. Що в свою чергу веде до зниження життєздатності організму і популяції.

Тубулін є головним структурним білком мікротрубочок цитоскелету складаються з α і β -тубуліну. При руйнуванні нейронів і гліальних клітин, порушення гематоенцефалічного бар'єру можливе вивільнення значної кількості тубуліну в кров. Тубулін характерний низькою антигенністю, пов'язаної з консерватизмом первинної структури цього білка. Тому для утворення аутоантитіл білок повинен тривалий час і в незначних кількостях надходити в кров (Курченко и др., 1991; Коржевский и др., 2010; Nedzvetsky et al., 2020).

Характерне збільшення вмісту гліального фібрилярного кислого білку свідчить про активацію протеолізу і подальшу перебудову цитоскелету в тканині мозку озерної жаби. Кожна проміжна філаментна структура, а також її субодиниці мають високу стійкість до спонтанної дисоціації. Обмежений протеоліз може слідувати за розщепленням кальпаїнів і каспаз, що супроводжує клітинну аномалію (Gray et al., 2006; Chen et al., 2013). Таким чином, збільшення вмісту ГФКБ може вказувати як на виснаження астроцитів, так і на ослаблення їх активності (Stopnicki et al., 2019).

Отримані результати свідчать, що нейроглія амфібій може відігравати життєво важливу роль у підтримці та забезпеченні функціонування нейронів за допомогою астрогліозу і підвищенню експресії ГФКБ, що відмічено для багатьох видів хребетних (Chiu, 1994; Nedzvetskii et al., 2001; Малик, 2010; Гассо и др. 2012; Kaas, 2016.).

Виявлено значне зростання вмісту активованої каспази-9, що свідчить про індукцію апоптозу в клітинах мозку тварин (рис. 8.2).

Каспази-сімейство еволюційно консервативних цистеїнових протеаз, що розщеплюють пептидні зв'язки, які утворені за участю аспарагінової кислоти. Розрізняють ініціюючі (каспази -8, -9, -10, -12) і ефекторні (каспази -3, -6, -7, -14). Каспази запускають кінцеві каскади апоптотичної смерті клітин через перетворення прокаспаз в активовані форми шляхом обмеженого протеолізу

(Широкова и др., 2007; Рыжов, Новиков, 2002; McIlwain et al., 2013; Mahata et al., 2015).

