

ISSN 2310-0842 print
ISSN 2312-301X online

ВІСНИК



Дніпропетровського університету Серія БІОЛОГІЯ, ЕКОЛОГІЯ

**Visnik Dnipropetrovs'kogo unìversitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology**

2014 22(1)

Друкується за рішенням вченої ради Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара
згідно з планом видань на 2014 рік (прот. № 6 від 19.12.2013 р.)

Редакційна колегія (Editorial Board)

Голова редакційної колегії:

Пахомов Олександр Євгенович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, декан ф-ту біології екології та медицини; д-р біол. наук, проф.

Заступники голови редакційної колегії:

Wasser Solomon P. – University of Haifa, Institute of Evolution, International Centre for Biotechnology and Biodiversity of Fungi, Haifa, Israel; Dr., Prof.;

Tchounwou Paul B. – Jackson State University, College of Science, Engineering & Technology, NIH-RCMI Center for Environmental Health, Associate Dean & Presidential Distinguished Professor, Jackson, USA; Sc. D.;

Fedak George – Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Eastern Cereal and Oilseed Research Centre (ECORC), Canada; Dr., Prof.

Науковий секретар редакційної колегії:

Бригадиренко Віктор Васильович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, доцент каф. зоології та екології; канд. біол. наук, доц.

Члени редакційної колегії:

Bedő Zoltán – Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary; D. Sc.;

Balázs Sándor – Bessenyei György College, Hungary; Prof.;

Barabasz Wieslaw – Agricultural University of Krakow, Department of Microbiology; Dr hab., Prof.;

Demberel Shirchin – The Mongolian Academy of Agricultural Science, Project Director of LAB Research, Mongolia; Sc. D, Prof.;

Kozytska S. – Institut fuer Molekulare Infektionsbiologie, Universitaet Wuerzburg, Deutschland; Dr.;

Kuschik Peter – Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Department of Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany; Dr.;

Pierzynowski Stefan G. – Lund University, Dept of Biology, Lund, Sweden; PhD, Prof.;

Vološčuk Ivan – Technická univerzita vo Zvolene, Fakulta Ekologie a Environmentalistiky, Slovak Republic; Prof., DrSc.;

Вінніков Альберт Іванович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. мікробіології, вірусології та біотехнології; д-р біол. наук, проф.;

Гаско Віктор Якович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. зоології та екології; канд. біол. наук, доц.;

Джебуадзе Юрій Юліанович – Інститут проблем екології та еволюції ім. О. М. Северцова РАН, заступник директора; академік РАН, д-р біол. наук;

Лихолат Юрій Васильович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. фізіології та інтродукції рослин; д-р біол. наук, проф.;

Мицик Леонід Павлович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. геоботаніки, ґрунтознавства та екології; д-р біол. наук, проф.;

Недзвецький Віктор Станіславович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.;

Сатарова Тетяна Миколаївна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. мікробіології, вірусології та біотехнології; д-р біол. наук, проф.;

Северинівська Олена Вікторівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. фізіології людини та тварин; д-р біол. наук., проф.;

Семенченко Віталій Павлович – ГНПО «НПЦ НАН Білорусі по біоресурсам», заступник генерального директора з наукової роботи, завідувач лабораторії гідробіології; член-кор. НАН Білорусі, д-р біол. наук.;

Травяєв Анатолій Павлович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. геоботаніки, ґрунтознавства та екології; член-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.;

Федоненко Олена Вікторівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. загальної біології та водних біоресурсів; д-р біол. наук, проф.;

Шевченко Тетяна Миколаївна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р біол. наук, доц.;

Штеменко Наталія Іванівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.



УДК 577.161.1:616.36-008.9

Особливості генерування активних форм кисню та азоту за гострої гепатотоксичності

І.О. Шмараков, В.Л. Борщовецька, М.М. Марченко

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, Україна

Розвиток більшості патологічних станів відбувається за вільнорадикальним механізмом, що на клітинному рівні характеризується посиленням продукування вільних радикалів, серед яких особливе місце належить активним формам кисню та азоту (АФК/АФА). Основними продуцентами вільнорадикальних форм кисню виступають передусім мембранні електронтранспортні NADH-залежні системи мітохондрій, NADPH-залежні системи ендоплазматичного ретикулуму, а також цитозольні оксидоредуктазні ферменти та мультиферментні комплекси. У роботі встановили особливості генерування супероксидного аніон радикала ($O_2^{\cdot-}$) як первинної активної форми кисню та оксиду азоту ($NO^{\cdot}$) в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності. У виділених методом диференційного центрифугування субклітинних фракціях (мітохондріальна, мікросомна, постмікросомна) печінки мишей лінії C57BL/6J встановлено особливості NAD(P)H-залежного генерування супероксидного аніон радикала ($O_2^{\cdot-}$) як первинної активної форми кисню та оксиду азоту ($NO^{\cdot}$) в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності та застосування фармакологічних доз вітаміну А. Розвиток гострої гепатотоксичності, індукованої одноразовим інтраперитонеальним введенням 500 мг/кг тіоацетаміду, супроводжується зростанням інтенсивності продукування супероксидного аніон радикала та оксиду азоту мікросомною та цитозольною фракціями клітин печінки, але не мітохондріальною фракцією. Введення фармакологічних доз вітаміну А (3000 МО) не викликає гепатопротекторного ефекту, проте посилює продукування активних форм кисню та азоту в печінці за гострої гепатотоксичності.

Ключові слова: гепатотоксичність; супероксид; оксид азоту; вітамін А

Reactive oxygen and nitrogen species generation features under conditions of acute hepatotoxicity

I.O. Shmarakov, V.L. Borschovetska, M.M. Marchenko

Y. Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, Ukraine

Development of the most of pathological conditions occurs by free radical mechanism which is characterized by increased free radical production at the cellular level, especially reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). The main producers of reactive oxygen species are, first of all, membrane bound NADH-dependent mitochondrial and NADPH-dependent endoplasmic reticulum electron transport systems, cytosolic oxidoreductase enzymes and multienzyme complexes. The aim of the study was to determine the features of generation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) as the primary reactive oxygen species, and nitric oxide ($NO^{\cdot}$) under conditions of thioacetamide-induced hepatotoxicity. The features of NAD(P)H-dependent generation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) as the primary reactive oxygen species, and nitric oxide ($NO^{\cdot}$) in subcellular (mitochondrial, microsomal and post-microsomal) fractions of C57BL/6J mouse liver cells isolated by the method of differential centrifugation were determined under conditions of thioacetamide-induced hepatotoxicity and supplementation with pharmacological doses of vitamin A. It was found that the development of acute hepatotoxicity induced by single intraperitoneal administration of 500 mg/kg of thioacetamide was accompanied by increased intensity of superoxide anion radical and nitric oxide production in microsomal and cytosolic fractions of liver cells, but not in mitochondrial fraction. Consumption of the pharmacological doses of vitamin A (3000 IU) has no hepatoprotective effect, however, it enhances the production of reactive oxygen and nitrogen species in the liver during acute hepatotoxicity.

Keywords: hepatotoxicity; superoxide; nitric oxide; vitamin A

Розвиток більшості патологічних станів відбувається за вільнорадикальним механізмом, що на клітинному рівні характеризується посиленням продукування вільних радикалів, серед яких особливе місце належить активним формам кисню та азоту (АФК/АФА) (D'Alessandro et al., 2011). Основними продуцентами вільнорадикальних форм кисню виступають передусім мембранні електронтранспортні NADH-залежні системи мітохондрій, NADPH-залежні системи ендоплазматичного ретикулу (Poyton et al., 2009; D'Alessandro et al., 2011; Uchi et al., 2013), а також цитозольні оксидоредуктазні ферменти та мультиферментні комплекси (Robert and Robert, 2013).

Водночас активні форми азоту можуть утворюватися за участі NO-синтази (He et al., 2010) та ксантиноксидази (Cantu-Medellin and Kelley, 2013b). Функціонуючи як елементи редоксзалежних сигнальних і метаболічних шляхів, активні форми кисню та азоту виконують передусім регуляторну роль у формуванні повноцінної відповіді біологічних систем на метаболічні та фізіологічні стимули, гостре та хронічне ураження тощо (Leach et al., 2001; Urtasun et al., 2008; Powers et al., 2011; Zhu et al., 2012).

Надлишкове та неконтрольоване утворення АФК/АФА виступає тригером у розвитку глибоких оксидативних пошкоджень клітинних компартментів, поглиблюючи розвиток патологічного процесу (Jaeschke et al., 2002; Urtasun et al., 2008; Muriel, 2009).

Нині проблема патологій печінки, у тому числі гепатиту, фіброзу, цирозу та гепатоклітинної карциноми, виявляється надзвичайно гострою, враховуючи постійно зростаюче токсичне навантаження та пов'язаний із цим оксидативний стрес у цьому основному метаболічному та провідному детоксуючому органі. Спільною особливістю вказаних патологій виявляється втрата запасів ретиноїдів (вітаміну А та його метаболітів) внаслідок активації стелатних клітин печінки, що може вказувати на їх інтенсивне використання за розвитку відповіді печінки на розвиток патологій (Shirakami et al., 2012; Urtasun et al., 2008). Проте метаболічна роль вивільнених ретиноїдів досі залишається незрозумілою – виконання протективних функцій чи поглиблення патологічного процесу.

У зв'язку з цим питання ефективності застосування аліментарних ретиноїдів із гепатопротекторною метою залишається відкритим, оскільки вимагає глибокого розуміння молекулярних механізмів залучення ретиноїдів у патологічний процес взагалі та у розвиток гепатотоксичності зокрема. Незважаючи на значні досягнення та постійне надходження нових відомостей про біохімічні основи токсичного ураження печінки, деякі питання все ще потребують більшої деталізації. Враховуючи вищевикладене, метою роботи було встановити особливості генерування супероксидного аніон радикала ($O_2^{\cdot-}$) як первинної активної форми кисню та оксиду азоту ($NO^{\cdot}$) в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності.

Дослідження проводили на мишах лінії C57BL/6J вагою 25–30 г та віком 2,5–3,0 місяці, які перебували на стандартному раціоні віварію. Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. № 3447-IV, «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 р. І Українським національним конгресом із біоетики, та з урахуванням положень, викладених у NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guide ..., 2011).

Гостре ураження печінки викликали шляхом одноразової інтраперитонеальної ін'єкції розчину тіоацетаміду (ТАА) в дозі 500 мг/кг маси тіла. Групу дослідного контролю складали тварини, яким інтраперитонеально вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину, окрема група мишей отримувала додатково 3000 міжнародних одиниць (МО) вітаміну А (фармакологічна доза) інтрагастрально *per os* у формі олійного розчину ретиніл ацетату через 12-годинні інтервали після ін'єкції ТАА чи фізіологічного розчину. Через 48 годин після введення тіоацетаміду тварин зважували та під легким ефірним наркозом проводили забір крові через нижню порожнисту вену та вилучали печінку. Печінку швидко зважували та використовували для отримання субклітинних фракцій методом диференційного центрифугування, яке проводили після попередньої перфузії підігрітим до +38 °C фізіологічним розчином.

Гомогенізацію печінки та всі процедури під час виділення проводили за температури +4 °C із використанням розчинів, охолоджених до вказаної температури. Мітохондріальну фракцію клітин печінки отримували методом, описаним (Kitagawa and Sugimoto, 1980). Мікросомну фракцію отримували методом (Schenkman and Cinti, 1978). Супернатант, отриманий після виділення мікросомної фракції, відбирали та використовували у подальших дослідженнях як постмікросомну (цитозольну) фракцію. Для встановлення ступеня забруднення виділених субклітинних фракцій домішками мембран інших фракцій визначали Na^+/K^+ -АТФазну активність (як специфічного маркера плазматичних мембран), сукцинатдегідрогеназну активність (як специфічного маркера внутрішньої мембрани мітохондрій) та глюкозо-6-фосфатазну активність (як специфічного маркера мембрани ЕПС). У дослідженнях використовували субклітинні фракції, рівень забруднення яких мембранами інших органел не перевищував 10%. Рівень NAD(P)H-залежного утворення супероксидних аніон радикалів субклітинними фракціями печінки реєстрували у тесті з нітросинім тетразолієм (Kostenko and Tsebrzhins'kii, 2000) та виражали у нмоль/хв/мг білка. Визначення рівня NADPH-залежного генерування та рівня оксиду азоту визначали модифікованим методом (Hwang et al., 1994) шляхом реєстрації вмісту нітриту-аніона (NO^{2-}), утвореного в NO-синтазній реакції, та виражали у нмоль/хв/мг білка та нмоль/г відповідно.

Вміст білка визначали методом Лоупі (Waterborg and Matthews, 1994).

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Усі дані представлені як середнє (M) $\pm$ стандартне відхилення (m). t -Критерій Стюдента застосовували для аналізу різниці даних між групами. Різниця з величиною $P < 0,05$ вважалась достовірною.

Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень показали, що розвиток гострої гепатотоксичності супроводжується посиленням продукування супероксидного аніон радикала, при цьому основними продуцентами цієї активної форми кисню виявляються елементи постмітохондріальної фракції клітин печінки. Встановлений факт виявився несподіваним з огляду на провідну роль мітохондрій як основних продуцентів $O_2^{\cdot-}$ у клітині (Poyton et al., 2009). У нашому експерименті мітохондріальна фракція володіла найвищою питомою $O_2^{\cdot-}$ -продукувальною активністю в печінці лише тварин контрольної групи, при цьому величина продукування супероксиду перебувала у межах 5 нмоль/хв/мг, у той час як для мікросомної та цитозольної фракцій ця величина не перевищувала 3 нмоль/хв/мг та 0,5 нмоль/хв/мг відповідно (рис. 1).

Уведення тваринам тіоацетаміду через 48 годин не викликало змін у продукуванні $O_2^{\cdot-}$ мітохондріальною фракцією (див. рис. 1 а), проте супроводжувалось зростанням величини генерування супероксиду в мікросомній та цитозольній фракціях (див. рис. 1 б, в). Зокрема величина NADPH-залежного утворення супероксиду мікросомною фракцією зростала удвічі, перевищуючи величину продукування цієї АФК мітохондріями печінки на 20%. При цьому рівень утворення $O_2^{\cdot-}$ цитозольною фракцією після введення тіоацетаміду на порядок перевищував вихідні величини (див. рис. 1 в). Фактично в умовах тіоацетамід-індукованої гепатотоксичності цитоплазматичні структури виступають основними продуцентами супероксидного аніон радикала.

Посилене продукування $O_2^{\cdot-}$ цими структурами можна пояснити, враховуючи особливості метаболізму тіоацетаміду. У разі потрапляння даного гепатотоксину в організм ссавців він виявляється субстратом для компонентів клітинної системи детоксикації, передусім мембранозв'язаних мікросомних монооксигеназ і цитозольних оксидоредуктаз, які забезпечують його біоактивацію до активних метаболітів – токсичного сульфоксиду (TASO) та діоксиду (TASO₂) (Chilakapati et al., 2005; Hajovsky et al., 2012). Ці активні інтермедіати за прооксидантним вільнорадикальним механізмом викликають утворення адуктів білків, ліпідів, нуклеїнових кислот (Stankova et al., 2010), ініціюють процеси пероксидного окислення ліпідів, зменшення рівня глутатіону та білкових тіолових груп (Wang et al., 2000). Очевидно, що в умовах посиленого оксидативного стресу, індукованого метаболітами тіоацетаміду, та навантаження на клітинну детоксикаційну систему мікросомні монооксигенази та цитозольні оксидоредуктази виступають додатковими джерелами активних форм кисню. Це передусім стосується активації за вказаних умов

супероксидпродукувальної ізоформи 2E1 цитохрому P₄₅₀ (Wang et al., 2000) та зростання частки оксидазної форми ксантиноксидази, здатної каталізувати одноелектронне відновлення кисню (Shmarakov and Marchenko, 2008).

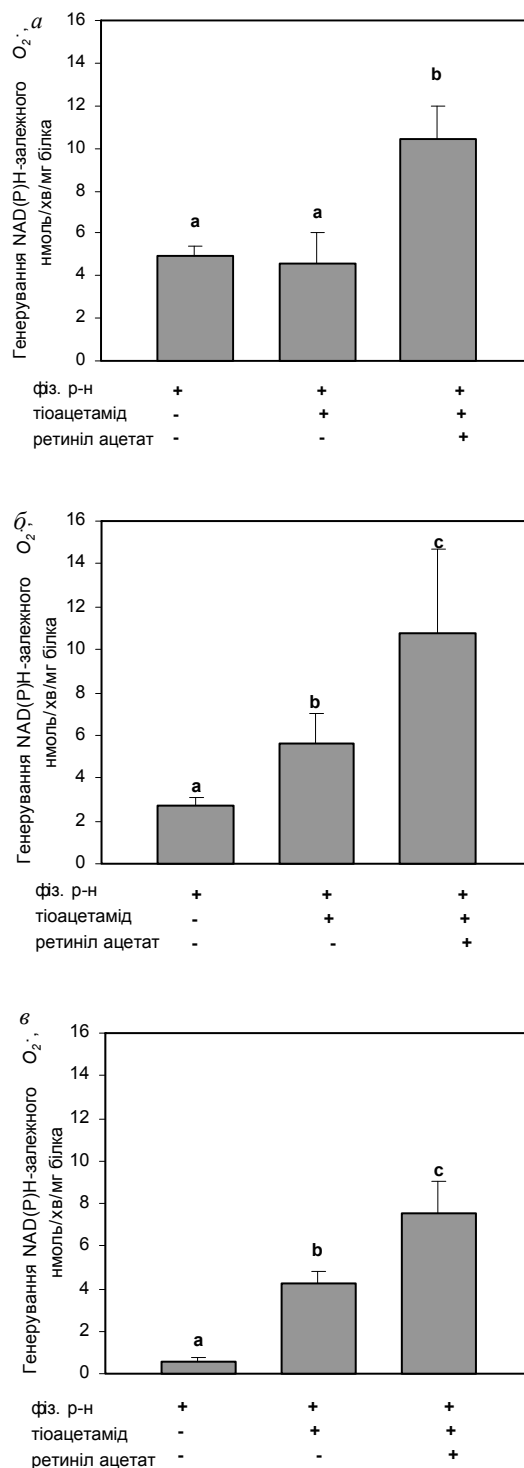


Рис. 1. Інтенсивність NAD(P)H-залежного генерування супероксидного аніон радикала мітохондріальною (а), мікросомною (б) та цитозольною (в) фракціями клітин печінки мишей: величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$; усі величини наведені як середнє $\pm$ 1 стандартне відхилення, $n = 6$ для кожної групи

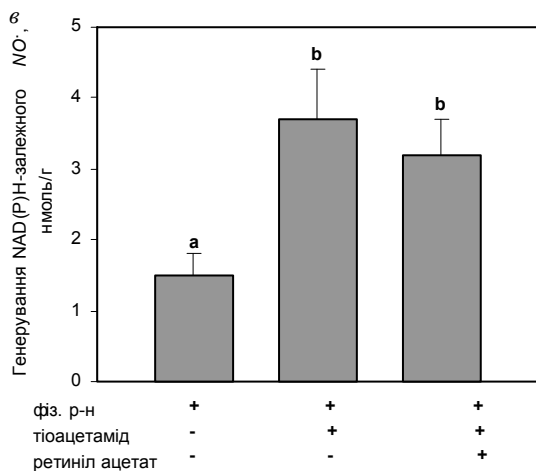
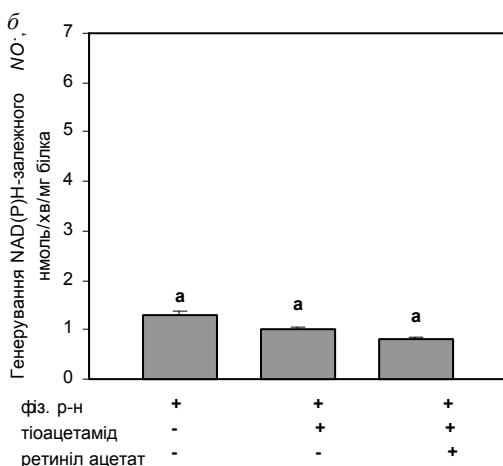
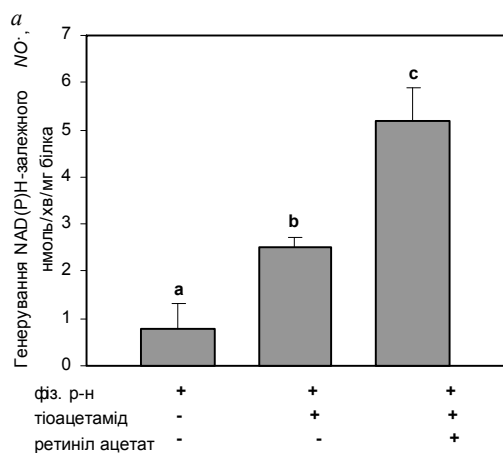


Рис. 2. Інтенсивність NADPH-залежного утворення нітриту іону цитозольною (а) та мітохондріальною (б) фракціями та рівень нітриту іона (в) в печінці мишей: величини, позначені різними індексами (а, б, с), статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$; усі величини представлені як середнє ± 1 стандартне відхилення, $n = 6$ для кожної групи

Застосування фармакологічних доз вітаміну А з коригуючою метою не лише не знижувало показники продуктування O_2 , а і посилювало його утворення в усіх без винятку досліджених субклітинних фракціях. Зокрема, показники інтенсивності генерування супероксиду виявлялись вищими удвічі при введенні 3 000 МО вітаміну А

після ін'єкції тіоацетаміду порівняно з тваринами, які не отримували ретиніл ацетату (див. рис. 1).

Не менш важливим елементом редоксзалежного сигнального шляху виступає оксид азоту ($NO\cdot$). При розвитку гепатотоксичності, індукованої введенням тіоацетаміду, спостерігається зростання інтенсивності утворення цієї активної форми азоту цитозольною фракцією зі зростанням рівня оксиду азоту в печінці (рис. 2 а, б) та незмінність показника інтенсивності генерування $NO\cdot$ у мітохондріальній фракції (рис. 2 в). Встановлені результати виявляються цілком логічними з огляду на цитозольну локалізацію $NO\cdot$ -продукувальних ферментів, насамперед індукційної ізоформи NO -синтази та ксантиноксидази (He et al., 2010; Cantu-Medellin and Kelley, 2013a). Водночас посилена продукція оксиду азоту при зростаючому продукуванні супероксиду виявляється потенційно небезпечною для клітин з огляду на можливе утворення надзвичайно цитотоксичного пероксинітриту ($ONOO\cdot$) (Novitskiy et al., 2006; Muriel, 2009). Введення 3000 МО вітаміну А супроводжувалось посиленням продукування оксиду азоту в цитозольній, але не в мітохондріальній, фракції.

Посилення продукування активних форм кисню та азоту виявляється одним із первинних елементів розвитку тіоацетамідіндукованої гепатотоксичності. Основна частка утворення супероксидного аніон радикала припадає на редоксзалежні оксидазні системи, локалізовані в основному в ендоплазматичному ретикулумі та цитозолі, при цьому внесок мітохондрій у продукування $O_2\cdot$ виявляється мінімальним (див. рис. 1). Генерування супероксидного аніон радикала при введенні тіоацетаміду відбувається одночасно з його біоактивацією мікросомними монооксигеназами та цитозольними оксидазами, що служить сигналом для активації гепатопротекторних механізмів. Одним з елементів сигнальних каскадів, активованих у відповідь на некрогенне ураження печінки, виступає оксид азоту, інтенсивне утворення якого спостерігається при введенні тіоацетаміду (див. рис. 2).

Уведення тваринам після ін'єкції тіоацетаміду фармакологічних доз вітаміну А викликало посилення генерування досліджуваних активних форм кисню та азоту. Фактично надходження ретиніл ацетату в організм за хімічно-індукованої гепатотоксичності виступало тригерним фактором у генеруванні супероксидного аніон радикала в усіх без винятку досліджених фракціях. Виявлене надпродукування $O_2\cdot$ супроводжувалось посиленням утворення $NO\cdot$, що безперечно має негативний характер, з огляду на можливість утворення цитотоксичного пероксинітриту.

Висновки

Розвиток гострої гепатотоксичності, індукованої введенням тіоацетаміду, супроводжується зростанням інтенсивності продукування супероксидного аніон радикала та оксиду азоту мікросомною та цитозольною фракціями клітин печінки. Уведення фармакологічних доз вітаміну А (3000 МО) не викликає гепатопротекторного ефекту, але посилює продукування активних форм кисню та азоту в печінці за гострої гепатотоксичності.

Бібліографічні посилання

- Cantu-Medellin, N., Kelley, E.E., 2013a. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 1(1), 353–358.
- Cantu-Medellin, N., Kelley, E.E., 2013b. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide* 34, 19–26.
- Chilakapati, J., Shankar, K., Korrapati, M.C., Hill, R.A., Mehendale, H.M., 2005. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. *Drug Metab. Dispos.* 33(12), 1877–1885.
- D'Alessandro, A., Rinalducci, S., Zolla, L., 2011. Redox proteomics and drug development. *J. Proteomics* 74(12), 2575–2595.
- Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition, 2011. The National Academies Press, Washington, DC.
- Hajovsky, H., Hu, G., Koen, Y., Sarma, D., Cui, W., Moore, D.S., 2012. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 25(9), 1955–1963.
- He, S., Rehman, H., Wright, G.L., Zhong, Z., 2010. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents mitochondrial damage and improves survival of steatotic partial liver grafts. *Transplantation* 89(3), 291–298.
- Hwang, S.M., Lopez, C.A., Heck, D.E., Gardner, C.R., Laskin, D.L., Laskin, J.D., 1994. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269(1), 711–715.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pesseyre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65(2), 166–176.
- Kitagawa, Y., Sugimoto, E., 1980. Estimation of the *in vivo* translational activity of rat liver mitochondria without use of an antibiotic. *J. Biochem.* 88(3), 689–693.
- Kostenko, V.O., Tsebrzhins'kii, O.I., 2000. [Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material]. *Fiziol. Zh.* 46(5), 56–62. (in Ukrainian).
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B., 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61(10), 3894–3901.
- Muriel, P., 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol. Int.* 3(4), 526–536.
- Novitskiy, G., Potter, J.J., Wang, L., Mezey, E., 2006. Influences of reactive oxygen species and nitric oxide on hepatic fibrogenesis. *Liver Int.* 26(10), 1248–1257.
- Powers, S.K., Talbert, E.E., Adihetty, P.J., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J. Physiol.* 589(9), 2129–2138.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., Castello, P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(7), 332–340.
- Robert, A.M., Robert, L., 2013. Xanthine oxidoreductase, free radicals and cardiovascular disease. A critical review. *Pathol. Oncol. Res.* 20(1), 1–10.
- Schenkman, J.B., Cinti, D.L., 1978. Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzymol.* 52, 83–89.
- Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2012. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim. Biophys. Acta* 1821(1), 124–136.
- Shmarakov, I.O., Marchenko, M.M., 2008. [Xanthine oxidase activity in the rat liver tissue in the process of oncogenesis]. *Ukr. Biokhim. Zh.* 80(6), 86–91 (in Ukrainian).
- Stankova, P., Kucera, O., Lotkova, H., Rousar, T., Endlicher, R., Cervinkova, Z., 2010. The toxic effect of thioacetamide on rat liver *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 24(8), 2097–2103.
- Uchi, J.O., Ryu, S.Y., Jhun, B.S., Hurst, S., Sheu, S.S., 2013. Mitochondrial ion channels/transporters as sensors and regulators of cellular redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* doi:10.1089/ars.2013.5681
- Urtasun, R., Conde de la Rosa, L., Nieto, N., 2008. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin. Liver Dis.* 12(4), 769–790.
- Wang, T., Shankar, K., Ronis, M.J., Mehendale, H.M., 2000. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294(2), 473–479.
- Waterborg, J.H., Matthews, H.R., 1994. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* 32, 1–4.
- Zhu, H., Jia, Z., Misra, H., Li, Y.R., 2012. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: Updated experimental and clinical evidence. *J. Dig. Dis.* 13(3), 133–142.

Надійшла до редколегії 21.02.2014



УДК 599.323.4:591.2

Кінетика тетанусу *musculus gastrocnemius* в алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою васкулярною ішемією задніх кінцівок за умов низькочастотної м'язової втоми

О.А. Мельничук¹, О.П. Мотузіук¹, С.Є. Швайко¹, О.М. Хома²

¹Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

²ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Досліджено зміну кінетики тетанусу *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) в алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою унілатеральною васкулярною ішемією м'язів задніх кінцівок за умов прогресивної низькочастотної м'язової втоми. Кінетика тетанусу *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими не зазнає суттєвих змін. Характерною ознакою низькочастотної втоми *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) за умов ішемії є швидка поява вторинного провисання механограми тетанусу протягом експерименту, що не дозволяє м'язу досягти оптимального рівня тетанічної сили. Встановлено значне зменшення силової продуктивності *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими за умов низькочастотної м'язової втоми. Оцінка змін силової продуктивності *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими вказує на синергічну взаємодію хронічної алкогольної інтоксикації та васкулярної ішемії в обмеженні моторної функції. Обговорено синергічний зв'язок алкоголь-асоційованої м'язової атрофії та ішемічного ушкодження м'язових тканин нижніх кінцівок у патогенезі моторної дисфункції.

Ключові слова: *m. gastrocnemius*; м'язова втома; алкогольна інтоксикація; васкулярна ішемія; тетанічна сила

Musculus gastrocnemius tetanus kinetics in alcohol-intoxicated rats with experimentally-induced hindlimb vascular ischemia under conditions of low-frequency muscle fatigue

O.A. Melnychuk¹, O.P. Motuziuk¹, S.Y. Shvayko¹, O.M. Homa²

¹Lesia Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine

²ESC "Institute of Biology" of Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

Alcohol intoxication and ischemic injury of skeletal muscles often accompany each other. It is shown that patients hospitalized with chronic alcoholism develop muscle fatigue. Skeletal muscle dysfunction in alcohol-dependent patients is caused by ethanol-associated myofibrillar atrophy and metabolic disbalance, while compression-ischemic lesions result from unconsciousness of the patient, in case of taking the critical alcohol dose. Therefore, the aim of this study is to discover typical *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) tetanic kinetics changes in alcohol intoxicated rats with experimentally induced vascular ischemia of hindlimb muscles under conditions of low-frequency progressive muscle fatigue. Experiments were carried out on 10 young male Wistar rats (149.5 ± 5.8 g) kept under standard vivarium conditions and diet. The investigation was conducted in two phases: chronic (30 days) and acute (3 hours) experiment. All surgical procedures were carried out aseptically under general anesthesia. Ischemic *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) tetanic kinetic changes and force productivity in alcohol intoxicated rats were investigated in the isometric mode, with direct electrical stimulation. The fatigue of *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) was evaluated by three characteristic criteria: the first sag effect, the secondary force rise, the second sag effect. There have been 10 similar

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, пр. Волі, 13, Луцьк, 43025, Україна.

Eastern European National University named after Lesia Ukrainka, Volya ave., 13, Lutsk, 43025, Ukraine.

Tel.: +38-098-795-67-72. E-mail: olexymelnichuk@gmail.com, cmoplutsk@gmail.com, svetashvaiko@ukr.net

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, 01601, Київ, Україна.

ISC "Biology Institute" of Kyiv National University named after Taras Shevchenko, Volodymyrs'ka str., 64/13, 01601, Kyiv, Ukraine.

Tel.: +38-093-740-59-37. E-mail: madpilot.mail@gmail.com

experiments: 5 series in each study group with 10 tetanic runs in each series. The highest amplitude of the native *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) tetanus relative to isoline was taken as 100% force response. The same pattern of *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) low-frequency fatigue development was found in both rat groups under study. It is evidenced by the absence of substantial *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) tetanus kinetics differences in alcohol intoxicated rats, compared with non-alcohol intoxicated rats during fatigue test. However, the appreciable *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) tetanic force reduction in alcohol intoxicated rats, compared with non-alcohol intoxicated rats is found. During fatigue test, *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) of non-alcohol intoxicated rats featured $75.0 \pm 17.4\%$ loss, that of alcohol intoxicated rats has lost $75.0 \pm 17.0\%$, while the native one – $62.0 \pm 11.3\%$ of initial force. Contraction-relaxation cycle kinetics changes were not identified. Thus, the tetanus kinetics and tetanic force change of *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) in alcohol intoxicated rats indicates no changes in the process of development of low-frequency muscle fatigue, compared with non-alcohol intoxicated rats. Low force productivity of *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) in alcohol intoxicated rats compared with non-alcohol intoxicated ones directly results from alcoholic myopathy complicated by vascular ischemia.

Keywords: *m. gastrocnemius*; muscle fatigue; alcohol intoxication; vascular ischemia; tetanic force

Вступ

Ішемічні захворювання складають групу серцево-судинних хвороб, зумовлених недостатньою оксигенацією тканини серця (викликають захворювання коронарної артерії), мозку (цереброваскулярні захворювання) та периферичних м'язів (захворювання периферичних артерій) (Lusis, 2000). Ішемічне ушкодження скелетних м'язів, зумовлене синдромом позиційної ішемії, за якого стиснення м'яких тканин нижніх кінцівок здійснюється масою власного тіла пацієнта, що перебуває в несвідомому стані, часто поєднується з алкогольною інтоксикацією. Безпосереднім патогенетичним механізмом ушкодження міоцитів у цьому випадку є або зменшення їх кровопостачання з наступним розвитком ішемії, або ж зміни метаболізму, що супроводжуються енергетичним дефіцитом (Zaugolnikov and Terlova, 2007). Ішемія викликає тяжкі морфофункціональні порушення м'язової тканини на рівні окремих міофібрил, що супроводжується пролонгованою дистрофією м'язових волокон (Patchenko et al., 2011). Безпосереднім наслідком ішемії є зменшення максимальної силової продуктивності (Lieber et al., 1992; Zavadovskiy et al., 2013), пришвидшення виникнення та розвитку процесу втоми (Lieber et al., 1992; Murthy et al., 2001).

У хворих на алкоголізм може виникнути алкогольна міопатія (Fernandez-Sola, 2003; Clary et al., 2011), яка вважається багатофакторною хворобою та характеризується генералізацією атрофічного процесу у скелетних м'язах, незалежно від їх гістологічної структури (Nicolas, 2003), оскільки при алкогольіндукованому ушкодженні скелетних м'язів найбільше страждають волокна II В (анаеробного) типу, на відміну від волокон I типу (аеробного) (Clary et al., 2011). Проте виявлені незначні атрофічні зміни й у м'язових волокнах I типу (Nicolas, 2003; Iraklis, 2008).

Нервово-м'язова втома може бути визначена як нездатність підтримувати необхідний чи очікуваний рівень сили, зумовлена змінами м'язової активності (Dimitrova et al., 2003; Barry and Enoka, 2007). Це складний процес, пов'язаний із різноманітними центральними та периферичними механізмами (Fitts, 1994). Центральні механізми полягають у зниженні нормальної активності м'язів, спричиненій зменшенням залучення моторних одиниць і зниженням швидкості їх розрядки (González-Izal et al., 2012), периферичні – у порушенні нервово-м'язової передачі та поширенні потенціалу дії, зменшенні сили скорочення м'язових волокон (Boyas and Guevel, 2011).

М'язова втома, пов'язана з ішемією, може бути зумовлена підвищенням концентрації H^+ або фосфатів у м'язах у результаті порушення кровообігу, нестачі кисню чи інших енергетичних субстратів (Murthy et al., 2001), розмежування процесів спряження збудження та скорочення або ж редукцією збудження (Fitts, 1994). Така втома асоціюється з ацидозом, що розвивається упродовж перших хвилин ішемії (Soussi et al., 1990). Припускають, що інгібування кальцієвої сензитивності та депресія м'язової сили, пов'язана із впливом реактивних форм кисню на міофібрили, спричинює м'язову втому (Reid, 2012). Оксидативний стрес – характерна ознака ішемічного ушкодження скелетних м'язів (Duarte et al., 1997) – посилюється за умов алкогольної інтоксикації (Gorshkova, 2013), внаслідок чого ушкоджуються міофібрили та мембранні системи сарколеми та мітохондрій. Найінтенсивніша м'язова втома спостерігається в людей із м'язовою дистрофією та може мати гострий чи хронічний статус (Angelini and Tasca, 2012).

Kiessling зі співавторами показали, що у пацієнтів, госпіталізованих із хронічним алкоголізмом, спостерігаються ознаки втоми скелетних м'язів (Kiessling et al., 1975). В алкоголь-залежних пацієнтів із різним терміном алкоголізації відмічено значну м'язову дисфункцію, незалежно від віку. Найбільші зміни моторної функції виявлені під час анаеробних силових тестів (Pendergast et al., 1990).

Комплексні дослідження впливу етанолу на м'язову тканину виявили достовірні специфічні ознаки атрофії м'язових волокон (Hunter et al., 2003). Ці зміни супроводжуються зменшенням відносного вмісту м'язових протеїнів: міозину, десміну, актину та тропоніну, титіну та небуліну (Reilly et al., 2000), а також зниженням інтенсивності їх синтезу (Vary et al., 2004). Такий ефект алкоголю на скелетні м'язи є результатом ушкодження факторів ініціації трансляції (Frost et al., 2005). Навіть за незначних концентрацій етиловий спирт може змінювати динамічні, біохімічні, механічні параметри скорочення м'язів та їх структуру (Podpalova et al., 2012).

Домінуючими проявами таких змін є м'язова слабкість, ускладнення локомоторної активності (Adachi et al., 2003; Frost et al., 2005), судоми, зниження скоротливої активності та силової продуктивності м'язів, атрофія та некроз (Preedy, 2001), міоглобінурія, набряк, крововилив, гостре запалення, фіброз, дилатація саркоплазматичного ретикулуму, розширення та деформування мітохондрій, збільшення вмісту ліпідів та глікогену у м'язах (Rubin, 1976). Припускається, що причиною м'язової слабкості за умов алкогольної інтоксикації є редукція процесу спряження збудження-скорочення, зумовлена інгібуванням

виходу кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали сарколеми (Cofán et al., 2000).

Зважаючи на значний науковий доробок у галузі ішемічного та алкогольного ушкодження м'язних тканин нижніх кінцівок, відсутні експериментальні роботи, пов'язані з вивченням моторної дисфункції в алкоголь-залежних пацієнтів із васкулярною ішемією, що зумовлює необхідність дослідження даної проблеми. Результати таких досліджень можуть мати прикладне застосування у травматології та токсикології, бути використані для поліпшення методик постішемічної терапії скелетних м'язів, оскільки дозволять краще зрозуміти перебіг процесу м'язової втоми в алкоголь-залежних пацієнтів з ішемічним ушкодженням м'язів.

Зважаючи на важливість медико-соціальних проблем, зумовлених алкоголем, метою дослідження є виявлення характерних змін кінетики тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) в алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою васкулярною ішемією м'язів задніх кінцівок за умов прогресивної низькочастотної втоми.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проводили на 10 молодих самцях щурів лінії Wistar ($m = 149,5 \pm 5,8$ г), яких утримували у стандартних умовах і раціоні віварію. Тварин поділили на дві групи з експериментально-індукованою уніатеральною васкулярною ішемією м'язів задніх кінцівок: неалкоголізовані ($n = 5$, $m = 154,1 \pm 8,3$ г) та алкоголізовані ($n = 5$, $m = 156,0 \pm 11,7$ г).

Протокол експерименту затверджений комісією з питань біоетики СНУ імені Лесі Українки відповідно до правил «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1985) і норм біомедичної етики, згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. № 3446-IV із проведенням медико-біологічних досліджень. Усі хірургічні процедури проводили в асептичних умовах під загальною анестезією.

Ініціація наркотичного сну тіопенталом натрію (0,04 мг/100 г, підтримувальна доза – 0,1 мг/100 г, швидкість введення – 5–10 мл/хв) здійснювалась після попередньої премедикації атропіном для попередження ларингоспазму та бронхоспазму (0,1 мл за 30 хв перед введенням у наркотичний сон). Глибина анестезії контролювалась шляхом оцінки сили згинального рефлексу під час пощипування великого пальця ноги.

Дослідження проходило у дві фази: хронічний (30 діб) і гострий (3 години) експеримент. Експериментальна хронічна алкогольна інтоксикація здійснювалась за методикою М.Х. Халілова та Ш.Я. Закірходжаєва (Haliliv and Zakirhodzhaev, 1983) протягом 30 календарних днів. Для ентеро-гастрального введення 40% етилового спирту застосовували епідуральний катетер Perifix® – Epidural Catheter ($d = 0,45 \times 0,85$ мм, $L = 1000$ мм; B Braun, Німеччина), контрольній групі перорально вводили воду.

Експериментальну унілатеральну васкулярну ішемію тривалістю 3 години індуковано через 30 діб після уве-

дення останньої дози етилового спирту. Для оклюзії проксимального та дистального відділів *a. femoralis* застосовували поліамідні нитки Nurlon 2/0 (Ethicon Inc, США). Після проведення всіх оперативних втручань рану зашивали, цими ж нитками, та дезінфікували 5% спиртовим розчином йоду. Після завершення експерименту тварини були піддані евтаназії шляхом введення критичної дози тіопенталу натрію (0,7 мг/100 г).

M. gastrocnemius (cap. med.), який містить пучки м'язових волокон різного типу (56% – швидкі гліколітичні, 38% – швидкі окисно-гліколітичні, 4% – повільні аеробні (Agiaro et al., 1973)) експонований та звільнений від навколишніх тканин. Поверхневі м'язи *m. biceps femoris* та *m. semitendinosus* вирізували, *m. soleus*, глибокі м'язи згиначі, малогомілкові м'язи та м'язи передньої поверхні гомілки залишили недоторканими, але денервували шляхом перерізання *n. peroneus communis* та відокремлення його поверхневих гілок – *n. peroneus*, *n. tibialis* та *n. suralis*. Після денервації здійснювали міотомію *m. gastrocnemius* відкритим способом по медіальній сполучній лінії до повного розірвання міжм'язових зв'язків медіальної та латеральної головок м'яза. Тенотомію *achilles tendon* здійснювали відокремленням дистального сухожильного кінця *m. gastrocnemius* (cap. med.) від дистального сухожильного кінця *m. plantaris*. Проксимальний сухожильний кінець *m. gastrocnemius* (cap. med.) відокремлювали від *os femoris* та *facies articularis sesamoidea lat. m. gastrocnemius* (cap. med.) контралатеральної сторони у неалкоголізованих щурів використовувався як контрольний м'яз. Підготовку ізольованого м'язового препарату до тензометричного дослідження здійснювали з використанням стереомікроскопа Brunel IMX Zoom Trinocular (Brunel Microscopes Ltd, Велика Британія).

Адаптований (позбавлений залишків нервів, судин і фасціальної сполучної тканини) м'язовий препарат протягом 20 хв розміщували у плексигласовій камері з постійно циркулюючим фізіологічним розчином Тірде ($H_2O - 100$ мл, $NaCl - 0,8$ г, $KCl - 0,02$ г, $CaCl_2 - 0,02$ г, $NaHCO_3 - 0,02$ г, $Na_2HPO_4 - 0,005$ г, $MgCl_2 - 0,01$ г, глюкоза – 0,1 г, O_2 – насичення, Нерес – 0,92 г, $pH - 7,0$) за температури $+37 \pm 1$ °C.

Для індукції низькочастотної м'язової втоми *m. gastrocnemius* (cap. med.) подразнювали через платинові електроди (розміщені на відстані 12 мм один відносно одного) імпульсами прямокутної форми: тривалість – 0,1 мс, частота – 30 Гц, напруга – 2 В, амплітуда – 10 мА. Тривалість стимуляційного сигналу становила 5 с, час релаксації – 2 хв. Імпульси генерували двоканальним імпульсним стимулятором із частотним діапазоном 0,5–50 Гц. Сигнал посилювали низькошумовим багатоканальним підсилювачем із низькочастотним (0,1 Гц) та високочастотним (10 кГц) фільтрами. Силу ізометричного скорочення реєстрували через силовий перетворювач, датчик сили був з'єднаний із підсилювачем і комплексом АЦП-ЦАП. Аналоговий сигнал від датчика подавали на двоканальний аналого-цифровий перетворювач, розрядністю 10 біт із частотою дискретизації 1 кГц.

За 100% силової відповіді брали максимальну висоту тетанусу нативного *m. gastrocnemius* (cap. med.) відносно ізолінії. Для характеристики змін тетанічної сили

m. gastrocnemius (*cap. med.*) розраховували такі параметри: F_{tet} (%) – тетанічна сила, t_{max} (мс) – час досягнення максимальної тетанічної сили, F_{ui} (fusion index) – індекс злиття, FI (fatigue index) – індекс втоми (Celichowski, 1992). Для останнього м'язового скорочення в кожному тетанічному пробігу розраховували CT (contraction time) (мс) – час від початку механічної активності до піка м'язового скорочення, HRT (half-relaxation time) (мс) – половина часу розслаблення. HRT – розраховували як час від тетанічного піка останнього скорочення у тетанусі до половини максимальної сили цього скорочення (Pieterkiewicz, 2007). Остання м'язова відповідь у тетанічному скороченні була обрана тому, що для неї добре простежується час досягнення піка сили та час розслаблення у зубчастому тетанусі.

Індекс злиття F_{ui} (fusion index) розраховано як відношення мінімальної м'язової сили (F_{min}) перед останнім скороченням у тетанусі до максимальної сили (F_{max}) цього скорочення у зубчастому тетанусі: F_{min}/F_{max} .

Індекс втоми FI розраховано як співвідношення кінцевої тетанічної сили (F) у кінці тесту до початкової

(I), яку приймали за 100%: $FI = I / F$. Процес втоми *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) оцінювали за трьома характеристичними критеріями: ефектом першого провисання, вторинним силовим підйомом, ефектом другого провисання (Celichowski, 1992).

Для зручності аналізу зміни кінетики тетанічного скорочення під час низькочастотної м'язової втоми, механограму тетанусу було поділено на чотири функціональні періоди (рис. 1): (t_0-t_1) – перше провисання (час від початку короткочасного зниження м'язової сили до моменту появи її зростання під час вторинного силового підйому), t_1-t_2 – вторинний силовий підйом (характеризує зростання сили м'язу), t_2-t_3 – вторинне провисання механограми тетанусу (відповідає різкій втраті м'язової сили протягом інтервалу часу t_1-t_2 або ж після досягнення максимальної сили F_{tet}), до початку її градуального зниження упродовж наступних компонентів тетанічного скорочення), t_3-t_4 – прогресивне зниження м'язової сили після досягнення F_{tet} . Час t_0 відповідає початку стимуляції.

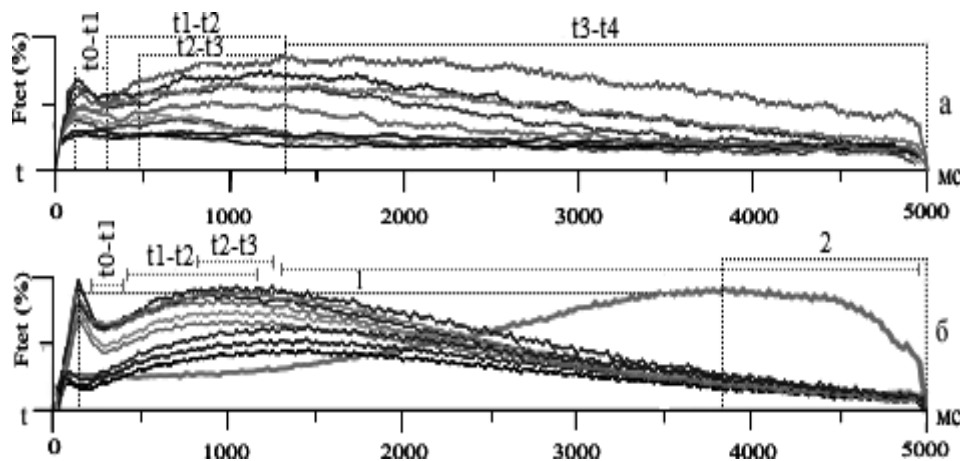


Рис. 1. Критерії оцінки змін кінетики механограми тетанусу *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) за умов прогресивної низькочастотної м'язової втоми: а – ішемізованого (в обох досліджуваних групах щурів), б – нативного *m. gastrocnemius* (*cap. med.*); t_0-t_1 – перше провисання, t_1-t_2 – вторинний силовий підйом, t_2-t_3 – вторинне провисання механограми тетанусу, t_3-t_4 – прогресивне зниження м'язової сили після досягнення F_{tet} ; 1 – вторинний силовий підйом у першому тетанусі, 2 – прогресивне зниження тетанічної сили у цьому ж тетанусі; горизонтальні відмітки на рис. 1 б позначають тренд відповідних контрактильних інтервалів у кожному наступному тетанічному пробігу після першого

В експериментальному дослідженні використано хімічні реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. (Хімлабор-реактив, Україна), етиловий спирт 96% (Біофарма ЛТД, Україна), дистильована вода, тіопентал натрію (Arterium, Україна), атропіну сульфат (0,1%) (ДЗ ГНЦЛС, Україна).

Для аналізу механограми тетанічного скорочення використовували програму Origin 7.0 (OriginLab Corporation, США). Графіки створювали у графічному редакторі CorelDraw x6 (Corel Corporation, Канада). Статистичну обробку результатів дослідження проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft, США). Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шанпіро – Вілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок застосовували U-критерій Манна – Вітні. Достовірними вважали відмінності за $P < 0,05$. Результа-

ти представлені як середнє арифметичне $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$), вказана кількість дослідів (n).

Результати та їх обговорення

Скелетні м'язи, залежно від виконуваних ними функцій, містять різне кількісне співвідношення повільних і швидких м'язових волокон. У зв'язку із цим рухові одиниці ссавців володіють значними відмінностями за їх функціональними властивостями. Ці відмінності проявляються у часовому ході зубчастого тетанусу (Celichowski, 1992). Швидкі рухові одиниці, які складаються з м'язових волокон анаеробного типу, порівняно з повільними, володіють так званим провисанням, тобто швидко зростання тетанічної напруженості упродовж перших компонентів зубчастого тетанусу супроводжується її наступним зниженням у наступних

його компонентах (Burke, 1981). Ця властивість моторних одиниць є критерієм їх диференціації на швидкі та повільні, пов'язана зі зміною у потенціюванні тетанічної сили. У зв'язку із цим обрана нами частота стимуляції дозволила простежити кінетику тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.), що складається винятково з анаеробних м'язових волокон (Ariano et al., 1973) за умов прогресивної низькочастотної м'язової втоми.

Результати досліджень показали, що зміна часового ходу тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) в обох досліджених групах щурів відбувається однаково, причому очевидно є тенденція до зменшення вираженості характеристичних параметрів низькочастотної втоми

механограми тетанусу в останніх тетанічних пробігах в алкоголізованих і неалкоголізованих щурів (рис. 2). У кожному наступному тетанічному пробігу час появи та тривалість цих параметрів зменшуються (табл. 1), одночасно із прискоренням досягнення піку тетанічної сили. Відсутність суттєвих відмінностей у кінетиці тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) дає підстави говорити про однаковий темп розвитку процесу низькочастотної м'язової втоми у досліджуваних групах щурів, а також вказує на ішеміє-асоційовану зумовленість кінетичних змін тетанусу, свідченням чого є швидка поява вторинного провисання механограми тетанусу, внаслідок чого м'яз не може досягти верхньої межі тетанічної сили.

Таблиця 1

Часовий хід (с) тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.)

№	Час появи			Тривалість		
	контроль	неалкоголізовані	алкоголізовані	контроль	неалкоголізовані	алкоголізовані
t_0-t_1						
1	0	0,15 ± 0,09*	0,20 ± 0,16*,**	0	0,23 ± 0,11	0,19 ± 0,06
2	0,19 ± 0,09	0,12 ± 0,06*	0,17 ± 0,14	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,08	0,23 ± 0,14
3	0,19 ± 0,03	0,13 ± 0,06	0,17 ± 0,09	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,12	0,19 ± 0,13
4	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,07	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,14	0,23 ± 0,18
5	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,17 ± 0,12*,**	0,12 ± 0,01	0,26 ± 0,10	0,25 ± 0,23
6	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,25 ± 0,10	0,35 ± 0,23
7	0,14 ± 0,02	0,10 ± 0,05	0,21 ± 0,10	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,07	0,43 ± 0,31
8	0,15 ± 0,02	0,08 ± 0,03*	0,14 ± 0,08	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,10	0,27 ± 0,06
9	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,02*	0,14 ± 0,13	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,09	0,19 ± 0,15
10	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,14	0,13 ± 0,02	0,26 ± 0,17	0,16 ± 0,12
t_1-t_2						
1	0	0,31 ± 0,14*	0,34 ± 0,15	3,80 ± 0,02	0,21 ± 0,75*	1,04 ± 0,12
2	0,36 ± 0,02	0,17 ± 0,10*	0,19 ± 0,13	1,23 ± 0,17	0,64 ± 0,45	0,14 ± 1,40
3	0,37 ± 0,05	0,34 ± 0,30	0,29 ± 0,11	1,02 ± 0,10	0,61 ± 0,38	0,54 ± 1,40
4	0,32 ± 0,04	0,32 ± 0,17	0,43 ± 0,22	0,61 ± 0,19	0,60 ± 0,34	0,62 ± 0,28
5	0,26 ± 0,01	0,42 ± 0,23	0,30 ± 0,29	0,69 ± 0,07	0,55 ± 0,23	0,90 ± 0,85
6	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,15	0,37 ± 0,14	0,73 ± 0,07	0,65 ± 0,30	0,72 ± 0,25
7	0,27 ± 0,01	0,23 ± 0,14	0,37 ± 0,27	0,77 ± 0,05	0,61 ± 0,22*	0,41 ± 0,33
8	0,26 ± 0,03	0,22 ± 0,12	0,26 ± 0,21	0,81 ± 0,01	0,40 ± 0,23	0,49 ± 0,41
9	0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,16	0,17 ± 0,14	0,65 ± 0,15	0,20 ± 0,03	0,36 ± 0,40
10	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,24	0,14 ± 0,12	0,76 ± 0,06	0,21 ± 0,17	0,47 ± 0,80
t_2-t_3						
1	0	0,63 ± 0,46*	0,87 ± 0,14	0	1,47 ± 0,38*	1,33 ± 0,36
2		0,61 ± 0,27*	1,14 ± 1,05		1,45 ± 1,37*	1,59 ± 1,78
3		0,71 ± 0,07*	0,64 ± 0,29		0,90 ± 0,23*	0,31 ± 0,21*,**
4		0,83 ± 0,37*	0,53 ± 0,50		0,71 ± 0,62*	0,53 ± 0,26
5		0,66 ± 0,37*	0,66 ± 0,30		0,54 ± 0,41*	0,36 ± 0,09
6		1,44 ± 0,82*	0,80 ± 0,35		0,74 ± 0,41*	0,45 ± 0,07
7		0,81 ± 0,13*	0,78 ± 0,41		0,50 ± 0,35*	0,44 ± 0,32
8		0,71 ± 0,31*	0,71 ± 0,39		0,56 ± 0,31*	0,38 ± 0,31
9		0,70 ± 0,35*	0,47 ± 0,30		0,50 ± 0,12*	0,21 ± 0,37
10		0,62 ± 0,24*	0,49 ± 0,26		0,57 ± 0,67*	0,36 ± 0,53
t_3-t_4						
1	4,20 ± 0,56	2,74 ± 1,12*	2,79 ± 0,68	1,04 ± 0,09	2,37 ± 1,21	2,59 ± 0,39
2	1,67 ± 0,02	2,14 ± 1,40	1,94 ± 0,54	3,43 ± 0,50	3,07 ± 1,24	2,79 ± 1,68
3	1,14 ± 0,21	1,54 ± 1,40	1,87 ± 1,20	3,34 ± 0,44	3,71 ± 0,30	4,03 ± 0,48
4	1,05 ± 0,02	1,62 ± 0,28*	1,44 ± 0,62	4,34 ± 0,15	3,91 ± 0,32*	4,21 ± 0,36
5	0,96 ± 0,02	1,90 ± 0,85*	1,32 ± 0,48	4,38 ± 0,01	3,90 ± 0,11*	4,31 ± 0,51
6	0,97 ± 0,02	1,72 ± 0,25*	1,18 ± 0,39*,**	4,04 ± 0,05	3,77 ± 0,49	4,38 ± 0,43
7	0,95 ± 0,11	1,41 ± 0,33*	1,57 ± 0,31	4,03 ± 0,01	3,95 ± 0,52	4,07 ± 0,10
8	1,15 ± 0,09	1,49 ± 0,41	1,46 ± 0,18	4,05 ± 0,02	3,86 ± 0,42	4,18 ± 0,17
9	1,09 ± 0,08	1,36 ± 0,40	1,21 ± 0,21	4,00 ± 0,08	4,23 ± 0,39	4,69 ± 0,21
10	1,07 ± 0,02	1,47 ± 0,80	1,00 ± 0,51	4,03 ± 0,04	4,00 ± 0,85	4,87 ± 0,17

Примітки: *t₀-t₁* – перше провисання, *t₁-t₂* – вторинний силовий підйом, *t₂-t₃* – вторинне провисання механограми тетанусу, *t₃-t₄* – прогресивне зниження тетанічної сили після досягнення тетанічного піку; № – номер тетанічного пробігу; * – $P < 0,05$ у неалкоголізованих щурів порівняно з контролем, * – $P < 0,05$ в алкоголізованих щурів порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими ($n = 5$).

Стосовно першого провисання механограми тетанусу встановлено, що даний параметр найвираженіший у першому тетанічному пробігу *m. gastrocnemius* (cap. med.) в обох досліджених групах щурів (рис. 2). Його поява на механограмі тетанусу нативного *m. gastrocnemius* (cap. med.) спостерігається в усіх тетанічних пробігах, окрім першого. Ми пояснюємо це повільним залученням у процес тетанічного скорочення швидких рухових одиниць, оскільки вони володіють високим порогом збудження (Mrówczyński et al., 2011). Необхідно зазначити, що в останніх тетанічних пробігах простежується тенденція до зменшення вираженості першого провисання механограми тетанусу (рис. 2).

Даний параметр з'являється на механограмі тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) у неалкоголізованих щурів через $0,12 \pm 0,06$ с після початку механічної активності, а в алкоголізованих – через $0,17 \pm 0,12$ с відносно часу t_0 . Середній час тривалості першого прогину у групі неалкоголізованих щурів становить $0,21 \pm 0,11$ с, у групі алкоголізованих – $0,25 \pm 0,18$ с ($P < 0,05$). Натомість, у нативного м'яза часові інтервали періоду t_0-t_1 становлять: час появи – $0,14 \pm 0,06$ с, тривалість $0,14 \pm 0,05$ с.

Початок вторинного зростання тетанічної сили під час вторинного силового підйому в неалкоголізованих щурів збігається з таким у нативного м'яза: $0,26 \pm 0,10$ с. У неалкоголізованих тварин вторинне зростання тетанічної сили починається через $0,28 \pm 0,18$ с, тоді як у групі алкоголізованих – через $0,29 \pm 0,19$ с відносно часу t_0 . Зважаючи на незначні відмінності в часі появи, тривалість вторинного підйому дещо відмінна: $0,57 \pm 0,42$ с у неалкоголізованих щурів і $0,51 \pm 0,48$ с в

алкоголізованих. В алкоголізованих щурів вторинний силовий підйом триває $1,10 \pm 0,93$ с. Однак ці відмінності не є статистично достовірними.

Вторинне провисання механограми тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) є параметром, що вказує на різке зменшення тетанічної сили у досліджуваних групах щурів. У нативного *m. gastrocnemius* (cap. med.) даний показник не був ідентифікований. Натомість у неалкоголізованих щурів цей параметр спостерігається через $0,81 \pm 0,56$ с, а в алкоголізованих – через $0,73 \pm 0,46$ с відносно часу t_0 . Характерно, що як і під час першого прогину та вторинного силового підйому, тривалість другого прогину дещо менша в групі алкоголізованих щурів ($0,58 \pm 0,34$ с) порівняно з неалкоголізованими ($0,79 \pm 0,74$ с), проте ці відмінності не є суттєвими. Другий прогин не був виявлений на механограмі тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) в алкоголізованих щурів в останніх двох тетанічних пробігах у серії експерименту 3, 4 та 5 через відсутність чітких меж для його ідентифікації (рис. 2). У нативного м'яза за умов короткочасної повторюваної стимуляції протягом експерименту вторинне провисання механокінетичної кривої є наслідком тривалої м'язової роботи, що свідчить про настання процесу втоми (Celichowski, 1992). У нашому дослідженні друге провисання механограми тетанусу нативного *m. gastrocnemius* (cap. med.) не спостерігається, оскільки за умов безперервної електричної стимуляції м'яз розвиває силу, яка, досягнувши пікового значення, прогресивно знижується до вихідного рівня.