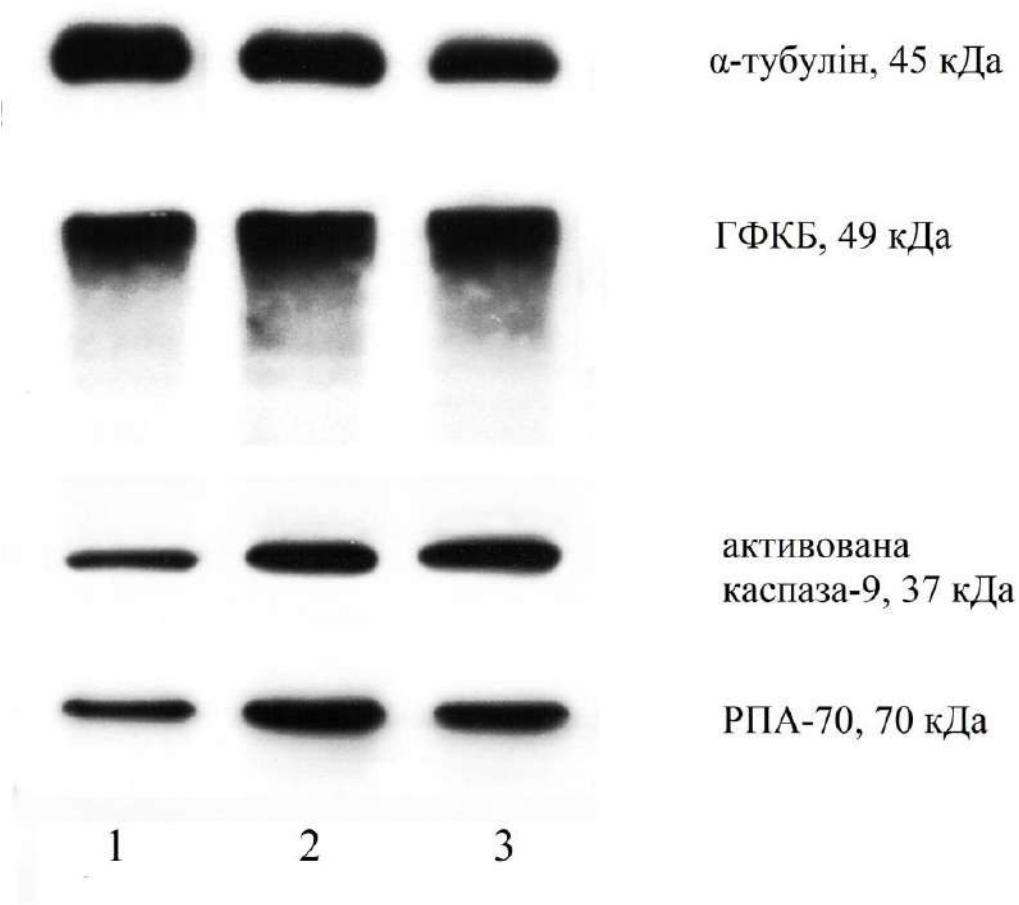


Рис. 8.2. Результати імуноблотингу фракції білків головного мозку *Pelophylax ridibundus*: 1 – Природний заповідник Дніпровсько-Орільський; забр. 2 – м. Дніпро (о-в Монастирський); забр. 3 – ПАТ «Дніпровський металургійний комбінат», * – $P < 0,05$ (за методом Краскела-Уолліса).

Встановлено значне зростання вмісту РПА–70 вказує на істотну активацію процесів репарації ДНК пошкоджень. Реплікаційний білок (РПА) представлений консервативними протеїнами, які присутні практично в кожній еукаріотичній клітині (Ishibashi et al., 2001; Wold, 1997). Доменна структура РПА подібна в усіх живих організмів (Iftode et al., 1999; Wold, 1997), він є одним з ключових білків у забезпеченні ДНК стабільності та цілісності, необхідний для багатьох процесів метаболізму ДНК, включаючи реплікацію ДНК, рекомбінацію та шляхи репарації ДНК. РПА - це

одноланцюговий ДНК-зв'язуючий білок, що складається з субодиниць 70-, 32 - та 14-кДа. РПА зв'язує ssDNA з високою спорідненістю і специфічно взаємодіє з кількома білками (Mason et al., 2014).

Висновки по розділу

1. Попри обмежені дані про біологію гліальних клітин мозку амфібій, спостережувані результати доводять, що астроцити озерних жаб можуть реагувати на токсичний вплив навколишнього середовища, використовуючи типову астрогліальну реакцію. Експресія ГФКБ та його фрагментація у *P. ridibundus* є дійсними біомаркерами впливу промислового забруднення.

2. У озерних жаб, що мешкають на антропогенно трансформованій (урбанізованій) території, відмічене зниження показників ліпідного обміну, що вказує на певні порушення фізіологічного стану тварин. Для показників активності лужної фосфатази, вмісту загального кальцію та неорганічного фосфору відмінностей між популяціями не виявлено. Отримані для цих показників значення перебувають у межах відомих для амфібій.

3. Результати дослідження стану нейроглії амфібій показали принципові для нервової тканини молекулярні порушення стану цитоскелета, індукцію клітинної загибелі і активацію системи репарації ДНК. Всі зазначені молекулярні маркери можуть бути валідними показниками екотоксичного впливу забруднювачів навколишнього середовища.

4. Визначення молекулярних біомаркерів, пов'язаних з раннім прогнозуванням, діагностикою та моніторингом основних фізіологічних змін організму озерних жаб, викликаних забрудненням навколишнього середовища, може бути використане для оцінки стану популяцій земноводних.

Перелік посилань

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J.S. (1991): Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Philadelphia: Saunders.

2. Arikan, Hüseyin., & Cicek, K. (2014). Haematology of amphibians and reptiles: A review. *North–Western journal of zoology*, 10(1), 190-209.
3. Chen, M. H., Hagemann, T. L., Quinlan, R. A., Messing, A., & Perng, M. D. (2013). Caspase cleavage of GFAP produces an assembly-compromised proteolytic fragment that promotes filament aggregation. *ASN Neuro*, 5(5), e00125.
4. Chiu, S. Y., & Kriegler, S. (1994). Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. *Glia*, 11(2), 191–200.
5. Gray, B. C., Skipp, P., O'Connor, V. M., & Perry, V. H. (2006). Increased expression of glial fibrillary acidic protein fragments and mu-calpain activation within the hippocampus of prion-infected mice. *Biochemical Society Transactions*, (34), 51–54.
6. Iftode, C., Daniely, Y., & Borowiec, J. A. (1999). Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), 141–180.
7. Ishibashi, T., Kimura, S., Furukawa, T., Hatanaka, M., Hashimoto, J., & Sakaguchi, K. (2001). Two types of replication protein A 70 kDa subunit in rice, *Oryza sativa*: molecular cloning, characterization, and cellular & tissue distribution. *Gene*, 272(1–2), 335–343.
8. Kaas, J. H. (2016). *Evolution of nervous systems*. Academic Press, Cambridge.
9. Mahata, B., Biswas, S., Rayman, P., Chahlavi, A., Ko, J., Bhattacharjee, A., ... & Biswas, K. (2015). GBM derived gangliosides induce T cell apoptosis through activation of the caspase cascade involving both the extrinsic and the intrinsic pathway. *PLoS One*, 10(7), e0134425.
10. Mason, A. G., Tom, S., Simard, J. P., Libby, R. T., Bammler, T. K., Beyer, R. P., Morton, A. J., Pearson, C. E., & La Spada, A. R. (2014). Expression levels of DNA replication and repair genes predict regional somatic repeat instability in the brain but are not altered by polyglutamine disease protein expression or age. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1606–1618.

11. McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656.
12. Metin, K., Türkozan, O., Kargin, F., Basumoglu, Y. K., Taskavak, E. R. T. A. N., & Koca, S. (2006). Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle *Emys orbicularis*. *Acta Veterinaria Brno*, 75(1), 49–55.
13. Nedzvetskii, V. S., Nerush, P. A., Tikhomirov, A. A., & Romanenko, L. A. (2001). Effects of ionizing radiation and aluminum chloride on protein of glial intermediate filaments in the rat brain. *Neurophysiology*, 33, 28–33.
14. Nedzvetsky, V. S., Gasso, V. Y., Novitskiy, R. O., & Yermolenko, S. V. (2020). Вплив інсектициду λ -цигалотрин на окиснювальний стрес та експресію реплікативного білка A в мозку риб. *Agrology*, 3(4), 214–218.
15. Stopnicki, B., Blain, M., Cui, Q. L., Kennedy, T. E., Antel, J. P., Healy, L. M., & Darlington, P. J. (2019). Helper CD4 T cells expressing granzyme B cause glial fibrillary acidic protein fragmentation in astrocytes in an MHCII-independent manner. *Glia*, 67(4), 582–593.
16. Valbona, A., Adiola, B., Eldores, S., & Alketa, G. (2012). Effects of pollution on amphibian blood parameters (*Ranidae*: *Rana balcanica* & *Rana lessonae*) from the Albania's coastal zone. Department of Biology; Faculty of Natural Sciences; Tirana University, 1-7.
17. Wold, M. S. (1997). Replication protein A: heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, (66), 61–92.
18. Zhelev, Z. M., Popgeorgiev, G. S., & Angelov, M. V. (2013). Investigating the changes in the morphological content of the blood of *Pelophylax ridibundus* (*Amphibia*: *Ranidae*) as a result of anthropogenic pollution and its use as an environmental bioindicator. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65(2), 187–196.
19. Аджиев, Д. Д., Пронина, Г. И., Иванов, А. А., & Корягина, Н. Ю. (2018). Функциональные показатели пойкилотермных гидробионтов из

природных и искусственных водных биоценозов. Сельскохозяйственная биология, 53(2), 337-347.

20. Гассо, В. Я., Клименко, О. Ю., Сухаренко, Е. В., & Недзвецкий, В. С. (2012). Оценка негативного эффекта загрязнения биогеоценозов с использованием нейроспецифического цитоскелетного белка прыткой ящерицы. Экология и ноосферология, 23(1-2), 58–66.
21. Дробот, Г. П., Мальцева, Н. Л., & Ведерников, А. А. (2011). Ответная реакция некоторых тканей лягушки озерной (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) на антропогенную нагрузку. Вестник Оренбургского государственного университета, 12 (131), 65-67.
22. Коржевский, Д. Э., Петрова, Е. С., Кирик, О. В., Безнин, Г. В., & Сухорукова, Е. Г. (2010). Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. Гены и клетки, 5(3), 57-63.
23. Курченко, В. П., Гавриленко, Н. В., Матюнина, М. В., & Пикулев, А. Т. (1991). Иммуноферментный анализ тубулина, 41–44.
24. Малик М. Г. (2010). Використання гліального фібрилярного кислого білка мозку риб у діагностиці стану природного середовища. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія, 18(1), 92–97.
25. Рыжов, С. В., & Новиков, В. В. (2002). Молекулярные механизмы апоптотических процессов. Российский биотерапевтический журнал, 1(3), 27–33.
26. Широкова, А. В. (2007). Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. Цитология, 49(5), 385–394.