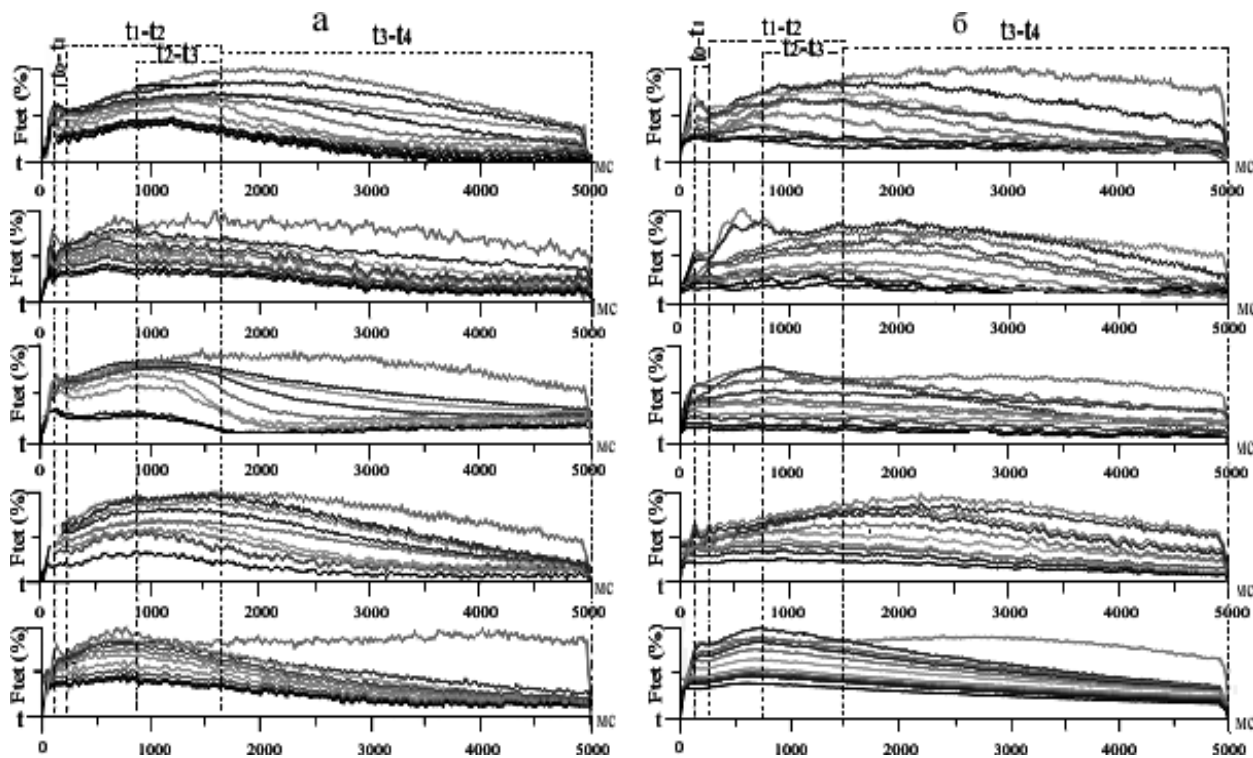


Рис. 2. Кінетика тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) за умов прогресивної низькочастотної втоми неалкоголізованих (а) і алкоголізованих (б) щурів: t_0-t_1 – перше провисання, t_1-t_2 – вторинний силовий підйом, t_2-t_3 – вторинне провисання механограми тетанусу, t_3-t_4 – прогресивне зниження м'язової сили; F_{tet} (%) – максимальна тетанічна сила, t (мс) – час; механограма тетанусу нативного *m. gastrocnemius* (cap. med.) показана на рис. 1б

Що стосується контрактильного інтервалу t_3-t_4 , то в неалкоголізованих щурів прогресивне зниження тетанічної сили починається через $1,74 \pm 0,72$ с, в алкоголізованих – через $1,58 \pm 0,72$ с відносно часу t_0 . Тривалість інтервалу t_3-t_4 становить $3,68 \pm 0,81$ та $4,01 \pm 0,91$ с відповідно, ці відмінності не є статистично значущими. Для порівняння, у нативного м'яза ці показники становлять: початок – $1,58 \pm 1,17$, тривалість – $3,72 \pm 1,05$ с. Можна стверджувати, що кінетика тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) у досліджуваних групах щурів порівняно з нативним м'язом за умов низькочастотної

втоми не зазнає суттєвих змін, оскільки середній час, протягом якого ці зміни можуть бути ідентифіковані, а також тривалість характеристичних параметрів тетанусу суттєво не відрізняються (табл. 2).

Поряд із незначними відмінностями у кінетиці тетанусу силова продуктивність м'яза зазнає суттєвих змін, особливо в алкоголізованих щурів, порівняно з нативним *m. gastrocnemius* (cap. med.) ($P < 0,05$) (табл. 3). В алкоголізованих щурів тетанічна сила *m. gastrocnemius* (cap. med.) становить $62,5 \pm 11,6\%$ від F_{tet} неалкоголізованих ($P < 0,05$).

Таблиця 2

Середні показники характеристичних періодів тетанусу (с) *m. gastrocnemius* (cap. med.) під час тесту на втому

Параметр	Контроль		Неалкоголізовані		Алкоголізовані	
	час виявлення	тривалість	час виявлення	тривалість	час виявлення	тривалість
t_0-t_1	$0,14 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,11$	$0,17 \pm 0,12$	$0,25 \pm 0,18$
t_1-t_2	$0,26 \pm 0,10$	$1,10 \pm 0,93$	$0,28 \pm 0,18$	$0,57 \pm 0,42$	$0,29 \pm 0,19$	$0,51 \pm 0,48$
t_2-t_3	0	0	$0,81 \pm 0,56$	$0,79 \pm 0,74$	$0,73 \pm 0,46$	$0,58 \pm 0,34$
t_3-t_4	$1,58 \pm 1,17$	$3,72 \pm 1,05$	$1,74 \pm 0,77$	$3,68 \pm 0,81$	$1,58 \pm 0,72$	$4,01 \pm 0,91$

Примітки: t_0-t_1 – перше провисання, t_1-t_2 – вторинний силовий підйом, t_2-t_3 – вторинне провисання механограми тетанусу, t_3-t_4 – прогресивне зниження тетанічної сили після досягнення піка тетанічного скорочення, * – $P < 0,05$, $n = 50$.

Таблиця 3

Параметри силової відповіді *m. gastrocnemius* (cap. med.)

№	F_{tet} , %			F_{ul}		
	контроль	неалкоголізовані	алкоголізовані	контроль	неалкоголізовані	алкоголізовані
1	100	73,17 ± 7,86	31,17 ± 17,17*,*	0,81 ± 0,06	0,64 ± 0,03*	0,56 ± 0,16
2		73,84 ± 14,7*	36,26 ± 18,59*,*	0,71 ± 0,05	0,60 ± 0,04*	0,45 ± 0,15
3		64,35 ± 9,73*	37,73 ± 18,89*,*	0,65 ± 0,12	0,54 ± 0,04	0,46 ± 0,07*,**
4		64,22 ± 8,45*	37,33 ± 18,04*,*	0,57 ± 0,13	0,50 ± 0,05	0,41 ± 0,09
5		63,06 ± 6,24	34,94 ± 15,92*,*	0,47 ± 0,11	0,46 ± 0,04	0,34 ± 0,05*,**
6		59,25 ± 6,14*	29,01 ± 14,63*,*	0,43 ± 0,11	0,43 ± 0,02	0,26 ± 0,03*,**
7		57,29 ± 6,11*	29,56 ± 14,49*,*	0,45 ± 0,08	0,38 ± 0,01	0,23 ± 0,06*,**
8		51,33 ± 2,33	26,23 ± 13,04*,*	0,40 ± 0,06	0,31 ± 0,03	0,22 ± 0,08
9		49,20 ± 4,33	23,60 ± 13,91*,*	0,34 ± 0,05	0,27 ± 0,03	0,20 ± 0,07*,**
10		52,09 ± 5,21	20,11 ± 10,04*,*	0,31 ± 0,10	0,23 ± 0,04	0,17 ± 0,06
t_{max} , с				FI		
1	4,07 ± 0,09	2,28 ± 0,48*	1,40 ± 0,89	0,38 ± 0,04	0,71 ± 0,06*	0,64 ± 0,04*,**
2	2,63 ± 0,32	1,89 ± 0,62*	1,63 ± 0,41			
3	2,31 ± 0,16	1,68 ± 0,41*	1,56 ± 0,39			
4	1,49 ± 0,42	1,61 ± 0,29	1,61 ± 0,41			
5	1,10 ± 0,01	1,16 ± 0,88	1,54 ± 0,47			
6	0,84 ± 0,05	1,31 ± 0,12*	1,43 ± 0,44			
7	0,78 ± 0,08	1,21 ± 0,27	0,94 ± 0,22			
8	0,78 ± 0,12	1,04 ± 0,22	0,76 ± 0,21			
9	0,67 ± 0,09	0,82 ± 0,49	0,68 ± 0,18			
10	0,55 ± 0,14	0,74 ± 0,44	0,60 ± 0,23			

Примітки: F_{tet} – тетанічна сила, t_{max} – час розвитку максимальної тетанічної сили, F_{ul} – індекс злиття, FI – індекс втоми, № – номер тетанічного пробігу; * – $P < 0,05$ у неалкоголізованих щурів порівняно з контролем, * – $P < 0,05$ в алкоголізованих щурів порівняно з контролем, ** – $P < 0,05$ в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими; $n = 5$.

Силову продуктивність *m. gastrocnemius* (cap. med.) у досліджуваних групах щурів зменшується з кожним реалізованим тетанічним пробігом, одночасно зі зменшенням часу досягнення максимальної сили та показників індексу злиття. Відмінності у часі досягнення F_{tet} не є статистично достовірними. На підставі показників індексу злиття можемо стверджувати, що зменшення ступеня злиття окремих м'язових скорочень упродовж послідовних тетанічних пробігів свідчить про залежність зменшення тетанічної сили від дефіциту вільного Ca^{2+} , оскільки кальцієвий дисбаланс –

характерна ознака м'язової дисфункції у таких патологічних умовах (Oba et al., 1997; Westerblad and Allen, 1998).

Показники індексу втоми свідчать про пришвидшення розвитку низькочастотної втоми *m. gastrocnemius* (cap. med.) в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими (табл. 1, рис. 3 б), оскільки в даному випадку упродовж тесту м'яз втрачає $36,0 \pm 17,0\%$ початкової тетанічної сили, в неалкоголізованих – $29,0 \pm 17,4\%$. F_{tet} нативного *m. gastrocnemius* (cap. med.) до кінця тесту зменшується на $62,0 \pm 11,3\%$. Отже, темп

розвитку низькочастотної втоми нативного *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) значно більший, аніж у неалкоголізованих і алкоголізованих щурів ($P < 0,05$). Ми пояснюємо це високою тетанічною силою нативного м'яза у першому тетанічному пробігу, внаслідок чого зменшення тетанічної сили відбувається швидше, про що свідчить високий показник індексу втоми. У неалкоголізованих і алкоголізованих тварин *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) початково розвиває меншу тетанічну силу порівняно з нативним м'язом, що зумовлює зменшення показників індексу втоми (табл. 3).

F_{tet} *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) зменшується рівномірно упродовж усього експерименту. Проте у нативного м'яза F_{tet} у другому тетанусі становить $82,3 \pm 3,0\%$, у кожному наступному – $91,3 \pm 1,1\%$ тетанічної сили попереднього тетанусу. У неалкоголізованих щурів F_{tet} у кожному наступному тетанічному пробігу становить $84,5 \pm 1,9\%$ тетанічної сили попереднього тетанусу. В алкоголізованих тварин цей показник дорівнює $84,1 \pm 1,6\%$. Ці відмінності не є статистично достовірними, що свідчить про відсутність змін у

швидкості зменшення тетанічної сили в цих групах (див. рис. 3 а).

Аналіз контрактильних параметрів останнього м'язового скорочення у тетанусі також вказує на відсутність достовірних відмінностей кінетики циклу скорочення – розслаблення. Для нативного *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) $CT = 0,04 \pm 0,006$ с, а $HRT = 0,02 \pm 0,006$ с. У неалкоголізованих і алкоголізованих щурів ці показники дещо збільшуються, однак статистично не відрізняються: $CT = 0,05 \pm 0,01$ с, $HRT = 0,02 \pm 0,006$ с; $CT = 0,05 \pm 0,01$ с, $HRT = 0,02 \pm 0,007$ с відповідно.

Можливим поясненням відсутності змін кінетики тетанусу можуть бути особливості гістологічної структури *m. gastrocnemius* (*cap. med.*). Враховуючи співвідношення м'язових волокон у досліджуваному м'язі (Ariano et al., 1973), можна стверджувати, що головну роль у тонічному підтриманні сили відіграють повільні рухові одиниці, які за низьких частот стимуляції повільно досягають необхідного рівня сили (Nicolas et al., 2003) та є резистентними до впливу етилового спирту.

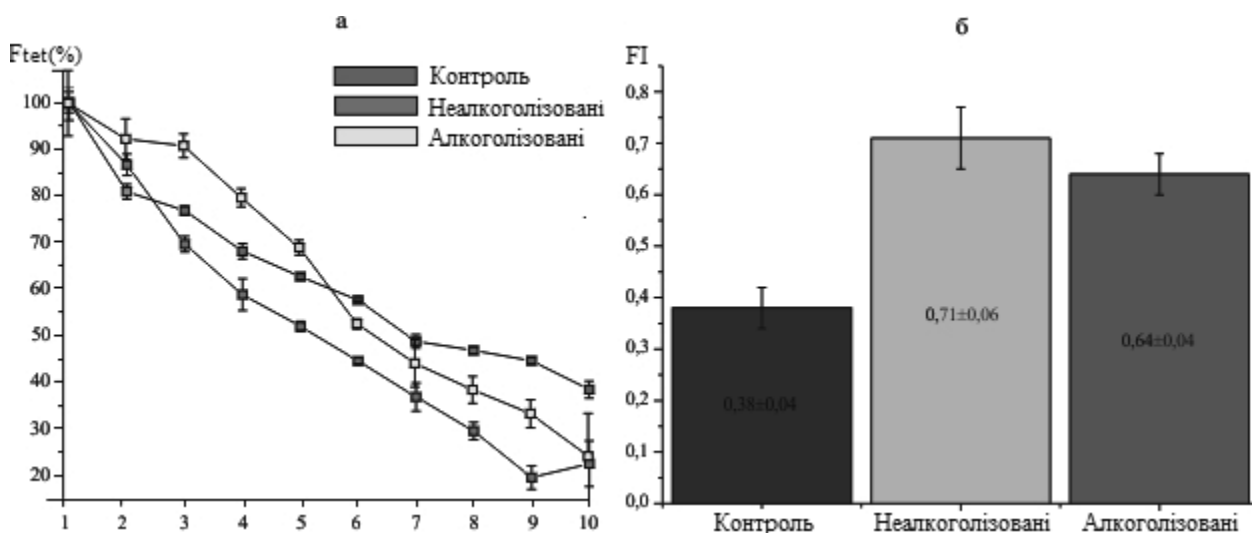


Рис. 3. Зміна тетанічної сили (а) та показники індексу втоми (б) *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) за умов прогресивної низькочастотної м'язової втоми: на рис. 3 а вісь ординат відповідає тетанічній силі F_{tet} (%), на рис. 3 б – індексу втоми (Fatigue Index); на рис. 3 а вісь абсцис – порядковий номер тетанусу під час тесту

У досліджуваних групах щурів перше провисання ідентифікується вже у першому тетанусі, тоді як у нативного м'яза воно не спостерігається. Втома швидких рухових одиниць супроводжується чітко вираженим першим провисанням механокінетичної кривої першого тетанусу з тенденцією до зникнення в наступних послідовних тетанічних пробігах (Celichowski, 1992). Ми пояснюємо це тонічною активністю повільних рухових одиниць, для яких ефект першого провисання не характерний (Burke, 1981), тому залучення швидких рухових одиниць потребує більше часу через високий поріг чутливості. Залучення у процес тетанічного скорочення анаеробних волокон супроводжується швидким виходом на тетанічне плато, оскільки вони забезпечують високу силу (Mrówczyński et al., 2011). Більш раннє досягнення піка ізометричної напруженості в наступних тетанусах у нативного м'яза, ймовірно, пов'язане зі зниженням порогу чутливості внаслідок

фосфорилування міозину, що робить м'яз чутливішим до активації, оскільки зазначено, що посилення рівня фосфорилування міозину передуює втомі м'яза (Cooke, 2007). Під час ішемії та алкогольної інтоксикації функціональна активність швидких рухових одиниць обмежується (Soussi et al., 1990), тому основне функціональне навантаження забезпечують повільні рухові одиниці, відносно резистентні до міотоксичного впливу алкоголю та його метаболіту – ацетальдегіду, проте вразливі до ішемії. Цей факт пояснює рівномірне зменшення тетанічної сили протягом експерименту в обох досліджуваних групах.

Таким чином, прогресивна низькочастотна втома *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) супроводжується значним зменшенням тетанічної сили в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими. Низька тетанічна сила *m. gastrocnemius* (*cap. med.*) в алкоголізованих тварин пояснюється алкоголь-індукованими структурно-

функціональними змінами: зміною окислювально-відновного статусу та антиоксидантного балансу (Fernandez-Sola et al., 2002), зниженням швидкості білкового синтезу, в тому числі й міофібрилярних білків (Vary et al., 2004), зміною стану мембран (Martin et al., 1984) та утворенням ацетальдегід-білкових адуктів (Estruch et al., 1993), порушенням вуглеводного, білкового, ліпідного та енергетичного обміну, структури та активності ферментів скелетних м'язів (Martin et al., 1984), ушкодженням ДНК та РНК (Hofer et al., 2005).

У неалкоголізованих щурів безпосереднім чинником редукції силової продуктивності будуть насамперед ультраструктурні зміни міофібрил, оскільки показано, що судинна оклюзія тривалістю 1 годину спричинює інтенсивну тканинну дегенерацію, яка супроводжується набряком, відокремленням м'язових волокон, розширенням міжфібрилярного простору (Carmo-Araújo et al., 2007), а також зменшенням площі поперечного перерізу м'язів, зумовленим фагоцитами (Motoharu et al., 2011). Інтенсивна міофібрилярна деградація викликати зміни структури саркомерів, унаслідок чого змінюватимуться механічні параметри м'яза, а кожний новий цикл механічної активності дедалі більше дестабілізуватиме саркомер (Nozdrenko et al., 2012). Ішемія скелетних м'язів, зумовлена тривалим стисненням або судинним ушкодженням в анаеробних умовах і за зниження продукції АТФ, пригнічує активність Na^+K^+ -АТФази, що зумовлює накопичення внутрішньоклітинної рідини та зростання концентрації інтрафібрилярного Ca^{2+} або зниження рівня його акумуляції чи відтоку внаслідок підвищення проникності мембрани саркоплазматичного ретикулуму (Tupling et al., 2001) та викликає розвиток контрактури.

За умов хронічної алкогольної інтоксикації ці зміни поглиблюватимуться, оскільки мембранна дестабілізація супроводжується підвищенням активності Ca^{2+} -АТФази, що змінює гомеостаз кальцію та дестабілізує скоротливу функцію м'язів (Ohlendieck et al., 2003), причому відмічене помітне збільшення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} під час алкогольної інтоксикації (Oba et al., 1997). Збільшення клітинної концентрації Ca^{2+} активує кальційактивовані нейтральні протеази, які спричиняють дегенерацію внутрішньоклітинних білків (Како, 1986). Це за умов алкогольної міопатії є фактором додаткового протеолізу. У цілому, зміни швидкісно-силових характеристик скелетних м'язів у досліджуваних груп щурів схожі зі змінами динамічних параметрів скорочення скелетних м'язів у разі виникнення фізіологічної втоми (Holobar et al., 2009).

Висновки

Під час низькочастотної втоми кінетика тетанусу *m. gastrocnemius* (cap. med.) в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими не зазнає суттєвих змін. Часові характеристики функціональних періодів механограми тетанусу у досліджуваних групах тварин порівняно з нативним м'язом також не відрізняються. Маркером, що свідчить про ускладнення моторної функції, в даному випадку виступає вторинне провисання механограми тетанусу. Його поява уже під

час вторинного силового підйому вказує на ішеміє-асоційовану зміну кінетики тетанусу, зумовлену ультраструктурною дезорганізацією міофібрил, що супроводжується різкою втратою тетанічної сили. Це дозволяє говорити про однаковий темп розвитку процесу низькочастотної втоми *m. gastrocnemius* (cap. med.) у досліджуваних групах щурів, однак швидший порівняно з нативним м'язом. Відсутність суттєвих відмінностей у швидкості зміни сили та кінетики циклу скорочення – розслаблення в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими також вказує на однаковий темп розвитку низькочастотної м'язової втоми. Низька силова продуктивність і вищий індекс втоми *m. gastrocnemius* (cap. med.) в алкоголізованих щурів порівняно з неалкоголізованими не є наслідком прогресивної низькочастотної втоми. Ці відмінності зумовлені алкогольасоційованою міопатією. У зв'язку з цим васкулярна ішемія є фактором додаткового поглиблення контрактильної дисфункції *m. gastrocnemius* (cap. med.), що не дозволяє м'язу досягти оптимуму тетанічної сили в даних умовах.

Бібліографічні посилання

- Adachi, J., Asano, M., Ueno, Y., Niemelä, O., Ohlendieck, K., Peters, T.J., Preedy, V.R., 2003. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14(11), 616–625.
- Angelini, C., Tasca, E., 2012. Muscle fatigue in neuromuscular disorders pathogenic mechanisms and treatment. *Neuromuscular Disord.* 22(3), 214–220.
- Ariano, M.A., Armstrong, R.B., Edgerton, V.R., 1973. Hind limb muscle fiber populations of five mammals. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 51–55.
- Barry, B.K., Enoka, R.M., 2007. The neurobiology of muscle fatigue: 15 years later. *Integr. Comp. Biol.* 47(4), 465–473.
- Boyas, S., Guevel, A., 2011. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: Underlying factors and adaptation mechanisms. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 54, 88–108.
- Burke, R.E. 1981. Motor unit: Anatomy, physiology and functional organization. *Handbook of Physiology* 2, 345–422.
- Carmo-Araújo, E.M., Dal-Pai-Silva, M., Dal-Pai, V., Cecchini, R., Anjos Ferreira, A.L., 2007. Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: Morphological and histochemical studies. *Int. J. Exp. Pathol.* 88(3), 147–154.
- Celichowski, J., 1992. Motor units of medial gastrocnemius muscle in the rat during the fatigue test. I. Time course of unfused tetanus. *Acta Neurobiol. Exp.* 52, 17–21.
- Clary, C.R., Guidot, D.M., Bratina, M.A., Otis, J.S., 2011. Chronic alcohol ingestion exacerbates skeletal muscle myopathy in HIV-1 transgenic rats. *AIDS Res. Ther.* 8(30), 1–9.
- Cofán, M., Nicolás, J.M., Fernández-Solá, J., Jordi, R., Tobias, E., Sacanella, E., Estruch, R., Urbano-Márquez, A., 2000. Acute ethanol treatment decreases intracellular calcium transients in mouse single skeletal muscle fibres *in vitro*. *Alcohol & Alcoholism* 35(2), 134–138.
- Cooke, R., 2007. Modulation of actomyosin interaction during fatigue of skeletal muscle. *Muscle Nerve* 36(6), 756–777.
- Dimitrova, N.A., Dimitrov, G.V., 2003. Interpretation of EMG changes with fatigue: Facts, pitfalls, and fallacies. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 13, 13–36.
- Duarte, J.A., Glöser, S., Remião, F., Carvalho, F., Bastos, M.L., Soares, J.M., Appel, H.J., 1997. Administration of tourniquet. I. Are edema and oxidative stress related to each other

- and to the duration of ischemia in reperfused skeletal muscle? Arch. Orthop. Trauma Surg. 116(1–2), 97–100.
- Estruch, R., Nicolas, J.M., Villegas, E., Junqué, A., Urbano-Márquez, A., 1993. Relationship between ethanol related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. Alcohol & Alcoholism 28(5), 543–550.
- Fernandez-Sola, J., Garcia, G., Elena, M., Tobías, E., Sacanella, E., Estruch, R., Nicolás, J.M., 2002. Muscle antioxidant status in chronic alcoholism. Alcohol Clin. Exp. Res. 26(12), 1858–1862.
- Fernandez-Sola, J., Preedy, V.R., Lang, C.H., Gonzalez-Reimers, E., Arno, M., Lin, J.C., Wiseman, H., Zhou, S., Emery, P.W., Nakahara, T., Hashimoto, K., Hirano, M., Santolaria-Fernández, F., González-Hernández, T., Fatjó, F., Sacanella, E., Estruch, R., Nicolás, J.M., Urbano-Márquez, A., 2007. Molecular and cellular events in alcohol-induced muscle disease. Alcohol Clin. Exp. Res. 31(12), 1953–1962.
- Fitts, R.H., 1994. Cellular mechanisms of muscle fatigue. Physiol. Rev. 74(1), 49–94.
- Frost, R.A., Nystrom, G., Burrows, P.V., Lang, C.H., 2005. Temporal differences in the ability of ethanol to modulate endotoxin-induced increases in inflammatory cytokines in muscle under *in vivo* conditions. Alcohol Clin. Exp. Res. 29(7), 1247–1256.
- González-Izal, M., Malanda, A., Gorostiaga, E., Izquierdo, M., 2012. Electromyographic models to assess muscle fatigue. J. Electromyog. Kines. 22, 501–512.
- Gorshkova, D.A., 2013. Sostojanie svobodnoradikal'nih procesov pri hronicheskoy alkogol'noj intoksikacii [Free radical processes state in chronic alcohol intoxication]. Actual Problems of Medicine. Materials of final annual scientific-practical conference on January 22, 2013 [Aktual'nie Problemy Mediciny. Materialy ezhegodnoj itogovoy nauchno-prakticheskoy konferencii 22 janvarja 2013]. Grodno, 191–193 (in Bilorus).
- Halilov, M.H., Zakirhodzhaev, S.J., 1983. K karakteristike nekotoryh patohimicheskikh sdvigov v krovi, tkanjah pecheni i golovnogno mozga pry eksperimentalnoj alkogolnoj intoksikacii. Voprosy Kliniki Alkogolizma. Tashkent, 38–41.
- Hofer, T., Badouard, C., Bajak, E., Ravanat, J.L., Mattsson, A., Cotgreave, I.A., 2005. Hydrogen-peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. Biol. Chem. 386(4), 333–337.
- Holobar, A., Farina, D., Gazzoni, M., Merletti, R., Zazula, D., 2009. Estimating motor unit discharge patterns from high-density surface electromyogram. Clin. Neurophysiol. 120(3), 551–562.
- Hunter, R.J., Neagoe, C., Järveläinen, H.A., Martin, C.R., Lindros, K.O., Linke, W.A., Preedy, V.R., 2003. Alcohol affects the skeletal muscle proteins, titin and nebulin in male and female rats. J. Nutr. 133(4), 1154–1157.
- Iraklis, I., 2008. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295(1), 290–296.
- Kako, K.J., 1986. Membrane phospholipids and plasmalogens in the ischemic myocardium. Can. J. Cardiol. 2(3), 184–194.
- Kiessling, K.H., Pilström, L., Bylund, A.C., Piehl, K., Saltin, B., 1975. Effect of chronic ethanol abuse on structure and enzyme activities of skeletal muscle in man. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 35(6), 601–607.
- Lieber, L.R., Pedowitz, R.A., Friden, J., Gershuni, D.H., 1992. Decrease muscle speed. Strength and fatigability following two hours of tourniquet-induced ischemia. Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg. 26, 127–132.
- Lusis, A.J., 2000. Atherosclerosis. Nature 407, 233–241.
- Martin, F.C., Slavin, G., Levi, A.J., Peters, T.J., 1984. Investigation of the organelle pathology of skeletal muscle in chronic alcoholism. J. Clin. Pathol. 37(4), 448–454.
- Motoharu, I., Yasuhiro, K., 2011. Morphologic changes in rat skeletal muscle after anterior tibial muscle and artery ligation. J. Clin. Welfare 10(8), 55–63.
- Mrówczyński, W., Celichowski, J., Krutki, P., Cabaj, A., Sławińska, U., Majczyński, H., 2011. Changes of the force-frequency relationship in the rat medial gastrocnemius muscle after total transection and hemisection of the spinal cord. J. Neurophysiol. 105, 2943–2950.
- Murthy, G., Hargens, A.R., Lehman, S., Rempel, D.M., 2001. Ischemia causes muscle fatigue. J. Orthop. Res. 19(3), 436–440.
- Nicolás, J.M., García, G., Fatjó, F., Sacanella, E., Tobías, E., Badía, E., Estruch, R., Fernández-Solà, J., 2003. Influence of nutritional status on alcoholic myopathy. Am. J. Clin. Nutr. 78(2), 326–333.
- Nozdrenko, D.M., Motuzjuk, O.P., Zavodovs'kij, D.O., Stepanjuk, J.V., 2012. Ul'trastrukturni zminy miofibril u ljudiny pry ishemichnij kontrakturi. Naukovyj Visnyk Volyn's'kogo Nacional'nogo Universytetu imeni Lesi Ukrainki 2, 89–92.
- Oba, T., Koshita, M., Yamaguchi, M., 1997. Ethanol enhances caffeine-induced Ca^{2+} release channel activation in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol. 272(2 Pt1), 622–627.
- Ohlendieck, K., Harmon, S., Koll, M., Paice, A.G., Preedy, V.R., 2003. Ca^{2+} regulatory muscle proteins in the alcohol-fed rat. Metabolism 52(9), 1102–1112.
- Patchenko, J.V., Saljutin, R.V., Dambrows'kyj, D.B., Martynenko, S.I., 2011. Stan sudynnoho endoteliju ta gistologichni zminy m'jazovoi' tkanyyny u hvoryh pry hronichnij ishemii'. Klinichna Hirurgija 3, 41–44.
- Pendergast, D.R., York, J.L., Fisher, N.M., 1990. A survey of muscle function in detoxified alcoholics. Alcohol. 7(4), 361–366.
- Pioterkiewicz, M., Celichowski, J., 2007. Tetanic potentiation in motor units of rat medial gastrocnemius. Acta Neurobiol. Exp. 67, 35–42.
- Podpalova, O.M., Nuryshenko, N.J., Cejsljer, J.V., Peljuh, L.I., Andrejchenko, S.V., Martynjuk, V.S., 2012. Vplyv hronichnoi' alkogolizacii' shchuriv na stupin' destruktyvnogo porushennja skeletnyh m'jaziv [Effect of chronic alcoholisation of rats on skeletal muscle destructive shifts]. Tezy dokladov mezhdisciplinarnoj nauchnoj konferencii: "Adaptacionnye strategii zhyvyh system" [Interdisciplinary scientific conference "Adaptive Strategies of living systems"]. AR Crimea, 179 (in Ukraine).
- Preedy, V.R., Peters, T.J., Adachi, J., Ahmed, S., Mantle, D., Niemela, O., Parkkila, S., Worrall, S., 2001. Pathogenic mechanisms in alcoholic myopathy. In: Alcohol in Health and Disease. International titisee symposium on health effects of alcohol intake, titisee Germany, 243–259.
- Reid, M.B., 2008. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. Free Radic. Biol. Med. 44(2), 169–179.
- Reilly, M.E., McKoy, G., Mantle, D., Peters, T.J., Goldspink, G., Preedy, V.R., 2000. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms I, IIa, IIx and IIb in type I and type II fibre predominant rat skeletal muscles in response to chronic alcohol feeding. J. Muscle Res. Cell Motil. 21(8), 763–777.
- Rubin, E., Katz, A.M., Lieber, C.S., Stein, Puskin, S., 1976. Muscle damage produced by chronic alcohol consumption. Am. J. Pathol. 83(3), 499–516.
- Soussi, B., Idström, J.P., Bylund-Fellenius, A.C., Scherstén, T., 1990. Dynamics of skeletal muscle energetics during ischemia and reperfusion assessed by *in vivo* ^{31}P NMR. NMR Biomed. 3(2), 71–77.
- Tupling, R., Green, H., Senisterra, G., Lepock, J., McKee, N., 2001. Effects of ischemia on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}

- uptake and Ca^{2+} release in rat skeletal muscle. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 281(2), 224–232.
- Vary, T.C., Nairn, A.C., Lang, C.H., 2004. Restoration of protein synthesis in heart and skeletal muscle after withdrawal of alcohol. Alcohol Clin. Exp. Res. 28(4), 517–525.
- Westerblad, H., Allen, D.J., 1991. Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. J. Gen. Physiol. 98(3), 615–635.
- Zaugolnikov, V.S., Teplova, N.N., 2007. Rabdomioliz i sindrom pozitsionnoy ishemii. Vyatskiy Meditsinskiy Vestnik 2, 71–73.
- Zavodovs'kyj, D., Nozdrenko, D., Homa, O., Soroka, V., 2013. Zmina shvydkisno-sylovyh pokaznykiv skorochennja gomilkovogo m'jazu shhura za umov shtuchno vyklykanoi' vaskuljarnoi' ishemii'. Visnyk Kyi'vs'kogo Nacional'nogo Universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Biologija 63, 5–7.

Надійшла до редколегії 01.04.2014



УДК 581.1

Кальций в растительных клетках

В.В. Швартау¹, П.А. Вирыч¹, Т.И. Маковейчук¹, А.Ю. Артеменко²

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна

²УНЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Представлены данные о роли кальция в растительных организмах. Описано участие элемента в процессах размножения, роста и развития, поглощения и транспорта веществ, реакции на неблагоприятные факторы окружающей среды, в защитных реакциях на повреждения патогенами и в симбиотических взаимодействиях. Рассмотрены молекулярные и биофизические механизмы транспорта Ca^{2+} , его участие в сигнальных системах, регуляции концентрации в компартментах клетки. Рассмотрены основные механизмы моделирования поведения кальциевой сигнальной системы в зависимости от типа фактора влияния и возможные модификации ответа путем влияния на ключевые компоненты системы.

Ключевые слова: кальций; растения; сигнальная система; гомеостаз

Calcium in plant cells

V.V. Schwartau¹, P.A. Virych¹, T.I. Makoveychuk¹, A.Y. Artemenko²

¹Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

²ESC "Institute of Biology" of Taras Shevchenko Kyiv National University, Kiev, Ukraine

The paper gives the review on the role of calcium in many physiological processes of plant organisms, including growth and development, protection from pathogenic influences, response to changing environmental factors, and many other aspects of plant physiology. Initial intake of calcium ions is carried out by Ca^{2+} -channels of plasma membrane and they are further transported by the xylem owing to auxins' attractive ability. The level of intake and selectivity of calcium transport to over-ground parts of the plant is controlled by a symplast. Ca^{2+} enters to the cytoplasm of endoderm cells through calcium channels on the cortical side of Kaspary bands, and is redistributed inside the stele by the symplast, with the use of Ca^{2+} -ATPases and Ca^{2+}/H^{+} -antiports. Owing to regulated expression and activity of these calcium transporters, calcium can be selectively delivered to the xylem. Important role in supporting calcium homeostasis is given to the vacuole which is the largest depo of calcium. Regulated quantity of calcium movement through the tonoplast is provided by a number of potential-, ligand-gated active transporters and channels, like Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+}/H^{+} exchanger. They are actively involved in the inactivation of the calcium signal by pumping Ca^{2+} to the depo of cells. Calcium ATPases are high affinity pumps that efficiently transfer calcium ions against the concentration gradient in their presence in the solution in nanomolar concentrations. Calcium exchangers are low affinity, high capacity Ca^{2+} transporters that are effectively transporting calcium after raising its concentration in the cell cytosol through the use of protons gradients. Maintaining constant concentration and participation in the response to stimuli of different types also involves ER, plastids, mitochondria, and cell wall. Calcium binding proteins contain several conserved sequences that provide sensitivity to changes in the concentration of Ca^{2+} and when you connect ion conformationally rearranged, thus passing the signal through the chain of intermediaries. The most important function of calcium is its participation in many cell signaling pathways. Channels, pumps, gene expression, synthesis of alkaloids, protective molecules, NO etc. respond to changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$, while transducers are represented by a number of proteins. The universality of calcium is evident in the study in connection with other signaling systems, such as NO, which is involved in the immune response and is able to control the feedback activity of protein activators channels, producing nitric oxide. Simulation of calcium responses can determine the impact of key

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, ул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна.

Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine, Vasyl'kivska str., 31/17, Kiev, 03022, Ukraine.

Tel.: +38-044-257-90-18. E-mail: schwartau@ifrg.kiev.ua, sphaenodon@ukr.net, makoveyt@ukr.net

УНЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

пр. Академіка Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна.

TRC «Institute of Biology» Taras Shevchenko Kiev National University, Akademik Glushkov Ave., 2, Kiev, 03022, Ukraine.

Tel.: +38-066-429-65-25. E-mail: artemenko_alex@ukr.net

level and their regulation, and also depends on the type of stimulus and the effector protein that specifically causes certain changes. Using spatiotemporal modeling, scientists showed that the key components for the formation of Ca^{2+} bursts are the internal and external surfaces of the nucleus membrane. The research was aimed at understanding of the mechanisms of influence of Ca^{2+} -binding components on Ca^{2+} oscillations. The simulation suggests the existence of a calcium depot EPR with conjugated lumen of the nucleus which releases its contents to nucleoplasm. With these assumptions, the mathematical model was created and confirmed experimentally. It describes the oscillation of nuclear calcium in root hairs of *Medicago truncatula* at symbiotic relationship of plants and fungi (rhizobia). Calcium oscillations are present in symbiotic relationships of the cortical layer of plant root cells. Before penetration of bacteria into the cells, slow oscillations of Ca^{2+} are observed, but with their penetration into the cells the oscillation frequency increases. These processes take place by changing buffer characteristics of the cytoplasm caused by signals from microbes, such as Nod-factor available after penetration of bacteria through the cell wall. Thus, the basic known molecular mechanisms for regulation of calcium homeostasis in plant cells are reviewed. Data presented in the paper is important for understanding the role of calcium in the ions' homeostasis and can be used for developing high-performance technologies of crops nutrition.

Keywords: calcium; plants; signal system; homeostasis

Введение

Сегодня никто не сомневается в том, что ионы кальция участвуют во многих физиологических процессах растительного организма. Среди них регуляция роста и развития, защита от патогенных влияний, восприятие изменений физических и химических факторов окружающей среды и многих других аспектов физиологии растений. Передача информации внутри клетки осуществляется веществами, количество которых можно легко регулировать и получать из внешней среды путем использования транспортных систем плазматической мембраны. Система регуляции внутриклеточной концентрации должна быть четко слажена для обеспечения быстрой десинситизации и подготовки к новому восприятию. Среди неорганических ионов существует несколько кандидатов: калий, натрий, кальций и магний. Первые два имеют сложные гидратные оболочки с большим диаметром и единичный заряд, что затрудняет взаимодействие с белковыми молекулами и прочное связывание с ними. Кальций способен образовывать от 6 до 9 координационных связей с лигандами, магний – строго 6, при этом часть связей используется на присоединение воды, что уменьшает его сродство к белковым молекулам. Еще одной проблемой является фиксированная длина связи в молекуле MgO – 0,21 нм, у кальция она более лабильна (0,23–0,26 нм), что позволяет ему образовывать координационные связи в белковом окружении быстрее и также быстро замещаться (приблизительно в 1000 раз по сравнению с магнием). Важным вопросом является поддержание гомеостаза иона. На поддержание постоянной концентрации ионов калия и натрия по обе стороны плазмалеммы клетка использует около 30% своей энергии, а на гомеостаз кальция – лишь около 1%.

Поступление кальция в растение осуществляется в ионной форме через кончик корня, что не очень эффективно по сравнению с другими ионами, например калием, который поглощается всей поверхностью. Также процессы поступления зависят от многих внешних условий, в т.ч. влажности почвы, количества кислорода, кислотности. Примером могут служить исследования на томатах, которые проявляли признаки дефицита кальция при нормальном его количестве в почве и водном стрессе. Первичное поглощение осуществляется Ca^{2+} -проводимыми каналами плазматической мембраны, а дальнейший транспорт осуществляется ксилемой за счет атрагирующей способности ауксинов. Внутри ткани, между клетками, кальций движется как апопластно, так

и симпластно. При апопластном – Ca^{2+} поступает к ксилеме, не изменяя внутриклеточного количества. Этот путь транспорта сильно влияет на транспирацию, что может привести к чрезмерному его притоку к наземной части растения и развитию кальцийиндуцированных болезней. Кроме того, апопластный транспорт неселективен к двухвалентным катионам, что может привести к аккумуляции токсических веществ (White et al., 2000). Симпластный путь позволяет растению контролировать уровень и селективность транспорта кальция к наземной части растения. Ca^{2+} поступает в цитоплазму клеток эндодермы через кальциевые каналы на кортикальной стороне поясков Каспари и перераспределяется внутри стелы по симпласту с помощью Ca^{2+} -АТФаз и Ca^{2+}/H^{+} -антипортов. Благодаря регулируемой экспрессии и активности этих транспортеров кальций может селективно доставляться к ксилеме в необходимых количествах (Medvedev, 2005). Эти перемещения должны быть строго сбалансированы, так как изменения концентрации кальция внутри клетки могут привести к нарушениям гомеостаза и возможному апоптозу. К этим изменениям также относится контроль поглощения и накопления токсичных ионов (Al , Cu) в наземной части растения. Для поддержания нормального роста и развития растения уровень поглощения должен находиться в пределах 1–10 мкМ. В отличие от одновалентных катионов, кальций не способен к реутилизации и накапливается в старых частях растения. Передвижение по растению осуществляется ситовидными трубками со скоростью приблизительно 1 м/час.

В цитоплазме концентрация кальция на 3–4 порядка ниже, чем во внутриклеточных компартментах. В состоянии покоя она варьирует в пределах 100–200 нМ, в митохондриях и ЭПР – около 1 мМ, в клеточной стенке и вакуоли – 1–10 мМ.

Множество белковых молекул способны изменять свою активность при связывании ионов Ca^{2+} , но в присоединении участвуют лишь несколько аминокислотных последовательностей.

C_2 -домен содержит около 130 аминокислотных остатков и первоначально идентифицирован в Ca^{2+} -зависимой протеинкиназе C . Он имеет два типа строения в зависимости от направления первой и последней β -складки, но общий принцип похож. Домен составляют 8 антипараллельных β -структур, которые образуют четыре β -слоя. Связывание иона кальция происходит в неупорядоченной части молекулы, между 2–3 и 6–7 β -складками. Кальцийсвязывающие белки могут содержать один или два домена C_2 . Большинство из них свя-

заны с мембранами, где и выполняют свои функции путем расщепления липидов (фосфолипаза A_2 , D , C), белок-белковых взаимодействий (протеинкиназа C), регуляции везикулярного транспорта (перфорин, синаптогагмин, рабфидин), участвуют в ГТФазных сигнальных путях (Nalefski and Falke, 1996).

EF-домен имеет структуру типа «спираль – петля – спираль» (helix – loop – helix) и состоит лишь из 29 аминокислотных остатков. Спираль E включает первые 10, петля – 10–21, а F -спираль – аминокислоты 19–29. Связывание кальция происходит в области петель координационными связями с аспаратом и глутаматом. Каждый такой домен способен присоединить два иона кальция и входит в состав множества белков: кальмодулина, кальцийзависимых протеинкиназ, центрина, кальцинеина, B -подобных белков, фосфолипаз, каналов, белковых фосфатаз и многих других (Day et al., 2002).

Кальциевые транспортеры

Существует несколько типов кальциевых транспортеров в зависимости от локализации и типа регуляции.

В плазматической мембране (ПМ) присутствует семейство кальциевых каналов, которые активируются в ответ на деполяризацию. Они были идентифицированы в клетках корней, мезофила листа и в суспензионных культурах. Эти каналы чувствительны к верапамилу, ионам лантана и гадолиния. Среди них есть высоко- и низкоселективные, которые кроме кальция способны пропускать также магний, барий, стронций.

Также в ПМ находятся гиперполяризационные Ca^{2+} -каналы, присутствующие в самых разнообразных тканях растения и выполняющие различные функции, включающие механочувствительность (эпидермис), закрывание – открывание устьичного аппарата, поглощение ионов из почвенного раствора, защиту от патогенных влияний, передачу сигнала от абсцизовой кислоты (АБК).

В ранних исследованиях элиситор-активированные Ca^{2+} -каналы ПМ описаны в клетках томата (*Lycopersicon esculentum* L.) и петрушки (*Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Hill.). Они активируются при низких значениях мембранного потенциала (около $-120 \dots -150$ мВ) и имеют высокую проницаемость (186 пС при 5 мМ внеклеточной концентрации $CaCl_2$ в суспензионной культуре клеток *P. crispum*). Ингибируются они микромолярными концентрациями La^{3+} и нифедипином. Исследования влияния различных элиситоров выделили типы кальциевых ответов. Клетки табака обрабатывали криптогенином и олигогалактоуридами. В обоих случаях наблюдался кальциевый ответ, затрагивающий цитозоль, митохондрии и хлоропласты; индуцировалось возрастание количества цитозольного кальция, транзистентные токи митохондрий. При этом ответ хлоропластов был несколько замедлен. При воздействии олигогалактоуридов не наблюдается значительного возрастания $[Ca^{2+}]_{цит}$ в отличие от криптохромов, что демонстрируют длительные высокоамплитудные возрастания $[Ca^{2+}]_{цит}$. Это позволяет разделить внутриклеточные пути сигнализации при влиянии этих двух веществ, которые включают и IP_3 (Manzoor et al., 2012).

Важную роль в поддержании кальциевого гомеостаза играет вакуоль. Она может занимать около 90% всего объема клетки и служит наибольшим депо кальция. При этом наблюдается значительный электрохимический градиент Ca^{2+} на тонопласте с большой разницей в концентрациях $[Ca^{2+}]_{цит} - 100-500$ нМ и $[Ca^{2+}]_{вак} -$ до 1 мМ.

Среди обнаруженных каналов тонопласта есть как потенциал-, так и лигандуправляемые. Они отвечают на действие фитата, кальция, IP_3 , АДФ-рибозы. При этом их разделяют на медленные и быстрые. Эти каналы ингибируются верапамилом, ионами лантана, наномолярными концентрациями карибдотоксина в цитоплазме, микромолярными – квинакрином, квинином, 9-аминоакридином, тубокурарином.

Наиболее важные из них те, которые принимают участие в поддержании гомеостаза кальция в цитоплазме – Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+}/H^+ -обменники.

Кальциевые АТФазы – высокоаффинные насосы, которые эффективно переносят ионы кальция против градиента в присутствии их в растворе в наномолярных концентрациях. Они являются членами суперсемейства P -типа АТФаз, которые характеризуются формированием промежуточных фосфорилированных состояний в их каталитическом цикле (Brini and Crafoli, 2009). Был идентифицирован ряд генов, которые отвечают за синтез этих транспортеров у растений и низших грибов. Дрожжи и растительные клетки содержат разные Ca^{2+} -АТФазы, которые похожи на животные типы. Вакуолярные транспортеры принадлежат к подтипу ПВ Ca^{2+} -АТФаз и похожи последовательностями и кинетикой на животные кальциевые АТФазы плазматической мембраны.

Для лучшего понимания связывания АТФ и механизмов активности Ca^{2+} -АТФаз проведена изоляция их АТФ-связывающих доменов *Solanum lycopersicon* типа ПА, которая не регулируется кальмодулином (принадлежит к P -типу) и гомологически очень похожа на найденную у млекопитающих ЭПР Ca^{2+} -АТФазу (SERCA) и *Arabidopsis* Ca^{2+} -АТФазу, изоформы 2, типа ПВ кальмодулинрегулируемую помпу P -типа эндоплазматического ретикула клеток *Arabidopsis*. Для исследований использовали флуоресцентные метки, связывающиеся с АТФ-гидролизными сайтами обеих Ca^{2+} -АТФаз. Интересным оказался тот факт, что растительные насосы могут с низким сродством связывать ГТФ, в отличие от SERCA и PMCA типов насосов млекопитающих, которые не способны этого делать (Galva et al., 2013).

В отличие от Ca^{2+} -АТФаз, кальциевые обменники – низкоаффинные высокоемкостные Ca^{2+} транспортеры, которые эффективно транспортируют кальций после поднятия его концентрации в цитозоле клетки. В обменном процессе может участвовать ион натрия или протон, соответственное название каналов – Na^+/Ca^{2+} - или Ca^{2+}/H^+ -обменники. При транспортировке одного иона кальция используется 2–3 протона. Повышение кислотности вакуолей растений протонной помпой генерирует большой протонный градиент на тонопласте, что используется для переноса кальция. Эти протонные АТФазы принадлежат к V -типу ($V-H^+$ -АТФаза), также растительная вакуоль имеет H^+ -пирофосфатазу. Активность этих насосов критично влияет на Ca^{2+}/H^+ -

обменную способность тонопласта, что продемонстрировано во многих исследованиях (Krebs et al., 2010).

Гены, отвечающие за кодирование кальций-протонного обменника (СAX) идентифицированы в *Arabidopsis*. Через некоторое время они были найдены в рисе и сое. СAX2, СAX5 и СAX6 типа 1В имеют более широкую субстратную специфичность к двухвалентным катионам, таким как Mn^{2+} и Cd^{2+} , в дополнение к Ca^{2+} (Hirschi et al., 2000; Pittman et al., 2004; Edmond et al., 2009) транспортеры СAX1, СAX3 и СAX4 типа 1А высокоспецифичны к транспортировке кальция (Shigaki et al., 2003). Регуляция активности осуществляется посттрансляционными модификациями N-конца, куда прикрепляется регуляторный протеин. Также наблюдается смена активности при взаимодействиях типа «протеин – протеин» с формированием гетерокомплексов между СAX1 и СAX3 (Zhao et al., 2009a, 2009b; Pittman, 2011).

Некоторые ионные проводимости в вакуолярной мембране регулируются уровнем $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ и белки, отвечающие за это, содержат связывающие кальций домены. Они включают в себя канал SV (Slow Vacuolar Channel), кодируемый TPC1. По крайней мере, еще два канала идентифицированы в тонопласте: вакуолярный калиевый канал (VK) и быстрый вакуолярный канал (FV) (Ward and Schroeder, 1994; Tikhonova et al., 1997). Активность VK канала зависит от $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в микромолярном диапазоне. Гены, отвечающие за кодирование этого канала – TWO-PORE K channel 1 (TPK1), они идентифицированы в *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum* (Gobert et al., 2007; Hamamoto et al., 2008). Белок TPK1 содержит два EF-домена, что объясняет его кальциевую зависимость при освобождении K^+ из вакуоли в клетках устьиц и при прорастании семян (Gobert et al., 2007; Reiter, 2011). Моделирование структуры TPC1 показало возможные сайты связывания Ca^{2+} , которые образованы остатками Glu-450, Asp-454, Glu-456 и Glu-457 на внутренней стороне канала. При замене одного из них функция канала теряется (Dadacz-Narloch et al., 2011).

ЭПР играет важную роль в поддержании постоянной концентрации цитозольного кальция и стабильной работы кальциевой сигнальной системы. Каналы активируются в ответ на аппликацию циклической АДФ-рибозы, никотиновой кислоты АТФ и IP_3 . Они довольно селективные, чувствительны к разнице концентраций Ca^{2+} на мембране ЭПР. Их проводность составляет 29 и 24 пкС в 50 мМ $CaCl_2$. Верапамил способен блокировать высокопроводящий канал, но на низкопроводящий не оказывает никакого влияния. Также он уменьшает проводимость при наличии в среде микромолярных концентраций Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} и наличии H_2O_2 .

Ключевую роль в регуляции внутриклеточных процессов, экспрессии генов, трансдукции сигналов играют циклические нуклеотиды цАМФ и цГМФ. Они могут связываться с двумя функциональными доменами белков – GAF (cyclic GMP, adenylyl cyclase, FhlA) и CNB (cyclic nucleotide binding). Фоторецепторы и рецепторы этилена содержат GAF-домен, но еще не было продемонстрировано непосредственного связывания ими циклических нуклеотидов. CNB-домен присутствует в двух группах катион-проницаемых каналов растений: циклические нуклеотидзависимые ионные каналы (CNGCs) и калиевые каналы шейкер-типа, для которых непосредст-

венное связывание циклических нуклеотидов не доказано. Первые – менее селективные и могут пропускать в основном Na^+ , K^+ и некоторые двухвалентные катионы, такие как Ca^{2+} .

Впервые был идентифицирован CNGC18 как катионный канал, активность которого зависит от циклических нуклеотидов и избыточная экспрессия которого приводила к аномальному росту пыльцевой трубки, в то время как с потерей функции наблюдалась мужская стерильность.

У *Arabidopsis* семейство CNGCs имеет около 20 членов, разделённых на 5 подсемейств (I, II, III, IVa и IVb) (Wu et al., 2011). В дополнение к CNGC18 есть еще 5 (7, 8, 9, 10 и 16), которые могут иметь отношение к ионным токам в пыльце. Активация происходит при связывании цАМФ на C-конце, а возможно также и при гиперполяризации. Негативная регуляция осуществляется кальмодулином при увеличении $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в том же сайте что и цАМФ так, что происходит конкуренция между этими двумя веществами, обеспечивая положительную и отрицательную регуляцию CNGC каналов. Они участвуют в выполнении множества функций: от регуляции роста пыльцевой трубки до адаптаций к биотическим и абиотическим стрессам (Nakagawa et al., 2007; Ma et al., 2009). Канал состоит из четырех субъединиц, которые формируют центральную неселективную пору, в области которой связываются циклические нуклеотиды. Каждая субъединица имеет шесть трансмембранных α -спиралей, C- и N-концы которых находятся в цитозоле. Порообразующая Р-петля расположена между пятым и шестым трансмембранными доменами и включает саму пору и селективный фильтр. Внутри большого C-конца молекулы находится сайт связывания с кальмодулином, который перекрывается с CNB-доменом. Такое положение отличается от гомологичных каналов животных, где кальмодулиновая регуляция происходит в N-концевой части белка (Bradley et al., 2005).

К физиологическим функциям, которые выполняют эти каналы, принадлежит направленный рост пыльцевой трубки, что было доказано исследованиями экспрессии генов *Arabidopsis* и формированием этими каналами поляризационного градиента кальция для целенаправленного роста. Также они участвуют в транспорте двухвалентных ионов тяжёлых металлов и апоптозе.

Патогенное влияние также затрагивает активность генов, отвечающих за синтез этих каналов. Наблюдаемый эффект включает синтез NO, салициловой кислоты и ряда генов защиты.

Гомологи глутаматных рецепторов (Glutamate receptor homologs, GLRs)

У животных большинство ионотропных глутаматных рецепторов – лигандзависимые неселективные катионные каналы, которые пропускают Ca^{2+} и играют важную роль в передаче нервных импульсов и других клеточных процессов. Базируясь на их последовательностях и структуре, были идентифицированы гомологи глутаматных рецепторов у нескольких видов одно- и двудольных растений. Они имеют три трансмембранных домена: порообразующий и два лигандсвязывающих.

Гены, отвечающие за их кодирование, найдены в *Arabidopsis* в количестве 20 гомологов, риса – 30, тополя – 61. Наиболее высокая их экспрессия наблюдается в корнях, где происходит активное поглощение ионов (GLR1.1, GLR2.1, GLR3.1), клетках устьиц, цветов, стручков, сосудистых тканях (GLR3.1). GLR3.1 – высокоактивный в сосудах, тогда как GLR3.2 – в корнях, сосудистых пучках, клетках мезофилла, устьиц и способен реагировать на температурный стресс. GLR1.2 и GLR3.7 экспрессируются в пылевых трубках. Используя блокатор 6,7-динитроквиноксалин-2,3-дион, наблюдают ухудшение ингибирования роста светом и снижение светозависимого синтеза хлорофилла. Кроме того, агонист S(+)-бетаметилалфа,бета-диаминопропионовая кислота способствует элонгации гипокотилей *Arabidopsis* и ингибирует раскрытие семядолей под действием света. Интересно, что канамицин выступает в роли антагониста и снижает диэтиоляцию у мутантных растений *Arabidopsis*. Кроме того, антагонисты животных iGluR ингибируют продукцию Ca^{2+} и NO в ответ на индуцирование возбудителем притока элиситора криптогенина, что подтверждает роль GLRs в передаче защитных сигналов у растений. Использованы генетические подходы к изучению физиологических функций GLRs. Семена ячменя с антисмысловым AtGLR1.1, едва проросшие в среде глюкозы, полностью восстанавливали свою жизнеспособность при добавлении в среду нитратов, что позволяет предположить контроль этим белком баланса углерода и азота (Kang and Turano, 2003). У такого рода растений наблюдаются сходные симптомы с гиперчувствительностью к абсцизовой кислоте, такие как редукция размеров устьичного аппарата и обратная регуляция 2C типа фосфатаз ABI1 и ABI2 (Kang et al., 2004). У риса, мутантного по гену OsGLR3.1, наблюдаются нарушения активности корневых меристем и запрограммированной гибели клеток (Li et al., 2006).

Этот тип каналов играет важную роль в Ca^{2+} гомеостазе и сигнализации. Гиперэкспрессия GLR3.2 в *Arabidopsis* обуславливает развитие симптомов дефицита кальция при его аккумуляции в растении, а AtGLR3.2 – гиперчувствительности к натрию и калию. GLR3.1 играет важную роль в индукции осцилляций Ca^{2+} в клетках устьиц и, собственно, кальциевой сигнализации (Jammes et al., 2011).

Двупоровые каналы (Two-pore channel 1, TPC1)

Гены двупорового канала 1 у *Arabidopsis* кодируют Ca^{2+} -индуцированные Ca^{2+} -освобождаемые каналы тонопласта. Они принадлежат к семейству потенциалзависимых катионных каналов и являются гомодимерами, каждый из которых имеет шесть трансмембранных спиралей и один порообразующий домен. Цитоплазматическая петля содержит две Ca^{2+} -связывающих EF-последовательности, что позволяет осуществлять Ca^{2+} -зависимую регуляцию белка. Предположительно, он должен был находиться в плазматической мембране, но был идентифицирован как медленный вакуолярный канал тонопласта в *Arabidopsis*. Активируется сменой потенциала тонопласта и поднятием концентрации внутриклеточного кальция (Peiter, 2005). У мутантных растений

tpc1, не имеющих функционального канала SV, наблюдаются дефекты на АБК-индуцированную репрессию прорастания семян и устьичные ответы на внеклеточный кальций (Peiter et al., 2005). NtTPC1s (*Nicotiana tabacum* TPC1s) были описаны как пути входа Ca^{2+} сквозь клеточную мембрану в клетках табака в ответ на холодовый шок, сахарозу, H_2O_2 , салициловую кислоту, которые действуют как элиситоры. OsTPC1, возможно, ключевой регулятор элиситор-активированного ответа, TaTPC1 – ответ на абиотический стресс.

Роль канала SV TPC1 в вакуолярном высвобождении кальция еще исследуется, и потому что канал не селективный относительно одно- и двухвалентных катионов, его функции могут касаться поддержания тургора, катионного гомеостаза, Ca^{2+} -зависимой передачи сигналов. Баланс между участием в разнообразных функциях зависит от влияния внешних факторов на клетку.

Механочувствительные кальцийпроницаемые каналы (Mechanosensitive Ca^{2+} -permeable channels, MSCCs)

Способность растений отвечать и адаптироваться ко многим механическим стимулам, таким как ветер, препятствия в почве и даже охотиться, в случае венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*), предполагает участие ионов кальция в сигнальных процессах механочувствительности. Экспериментальные данные, доказывающие это, получены на проростках экворинэкспрессированного табака (Knight et al., 1991). Несколько позже Динг и Пикард описали наличие механочувствительных Ca^{2+} -чувствительных катионных каналов в эпидермальных клетках, в затененной цитоплазме которых наблюдалось повышение концентрации Ca^{2+} как доказательство активности каналов. Результаты петч-клемп-исследований одиночных клеток показали Ca^{2+} -активность каналов в плазматической мембране, зависящую от механических стимулов (Ding and Pichard, 1993). Gd^{3+} , La^{3+} и очень низкая температура замедляют каналы, тогда как этил-TV-фенилкарбамат, низкая температура, повышение pH и мембранная деполяризация сенсibiliзируют их.

В *Arabidopsis* найдена группа белков, похожих на бактериальные MscS (Mechanosensitive ion channel), ионные токи сквозь них зависели от механического влияния. Эти белки участвуют в корневой механочувствительности и управлении формой пластид. Также у ДНК *Arabidopsis* нашли потенциальный механочувствительный Ca^{2+} -канал, похожий на гомологичный дрожжей – MCA1 (mid1-complementing activity 1). Он располагался в плазматической мембране и, при чрезмерной экспрессии, повышал уровень цитозольного кальция; неспецифически блокировался гадолинием, но не реагировал на верапамил, что доказывало его принадлежность к семейству MSCC (Nakagawa et al., 2007).

Кальциевая сигнализация

Важнейшей функцией кальция является его участие во множестве сигнальных путей клетки. На изменения $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ реагируют каналы, помпы, экспрессия генов,

синтез алкалоидов, защитных молекул, *NO* и др., а трансдукторами при этом является ряд белков (Medvedev, 2005). Рассмотрим основные из них.

Большинство белков CBL присутствуют в мембранах. Их эффекторные киназы главным образом локализируются в цитозоле и ядре (Batistic et al., 2010). Для исследований данных взаимодействий используют флуоресцентные метки и модифицированные ими эффекторные белки. С их помощью установлено место передачи кальциевого сигнала для разных протеинкиназ. Например, киназы CIPK23 и CIPK24 взаимодействуют с CBL1 и CBL9 возле плазматической мембраны (Xu, 2006; Waadt et al., 2008). Эти результаты позволяют установить, что белки CBL определяют местонахождение и действие комплексных соединений CBL-CIPK. Особый случай взаимодействия наблюдался для цитозольного датчика кальция CBL8 с киназой CIPK14. Взаимодействие между этими двумя белками наблюдалось исключительно в плазматической мембране (Batistic et al., 2010). Предположение, что CBL8 не имеет модифицированного липидом *N*-конца и, таким образом, отличается от липидмодифицированных CBL1, 4, 5 и 9, позволяет предположить альтернативный способ формирования комплексов CBL8-CIPK. Другие CIPK14-киназы взаимодействуют с локализованными в тонопласте CBL2 и CBL3, показывая, что одна и та же киназа может быть задействована в разных путях, с включением многообразных CBLs различных структур клетки. Дальнейшие исследования с помощью метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) обнаружили альтернативные пути взаимодействия и формирования комплексов CBL-CIPK24 в плазматической мембране – CBL1-CIPK24 и CBL5-CIPK24, тонопласте – CBL2-CIPK24 и CBL10-CIPK24 (Waadt et al., 2008; Batistic et al., 2010). Но данный метод не позволяет исследовать перемещение белков в клетке, так как дополнительно стабилизирует образованные ими комплексы, поэтому был использован иной подход к проблеме – коэкспрессия флуороформеченых CBLs и CIPKs. Эти исследования показали, что CIPK5, связанный с зеленым флуоресцентным белком (Green fluorescent protein, GFP), не находится в цитозоле долгое время и обнаруживается в тонопласте. Таким образом можно сделать вывод, что белки CBL, взаимодействуя в цитозоле с CIPKs, могут перемещаться к мембранам, где и выполняют основную функцию. Это должно в будущем связать зависимость альтернативных взаимодействий CBL-CIPK и концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Вероятно, различные комплексы CBL-CIPK требуют формирования разных концентраций цитозольного кальция и эта зависимость касается расшифровки определенного Ca^{2+} -сигнала. Кроме того, Ca^{2+} -связывающие способности белков CBL могут изменяться при взаимодействии с другим CIPK, как это показали исследования кристаллизации комплексов соединений CBL2-CIPK14, так же как CBL4-CIPK24 (Sanchez-Barrena et al., 2013). Это создает дополнительные трудности в изучении зависимости концентрации Ca^{2+} и комплексообразования CBL-CIPK. Вместе взятые эти переменные параметры образования CBL-CIPK способствуют расшифровке отличающегося Ca^{2+} -сигнала в определенных мес-

тах клетки, запускающей генерацию отдельных специфических реакций.

Одна из важнейших функций данных взаимодействий – ответы на абиотический стресс с участием АБК у *Arabidopsis*. Недавними исследованиями проанализированы функции CBL и CIPK у пшеницы, сорго, яблони, хлопка, тополя и др. (Yang, 2008; Piao et al., 2010; Chen et al., 2012; Wang et al., 2012; He et al., 2013; Zhang et al., 2013). В последнее время пять новых CIPKs и два CBLs идентифицированы в фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.), 43 подобных CIPK гена (похожие у риса) обнаружены у кукурузы (*Zea mays* L.) (Hen et al., 2011). Функции CIPK риса заключаются в модуляции ответов на абиотический стресс на протяжении прорастания семян и роста проростков (OsCIPK31) (Piao et al., 2010) и ген OsCIPK23, который, как оказалось, мультистрессиндуцирован, регулирует сигнальные пути во время опыления и реакцию на водный дефицит (Yang et al., 2008). Другой пример – многофункциональность CIPK-OsCIPK15, который был включен в механизм толерантности к дефициту кислорода, а также в различных MAMP-иммунных (Microbe-associated molecular pattern, MAMP) реакциях вместе с OsCIPK14 (Kurusu et al., 2010).

Повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ и синтез реактивных форм кислорода (РФК) являются фундаментальными компонентами быстрых иммунных реакций на патогенные воздействия у растений и животных и эти исследования были опубликованы многими учеными (Schwessinger and Zipfel, 2008; Boller and Felix, 2009; Dubiella et al., 2013). Также они важны и для передачи сигнала от АБК в клетках устьиц, при прорастании семян, росте пыльцевой трубки и удлинении корня, как регулятор Na^+/K^+ -гомеостаза растений при солевом стрессе (Potocký et al., 2012). Несколько исследований показали, что поддерживается взаимосвязь между Ca^{2+} и повышением реактивных форм кислорода (РФК), поэтому была описана активация кальциевых каналов клеток устьиц и корней РФК (Pei et al., 2000; Demidchik et al., 2003; Hua et al., 2012) и наоборот, кальций усиливает накопление реактивных форм кислорода (Takeda et al., 2008).

Сигнальные пути кальция способны затрагивать и *NO*-сигнализацию, *NO*-реактивный свободный газообразный радикал. На сегодняшний момент доказано его участие в разных физиологических процессах, таких как рост корней, закрытие устьиц, гомеостаз железа и гормонов, адаптивные реакции к биотическим и абиотическим стрессам (Simontacchi et al., 2013). Наибольший прогресс в изучении функций оксида азота приходится на последние 10 лет после открытия его энзиматического происхождения в растении. Определено несколько вторичных посредников, через которые осуществляется влияние на клетку: цГМФ, протеинкиназы, белки, зависящие от посттрансляционных модификаций посредством *NO* и ряд генов (Yu et al., 2012).

Более десяти лет назад Грант с соавторами (Grant et al., 2000) продемонстрировали, что поврежденные болезнями листья растений имеют повышенный уровень цитозольного кальция, что является одним из этапов иммунного ответа растения. Ферменты активации кальцийпроницаемых каналов также могут контролировать *NO* (Garcia-Mata et al., 2003).

После открытия ряда генов кальцийзависимых белков стали изучать пути регуляции их экспрессии. Одним из таких компонентов является оксид азота. Определение проводили путем введения в растение самого газа или молекул предшественников для копирования эффекта эндогенного *NO*. Среди генов присутствуют представители ряда кальцийзависимых сигнальных каскадов, в том числе кальциевые сенсоры, Ca^{2+} -проницаемые каналы, помпы и другие Ca^{2+} -зависимые протеины (Jeandroz et al., 2013).

Кроме известных кальциевых депо, предложено участие аппарата Гольджи в генерации кальциевого сигнала. Оказалось, что эта структура не участвует в каких либо ответах и изменяет активность своих транспортеров кальция в ответ на гормональные стимулы, поддерживая при этом стабильную концентрацию кальция (Ordenesa et al., 2012).

Участие в фототропизме и фотореакциях

Свет – один из самых важных факторов окружающей среды, который служит для растений источником энергии и управляет всеми стадиями их развития (от прорастания семян до финальных стадий цикла развития). Прорастание семян, рост и ингибирование гипокотилей, рост семядолей, развитие хлоропластов, архитектуры растения, расположение клеток в листе, ионный обмен в клетках – все эти процессы регулируются светом. Рецепция осуществляется, по крайней мере, тремя семействами фоторецепторов: фитохромы, рецепторы синего света и УФ-В фоторецепторы.

Элементы цитоскелета, такие как микротрубочки и микрофиламенты, могут играть важную роль в механизме передачи, так как они формируют много связей в цепи трансдукции светового сигнала, особенно в деятельности ионных каналов. Функционирование Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов плазмалеммы клеток харовых водорослей зависит от микротрубочек. В результате разрушения микротрубочек наблюдаются изменения в активации потенциалзависимых Ca^{2+} -управляемых каналов плазматической мембраны клеток моркови. Очевидно, это связано с двумя факторами: вязкие эластические свойства цитоскелета, который обеспечивает механическую связь между элементами клетки и его большая отрицательно заряженная поверхность. В ответ на формирование активной формы фоторецептора меняется положение и активность различных протеинов, таких как липидкиназы, фосфолипазы, G-белки на поверхности цитоскелета. *Mougeotia* – нитчатая зеленая морская водоросль, которая содержит единственный ленточный хлоропласт, способный вращаться вокруг продольной оси в ответ на изменение освещения. Последовательность передачи светового сигнала с некоторыми модификациями можно изобразить следующим образом: $P + h\nu \rightarrow P^* \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow CaM \rightarrow$ модификация микротрубочек (микрофиламентов) $\rightarrow$ вращение хлоропласта. Предполагается, что связывающие актин белки, киназы, так же как и различные вторичные посредники (Ca^{2+} , IP_3), включаются в передачу сигнала с участием актина цитоскелета. По аналогии с животными клетками последовательность передачи светового сигнала в раститель-

ных клетках могла быть следующей: $P + h\nu \rightarrow P^* \rightarrow$ G-белок $\rightarrow$ аденилатциклаза $\rightarrow$ цАМФ $\rightarrow$ протеинкиназы $\rightarrow$ элементы цитоскелета $\rightarrow Ca^{2+}$ -каналы $\rightarrow$ увеличение количества цитозольного кальция $\rightarrow$ метаболический ответ.

Синий свет – ключевой фактор, контролирующий рост растений и их морфогенез. Генетические исследования *Arabidopsis thaliana* показали, что этот диапазон спектра поглощают два рецептора: фототропин 1 (phototropin 1, phot1) и фототропин 2 (phototropin 2, phot2). Посредством их регулируются движения растений: фототропизмы, миграция хлоропластов, открытие устьиц, опускание листьев и их ориентация по свету (Inoue et al., 2010). Эти эффекты могут осуществляться путем сложного взаимодействия между сенсорами, путем обратной связи, через ряд фосфатаз, киназ, а также путем изменения ионного гомеостаза. Кальций также в этом участвует. Недавние исследования продемонстрировали, что фототропины способствуют мобилизации Ca^{2+} в ответ на синий свет и что phot1 и phot2 с разными механизмами вызывают увеличение Ca^{2+} в клетках листа соответственно изменениям интенсивности рассеянного света (Harada et al., 2007, 2013). При низких интенсивностях синего света phot1 способствует вхождению кальция исключительно через каналы плазматической мембраны. При большой интенсивности потока света увеличивается концентрация $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ преимущественно за счет каналов внутриклеточных депо, так же как и каналами ПМ. Интересно, что угнетающее действие ингибиторов фосфолипазы C на ответы диких типов растений являются более заметными, нежели в единственном мутанте phot1. Это указывает на некоторое функциональное взаимодействие между phot1 и phot2, вызывающее изменения в Ca^{2+} цитозоля (Harada et al., 2003).

Из-за разной светочувствительности и избыточной функции между phot1 и phot2 ранние исследования сконцентрировались на phot1-зависимых физиологических ответах, у которых наблюдается зависимый от синего света поток кальция из апопласта в клетки мезофилла деэтиолированных и этиолированных проростков.

В последних исследованиях было доказано, что в этиолированных проростках phot2 способствует увеличению $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ за счет внутриклеточных депо. Это доказывает отличие механизмов влияния фототропинов на клетки (Zhao et al., 2013).

Ca^{2+} и рост пыльцевых трубок

Рост пыльцевых трубок – быстрый и высокополяризованный процесс. Динамика неорганических ионов играет одну из важнейших ролей. Четыре иона – Ca^{2+} , H^+ , K^+ и Cl^- – самые важные из них, с приоритетом у кальция. Апикальный градиент Ca^{2+} важен для направленного роста и модуляции полярности клетки. Частота осцилляций $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ пропорциональна темпам роста пыльцевой трубки. Некоторые Ca^{2+} -связывающие белки также принимают участие в обратной регуляции роста пыльцевой трубки. Среди них кальмодулин, кальцийзависимые протеинкиназы (CDPKs), белки цитоскелета. В частности, CDPKs являются важнейшими регуляторами роста путем влияния на актиновые филаменты цито-

скелета кукурузы, фосфорилируя актиндеполимеризующие факторы, что приводит к повторной пересборке актиновых филаментов. В *Arabidopsis* найдены генетические доказательства участия кальциевой протеинкиназы 17 и 34 в росте пыльцевых трубок.

Многие процессы с участием кальция, такие как динамика цитоскелета, эндо- и экзоцитоз, прямо или косвенно участвуют в росте пыльцы (Helling et al., 2006; Konrad et al., 2011). На основе наблюдений известно, что кальций регулирует активность ионных каналов во многих других физиологических процессах. Активность или локализация на мембране потенциалзависимых K^+ -каналов модулируется кальцинейрин В-подобными белками и взаимодействующими с ними киназами, которые играют важную роль в поглощении и распределении калия в клетке (Xu, 2006; Held et al., 2011). Ранние исследования не показали зависимости между калиевыми токами и изменениями внутриклеточного кальция, но методом петч-клемп изолированных протопластов пыльцевых трубок *Arabidopsis* доказано, что внутриклеточные токи калия зависят от колебаний $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$. Эта регуляция осуществлялась посредством взаимодействий кальций-зависимых протеинкиназ 11 и 24, локализованных в плазматической мембране. CDPK11 может фосфорилировать CDPK24 и работают они, как один киназный каскад, наподобие митогенактивируемой протеинкиназы. Регуляция активности потенциалзависимых каналов K^+ обратно регулируется двумя этими протеинкиназами (Zhao et al., 2013).

Сегодня хорошо известно, что среди всех известных видов клеток, которые поддавались изучению свободного внутриклеточного цитоплазматического кальция, на кончиках пыльцевых трубок его концентрация является самой высокой – около 2–10 мкМ при 20–200 нМ в базальной ее части. В противоположность этому внеклеточные концентрации могут варьировать в очень широких пределах от 10 до 10 000 мкМ. Апикальный приток ионов Ca^{2+} является основным источником создания этого градиента, в сочетании с субапикальной секрецией этого иона через плазматическую мембрану или закачку в депо (Hepler, 2012).

Кальциевый градиент необходим не только для роста пыльцевой трубки. Он влияет на направление роста и изменение его фокуса, приводит к переориентации оси роста по отношению к месту с высшей концентрацией Ca^{2+} . Рост по кальциевому градиенту устанавливается уже при регидратации пыльцевых зерен, где они в конечном счете определяют место прорастания пыльцы. Добавление нифедипина предотвращает создание кальциевого градиента, а также прорастание. Эксперименты с латрукулином В, который предотвращает полимеризацию актина, кроме того показали связь между динамикой актина и градиентом Ca^{2+} в пыльце лилии (Iwano et al., 2004; Cardenas et al., 2008).

Вышеупомянутые темпы роста пыльцевых трубок изменяются по амплитуде. То же наблюдается в осцилляциях цитоплазматического кальция (Hepler et al., 2012). $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ и темпы роста колеблются синхронно, с периодом 15–60 с. Колебания $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ отстают на 10–40° от темпов роста, тогда как входной ток Ca^{2+} отстает на 11 с от пика роста в *Lilium longiflorum*. Это соответствует сдвигу фаз на ~140°, касающихся периода ~30 с

(Holdaway-Clarke et al., 1997). Также важную роль в модуляции $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ играют CNGCs (Cyclic nucleotide gated channels) и недавние исследования показали важную роль каналов, управляемых глутаматными рецепторами, для нормального роста пыльцевой трубки. Повышение концентрации цитозольного кальция вызывает деполимеризацию F-актина с помощью актинсвязывающих белков (гельзолина, профилина и др.), что замедляет темпы роста. Механоактивируемые каналы плазматической мембраны в это время закрыты или не достаточно активны, а значит цитозольные концентрации Ca^{2+} снижаются, что приводит к реорганизации актинового цитоскелета и увеличению темпов роста. Непосредственно $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ может вызвать освобождение Ca^{2+} из внутренних запасов путем активации фосфолипазы C и освобождением инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), который, в свою очередь, высвобождает Ca^{2+} из депо (Franklin-Tong et al., 1996). Увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ также способствует слиянию везикул на плазматической мембране, но еще не ясно – это прямой эффект влияния Ca^{2+} или косвенно опосредованный аннексинами и синаптотагминами (Hepler and Winship, 2010).

Этот целенаправленный транспорт экзоцитозных пузырьков служит основой отложения клеточной стенки в одном направлении, что необходимо для полярного роста.

Осцилляции цитозольного кальция наблюдаются в условиях *in vitro*, но *in vivo* они наблюдаются очень слабо или почти отсутствуют (Iwano et al., 2009). На сегодняшний день используются новейшие двухфотонные микроскопы для этих исследований, что позволяет получать данные с большой разрешающей способностью. Все же колебания обнаруживаются и их интенсивность и амплитуда пропорциональны росту пыльцевой трубки, следовательно они реагируют гомеостатически на возмущения и обеспечивают определенную стабильность.

При росте клеточной стенки Ca^{2+} также играет важную роль. На апикальной части клетки, путем экзоцитоза, наслаиваются пектиновые вещества и вместе с тургором клетки обеспечивают ее рост. Среди них преобладают метил-пектины, которые легко связывают ионы кальция, формируя гель с низкой силой связывания. Метил-пектиназа, выделенная наружу, деметилирует предшественник пектина и свободные молекулы сшиваются ионами кальция. Этот процесс увеличивает жесткость клеточной стенки. Для нормального роста пыльцевой трубки необходима концентрация Ca^{2+} вне клеток в диапазоне от 10 мкМ до 10 мМ, чтобы сохранить клеточные стенки достаточно жесткими на разрыв и достаточно гибкими для обеспечения роста (Hepler and Winship, 2010).

Тем не менее, внешний Ca^{2+} необходим не только для сшивания компонентов клеточной стенки. Прорастающим пыльцевым зернам и удлиняющимся пыльцевым трубкам необходим постоянный внешний источник кальция, в целях установления и поддержания необходимого внутреннего Ca^{2+} градиента. Обилие внешнего кальция даже повышает реакцию растущей пыльцевой трубки на ростовые стимулы (Bou Daher and Geitmann, 2011). Следовательно, значительные количества внеклеточного Ca^{2+} должны присутствовать в пестике и его клее (Ge et al., 2009).

Участие кальция в симбиотических отношениях с микроорганизмами и грибами

Дефицит поступления питательных веществ из окружающей среды ограничивает рост и развитие растений и многие из них взаимодействуют с разнообразными организмами для предотвращения этого. Ассоциация с эндомикоризными грибами помогает в питании, особенно для обеспечения фосфатами, и этот симбиоз помог становлению высших растений на суше в процессе их эволюции. Хорошо известные взаимодействия между азотфиксирующими бактериями и растениями семейства Fabaceae. Их симбиоз сопровождается обменом сигнальных молекул, что помогает в идентификации растением полезных бактерий, это взаимодействие строго специфическое и определяется, так называемым, Nod-фактором (nodulation factor, Nod). Связывание Nod осуществляется лектиннуклеотидфосфогидролазой (lectin nucleotide phosphohydrolase, LNP). Его влияние на клетки корней лотоса (*Lotus japonicus*) вызывает изменение внутриклеточной концентрации кальция в диких типах, что было подтверждено на мутантных по рецепторам к Nod растениях и сопровождалось деформацией корневых волосков (Miwa et al., 2006; Roberts et al., 2013).

После получения диффундирующих сигналов от микросимбионтов корни растения инициируют программы, связанные с развитием, которые приводят к инфекции ризоидных или микоризных грибов. Обе программы используют один и тот же сигнальный путь с несколькими характерными компонентами. В частности, в обоих типах симбиоза установлены характерные особенности изменения перинуклеарного и нуклеарного кальция. Вероятно, источником Ca^{2+} является ядерный люмен и связанная с ним эндоплазматическая сеть с целенаправленным выпуском кальция в ядерной оболочке (Caroen, 2011).

Генетический анализ *Medicago truncatula* помог идентифицировать несколько генов, которые отвечают за осуществление обоих типов симбиоза. Два из них (DMI1 и DMI2) стимулируют Ca^{2+} осцилляции, но точные механизмы и функции этих компонентов остаются неизвестными. DMI2 кодирует плазмалеммную рецепторподобную киназу, что облегчает передачу сигнала в клетку. DMI1 – катионный канал, локализованный преимущественно на внутренней ядерной оболочке (Caroen, 2011; Venkateshwaran, 2012). DMI3 кодирует кальмодулинзависимую протеинкиназу, взаимодействующую с обратнорегулированными компонентами, выступающую в роли декодера кальциевых осцилляций (Hayashi et al., 2010). Дополнительные гены кодируют три нуклеопорина (NUP85, NUP133 и NENA), также участвующие в колебаниях кальция (Groth et al., 2010). К передаче сигналов могут подключаться ядерные поры и кальциевые каналы ядерной оболочки, которые формируют так называемый путь Sym.

DMI1 играет важную роль в продукции Ca^{2+} осцилляций, но конкретные механизмы этого процесса неизвестны. Ортологи DMI1 обнаружены в *Lotus japonicus* и называются CASTOR и POLLUX (Charpentier et al., 2008), гороха (*Pisum sativum*) SYM8 (Edwards, 2007). CASTOR и POLLUX, хорошо известные кальций-кальмодулинзависимые протеинкиназы, которые высо-

коконсервативны у разных растений (Banba et al., 2008; Chen et al., 2009). Они играют важную роль в Ca^{2+} осцилляциях при микоризной сигнализации.

DMI1 не является каналом, ответственным за высвобождение кальция, но, вероятно, он модулирует их активность (Venkateshwaran, 2012). Это похоже на регуляцию некоторых K^{+} -зависимых каналов, основываясь на том, что POLLUX комплементарны K^{+} транспорту в дрожжах (Charpentier, 2008). При симбиозе способ действия DMI1 должен способствовать поступлению катионов к ядерной оболочке для уравнивания зарядов, которое произойдет после высвобождения кальция в нуклеоплазму и цитоплазму. Катионный канал, таким образом, может изменить трансмембранный потенциал через ядерную мембрану, воздействуя на открытие потенциалуправляемых Ca^{2+} -каналов (Edwards et al., 2007).

Особенности колебаний Ca^{2+} связаны с активностью Ca^{2+} -насосов и Ca^{2+} -каналов. Помпы необходимы для повторно закачивания Ca^{2+} в депо после каждой вспышки, активно транспортируя Ca^{2+} против градиента концентрации, используя АТФ. Недавно найден SERCA тип кальциевых АТФаз – MCA8, которые расположены на внутренней ядерной оболочке *M. truncatula* и необходимы для осцилляций Ca^{2+} (Caroen, 2011). Эти насосы широко распространены в плазматических мембранах растительных клеток, а вариации их структуры указывают на дифференциальную регуляцию.

Ca^{2+} -каналы, освобождающие кальций из депо, могут зависеть от потенциала. После высвобождения Ca^{2+} в цитозоль и нуклеоплазму буфера, они связывают свободные ионы из-за их токсичности для клетки. Буферные системы, способные связать Ca^{2+} , могут играть важную роль в определении нелинейного поведения колебательной системы при Ca^{2+} -сигнализации (Falcke, 2004). В клетке присутствуют многочисленные молекулы, связывающие кальций, включая экзогенные красители и хелаторы Ca^{2+} .

Капоен с сотрудниками (Caroen et al., 2011) исследовали создание и передачу пространственной волны по ядерной оболочке и показали, что ключевые компоненты для формирования Ca^{2+} всплесков находятся на внутренней и внешней поверхностях мембраны ядра. При вычислениях допускался ряд приближений (с целью обеспечения эффективности вычислений), необходимых для пространственно-временного моделирования. Главной задачей для этих исследований являлось понимание механизмов влияния Ca^{2+} -связывающих компонентов на осцилляции Ca^{2+} .

Процесс моделирования допускает присутствие трех основных белков: K^{+} -каналов, потенциалзависимых Ca^{2+} каналов и Ca^{2+} -АТФаз. Все эти компоненты присутствуют на ядерной мембране. K^{+} -канал представлен белком DMI1 (Venkateshwaran et al., 2012), основным белком, задающим изменения мембранного потенциала. Полагают, что Ca^{2+} -каналы являются потенциалзависимыми. Так как DMI1 не имеет доменов-сенсоров, чувствительных к изменениям мембранного потенциала, поэтому можно предположить, что любые его изменения не повлекут за собой модуляцию активности канала. Ca^{2+} -помпы представлены MCA8, SERCA типами АТФаз (Caroen et al., 2011). Они способствуют закачке кальция против градиента концентрации с использова-

нием энергии АТФ. При моделировании предполагается, что DM11 в состоянии изменять потенциал мембраны, чтобы обеспечить проток ионов против движения Ca^{2+} .

Модель принимает внутреннюю локализацию ядерной оболочки в клетках корневых волосков *Medicago truncatula*, базирующейся на преимущественном местонахождении DM11. Люмен ядра сопряжен с ЭПР и как предполагается, существует градиент кальция через внутреннюю ядерную оболочку с высокой концентрацией Ca^{2+} в люмене и низкой – в нуклеоплазме. Для упрощения допускается существование одного кальциевого депо ЭПР с сопряженным люменом ядра, который освобождает свое содержимое в нуклеоплазму. На основе этих допущений была создана математическая модель, подтвержденная экспериментально и описывающая осцилляции ядерного кальция в корневых волосках *Medicago truncatula* при симбиотических отношениях растения с грибом (Granqvist et al., 2012).

Другие исследования, описывающие симбиотические отношения корового слоя клеток корней растений, показали присутствие кальциевых осцилляций. Перед проникновением бактерий в клетки наблюдаются медленные колебания Ca^{2+} . По мере проникновения их в клетки частота колебаний возрастает. Одним из объяснений может быть изменение буферных характеристик цитоплазмы, что вызвано сигналом от микробов, таких как Nod-фактор, который станет доступным после проникновения бактерий через оболочку клетки (Sieberer et al., 2011).

Кальций и накопление жасмоновой кислоты

Жасмоновая кислота (ЖК) играет важную роль во взаимодействиях «растение – насекомое». При повреждении тканей растительными животными обычно очень сильно повышается концентрация ЖК, что, в свою очередь, активирует накопление метаболитов, которые функционируют в качестве защиты против травоядных животных.

Было продемонстрировано, что присутствие метилжасмоната способствует закрытию клеток устьиц с изменениями свободного цитоплазматического кальция. К этим изменениям причастна кальцийзависимая протеинкиназа 6 (calcium dependent protein kinase 6, CDPK6), способная изменять активность медленных кальциевых каналов плазматической мембраны (Munemasa et al., 2011). Другие протеинкиназы также участвуют в ранних этапах синтеза жасмоновой кислоты. Растения *Nicotiana tabacum* с сильно экспрессированными генами CDPK4 и CDPK5 накапливали большие количества ЖК. Анализ ферментов цепочки её синтеза не показал прямого влияния киназ на их активность, как и генетических различий между мутантными формами по CDPK4 и CDPK5. Динамика ЖК у этих растений была подобной, исключая возможность уменьшения количества за счет разложения в диком типе. Для получения дополнительной информации изучили влияние протеинкиназ на количество предшественников синтеза ЖК – свободных жирных кислот $C_{18:3}$ и (9S,13S)-12-оксо-фитодиеновой кислоты (ОФДК). В диком типе наблюдалось уменьшения

уровня $C_{18:3}$, но количество ОФДК и ЖК увеличивалось, что указывает на регуляцию CDPK4 и CDPK5 ранних этапов синтеза ЖК. Возможно, этот эффект заключается в контроле активности оксидсинтазы и оксидциклазы, которые превращают 13(S)-гидропероксиоктадекатриеновую кислоту в ОФДК (Hettenhausen et al., 2012; Hettenhausen et al., 2013).

CML (calmodulin-like protein, CML) – семейство протеинов, имеющих три EF-домена и работающих как переклюкатели. Семейство генов CML включает около 50 белков, но специфически реагирует на элиситоры и повреждения насекомых только CML42. Также было описано влияние на экспрессию этого гена пептида грибов Avr9. Предположена также регуляция транскрипционным фактором WRKY (Segonzac et al., 2011). Обнаруживаются транскрипты CML42 при влиянии на клетку элиситоров, присутствующих в экстракте клеточной стенки мутантного гриба *Piriformospora indica*, который поддерживает рост проростков *Arabidopsis* (Vadassery et al., 2009). Эти исследования показывают, что экспрессия CML42 высока при влиянии многих биотических стимулов, включающих активацию PAMP, HAMP, и специфическую активацию элиситорами, что указывает на консервативность ранних сигнальных путей. Кроме того, эти вмешательства способствуют повышению цитозольного кальция и выбросу фитогормонов.

При сравнении растений с суперэкспрессированным CML42 и диким типом не наблюдается заметной разницы в концентрации ЖК и её производных. Однако в CML42 показана более сильная регуляция чувствительных к ЖК генов VSP2 и Thi2.1, в ответ на инвазию *S. littoralis*, что указывает на более высокую устойчивость к повреждениям. При этом ЖК действует на два пути, ERF и MYC2, которые функционируют антагонистически. При активации MYC2 растением запускается защитная реакция на борьбу с насекомым, ERF – активируются насекомым (Verhage et al., 2011). Потеря функции CML42 могла бы воздействовать на ответвление CML42 непосредственно. Интересно, что регуляция осуществляется не на уровне синтеза ЖК, а на уже задействованных сигнальных путях от ЖК.

Доказательства роли Ca^{2+} в регуляции биосинтеза ЖК исходят из того, что жасмонаты вызывают повышение Ca^{2+} путем активирования известных генов двупорового канала 1 (Two pore channel 1, TPC1) (Bonaventure et al., 2007). Обратная регуляция TPC1, мембранных катионных каналов тонопласта амплифицирует накопление ЖК после заражения. Неизвестно, каким образом кальций опосредствует сигналы от ЖК и способствует её восприятию клеткой. В cml42 линиях концентрация кальция в ответ на действие ЖК выше, нежели в диком типе. С другой стороны, влияние *S. littoralis* на растения повышает в одинаковом количестве концентрацию кальция и не зависит от типа растения. Это значит, что CML42 повышает ЖК-индуцированное освобождение кальция и обратно регулирует это, и CML42 уменьшает Ca^{2+} -выброс в ответ на инвазию насекомых, поскольку потеря функции не имеет никакого эффекта.

Потеря функции экспрессии CML42 приводит к восстановлению у *S. littoralis* защиты от вредителей: личинки набирают меньше веса на мутантных растениях по сравнению с растениями дикого типа. Следовательно,

можно предположить, что CML42 отрицательно влияет на защиту растения, поскольку потеря функции этого гена способствует большему сопротивлению против травоядных животных. Роль CML42 в развитии растения была идентифицирована на опытах по связи с KIC (кальцийсвязывающий белок), который отрицательно регулирует рост ответвлений трихом (Dobney et al., 2009).

Ранние исследования многих систем показали, что Ca^{2+} -сигнализация отрицательно воздействует на защиту растения. В растениях ячменя потеря кальмодулинсвязывающих частей белков MLO для обратной регуляции защиты против ложной мучнистой росы, и Ca^{2+} -активируемый транскрипционный фактор CAMTA3 отрицательно регулируют уровни салициловой кислоты, присоединяясь к белку-регулятору салициловой кислоты EDS1. WRKY11 и -17, также известны как обратные регуляторы основной защиты от бактериальной инфекции. Роль CML42 заключается в регуляции активации – деактивации упомянутых путей защиты. Также он способствует контролю экспрессии ферментов синтеза ряда фитогормонов (этилена, АБК).

Участие в абиотических стрессах

Кэмпфероловые гликозиды – высокомолекулярные флавоноиды листьев, стеблей и цветов арабидопсиса, которые защищают от ультрафиолетовой радиации (УФ). Известно, что CML42 способствует их продукции и накоплению. Растения *cml42* также были менее резистентны к УФ, подтверждая данное действие флавоновых гликозидов и различные роли кальциевых датчиков, таких как CML42, которые воспринимают действие Ca^{2+} . Среди других абиотических воздействий важна засуха, которая стимулирует продукцию АБК, что способствует закрытию устьиц и индукции экспрессии стрессактивируемых генов. Cml42 вызывает накопление АБК в ответ на многократные циклы засухи, но при этом не формируется засухостойкий фенотип. Это указывает на CML42 отрицательную регуляцию уровней АБК во время стресса. CML9 – другой член семейства CML, известный как отрицательный регулятор в сигнальном пути АБК (Magnan et al., 2008). Кальциевый сенсор, который принадлежит к семейству кальцинеурин В-подобных белков (calcineurin B-like, CBL), также известный отрицательный регулятор в АБК-пути с контролем её синтеза (Vadassery et al., 2012).

При изучении холодостойкости *Populus euphratica* было продемонстрировано участие CPK10 в формировании устойчивости растения. Трансгенные растения, с гиперэкспрессией этого белка, содержали больше АБК, закрытие устьиц и повышенную толерантность к заморзанию. При этом усиливалась экспрессия генов, отвечающих за абиотический стресс, таких как RD29B и COR15A. Похожая ситуация наблюдалась и при засухе. Можно предположить, что CPK10 действует как положительный регулятор, реагирующий на холодовой и тепловой стресс (Chen et al., 2013).

Помимо сенсоров кальция, определенное место занимают и кальциевые транспортёры, особенно Р-АТФазы, которые в своей молекуле имеют CaM-свя-

зывающую последовательность и способны участвовать в ответах на биотический и абиотический стресс (Huda et al., 2013).

Таким образом, рассмотрены основные известные молекулярные механизмы регуляции гомеостаза кальция в клетках растений. Представленные данные имеют значение для понимания роли кальция в гомеостазе ионов и могут быть использованы для разработки высокоэффективных технологий питания культурных растений.

Библиографические ссылки

- Banba, M., Gutjahr, C., Miyao, A., Hirochika, H., Paszkowski, U., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., 2008. Divergence of evolutionary ways among common sym genes: CASTOR and CCMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 49(11), 1659–1671.
- Batistic, O., Waadt, R., Steinhörst, L., Held, K., Kudla, J., 2010. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J.* 61(2), 211–222.
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Rodrigues, V., Armand, F., Farmer, E., 2007. The *fou2* gain-of-function allele and the wild-type allele of Two Pore Channel 1 contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 48(12), 1775–1789.
- Bou Daher, F., Geitmann, A., 2011. Actin is involved in pollen tube tropism through redefining the spatial targeting of secretory vesicles. *Traffic* 12, 1537–1551.
- Bradley, J., Reiser, J., Frings, S., 2005. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 343–349.
- Brini, M., Crafoli, E., 2009. Calcium pumps in heart and disease. *Physiol. Rev.* 89(4), 1341–1378.
- Capoen W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ané, J.M., Oldroyd, G.E., 2011. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(34), 14348–14353.
- Cardenas, L., Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J., Hepler, P., 2008. Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol.* 146, 1611–1621.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., Parniske, M., 2008. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20(12), 3467–3479.
- Chen, C., Fan, C., Gao, M., Zhu, H., 2009. Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol.* 149, 306–317.
- Chen, J., Xue, B., Xia, X., & Yin, W., 2013. A novel calcium-dependent protein kinase gene from *Populus euphratica*, confers both drought and cold stress tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441(3), 630–636.
- Chen, L., Ren, F., Zhou, L., 2012. The *Brassica napus* calcineurin B-like 1-CBL-interacting protein kinase 6 component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signalling. *J. Exp. Bot.* 63(17), 6211–6222.

- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Shigaki, T., Lachmansingh, J., Le-Clere, S., Lahner, B., Salt, D.E., Hirschi, K.D., 2005. Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol.* 138, 2048–2060.
- Dadacz-Narloch, B., Beyhl, D., Larisch, C., Lopez-Sanjurjo, E.J., Reski, R., Kuchitsu, K., Mueller, T.D., Becker, D., Schönknecht, G., Hedrich, R., 2011. A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium levels. *Plant Cell.* 23, 2696–2707.
- Day, S., Reddy, S., Ali, S., Reddy, A., 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 10(3), 1–24.
- Demidchik, V., Shabala, S., Coutts, K., Tester, M., Davies, J., 2003. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *J. Cell Sci.* 116, 81–88.
- Ding, J., Richard, B., 1993. Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal calls. *Plant J.* 3, 83–110.
- Dobney, S., Chiasson, D., Lam, P., Smith, S., Snedden, W., 2009. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *J. Biol. Chem.* 46, 31647–31657.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(21), 8744–8449.
- Edmond, C., Shigaki, T., Ewert, S., 2009. Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity. *Biochem. J.* 418, 145–154.
- Edwards, A., Heckmann, A.B., Yousafzai, F., Duc, G., Downie, J.A., 2007. Structural implications of mutations in the pea SYM8 symbiosis gene, the DMI1 ortholog, encoding a predicted ion channel. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 1183–1191.
- Falcke, M., 2004. Reading the patterns in living cells: The physics of Ca^{2+} signaling. *Adv. Phys.* 53, 255–440.
- Franklin-Tong, V., Drobak, B., Allan, A., Watkins, P., Tre-wavas, A., 1996. Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Plant Cell* 8, 1305–1321.
- Galva, C., Virgin, G., Helms, J., Gatto, C., 2013. ATP protects against FITC labeling of *Solanum lycopersicon* and *Arabidopsis thaliana* Ca^{2+} -ATPase ATP binding domains. *Plant Physiol. Biochem.* 71, 261–267.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolowski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M., 2003. Nitric oxide regulates K^{+} and Cl^{-} channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11116–11121.
- Ge, L., Xie, C., Tian, H., Russell, S., 2009. Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation. *Sex. Plant Reprod.* 22, 87–96.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., Maathuis, F., 2007. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K^{+} conductance and plays a role in K^{+} homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10726–10731.
- Granqvist, E., Wysham, D., Hazledine, S., Kozlowski, W., Sun, J., Charpentier, M., Martins, T.V., Haleux, P., Tsaneva-Atanasova, K., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., Morris, R.J., 2012. Buffering capacity explains signal variation in symbiotic calcium oscillations. *Plant Physiol.* 160, 2300–2310.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., Mansfield, J., 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23, 441–450.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Drlxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., Parniske, M., 2010. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22, 2509–2526.
- Hamamoto, S., Marui, J., Matsuoka, K., 2008. Characterization of a tobacco TPK-type K^{+} channel as a novel tonoplast K^{+} channel using yeast tonoplasts. *J. Biol. Chem.* 283, 1911–1920.
- Harada, A., Shimazaki, K., 2007. Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochem. Photobiol.* 83, 102–111.
- Harada, A., Sakai, T., Okada, K., 2003. phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca^{2+} differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8583–8588.
- Harada, A., Takemiya, A., Inoue, S., Sakai, T., Shimazaki, K., 2013. Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant Cell Physiol.* 54, 36–47.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., Imaizumi-Anraku, H., 2010. A dominant function of CcAMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J.* 63, 141–154.
- He, L., Yang, X., Wang, L., 2013. Molecular cloning and functional characterization of a novel cotton CBL-interacting protein kinase gene (GhCIPK6) reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435(2), 209–215.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratq-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J.B., Kudla, J., 2011. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Res.* 21, 1116–1130.
- Helling, D., Possart, A., Cottier, S., Klahre, U., Kost, B., 2006. Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling. *Plant Cell* 18, 3519–3534.
- Hen, X., Gu, Z., Xin, D., Hao, L., Liu, C., Huang, J., Ma, B., Zhang, H., 2011. Identification and characterization of putative CIPK genes in maize. *J. Genet. Genomics.* 38(2), 77–87.
- Hepler, P., Winship, L., 2010. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 147–160.
- Hepler, P., Kunkel, J., Rounds, C., Winship, L., 2012. Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci.* 17, 32–38.
- Hettenhausen, C., Baldwin, I., Wu, J. (2013). *Nicotiana attenuata* MPK4 suppresses a novel jasmonic acid (JA) signaling-independent defense pathway against the specialist insect *Manduca sexta*, but is not required for the resistance to the generalist *Spodoptera littoralis*. *New Phytol.* 199(3), 787–799.
- Hettenhausen, C., Yang, D., Baldwin, I., Wu, J., 2012. Calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in *Nicotiana attenuata*. *Plant Signal Behav.* 8(1), e22784.
- Hirschi, K., Korenkov, V., Wilganowski, N., Wagner, G., 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124, 125–133.
- Holdaway-Clarke, T., Feijy, J., Hackett, G., Kunkel, J., Hepler, P., 1997. Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* 9, 1999–2010.
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z., Gong, Z., 2012. A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2546–2561.

- Huda, K., Banu, M., Tuteja, R., Tuteja, N., 2013. Global calcium transducer P-type Ca^{2+} -ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling. *J. Exp. Bot.* 64(11), 3099–3109.
- Inoue, S., Takemiya, A., Shimazaki, K., 2010. Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 587–593.
- Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., Takayama, S., 2009. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol.* 150, 1322–1334.
- Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A., 2004. Ca^{2+} dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 3562–3571.
- Jammes, F., Hu, H.-C., Villiers, F., Bouten, R., Kwak, M., 2011. Calcium-permeable channels in plant cell. *FEBS J.* 27, 4262–4276.
- Jeandroz, S., Lamotte, O., Astier, J., Rasul, S., Trapet, P., Beson-Bard, A., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Ma, W., Berkowitz, G.A., Wendehenne, D., 2013. There's more to the picture than meets the eye: Nitric oxide cross talk with Ca^{2+} signaling. *Plant Physiol.* 163, 459–470.
- Kang, J., Turano, F., 2003. The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6872–6877.
- Kang, J., Mehta, S., Turano, F., 2004. The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol.* 45, 1380–1389.
- Knight, M., Campbell, A., Smith, S., Trewavas, A., 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526.
- Konrad, K., Wudick, M., Feijy, J., 2011. Calcium regulation of tip growth: New genes for old mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 721–730.
- Krebs, M., Beyhl, D., Grollich, E., Al-Resheid, K., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R., Schumacher, K., 2010. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Plant Physiol.* 107(7), 3251–3256.
- Kurusu, T., Hamada, J., Hamada, H., Hanamata, S., Kuchitsu, K., 2010. Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice. *Plant Signal Behav.* 8(5), 1045–1047.
- Li, J., Zhu, S., Song, X., Shen, Y., Chen, H., Yu, J., Yi, K., Liu, Y., Karplus, V.J., Wu, P., Deng, X.W., 2006. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell* 18, 340–349.
- Ma, W., Zhi, Q., Smigel, A., Walker, R., Verma, R., Berkowitz, G., 2009. Ca^{2+} , cAMP, and transduction of non-self-perception during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20995–21000.
- Magnan, F., Ranty, B., Charpentreau, M., Sotta, B., Galaud, J., Aldon, D., 2008. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J.* 56(4), 575–589.
- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., Garcia-Brugger, A., 2012. Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium* 51(6), 434–444.
- Medvedev, C.C., 2005. Calcium signal system [Kalcievaya signalnaya sistema]. *Fiziologiya Rasteniy* 52(2), 282–305 (in Russian).
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., 2006. Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J.* 48, 883–894.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G., Downie, J., 2006. Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 914–923.
- Munemasa, S., Hossain, M., Nakamura, Y., Mori, I., Murata, Y., 2011. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiol.* 155, 553–561.
- Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qi, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., Kishigami, A., Sokabe, M., Kojima, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Iida, K., Terashima, A., Nakano, M., Ikeda, M., Yamanaka, T., Iida, H., 2007. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104, 3639–3644.
- Nalefski, A., Falke, J., 1996. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375–2390.
- Ordenesa, V., Morenoc, I., Maturanac, D., Norambuenad, L., Trewavase, A., Orellana, A., 2012. *In vivo* analysis of the calcium signature in the plant Golgi apparatus reveals unique dynamics. *Cell Calcium* 52, 397–404.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I., 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734.
- Peiter, E., 2011. The plant vacuole: Emitter and receiver of calcium signals. *Cell Calcium* 50, 120–128.
- Peiter, E., Maathuis, F., Mills, L., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., Sanders, D., 2005. The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434, 404–408.
- Piao, H., Xuan, Y., Park, S.H., Je, B.I., Park, S.J., Park, S.H., Kim, C.M., Huang, J., Wang, G.K., Kim, M.J., Kang, S.M., Lee, I.J., Kwon, T.R., Kim, Y.H., Yeo, U.S., Yi, G., Son, D., Han, C.D., 2010. OsCIPK31, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress conditions in rice plants. *Mol. Cells* 30(1), 19–27.
- Pittman, J., 2011. Vacuolar Ca^{2+} uptake. *Cell Calcium* 50, 139–146.
- Pittman, J., Shigaki, T., Marshall, J., Morris, J., Cheng, N., Hirsch, K., 2004. Functional and regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter. *Plant Mol. Biol.* 56, 959–971.
- Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M., Potocká, A., Alché Jde, D., Kost, B., Žárský, V., 2012. NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *J. Plant Physiol.* 169(16), 1654–1663.
- Roberts, N., Morieri, G., Kalsi, G., Rose, A., Stiller, J., Edwards, A., Xie, F., Gresshoff, P.M., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., Etzler, M.E., 2013. Rhizobial and mycorrhizal symbioses in *Lotus japonicus* require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling. *Plant Physiol.* 161, 556–567.
- Sanchez-Barrena, M., Martinez-Ripoll, M., Albert, A., 2013. Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5734–5749.
- Schwessinger, B., Zipfel, C., 2008. News from the frontline: Recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(4), 389–395.
- Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S., Hann, D., Zipfel, C., Rathjen, J., 2011. Hierarchy and roles of pathogen-

- associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 156(2), 687–699.
- Shigaki, T., Pittman, J., Hirschi, K., 2003. Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/ H^+ antiporter CAX2. *J. Biol. Chem.* 278, 6610–6617.
- Sieberer, B., Chabaud, M., Fournier, J., Timmers, A., Barker, D., 2011. A switch in Ca^{2+} spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *Plant J.* 69, 822–830.
- Simontacchi, M., García-Mata, C., Bartoli, C., Santa-María, G., Lamattina, L., 2013. Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep.* 32(6), 853–866.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., Dolan, L., 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319, 1241–1244.
- Tikhonova, L., Pottosin, I., Dietz, K., Schwnknecht, G., 1997. Fast-activating cation channel in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium. *Plant J.* 11, 1059–1070.
- Vadassery, J., Ranf, S., Drzewiecki, C., Mithöfer, A., Mazars, C., Scheel, D., Lee, J., Oelmüller, R., 2009. A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J.* 59(2), 193–206.
- Vadassery, J., Reichelt, M., Hause, B., Gershenzon, J., Boland, W., Mithöfer, A., 2012. CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera* herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159, 1159–1175.
- Venkateshwaran, M., Cosme, A., Han, L., Banba, M., Satyshur, K.A., Schleiff, E., Parniske, M., Imaizumi-Anraku, H., Ané, J.M., 2012. The recent evolution of a symbiotic ion channel in the legume family altered ion conductance and improved functionality in calcium signaling. *Plant Cell* 24, 2528–2545.
- Verhage, A., Vlaardingerbroek, I., Raaymakers, C., Van Dam, N., Dicke, M., Van Wees, S.C., Pieterse, C.M., 2011. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Front Plant Sci.* 26(2), 47.
- Waadt, R., Schmidt, L., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., Kudla, J., 2008. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J.* 56, 505–516.
- Wang, R., Li, L.L., Cao, Z.H., Zhao, Q., Li, M., Zhang, L.Y., Hao, Y.J., 2012. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple MdCIPK6L gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 79(1–2), 123–135.
- Ward, J., Schroeder, J., 1994. Calcium-activated K^+ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* 6, 669–683.
- White, P., 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 171–189.
- White, P., Bowen, H., Demidchik, V., Nichols, C., Davies, J., 2002. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1564, 299–309.
- Wu, J., Qu, H., Jin, C., Shang, Z., Wu, J., Xu, G., Gao, Y., Zhang, S., 2011. cAMP activates hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels in the pollen of *Pyrus pyrifolia*. *Plant Cell Rep.* 30, 1193–1200.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., Wu, W.H., 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* 125(7), 1347–1360.
- Yang, W., Kong, Z., Omo-Ikerodah, E., Xu, W., Li, Q., Xue, Y., 2008. Calcineurin B-like interacting protein kinase OsCIPK23 functions in pollination and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Genet. Genomics* 35(9), 531–543.
- Yu, M., Yun, B., Spoel, S., Loake, G., 2012. A sleigh ride through the SNO: Regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 424–430.
- Zhang, H., Lv, F., Han, X., 2013. The calcium sensor PeCBL1, interacting with PeCIPK24/25 and PeCIPK26, regulates Na^+/K^+ homeostasis in *Populus euphratica*. *Plant Cell Rep.* 32(5), 611–621.
- Zhao, J., Connorton, J., Guo, Y., Li, X., Shigaki, T., Hirschi, K.D., Pittman, J.K., 2009a. Functional studies of split *Arabidopsis* Ca^{2+}/H^+ exchangers. *J. Biol. Chem.* 284(49), 34075–34083.
- Zhao, J., Shigaki, T., Mei, H., Gu, Y., Cheng, N., Hirschi, K., 2009b. Interaction between *Arabidopsis* Ca^{2+}/H^+ exchangers CAX1 and CAX3. *J. Biol. Chem.* 284(7), 4605–4615.
- Zhao, L.-N., Shen, L.-K., Zhang, W.-Z., Zhang, W., Wang, Y., Wu, W.-H., 2013. Ca^{2+} -dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K^+ channels in *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant Cell* 25(2), 649–661.
- Zhao, X., Wang, Y.-L., Qiao, X.-R., Wang, J., Wang, L.-D., Xu, C.-S., Zhang, X., 2013. Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiol.* 162(3), 1539–1551.

Надійшла до редколегії 05.04.2014



УДК 581.5(477.87):631.842

Аліментарні тригери гормонзалежних форм раку молочної залози

Т.Ю. Лихолат¹, О.А. Лихолат², В.С. Недзвєцький¹, В.В. Лактіонов³

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

²Академія митної служби України, Дніпропетровськ, Україна

³Комунальний заклад «Центральна міська лікарня», Новомосковськ, Україна

Досліджено процеси перекисного окиснення ліпідів і стан системи антиокисного захисту в організмі щурів різного віку, що піддавалися впливу екзоестрогенів. Установлено різний ступінь інтенсифікації пероксидації залежно від віку та дослідного органа: максимальне перевищення контрольних показників відмічене у сироватці крові, що свідчить про вплив синтетичних естрогенів на всі основні системи організму. У самиць у препубертатному періоді у печінці реакція прооксидантної системи та напруження в системі антиоксидантного захисту перевищували силу відповіді в органі статевозрілих тварин. Відмічено органну дискретність змін активності ензимів антиоксидантного захисту, яка залежить від віку тварин. Ураховуючи залучення системи глутатіону до дезактивації естрогенів шляхом їх кон'югації в реакціях, що каталізуються глутатіонтрансферазою, зниження активності ензиму може викликати накопичення високоактивних проміжних метаболітів із наступним пошкодженням внутрішньоклітинних структур. Ці феномени надалі можуть стати тригером зниження потенціалу компенсаторних механізмів, що разом із генотоксичною дією екзоестрогенів є важливою патогенетичною ланкою в канцерогенезі: ініціюють розвиток проліферативних процесів та виникнення в майбутньому ракових станів і, зокрема, гормонзалежних пухлин молочної залози.

Ключові слова: екзоестрогени; перекисне окиснення ліпідів; система антиоксидантного захисту

Alimentary triggers of hormone dependent breast cancers

T.Y. Lykholat¹, O.A. Lykholat², V.S. Nedzvetsky¹, V.V. Laktionov³

¹Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Academy of Customs Service of Ukraine, Dnipropetrovsk, Ukraine

³Central Hospital Munisipal Enterprise, Novomoskovsk, Ukraine

Breast cancer (BC) consistently holds the leading positions in the structure of morbidity and mortality of the female population. Food containing veterinary hormones is extremely dangerous to human health: estrogens are female sex hormones. Excessive level of estrogen in the body gives rise to diseases of varying severity: in women (especially of older age) it may cause breast cancer. The paper investigates the processes of lipid peroxidation and the status of antioxidant protection system in rats of different ages exposed to exogenous estrogens. The purpose of the work is to study lipid peroxidation and antioxidative protection status in rats of different ages exposed to exogenous estrogens for determining the trigger mechanisms for tumor development. Experiments were conducted on female Wistar rats exposed to exogenous estrogen for 45 days. At the beginning of the experiment, age of experimental animals was 3 months in pubertal period and 6 months as mature ones. The control groups consisted of intact animals of appropriate age. To simulate the influence of exogenous estrogen, rats' food was treated with the Sinestron drug at the rate of 2 mg per kg. The research materials were serum and liver of rats. Objects of the research

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна.
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-229-19-61. E-mail: lykholat2010@ukr.net

Академія митної служби України, вул. Дзержинського, 2/4, Дніпропетровськ, 49000, Україна.
Academy of Custom Service of Ukraine, Dzerzhinsky st., 2/4, Dnipropetrovsk, 49000, Ukraine.
Tel.: +38-066-038-68-92. E-mail: lykholat2010@ukr.net

Комунальний заклад «Центральна міська лікарня», вул. Сучкова, 40, Новомосковськ, 51200, Україна.
Central Hospital Munisipal Enterprise, Suchkov st., 40, Novomoskovsk, 51200, Ukraine.
Tel.: +38-095-276-09-62. E-mail: 197306@mail.ruukr.net

were indicators of lipid peroxidation activity (content of TBA-active products) and antioxidant protection system (reduced glutathione (RG) level), glutathione transferase (GT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP), superoxide dismutase (SOD) activity, and total antioxidative activity (AOA). Data obtained was treated with standard methods of estimation of variation series. Various degrees of peroxidation intensification depending on the age and organs were determined. Maximum excess of control indexes in the serum was observed and it indicated synthetic estrogen effect of on all major body systems. In prepubertal period females' liver the reaction of prooxidant system and tension in the antioxidant protection system exceeded the strength of response in the body of mature animals. The organ discreteness of changes in the activity of antioxidant protection enzymes depending on the age of the animals was recorded. Given the involvement of glutathione system in the deactivation of estrogens through their conjugation in reactions catalyzed by glutathione transferase, decreased enzyme activity may lead to accumulation of highly active intermediate metabolites with subsequent damage to intracellular structures. Later on, these phenomena may become a trigger of reduction of the compensatory mechanisms' potential, which together with the genotoxic effect of exogenous estrogens is an important pathogenetic element in carcinogenesis: they initiate the development of proliferative processes and occurrence of cancer conditions, in particular, hormone dependent breast tumors, in future.

Keywords: exogenous estrogens; lipid peroxidation; antioxidant protection system

Вступ

Рак молочної залози (РМЗ) у структурі захворюваності та смертності жіночого населення стійко займає лідируючі позиції. У світі щорічно реєструється понад 1 млн випадків даного захворювання, гинуть від нього близько 250 тис. жінок. Якщо загальна захворюваність злоскісними пухлинами з віком збільшується, досягаючи максимуму до 70–80 років, то при раку молочної залози пік захворюваності припадає на 45–59 років. У структурі онкологічної захворюваності жінок в Україні РМЗ посідає перше місце. Рівень захворюваності на РМЗ в Україні за останні 45 років (1965–2010) зріс із 17,6 до 69,7 на 100 тис. жіночого населення, за останні 20 років – у 2,5 раза, щорічний приріст цієї онкопатології становить понад 2%. За даними Національного канцер-реєстру, щорічно в Україні реєструють понад 16,5 тис. нових випадків РМЗ, серед яких 25% – жінки репродуктивного віку (Lykholat, 2012; Fedorenko et al., 2013; Smolanka et al., 2013).

Рак молочної залози є патологією з дуже широкою варіацією частоти між різними географічними районами та групами населення: відмінності між регіонами з високим ризиком (Європа, Північна Америка, Австралія) та низьким (Латинська Америка, Азія, включаючи Японію, Африка) – більше ніж 8-кратні. Майже повселюдно констатується вища захворюваність жінок, що проживають у великих містах, ніж мешканок маленьких містечок і сільських місцевостей. Крім того, в індустріально розвинених районах жінки хворіють частіше. Подібні явища, вірогідно, пов'язані з впливом екзогенних чинників, що здатні ініціювати процеси канцерогенезу в організмі.

Харчування становить 30–35% факторів ризику, які сприяють виникненню пухлин. Деякі харчові продукти та раціон пов'язані з виникненням різних видів раку. У сучасному промисловому тваринництві, птахівництві та рибництві за інтенсивних технологій вирощування тварин, у порушення технологічних регламентів часто незаконно застосовують шкідливі для здоров'я людини гормональні стимулятори росту, тому що вони дозволяють домогтися значного підвищення продуктивності тваринництва (Stephany, 2001, 2010; Brynes, 2005). Продукція, що вміщує ветеринарні препарати, вкрай небезпечна для здоров'я людини: гормональні стимулятори росту – стильбени, стероїдні гормони мають канцерогенну активність, викликають порушення статевого дозрівання та репродуктивної здатності (Lattea and

Chirinos, 2007; Wang and Wang, 2007). Гормони не повністю руйнуються за теплової обробки продуктів. Тому всі гормони, спочатку присутні в м'ясі, молоці, яйцях, овочах і фруктах, там і залишаються, хоча іноді й у менших дозах. Стероїдні гормони руйнуються під час теплової обробки найменше (Chun, 2012). Чоловічі та жіночі гормони містяться в м'ясі (яловичині, свинині, курятині), жіночі – у молоці та яйцях, фітогормони – в овочах і фруктах. Найбільшу популярність здобув фітоестроген, що міститься у сої. Статеві гормони тварин ідентичні гормонам людини. Таким чином, усі гормони, які застосовуються у тваринництві, здатні впливати на людський організм. Потрапляючи до організму людини з їжею, ці гормони сприймаються ним як власні (Brinkman, 2010; Boucher, 2012).

Естрогени – група жіночих статевих гормонів, що синтезуються в організмі яєчниками та регулюють специфічні статеві функції. Надмірний рівень естрогену в організмі буває причиною захворювань різного ступеня тяжкості: у жінок (особливо літнього віку) він здатний викликати рак грудей (Fung et al., 2006; Lykholat et al., 2013). Однак результати досліджень не дозволяють отримати однозначні та послідовні докази про асоціацію між дієтою та розвитком канцерогенезу: прямої кореляції між раціоном і захворюванням на рак молочної залози не виявлено, але є вагомі підстави вважати, що споживання великої кількості жирів тваринного походження (із м'ясом і молочними продуктами) може сприяти його розвитку, можливо, у результаті підвищення рівнів естрогену, що циркулює в організмі (Baena et al., 2013).

Найбільш відповідальний період постнатального онтогенезу – статеве дозрівання (пубертатний період). У пубертатному періоді виділяють дві фази: ранню (препубертатну) та зрілу (власне пубертатну). Власне пубертатна фаза характеризується найзначнішими зрушеннями морфофункціональних параметрів, тому існує підвищення імовірності відхилень показників здоров'я. Головна подія цього періоду – дозрівання системи взаємодії «гіпоталамус – гіпофіз – гонади». У препубертатному та пубертатному періодах кількість гормонів, що зумовлюють формування жіночого фенотипу та секретуються гіпофізом і яєчниками, поступово збільшується. Статеві гормони разом з іншими факторами, зокрема соматотропним гормоном, викликають великі морфофункціональні зрушення в організмі, здійснюють виражений ефект на біохімічні обмінні процеси, підсилюючи анаболізм, впливають на функцію різних органів і систем організму: при гіпоестрогенії (що

не відповідає віку) розвиваються остеопороз, гормональна кардіопатія, депресивний стан, сенільні психози; при гіперестрогенії – гіперпластичні процеси та гормонзалежні пухлини (Bouwens et al., 2011).

Мета роботи – оцінити процеси перекисного окиснення ліпідів і стан системи антиокисного захисту в організмі щурів різного віку, що піддавалися впливу екзоестрогенів, для визначення тригерних механізмів розвитку новоутворень.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проведені на щурах-самках лінії Вістар, яких піддавали впливу екзоестрогену протягом 45 діб. На початок експерименту вік піддослідних тварин складав 3 місяці – у препубертатному періоді (група II, $n = 6$) та 6 місяців – статевозрілі (група IV, $n = 6$). Контрольні групи склали інтактні тварини відповідного віку (групи I, $n = 6$ та III, $n = 6$).

Для моделювання впливу екзогенного естрогену їжу щурів обробляли препаратом Сінестрон – похідний стильбену, за хімічною будовою відрізняється від стероїдних естрогенних гормонів (жіночих статевих гормонів), але за біологічними та лікувальними властивостями близький до них – у розрахунку 2 мкг/кг маси.

Матеріали дослідження – сироватка крові та печінка щурів. Органи промивали охолодженим фізіологічним розчином і поміщали в охолоджене середовище гомогенізації. Для отримання 10% гомогенатів тканини подрібнювали на холоду та гомогенізували в гомогенаторі Поттера з тефлоновим пестиком у п'ятикратному об'ємі 0,25 М сахарози, виготовленої на 0,001 М розчині ЕДТА.

Оцінювали вміст ТБК-активних продуктів (Gavrilov et al., 1987) та системи антиоксидантного захисту – рівень відновленого глутатіону (ВГ) (Owens and Belcher, 1965), активність глутатіонтрансферази (ГТ), глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГП), супероксиддисмутази (СОД) (Pereslegina, 1989), загальної антиокисної активності (Klebanov et al., 1988).

Одержані дані обробляли стандартними методами оцінки варіаційних рядів. Різницю між порівнюваними величинами вважали вірогідною при $P < 0,05$. Обчислення виконували за допомогою програмного продукту Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результати та їх обговорення

За літературними даними, при онкологічних захворюваннях спостерігається порушення окисного гомеостазу у вигляді активації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) (Boucher et al., 2012). Після проведення досліджень щодо визначення впливу експозиції екзоестрогену на процеси ПОЛ та стан антиоксидантного захисту в органах щурів різного віку були отримані такі результати. У групі щурів у пубертатному періоді рівень ТБК-активних продуктів у печінці перевищував контрольні параметри на 25,6%, статевозрілих самок – на 18,5% (табл. 1). У сироватці крові щурів віком 4,5 місяці у препубертатному періоді рівень ТБКАП пе-

ревищував контрольні показники на 48,4%, 7,5 місяців – на 51,4% (табл. 2).

Глутатіон – один із найпотужніших клітинних неензимних антиоксидантів. На синтез цього трипептиду в організмі також впливає вік. Починаючи з 28 років, його виробництво зменшується з кожним роком приблизно на 1%. Дефіцит глутатіону відмічається при дуже багатьох захворюваннях, зокрема новоутвореннях. Головним органом синтезу відновленого глутатіону у ссавців є печінка (Akerboom and Sies, 1990). Вміст відновленого глутатіону в печінці щурів групи II перевищував показники відповідної контрольної групи на 39,9%. У групі IV, яку склали щури старшого віку, підвищення складало 32,4%, що є реактивною відповіддю на пролонгований токсичний вплив. Вживання синтетичних естрогенів спричинює виснаження пулу відновного глутатіону у сироватці: у піддослідних щурів (група II) вміст ВГ був зниженим на 22% порівняно з контролем. У групі IV також зафіксоване падіння рівня відновного глутатіону відносно контрольного показника на 11%. Зниження рівня глутатіону слугує показником виснаження антиоксидантної системи.

Глутатіонредуктаза (ГР) – значно поширений флавіновий фермент, що підтримує високу внутрішньоклітинну концентрацію відновленої форми глутатіону (GSH). Глутатіонредуктаза має високу специфічність до глутатіону та крім основної, глутатіонвідновної, активності здатна проявляти трансгідрогеназну, електронтрансферазну та діафоруазну активності. Глутатіонредуктаза міститься в основному в розчинній частині клітин. Фермент виявлений також у складі хроматину ядер. У піддослідній групі самок віком 4,5 місяця активність глутатіонредуктази в печінці була на 11,5% нижчою порівняно з контрольною, що є несприятливим чинником виснаження пулу GSH із часом. У тварин віком 7,5 місяця активність ферменту була вищою на 48,0%, ніж у інтактних самок відповідного віку, що, можливо, є проявом адаптивної реакції на токсичну експозицію. За впливу Сінестрону у сироватці крові щурів у препубертатному періоді зафіксовано інгібування ензиму на 17,0%, статевозрілих – на 8,0%.

У знешкодженні вторинних продуктів перекисації та інших окиснених речовин головну роль відіграють глутатіонтрансферази. Вони кон'югують із глутатіоном головні та найтоксичніші продукти перекисного окиснення ліпідів. Відновлення за допомогою глутатіонтрансферази гідропероксидів попереджає прогресування перекисації та появу її вторинних метаболітів. У печінці піддослідних тварин віком 4,5 та 7,5 місяця активність ферменту зростала на 18,3% і 20,7%, відповідно. Протилежні зміни активності ензиму детерміновані у сироватці крові щурів обох дослідних груп – зниження на 20,0% (II група) та 8,0% (IV група) порівняно з контрольними індексами.

Супероксиддисмутаза здійснює інактивацію радикалів кисню, які виникають у ході біологічних реакцій перенесення електронів або за впливу ксенобіотиків, при різних захворюваннях (Alyae et al., 2006). Під час визначення активності СОД у печінці піддослідних груп щурів у препубертатному періоді та у статевозрілих спостерігалась тенденція до зростання на 8,9 і 5,4%, відповідно. Процеси дисмутації вільних

радикалів у сироватці крові щурів молодшого віку посилені на 9,0%, у щурів старшої вікової групи спостерігається тенденція до посилення процесу.

Шляхом відновлення перекисів ліпідів у відповідні спирти та розщеплення пероксиду водню до води глутатіонпероксидаза захищає організм від окиснювального пошкодження (Mariani et al., 2011). Під час визначення активності ГП, що як донор H^+ використовує відновлений глутатіон, у печінці спостерігалася тенденція до зменшення у дослідній групі II на 4,8% порівняно з контрольними показниками, у статевозрілих тварин навпаки, у дослідній групі знайдене незначне (на 1,7%)

перевищення контролю. У сироватці спостерігалась тенденція до збільшення активності ГП у дослідних групах II та IV на 12 і 5%, відповідно.

Детермінація інтегрального показника стану антиоксидантних систем – загальної антиоксидантної активності в органах самиць щурів свідчить про різний потенціал захисних систем залежно від віку. У сироватці крові та печінці відмічене підвищення активності антиокисної системи: у самиць віком 4,5 місяця – на 21,0 і 18,1%, 7,5 місяця – на 28,9 і 13,6% порівняно з контрольними групами відповідного віку.

Таблиця 1

Показники печінки щурів, аліментарно експонованих екзогенними гормонами, $M \pm m$

Показники	I група, $n = 6$	II група, $n = 6$	III група, $n = 6$	IV група, $n = 6$
GSH, ммоль/г тканини	$12,9 \pm 0,6$	$17,5 \pm 0,8^*$	$10,8 \pm 0,5$	$14,3 \pm 0,7^*$
GR, мкмоль/хв г білка	$214,3 \pm 10,7$	$189,7 \pm 9,5^*$	$139,8 \pm 7,0$	$206,9 \pm 10,3^*$
GST, мкмоль/хв г білка	$487,7 \pm 24,4$	$576,9 \pm 28,9^*$	$452,5 \pm 22,6$	$546,2 \pm 27,3^*$
ТВКАП, нмоль/г білка	$29,1 \pm 1,5$	$36,6 \pm 1,8^*$	$23,2 \pm 1,2$	$27,5 \pm 1,4^*$
АОА, ум. од.	$26,5 \pm 1,3$	$31,3 \pm 1,6^*$	$36,6 \pm 1,8$	$41,6 \pm 2,1^*$
СОД, опт. од./хв г білка	$236,5 \pm 11,8$	$257,6 \pm 12,9$	$254,4 \pm 12,7$	$268,1 \pm 13,4$
GP, мкмоль/хв г білка	$53,1 \pm 2,7$	$50,5 \pm 2,5$	$51,8 \pm 2,6$	$52,7 \pm 2,6$

Примітка: * (тут і далі) – вірогідність відмінностей показників дослідних груп від контрольних, $P < 0,05$.

Таблиця 2

Показники сироватки крові щурів, аліментарно експонованих екзогенними гормонами, $M \pm m$

Показники	I група, $n = 6$	II група, $n = 6$	III група, $n = 6$	IV група, $n = 6$
GSH, ммоль/мл	$2,60 \pm 0,13$	$2,01 \pm 0,10^*$	$2,36 \pm 0,12$	$2,11 \pm 0,10^*$
GR, мкмоль/хв мл	$0,42 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,02^*$	$0,39 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,02$
GST, мкмоль/хв мл	$9,12 \pm 0,45$	$7,30 \pm 0,37^*$	$8,79 \pm 0,96$	$8,09 \pm 0,40^*$
ТВКАП, нмоль/г білка	$0,75 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,06^*$	$0,75 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,57$
АОА, ум. од.	$39,4 \pm 1,9$	$47,7 \pm 2,4^*$	$38,0 \pm 2,1$	$49,0 \pm 2,5^*$
СОД, опт. од./хв	$53,2 \pm 2,7$	$70,2 \pm 3,5^*$	$55,6 \pm 2,8$	$59,4 \pm 2,9$
GP, мкмоль/хв мл	$0,088 \pm 0,004$	$0,099 \pm 0,005^*$	$0,096 \pm 0,005$	$0,101 \pm 0,005$

Дослідження ефективності впливу екзоестрогенів на перебіг процесів перекисного окиснення ліпідів і стан системи антиокисного захисту в умовах модельного досліду показало різний ступінь інтенсифікації пероксидації залежно від віку та дослідного органа. За отриманими результатами хронічне вживання стероїдних гормонів з їжею викликало напруження прооксидантно-антиоксидантної системи, що є неспецифічною реакцією організму на стресові чинники.

Пролонгований системний дисбаланс може в майбутньому реалізуватися в розвиток дистресу, що є одним з основних механізмів виникнення патологічних явищ, зокрема, новоутворень. Оскільки стресовим чинником виступають стероїдні гормони, ймовірно, подібні феномени будуть мати місце, перш за все, в естрогензалежних органах, зокрема молочній залозі.

Висновки

Аліментарна експозиція естрогенів спричиняє посилення процесів перекисного окиснення ліпідів в організмі тварин у препубертатному періоді та статевозрілих самиць. Установлено різний ступінь інтенсифікації пероксидації залежно від віку та дослідного органа: максимальне перевищення контрольних показників відмічене у сироватці крові, що свідчить про

вплив синтетичних естрогенів на всі основні системи організму. У самиць у пубертатному періоді в печінці реакція прооксидантної системи та напруження системи антиоксидантного захисту перевищувала силу відповіді в органі статевозрілих тварин. Відмічено органну дискретність змін активності ензимів антиоксидантного захисту, яка залежить від віку тварин, свідчить про розбалансування роботи ензимів системи глутатіону. Враховуючи залучення системи глутатіону до дезактивації естрогенів шляхом їх кон'югації в реакціях, що каталізуються глутатіонтрансферазою, зниження активності ензиму може спричинювати накопичення високоактивних проміжних метаболітів із наступним пошкодженням внутрішньоклітинних структур. Імбаланс ланки СОД – ГП проявляється накопиченням перекисів, що є показником розвитку ендогенної інтоксикації, яка більшою мірою виражається у самиць пубертатного періоду.

Порушення окисного гомеостазу у вигляді активації процесів перекисного окиснення ліпідів зі значним накопиченням у крові та печінці початкових і кінцевих продуктів, напруження ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи, зниження загальної антиокисної активності сприяють розвитку афектів у системі детоксикації, метаболічної імунодепресії, що проявляється маніфестацією

ендогенної інтоксикації. Ці феномени надалі можуть стати тригером зниження потенціалу компенсаторних механізмів, що разом із генотоксичною дією екзоестрогенів є важливою патогенетичною ланкою канцерогенезу: ініціює розвиток проліферативних процесів та виникнення в майбутньому ракових станів і, зокрема, гормонзалежних пухлин молочної залози.

Бібліографічні посилання

- Alyae, Y.G., Bezrukov, E.A., Tsestiperov, P.A., 2006. Molekulyarnaya patologiya raka pretstatel'noy gelezy: Diagnosticheskaya i prognosticheskaya znachimos't osnovnykh markerov [Molecular pathology of gland cancer: Diagnostic and prognostic significance of major markers]. *Oncourology* 2, 45–50.
- Baena Ruiz, R., Salinas Hernández, P., 2013. Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas* 13, 360–365.
- Boucher, B.A., Cotterchio, M., Curca, I.A., Kreiger, N., Harris, S.A., Kirsh, V.A., Goodwin, P.J., 2012. Intake of phytoestrogen foods and supplements among women recently diagnosed with breast cancer in Ontario, Canada. *Cancer. Prev. Control* 4(3), 95–107.
- Bouwens, C.S., van Rensburg, S.J., de Kock, L., Apffelstaedt, L.P., Kotze, M.J., 2011. Influence of genetic factors on the development of breast cancer in the older woman. *Reprod. Toxicol.* 3, 302–311.
- Brinkman, M.T., Baglietto, L., Krishnan, K., English, D.R., Severi, G., Morris, H.A., Hopper, J.L., Giles, G.G., 2010. Consumption of animal products, their nutrient components and postmenopausal circulating steroid hormone concentrations. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 176–183.
- Brynes, S.D., 2005. Demystifying 21 CFR Part 556 tolerances for residues of new animal drugs in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42(3), 324–327.
- Chun, J., Pocock, B., Joseph, K.A., Tamer, E.M., Klein, L., Schnabel, F., 2012. Breast cancer risk factors in younger and older women. *Curr. Aging. Sci.* 5(2), 140–147.
- Fedorenko, Z.P., Myhaylovich, Y.Y., Gulak, L.O., 2013. Rak v Ukraini [Cancer in Ukraine] Bulletin of National Cancer-Register of Ukraine 2011–2012 (in Ukrainian).
- Fung, T.T., Hu, F.B., McCullough, M.L., Newby, P.K., Willett, W.C., Holmes, M.D., 2006. Diet quality is associated with the risk of estrogen receptor-negative breast cancer in postmenopausal women. *J. Nutr.* 136, 466–472.
- Gavrilov, V.B., Gavrilova, A.P., Mazhul', L.M., 1987. Analiz metodov opredeleniya produktov perekisnogo okisleniya lipidov v cyvorotke krovi po testy s tiobarbiturovoy kislotoy [Analysis of methods for determining lipid peroxidation products in the blood serum on test with thiobarbituric acid]. *Vopr. Med. Chim.* 1, 118–122.
- Klebanov, G.I., 1988. Otsenka antiokislitel'noy aktivnosti plazmy krovi s primeneniem geltochnyuch lipoproteidov [Evaluation of antioxidative activity of blood plasma using yolk lipoproteins]. *Lab. Delo* 5, 59–62 (in Russian).
- Larrea, F., Chirinos, M., 2007. Impact on human health of hormonal additives used in animal production. *Rev. Invest. Clin.* 59(3), 206–211.
- Lykholat, T.Y., 2012. Zalezghnist' protsesiv metastazuvannya vid retseptornogo profilyu ta viku chvorych n arak molotchnoy galozy [The dependence of the process of metastasis from receptor profile and age of patients with breast cancer]. *Visn. Lviv. Univ. Biol.* 56, 242–247 (in Ukrainian).
- Lykholat, T.Y., Antonyuk, S.V., Probatchay, V.I., 2013. Osoblyvosti receptorno' vidpovidi chynnykiv zrostantnja puhlyny u hvoryh na rak molochnoi' zalozy [Features of receptor response of factors of tumor growth in patients with breast cancer]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 3(1), 38–43 (in Ukrainian).
- Mariani, A., Jeandel, C., Paris, F., Ecohard, R., 2011. Puberty and pubertal growth dynamics in children with idiopathic short stature. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 24(6), 319–325.
- Owens, C.W.I., Belcher, R.V., 1965. A colorimetric micro-method for determination of glutathione. *Biochem. J.* 94(3), 705–711.
- Pereslegina, I.A. 1989. Aktivnost' antioxidantnyuch fermentov clunyu zdorovykh detey [The activity of antioxidant enzymes saliva of healthy children]. *Lab. delo* 11, 20–23 (in Russian).
- Smolanka, I.I., Sklyar, S.Y., Golovko, T.S., Ganuch, O.V., 2013. Kkryning, profilaktika ta rannya diagnostika raku grudnoy zhelezy [Screening, prevention and early detection of breast cancer]. *Clin. Oncol.* 8(1), 12–25 (in Ukrainian).
- Stephany, R.W., 2001. Hormones in meat: Different approaches in the EU and in the USA. *Handb. Exp. Pharmacol.* 103, 357–363.
- Stephany, R.W., 2010. Hormonal growth promoting agents in food producing animals. *Handb. Exp. Pharmacol.* 195, 355–367.
- Wang, S., Wang, X.H., 2007. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products: A review. *Food Addit. Contam.* 24(6), 573–582.

Надійшла до редколегії 08.04.2014



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 2014. 22(1), 38–45.

doi:10.15421/011405

ISSN 2310-0842 print

ISSN 2312-301X online

www.ecology.dp.ua

УДК 631.42 (477.63)

Мікроморфологічні та фізичні властивості ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області

К.М. Божко

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Установлено мікроморфологічні та фізичні властивості едафотопів південного варіанта байрачних лісів Дніпропетровщини на прикладі байраку Військовий. Проаналізовано структуру ґрунту, агрегатний склад, водостійкість агрегатів і ґрунотвірні процеси байрачної екосистеми. Мікроморфологічні дослідження виявили високий ступінь агрегованості верхніх (0–60 см) горизонтів ґрунтового профілю. Структурування має зоогенне походження. Копролітового характеру агрегати містять добре розкладені рослинні залишки. Темно-бурий, майже чорний колір по всій площі мікроморфологічного шліфа зумовлений великою кількістю (80%) органічних сполук, що вказує на активні процеси гуміфікації. Тонкодисперсний гумус представлений великою кількістю рівномірно розташованих згустків гумонів. Форма гумусу – муль. Скелет представлений мінералами різного розміру. У скелеті домінують кварц і польові шпати. Плазма гумусо-глиниста, однорідна по всій площині шліфа, анізотропна з крапчастим світлінням. Площа видимої поверхні пор у верхніх горизонтах ґрунтового профілю значна (40–65%). Пори округлої та подовженої правильної форми. У порах зустрічаються викиди дрібних безхребетних (50%). Із глибиною ґрунтового розрізу площа видимих пор зменшується разом з агрегованістю. Корелюючи з мікроморфологічними характеристиками, водостійкість структурних агрегатів досягає дуже великих (80%) показників у верхніх горизонтах ґрунтового розрізу, знижуючись із глибиною.

Ключові слова: байрак; ґрунт; структура; агрегованість; мікроморфологія.

Micromorphological and physical properties of southern ravine soils in Dnipropetrovsk region

K.M. Bozhko

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The article contains the results of determination of physical and micromorphological properties of soils under natural ravine vegetation in the southern part of Dnipropetrovsk region. The value of ravine forests for the steppe zone of Ukraine is analyzed, and the methods of investigation are shown. Forest typology characteristics of the vegetation stationary test areas, as well as macro- and micromorphological characteristic of the soil profile, structural condition of the soil, its aggregate composition, and water stability of aggregates, are determined. Soil-forming processes in ravine ecosystems of the southern variant in Dnipropetrovsk region are diagnosed. Micromorphological studies of soil in the intact state, as well as analysis of produced thin sections, revealed the high degree of aggregation of the upper (0–60 cm) soil horizons. Structure formation is of zoogenic origin. Large amount of soil aggregates of coprolite structure is clearly seen under the microscope. Well decomposed plant residues are visible in the aggregates. Soil over the entire area of the section is of dark brown, almost black color. This is due to the large amount (80%) of organic substances indicating the active processes of humification. Fine grained humus is represented by plenty of equally spaced bunches of humones. Humus is in mull form. Skeleton is composed of different sized minerals, with quartz and feldspars dominating in its structure. Plasma is of humus-clay type, uniform over the entire area of the section and anisotropic with point illumination. Visible pore surface area is significant (65%) in the upper layers of the soil profile. Pores feature round and oblong regular shape. Often (on 50% of the pore area) the outbreaks of small invertebrates are found. With the depth of the soil profile, visible pore area decreases, as well as the aggregation. While correlating with the micromorphological characteristics, water stability of the soil structural aggregates reaches very high (80%) indices in the upper horizons of the soil profile and gradually decreases with the soil profile depth. Active biogenic microstructure formation, defining significant aggregation and looseness of microstructure, was diagnosed.

Keywords: ravine; soil structure; aggregation; micromorphology

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна.
Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin ave, 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-066-704-91-88, +38-067-917-04-77. E-mail: dnu_gbe_bozhko@mail.ru*

Вступ

Науковці різних країн світу широко досліджували морфологічні, фізичні властивості ґрунтів і ґрунтовірні процеси вченими. Китайські вчені вдосконалюють мікробіологічні та біохімічні системи оцінки якості ґрунтів (He et al., 2003), досліджують розподіл ртуті у підстилці та по ґрунтовому горизонту (Gong et al., 2014), динаміку хімічних і фізичних властивостей ґрунтів північного Китаю (Huang et al., 2007), еволюцію властивостей піщаних ґрунтів (Zhenghu et al., 2004), викиди CO_2 на різних типах ґрунтів напівпустельних лесових плато (Shi et al., 2014), вплив типів рослинності на характеристики ґрунтів лесових пагорбкових місцевостей (Zhao et al., 2013), динаміку вуглецю у ґрунті під час опустелювання (Feng et al., 2002). Німецькі вчені досліджують зв'язок макропор ґрунту та його гідрологічні властивості (Badorreck et al., 2013; Bogner et al., 2014). Англійські науковці дають кількісну оцінку ґрунтового органічного вуглецю різних типів землекористування східних Гімалаїв (Dorji et al., 2014). Бразильські вчені досліджують кількість органічного вуглецю, сполук Fe , вилугованість, фізичні та хімічні властивості ґрунтів у разі лісовідновлення з *Pinus sp.* (Zinn et al., 2014), морфологічні, мінералогічні та мікроморфологічні властивості ґрунтів прибережних північно-східних рівнин Бразилії (Silva et al., 2012), дощових черв'як як показник якості ґрунту в бразильських системах обробки ґрунту (Bartz et al., 2013). Проблеми рекультивації ґрунтів Південно-Східної Аляски після зсувів досліджували вчені США (Adams and Sidle, 1987). Іранські науковці досліджують фізико-хімічні, мінералогічні та мікроморфологічні зміни ґрунту, пов'язані з процесами опустелювання (Taghizadeh-Mehrjardi et al., 2012), процеси ґрунтоутворення в лесових ґрунтах Північно-Східного Ірану. Французькі дослідники вивчають кількісний агрегатний склад зразків ґрунту у непорушеному стані на ранніх стадіях ґрунтоутворення шляхом сканування ґрунтових шліфів (Jangorzo et al., 2013), вторинне накопичення $CaCO_3$ у ґрунтах Європейського лесового поясу (Becze-Deák et al., 1997), кальцій-магнієве вапнування та закислення лісових ґрунтів: вплив на гумус, морфологію та функціонування (Rizvi et al., 2012). Бельгійські вчені застосовують метод мікроморфології ґрунтів під час палеогеологічних досліджень (Devos et al., 2013). Австралійці визначають роль методу мікроморфології ґрунтів як ключового в дослідженнях генезису глинистих мінералів (Churchman, 2013). Ще багато цікавих досліджень учених всього світу варті уваги: питання агрегації ґрунтів і стабілізації органічного вуглецю після ерозії (Wang, 2014), стабілізація N в органічно-мінеральних фракціях ґрунту після довгих літніх посух (Bimüller et al., 2014), контроль за мінеральним складом кругообігу та розвитку органічних речовин (Pronk et al., 2013), органічний склад ґрунтових горизонтів під широколистяними лісами (Vancampenhout et al., 2012), зв'язок мікроорганізмів із водостійкістю ґрунтових агрегатів у розкладених рослинних залишках (Le Guillou et al., 2012).

Крім зазначених досліджень, велась робота із класифікації ґрунтів. Румунські вчені, для забезпечення сучасної термінології ґрунтів, досліджують аспекти кореляції румунської системи таксономії ґрунтів (Secu et al., 2008). Ведуться роботи зі словацької системи класифікації та кореляції ґрунтів (Sobocka, 2008), кореляції австрійської класифікації ґрунтів (Nestroy, 2008).

Дніпропетровська школа ґрунтознавців багато років вивчає комплекс властивостей, характер ґрунтоутворення та генезис ґрунтів південного сходу України (Belgard, 1977; Bilova and Travleev, 1999).

Розорані під сільське господарство землі в Україні становлять 81%. Великий рівень розораності спричинює ерозію ґрунтів, щорічні втрати чорноземів. Лісові насадження мають багатифункціональні властивості. Вони припиняють негативний вплив сухих вітрів, перетворюють поверхневий стік води на глибинний, поліпшують родючість ґрунтів (Bilova, 1997). Відіграючи роль найпотужнішого фактора боротьби з ерозією ґрунту, захисні штучні лісові насадження мають велике значення для екологічної та аграрної стабільності України. Наші висновки збігаються з висновками іспанських і французьких учених, які вважають найбільш вдалим вирішенням хімічних, токсикологічних і екологічних проблем, пов'язаних із забрудненням ґрунтів шляхом, саме фітостабілізацію (Epelde et al., 2014; Nsanganwimana 2014).

Завдяки різноманіттю геоморфології в межах степової зони України маємо ряд місцезнаходжень (балки), де розташовані природні байрачні ліси, які перебувають тут в умовах своєї екологічної відповідності (Belgard, 1971). Ліси у степу формуються в долинах річок, на пристінах, у балках і ярах вододілів. Важливий внесок у науку зробив О.Л. Бельгард, створивши типологію природних і штучних лісів. Значне місце вчений надає байрачним лісам, оскільки вони – давні екосистеми, які мають суттєве значення для збереження біологічного різноманіття лісових екосистем степової зони, а також слугують прикладом у створенні штучних лісів та лісосмуг.

Про давність виникнення байрачних лісів у Степу говорять такі факти як відсутність кротовин (на відміну від степових біогеоценозів), наявність старих ходів коріння відмерлих дерев, добре сформований специфічний еловіально-іловіальний ґрунтовий профіль та інші (Bilova, 1997; Bilova and Travleev, 1999).

У залісненій балці зосереджені ґрунти, які характеризуються унікальними екологічними, зокрема мікрокліматичними особливостями ґрунтовірних процесів. Пониження рельєфу створюють умови, які сприяють накопиченню вологи у ґрунті, зменшенню негативного впливу теплового фактора. Результати численних багаторічних досліджень ґрунтів степової зони України свідчать, що:

1) оптимізація мікроструктурної організації чорноземних ґрунтів відображається у збільшенні агрегованості, пористості, пухкості мікроструктури, спостерігається у ряду «чорнозем звичайний – чорнозем звичайний лісополіпшений – байрачні чорноземи» (Bilova, 1997);

2) коефіцієнт структурності (K) характеризується відношенням ґрунтових агрегатів, розміром 0,25–8,00 мм до суми агрегатів дрібніших 0,25 мм та крупніших 8,00 мм, вищий у байрачних ґрунтах, ніж в інших підтипах чорноземів (Bilova, Travleev, 1999);

3) водостійкість, найпродуктивніших для чорноземів ґрунтових агрегатів, розміром 0,25, 0,50 та 1,00 мм, теж вища у байрачних чорноземах, порівняно з чорноземами звичайними (Bilova, 1997).

Матеріал і методи досліджень

Природні байрачні ліси південного варіанта на Дніпропетровщині виникли в умовах правобережного плато Дніпра. За приклад таких біогеоценозів обрано урочище Військове (48° 10' 14" п. ш., 35° 10' 00" с. д.). Для проведення аналізів відібрано 84 зразки ґрунту, із них 13 – зразки у непорушеному стані для виготовлення мікроморфологічних шліфів.

Методологічний підхід досліджень базується на типологічних принципах, розроблених для лісів степової зони О.І. Бельгардом (Belgard, 1971), і методологічних принципах екологічної мікроморфології ґрунтів, запропонованих Н.А. Біловою, А.П. Травлєєвим (Bilova and Travleev, 1997). Польові дослідження, геоботанічний опис, біоекологічна характеристика флори виконані на основі загальноновизнаних методів і підходів. Мікроморфологічна структура ґрунтів вивчена методами, розробленими О.І. Парфьоновою та К.А. Яриловою (Parfyonova and Yarilova, 1977), С.А. Шобою (Shoba, 1981). Прозорі шліфи виготовляли методом О.Ф. Мочалової (Mochalova, 1956), у розшифруванні застосовували «Методическое руководство по микроморфологии почв» за редакцією Г.В. Добровольського (Dobrovolskiy, 1983). Визначення агрегатного складу проводили методом сухого просіювання зразків ґрунту крізь сита. При цьому кожний ґрунтовий профіль поділяли на 10 зон по 10 см і відбирали проби ґрунту згори вниз. Коефіцієнт структурності визначали за І.Б. Ревутом (Revut, 1964): $K = C/B$, де C – кількість структурних окремоостей, розміром 0,25–8 мм, B – сума окремоостей, більших 8 мм, і пилюватих окремоостей, дрібніших 0,25 мм; аналіз на водостійкість структурних агрегатів виконано за М.Є. Бекаревичем та М.В. Кречуном (Bekarevich and Krechun, 1964). Для виявлення залежності між двома фізичними властивостями використано біометричний кореляційний метод.

Результати та їх обговорення

Пробна ділянка закладена у нижній третині схилу 25° північної експозиції на відстані 5 м від тальвегу балки. Умови зволоження – атмосферно-транзитні притічно-відтічні. Тип лісового біогеоценозу – пакленова діброва з яглицею звичайною та купиною багатоквітковою. Склад деревостану: 80% – *Quercus robur* L., 20% – *Acer campestre* L. Зімкненість крон – 0,9. Ґрунт – чорнозем лісовий на лесових суглинках.

Горизонт 0–8 см. Темно-сірий, майже чорний свіжий елювіальний горіхувато-зернистої структури пухкий

корененасичений суглинистий ґрунт, перехід мало помітний. Чорно-буре забарвлення мікроморфологічного шліфа однорідне по всій поверхні. Колір зумовлений високим вмістом органічних сполук. Дуже добре агрегований пухкий горизонт. Агрегати, здебільшого, правильної форми, зазвичай представлені викидами дощових черв'їв (рис. 1 а). У них органічна речовина представлена добре переробленими та розкладеними рослинними залишками. Мікроскладення здебільшого агрегованого та, подекуди, губчастого типу, залежно від мікрозони ґрунтового шліфа. Елементарна мікробудова плазмово-пилюватого типу (рис. 1 з). Скелет представлений мінералами різного розміру (рис. 1 е). У скелеті домінують кварц і польові шпати. Плазма гумусоглиниста, однорідна по всій площині шліфа, анізотропна з крапчастим світінням (рис. 1 б). Рослинні залишки різного ступеня розкладеності (рис. 1 д). Тонкодисперсний гумус представлений великою кількістю рівномірно розташованих згустків гумонів. Форма гумусу – муль. Площа видимої поверхні пор значна (40–55% залежно від мікрозони шліфа). Пори округлої та подовженої правильної форми. У порах зустрічаються викиди дрібних безхребетних (рис. 1 а).

Горизонт 8–48 см. Темно-сірий, майже чорний свіжий горіхувато-дрібнозернистий карбонатний пухкий суглинок. Скипання карбонатів від HCl – на глибині 23 см. Перехід поступовий.

У скелеті домінують кварц і польові шпати, мінерали різного розміру (рис. 1 е). Мікроскладення здебільшого губчастого типу (рис. 2 в). Елементарна мікробудова плазмово-пилюватого типу (рис. 2 з). Плазма гумусоглиниста, однорідна по всій площині шліфа, анізотропна з крапчастим світінням (рис. 2 б). Рослинні залишки різного ступеня розкладеності: від свіжих до слабко розкладених. Площа видимої поверхні пор помітно менша.

Горизонт 48–76 см. Темно-сірий, майже чорний свіжий горіхувато-дрібнозернистий пухкий карбонатний суглинок. Мікроскладення здебільшого губчастого типу. Елементарна мікробудова плазмово-пилюватого типу.

Скелет представлений мінералами різного розміру. У скелеті домінують кварц і польові шпати. Плазма карбонатно-гумусоглиниста, однорідна по всій площині шліфа, анізотропна з крапчастим світінням. Рослинні залишки різного ступеня розкладеності. Тонкодисперсний гумус представлений великою кількістю рівномірно розташованих згустків гумонів. Форма гумусу – муль. Площа видимої поверхні пор значно менша. Пори подовженої форми та пори-тріщини.

Ph 76–110 см. Темно-сірий, колір поступово світлішає, гумусований свіжий дрібнозернистий суглинистий карбонатний щільнішої структури. Перехід поступовий.

Коефіцієнт структурності (K) зменшується зі збільшенням глибини горизонту (табл. 1). Максимальне його значення – у горизонті 10–20 см (12,2), мінімальне – у горизонті 50–60 см (0,19). Сума агрегатів розміром 0,5–2,0 мм зменшується зі збільшенням глибини горизонту. Найбільше значення даного показника – у горизонті 10–20 см (82,9%), найменше – у горизонті 50–60 см (12,5%).

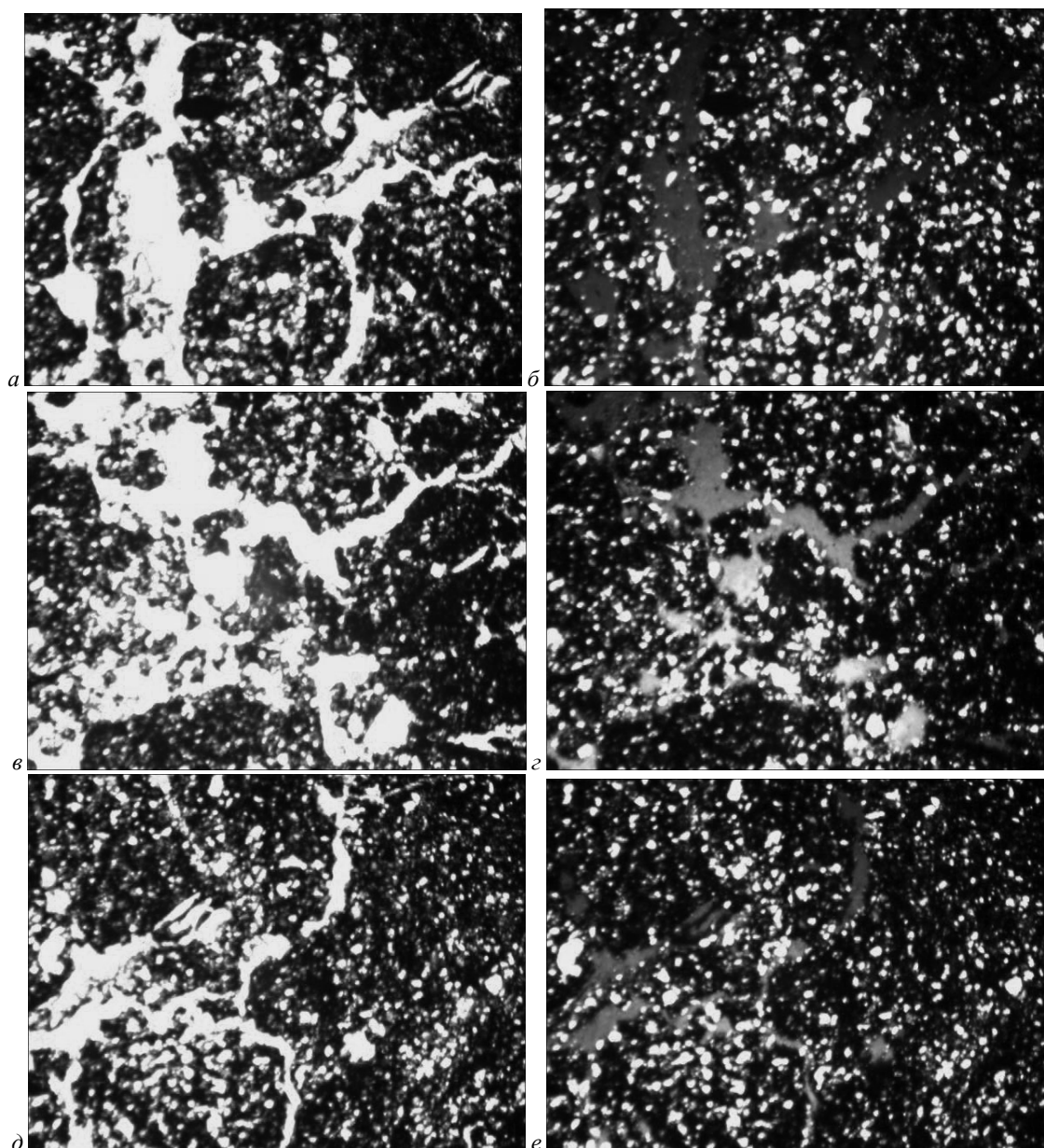


Рис. 1. Мікроморфологічна будова ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області (0–8 см, х60):
a – ніколі паралельні, капроліт у поровому просторі, рослинні залишки; *б* – ніколі схрещені, гумусо-глиниста анізотропна плазма; *в* – ніколі паралельні, мікроскладення пухкого типу; *г* – ніколі схрещені, елементарна плазово-пилювата мікробудова; *д* – ніколі паралельні, пори, скелет, рослинні залишки; *е* – ніколі схрещені, пори, скелет

Таблиця 1

Агрегатний склад (%) ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області

Горизонт, см	Розмір агрегатних фракцій, мм							<i>J</i> , %	<i>C</i> , %	<i>B</i> , %	<i>K</i>
	16–8	8–4	4–2	2–1	1–0,5	0,5–0,25	<0,25				
0–10	5,04	4,46	30,09	11,14	4,28	4,27	40,72	45,5	54,3	45,8	1,19
10–20	5,30	4,63	23,89	45,68	13,33	4,88	2,29	82,9	92,42	7,58	12,25
20–30	8,63	8,51	25,96	42,62	8,26	3,43	2,59	76,8	88,8	11,2	7,91
30–40	21,95	7,56	23,66	34,11	7,55	2,92	2,28	65,3	75,8	24,2	3,13
40–50	21,81	8,80	19,59	30,40	8,13	3,31	7,97	58,1	70,2	29,8	2,36
50–60	83,28	2,50	4,68	5,96	1,86	1,10	0,68	12,5	16,0	84,0	0,19
60–70	57,47	5,85	13,73	16,02	4,00	1,42	1,52	33,8	41,0	59,0	0,70
70–80	36,38	8,54	19,23	24,55	6,17	2,82	2,32	50,0	61,3	38,7	1,58
80–90	63,80	5,60	9,84	12,92	4,17	1,70	1,99	26,9	34,2	65,8	0,52
90–100	42,96	8,76	16,64	2,12	5,92	2,44	21,17	24,7	35,9	64,1	0,56

Примітки: *J* – сума ґрунтових агрегатів розміром 0,5–2,0 мм, *C* – сума ґрунтових агрегатів розміром 0,25–8,0 мм, *B* – сума ґрунтових агрегатів, дрібніших 0,25 мм та більших 8,0 мм, *K* – коефіцієнт структурності, що виражається відношенням *C/B*; дослідження проводили у 3-разовій повторності.

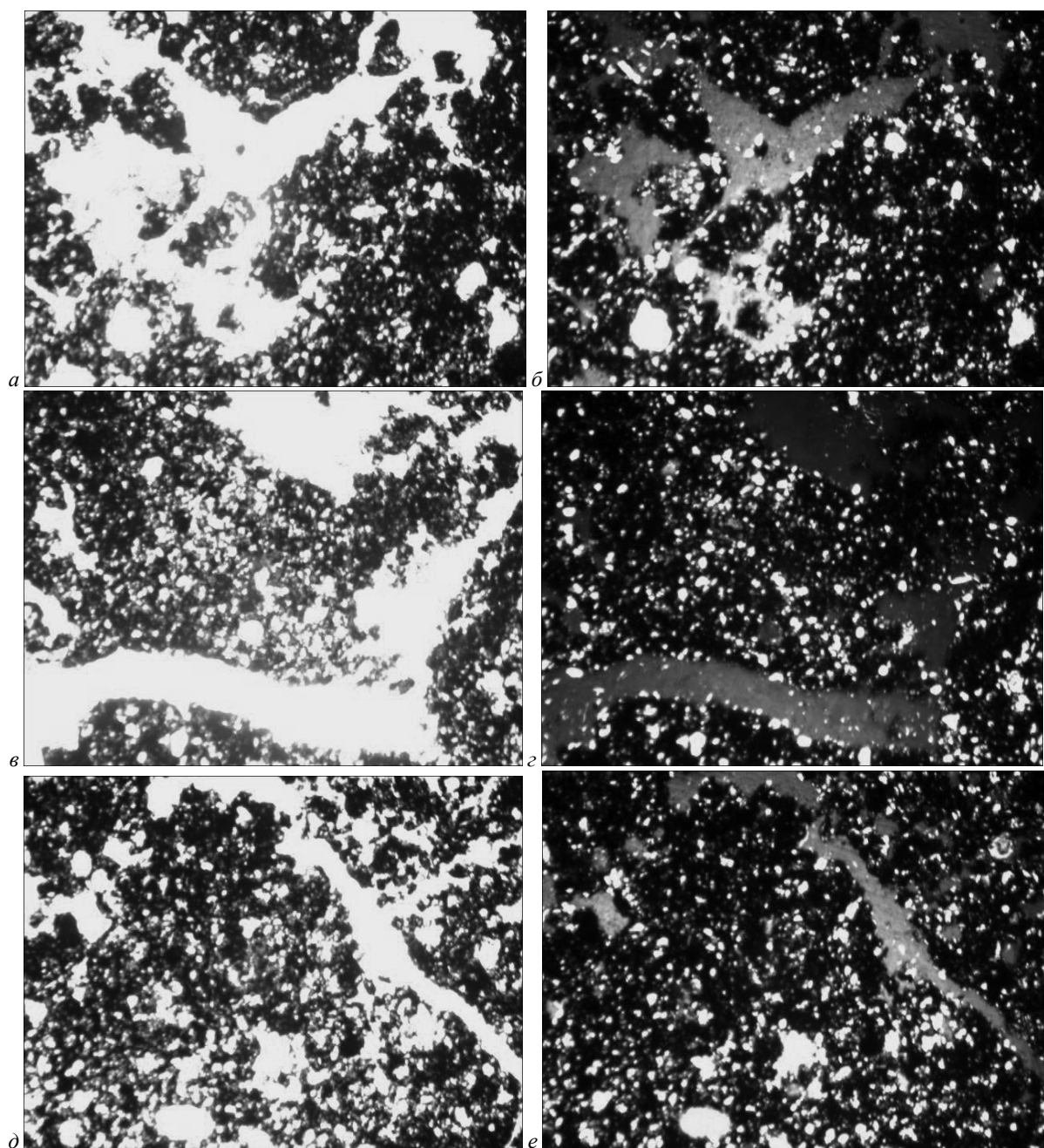


Рис. 2. Мікроморфологічна будова ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області (8–48 см, х60):
а – ніколі паралельні, мікроскладення губчатого типу, рослинні залишки; *б* – ніколі схрещені, гумусо-глиниста анізотропна плазма; *в* – ніколі паралельні, мікроскладення губчатого типу; *г* – ніколі схрещені, елементарна плазмово-пиловата мікробудова; *д* – ніколі паралельні, пори, скелет, рослинні залишки; *е* – ніколі схрещені, пори, скелет

Показник водостійкості ґрунтових агрегатів зменшується зі збільшенням глибини горизонту. Максимального значення (88,0%) набуває у горизонті 0–10 см (фракція 0,25–0,50 мм), мінімального (20,9%) – у горизонті 90–100 см (фракція 0,50–1,00 мм). У фракціях 0,25–0,50 мм значення показника найбільші. Агрегованість ґрунтів підвищується від чорноземів звичайних до чорноземів байрачних лісів. Коефіцієнт структурності у байраках досягає 12,3% порівняно з 2,4% у чорноземах звичайних степових. Сума агрегатів 0,5–2,0 мм становить 82,0 та 17,0% відповідно. Водостійкість ґрунтових агрегатів байрачних чорноземів становить 88,0%, на відміну від чорноземів звичайних степових (70,0%). Результати наших досліджень подібні до результатів досліджень

зарубіжних авторів. Іранські вчені (Taghizadeh-Mehrjardi et al., 2012), досліджуючи фізико-хімічні, мінералогічні та мікроморфологічні властивості ґрунтів пустельних, напівпустельних і непустельних місцевостей, отримали такі результати. Комплекс показників ґрунтів підвищується від пустельних до непустельних місцевостей, при цьому мінералогічний склад усіх зразків ґрунту приблизно однаковий, а за механічним складом непустельних ґрунтів переважають піщані фракції (це зумовлює кращий дренаж), у пустельних ґрунтах – мулисті фракції. Результати мікроморфологічного аналізу вказують на те, що ґрунти непустельних місцевостей мають зернисту мікроструктуру, імовірно, через високий вміст органічних сполук.

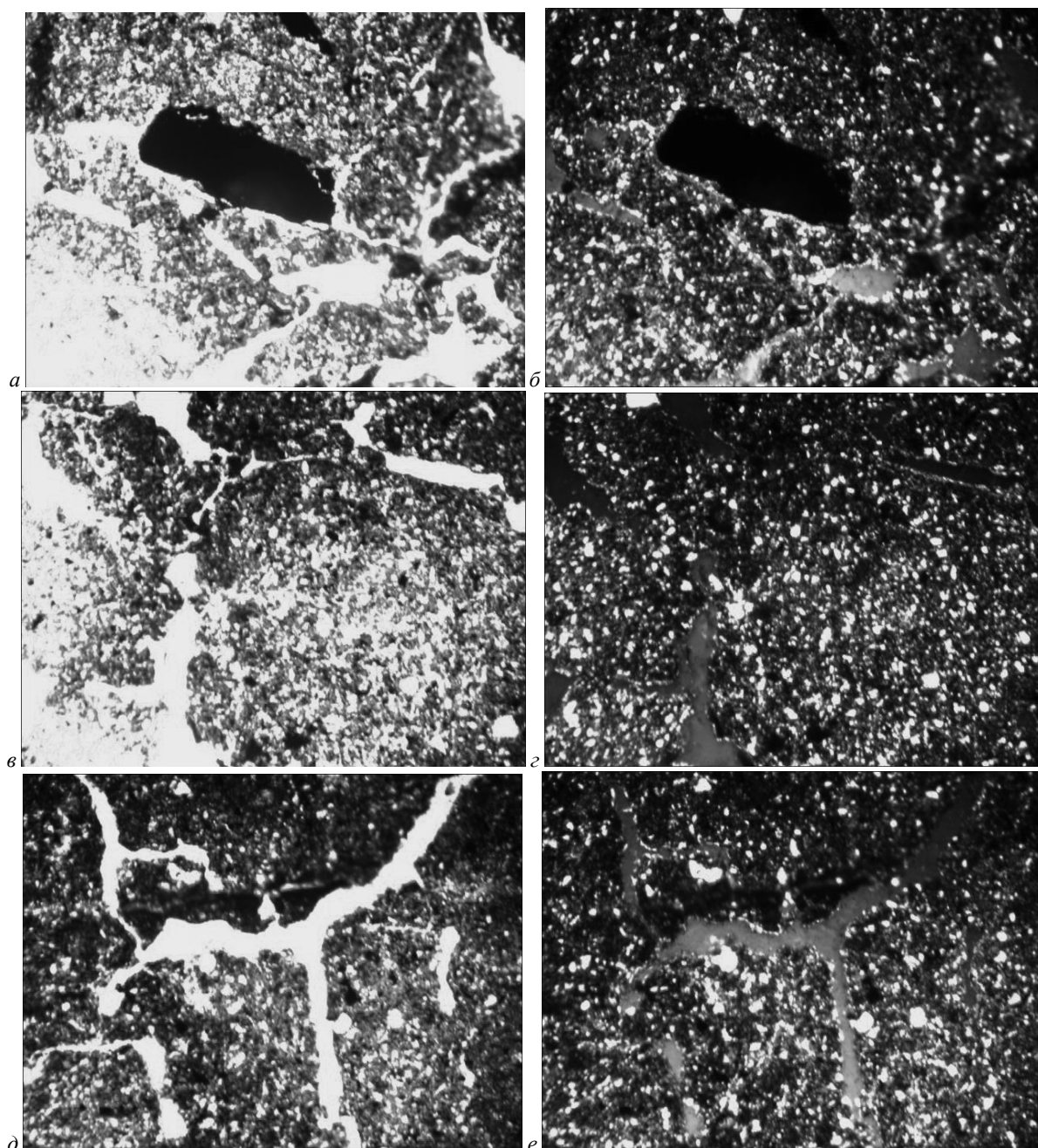


Рис. 3. Мікроморфологічна будова ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області (48–76 см, х60):
а – ніколи паралельні, вуглеподібні частини, пори різної форми; *б* – ніколи схрещені, вуглеподібні частини, анізотропний скелет; *в* – ніколи паралельні, мікроскладення губчастого типу; *г* – ніколи схрещені, елементарна плазмово-пилувата мікробудова; *д* – ніколи паралельні, пори неправильної подовженої форми; *е* – ніколи схрещені, пори, скелет

Таблиця 2

Водостійкість структурних агрегатів ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області

Горизонт, см	Фракція, мм	Агрегатний склад (%) за результатами промивання			Сума всіх агрегатів, %
		1,00	0,50	0,25	
1	2	3	4	5	6
0–10	1,00–2,00	45,01	3,61	2,90	51,52
	0,50–1,00	14,01	29,30	1,03	44,34
	0,25–0,50	28,60	52,92	26,98	88,01
10–20	1,00–2,00	4,22	12,04	12,04	28,30
	0,50–1,00	2,04	45,41	19,92	67,37
	0,25–0,50	23,93	14,31	56,23	84,20
20–30	1,00–2,00	23,93	32,12	1,25	57,30
	0,50–1,00	0,75	6,80	41,58	49,13
	0,25–0,50	44,91	20,92	2,99	68,82

1	2	3	4	5	6
30–40	1,00–2,00	8,88	29,46	16,19	54,53
	0,50–1,00	3,68	23,26	30,06	57,00
	0,25–0,50	11,50	17,05	27,82	56,37
40–50	1,00–2,00	24,84	8,55	2,13	35,52
	0,50–1,00	23,37	9,22	9,22	41,81
	0,25–0,50	3,19	17,57	33,50	54,26
50–60	1,00–2,00	2,80	18,30	24,60	45,70
	0,50–1,00	11,20	24,48	18,90	54,58
	0,25–0,50	33,80	4,78	8,02	46,60
60–70	1,00–2,00	5,40	29,70	5,40	40,50
	0,50–1,00	19,50	2,88	31,70	54,08
	0,25–0,50	1,73	42,30	1,53	45,56
70–80	1,00–2,00	11,40	11,81	8,55	31,76
	0,50–1,00	18,63	5,67	12,15	36,45
	0,25–0,50	26,59	17,93	5,67	50,19
80–90	1,00–2,00	26,00	20,67	3,15	49,82
	0,50–1,00	17,26	21,20	6,67	45,13
	0,25–0,50	0,28	8,41	22,08	30,77
90–100	1,00–2,00	29,29	2,46	1,87	33,62
	0,50–1,00	15,20	5,06	0,60	20,86
	0,25–0,50	1,54	13,69	15,41	30,64

Примітка: для аналізу брали агрегати 0,25–1,00 мм як найпродуктивніші для чорноземних ґрунтів.

Висновки

Еколого-мікроморфологічні дослідження виявили високий ступінь агрегованості верхніх горизонтів ґрунтового профілю. Характер структуроутворення має зоогенне походження. Агрегати здебільшого копролітового характеру містять добре перероблені рослинні залишки. Темно-бурий, майже чорний колір по всій площі мікроморфологічного шліфа зумовлений великою кількістю органічних сполук, що вказує на активні процеси гуміфікації. Тонкодисперсний гумус представлений великою кількістю рівномірно розташованих згустків гумонів. Форма гумусу – муль. Площа видимої поверхні пор у верхніх горизонтах ґрунтового профілю значна (40–65%). Пори округлої та видовженої форми. Зазвичай у порах зустрічаються викиди дрібних безхребетних. Із глибиною ґрунтового розрізу площа видимих пор зменшується разом з агрегованістю. Кореляючи з мікроморфологічними характеристиками, водостійкість структурних агрегатів досягає максимуму у верхніх горизонтах ґрунтового розрізу, знижуючись із глибиною. Узагалі байрачні ґрунти характеризуються активним біогенним мікροструктуроутворенням, результатом якого є значна агрегованість і пухкість мікροструктури.

Бібліографічні посилання

- Adams, P.W., Sidle, R.C., 1987. Soil conditions in three recent landslides in Southeast Alaska. *Forest Ecol. Manag.* 18, 93–102.
- Badorreck, A., Gerke, H.H., Hüttl, R.F., 2013. Morphology of physical soil crusts and infiltration patterns in an artificial catchment. *Soil Tillage Res.* 129, 1–8.
- Bartz, M.L.C., Pasini, A., Gardner Brown, G., 2013. Earthworms as soil quality indicators in Brazilian no-tillage systems. *Appl. Soil Ecol.* 69, 39–48.
- Becze-Deák, J., Langohr, R., Verrecchia, E.P., 1997. Small scale secondary CaCO_3 accumulations in selected sections of the

- European loess belt. Morphological forms and potential for paleoenvironmental reconstruction. *Geoderma* 76(3–4), 221–252.
- Bekarevich, N.E., Krechun, Z.A., 1964. Vodoprochnost' pochvennoy strukturi i opredelenie eyo metodom agregatnogo analiza. Metodika issledovaniy v oblasti fiziki pochv [The water-soil structure and its determination by analysis of aggregate. Methods of research in the field of soil physics] 132–164 (in Russian).
- Belgard, A.L., 1971. Stepnoe lesovedenie [Steppe Forestry]. Lesnaya promishlennost', Moscow (in Russian).
- Bilova, N.A., 1997. Ekologiya, mikromorfologiya, antropogenez lesnih pochv stepnoy zoni Ukraini [Ecology, micromorphology, anthropogenez of forest soils of the steppe zone of Ukraine]. Dnepropetrovsk University Press, Dnepropetrovsk (in Russian).
- Bilova, N.A., Travleev, A.P., 1999. Estestvennye lesa i stepnie pochvi [Natural forest and grassland soils]. Dnepropetrovsk University Press, Dnepropetrovsk (in Russian).
- Bimüller, C., Dannenmann, M., Tejedor, J., Margit von Lütow, Buegger, F., Meier, R., Haug, S., Schroll, R., Kögel-Knabner, I., 2014. Prolonged summer droughts retard soil N processing and stabilization in organomineral fractions. *Soil Biol. Biochem.* 68, 241–251.
- Bogner, C., Bauer, F., Trancón y Widemann, B., Viñan, P., Balcazar, L., Huwe, B., 2014. Quantifying the morphology of flow patterns in landslide-affected and unaffected soils. *J. Hydrol.* 511, 460–473.
- Churchman, G.J., 2013. The key role of micromorphology in studies of the genesis of clay minerals and their associations in soils and its relevance to advances in the philosophy of soil science. *Turk. J. Earth Sci.* 22, 376–390.
- Devos, Y., Wouters, B., Vrydaghs, L., Tys, D., Bellens, T., Schryvers, A., 2013. A soil micromorphological study on the origins of the early medieval trading centre of Antwerp (Belgium). *Quat. Int.* 315, 167–183.
- Dobrovol'skiy, G.V., 1983. Metodicheskoe rukovodstvo po mikromorfologii pochv [Methodological guidance on soil micromorphology]. Moscow (in Russian).
- Dorji, T., Odeh, I.O.A., Field, D.J., Baillie, I.C., 2014. Digital soil mapping of soil organic carbon stocks under different

- land use and land cover types in montane ecosystems, Eastern Himalayas. *Forest Ecol. Manag.* 318, 91–102.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Alkorta, I., Garbisu, C., 2014. Adaptive long-term monitoring of soil health in metal phytostabilization: Ecological attributes and ecosystem services based on soil microbial parameters. *Int. J. Phytoremediation* 16, 971–981.
- Feng, Q., Endo, K.N., Guodong, C., 2002. Soil carbon in desertified land in relation to site characteristics. *Geoderma* 106, 21–43.
- Gong, P., Wang, X.-P., Xue, Y.-G., Xu, B.-Q., Yao, T.-D., 2014. Mercury distribution in the foliage and soil profiles of the Tibetan forest: Processes and implications for regional cycling. *Environ. Pollut.* 188, 94–101.
- He, Z.L., Yang, X.E., Baligar, V.C., Calvert, D.V., 2003. Microbiological and biochemical indexing systems for assessing quality of acid soils. *Adv. Agron.* 78, 89–138.
- Huang, D., Wang, K., Wu, W.L., 2007. Dynamics of soil physical and chemical properties and vegetation succession characteristics during grassland desertification under sheep grazing in an agro-pastoral transition zone in Northern China. *J. Arid Environ.* 70, 120–136.
- Jangorzo, N.S., Schwartz, C., Watteau, F., 2013. Image analysis of soil thin sections for a non-destructive quantification of aggregation in the early stages of pedogenesis. *Eur. J. Soil Sci.* doi: 10.1111/ejss.12110.
- Khormali, F., Ghergherechi, S., Kehl, M., Ayoubi, S., 2012. Soil formation in loess-derived soils along a subhumid to humid climate gradient, Northeastern Iran. *Geoderma* 179–180, 113–122.
- Le Guillou, C., Angers, D.A., Maron, P.A., Leterme, P., Menaséri-Aubry, S., 2012. Linking microbial community to soil water-stable aggregation during crop residue decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 50, 126–133.
- Mochalova, E.F., 1956. Ispol'zovanie shlifov is pochv [Making thin sections of undisturbed soil with structure]. *Pochvovedenie* 10, 6–38 (in Russian).
- Nestroy, O., 2008. Correlations of the Austrian Soil Classification 2000 with the WRB 2006. *Soil Sci.* 9(13), 174–176.
- Nsanganwimana, F., Marchand, L., Douay, F., Mench, M., 2014. *Arundo donax* L., a Candidate for phytomanaging water and soils contaminated by trace elements and producing plant-based feedstock. A review. *Int. J. Phytoremediation* 16, 982–1017.
- Parfyonova, E.I., Yarilova, Y.A., 1977. Rukovodstvo k mikromorfologicheskim issledovaniyam v pochvovedenii [Guide to micromorphological studies in soil science]. Neuka, Moscow (in Russian).
- Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., 2013. Is turnover and development of organic matter controlled by mineral composition? *Soil Biol. Biochem.* 67, 235–244.
- Ramezanpour, H., Pourmasoumi, M., 2012. Micromorphological aspects of two forest soils development derived from igneous rocks in Lahijan, Iran. *J. Mt. Sci.* 9, 646–655.
- Revut, I.B., 1965. Pochva o sebe (Sovremenniy vzglyad na mehanicheskiy sostav i strukturu pochvi) [Soil about yourself (modern view on the mechanical composition and structure of the soil)]. Znanije, Moscow (in Russian).
- Rizvi, S.H., Gauquelin, T., Gers, C., Guérol, F., Pagnout, C., Baldy, V., 2012. Calcium-magnesium liming of acidified forested catchments: Effects on humus morphology and functioning. *Appl. Soil Ecol.* 62, 81–87.
- Secu, C.V., Patriche, C., Vasiliniuc, I., 2008. Aspects regarding the correlation of the Romanian Soil Taxonomy System (2003) with WRB (2006). *Soil Sci.* 9(13), 56–62.
- Shi, W.-Y., Yan, M.-J., Zhang, J.-G., Guan, J.-H., Du, S., 2014. Soil CO₂ emissions from five different types of land use on the semiarid Loess Plateau of China, with emphasis on the contribution of winter soil respiration. *Atmos. Environ.* 88, 74–82.
- Shoba, S.A., 1981. Mikrofotoimetriya shlifov pochv [Microphotometers of thin soil]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta* 3, 11–18.
- Silva, E.A., Gomes, J.B.V., Filho, J.C.A., Vidal-Torrado, P., Cooper, M., Curi, N., 2012. Morphology, mineralogy and micromorphology of soils associated to summit depressions of the Northeastern Brazilian coastal plains. *Cienc. Agrotecnol.* 36, 507–517.
- Sobocka, J., 2008. Position of technosols in the Slovak Soil Classification system and their correlation. *Soil Sci.* 9(13), 177–182.
- Taghizadeh-Mehrjardi, R., Akbarzadeh, A., 2014. Soil physico-chemical, mineralogical, and micromorphological changes due to desertification processes in Yazd region, Iran. *Arch. Agron. Soil Sci.* 60, 487–506.
- Vancampenhout, K., De Vos, B., Wouters, K., Swennen, R., Buurman, P., Deckers, J., 2012. Organic matter of subsoil horizons under broadleaved forest: Highly processed or labile and plant-derived? *Soil Biol. Biochem.* 50, 40–46.
- Wang, X., Erik, L.H., Cammeraat, C.C., Kalbitz, K., 2014. Soil aggregation and the stabilization of organic carbon as affected by erosion and deposition. *Soil Biol. Biochem.* 72, 55–65.
- Zhao, T., Yan, H., Jiang, Y.L., Huang, Y.M., An, S.S., 2013. Effects of vegetation types on soil microbial biomass C, N, P on the Loess Hilly Area. *Acta Ecol. Sin.* 33, 5615–5622.
- Zhenghu, D., Honglang, X., Xinrong, L., Zhibao, D., Gang, W., 2004. Evolution of soil properties on stabilized sands in the Tengger Desert, China. *Geomorphology* 59, 237–246.
- Zinn, Y.L., Guerra, A.R., Silva, C.A., Faria, J.A., Silva, T.A.C., 2014. Soil organic carbon and morphology as affected by pine plantation establishment in Minas Gerais, Brazil. *Forest Ecol. Manag.* 318, 261–269.
- Zúñiga, M.C., Feijoo, A.M., Quintero, H., Aldana, N.J., Carvajal, A.F., 2013. Farmers' perceptions of earthworms and their role in soil. *Appl. Soil Ecol.* 69, 61–68.

Надійшла до редколегії 12.04.2014



УДК 577.3+57.033

Роль ферментов катаболизма АМР в энергетическом статусе эритроцитов в условиях их истощения по глюкозе

О.И. Доценко, Я.А. Трошинская

Донецкий национальный университет, Донецк, Украина

Изучено изменение активностей ферментов катаболизма АМР эритроцитов мембраносвязанной (eN) и цитоплазматической (cN-1A) форм 5'-нуклеотидазы, АМР-дезаминазы в условиях истощения по глюкозе и при действии на клетки вибрации в диапазоне 8–32 Гц (с шагом 4 Гц) амплитудой $0,5 \pm 0,04$ мм. На основании экспериментальных данных проанализированы механизмы регуляции метаболизма аденилатов в эритроцитах человека и принципы взаимодействия метаболизма аденилатов и энергетического метаболизма клетки. Активность мембраносвязанной 5'-нуклеотидазы может отражать перестройки липидного бислоя клетки при действии на нее внешних факторов.

Ключевые слова: эритроциты; вибрация; 5'-нуклеотидаза; АМР-дезаминаза; аденилатный метаболизм

Role of AMP catabolism enzymes in the energetic status of erythrocytes under conditions of glucose depletion

O.I. Dotsenko, Y.A. Troshchynskaya

Donetsk National University, Donetsk, Ukraine

The adenylate metabolism determines the value of energy charge, adenylate pool and ATP concentration, with its level strongly differing in various cell types. The reasons of such differences are still not clear, moreover, role of adenylate metabolism in the regulation of intracellular ATP concentration is not fully known. Hypotheses about mechanisms of adenylate pool stabilization are based on results of mathematical modeling and require the experimental verification. It is known that AMP catabolism enzymes such as AMP-desaminase and 5'-nucleotidase are directly involved in the processes of adenylate charge and pool regulation and their activity depends on the concentration of this metabolite. It is considered that switching from AMP-desaminase pathway of AMP catabolism to 5'-nucleotidase pathway and vice versa may contribute to stabilization of adenylate charge and pool under increased energy load that leads to the reduction of ATP content. The objective of this study consisted in the experimental investigation of mechanisms of adenylate metabolism regulation in human erythrocytes as well as principles of adenylate and energy metabolism interaction in erythrocytes with varied energy charge. Changes in activities of catabolism enzymes such as AMP-membrane-bound (eN) and cytosolic (cN-1A) 5'-nucleotidase, AMP-desaminase (AMPDA) of erythrocytes under conditions of glucose depletion and under vibration effect on cells in the range of frequencies of 8–32 Hz, step of 4 Hz, and the amplitude of $0,5 \pm 0,04$ mm have been studied. Antiphase change of cN-1A and AMPDA activities in erythrocytes incubated in the medium without glucose was shown. Processes of switching of two ways of AMP catabolism create the conditions for the stabilization of energy charge and the ATP concentration stabilization though at a level below the initial one. In the erythrocytes in the medium without glucose and under vibration the antiphase change of enzyme activity was observed only under vibration at frequencies of 8 and 12 Hz. Under action of vibration in the range of frequencies 16–28 Hz, AMP catabolism mainly occurred in AMPDA pathway, cN-II, which was evidenced by sigmoid character of increase in AMPDA activity more than 2 times. Under vibration at frequency of 16 Hz cN-1A activity insignificantly changed. In frequency range of 20–28 Hz cN-1A activity was growing monotonically during 3 hours of action. Growth of cN-1A activity (50.0 ± 4.5 , 34.3 ± 12.8 , $39.1 \pm 1.8\%$ under the action at frequencies of 20, 24 and 32 Hz respectively, more than 2 times under action at 28 Hz) proves that cN-1A, ADODA pathway is also involved in the processes of AMP catabolism. The AMPDA activity also increased under vibration at frequency of 32 Hz, but the sigmoid character of the increase in activity was not observed. Thus, the processes of AMP catabolism intensify in erythrocytes under vibration. These processes are realized by two degradation ways. In this case, other mechanisms which are discussed in this study

are likely to be involved in the stabilization of AMP level. It was shown that membrane-bound 5'-nucleotidase activity could reflect the cell lipid bilayer reorganization under the influence of external factors.

Keywords: erythrocytes; vibration; 5'-nucleotidase; AMP-desaminase; adenylate metabolism

Введение

В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании регуляции клеточного метаболизма. В то же время, механизмы взаимодействия многих важных метаболических систем в клетке остаются не ясными. Это относится даже к такому важному внутриклеточному параметру как концентрация аденозин 5'-трифосфата (АТФ). Концентрация АТФ устанавливается в результате взаимодействия энергетического метаболизма и метаболизма аденилатов. Энергетический метаболизм обеспечивает взаимопревращение между АТФ, аденозин 5'-дифосфатом (АДФ) и аденозин 5'-монофосфатом (АМФ), определяя энергетический заряд клетки ($ATP + 0,5ADP / (ATP + ADP + AMP)$) и размер аденилатного пула ($ATP + ADP + AMP$) (Ataullakhanov and Vitvitsky, 2002; Dudzinska et al., 2006; Khlyntseva et al., 2009). Энергетический заряд клетки жестко контролируется метаболическими процессами (Chapman and Atkinson, 1973; Dudzinska et al., 2010; Walther et al., 2010; Plaideau et al., 2012; Dudzinska, 2014), уровень же АТФ может существенно варьировать даже в клетках одного типа (Ataullakhanov and Vitvitsky, 2002).

Согласно гипотезе Аткинсона (Atkinson, 1968; Chapman and Atkinson, 1973), клетка стабилизирует свой энергетический заряд, используя следующий механизм. С ростом концентрации АМФ энергетический заряд клетки снижается. Усиление процессов деградации АМФ приводит к стабилизации энергетического заряда, уменьшая при этом размер аденилатного пула. Деградация (катаболизм) АМФ происходит в двух реакциях. Одна из них – АМФ-дезаминазная реакция, в которой аминогруппа безвозвратно отщепляется от АМФ, приводя к образованию инозин 5'-монофосфата и аммиака. Во второй, катализируемой 5'-нуклеотидазой (5'-НТ), гидролитическое отщепление фосфатной группы приводит к образованию аденозина. Стабилизирующийся эффект очевиден, но цена за эту дополнительную стабилизацию – сокращение размера пула аденилатов и абсолютной концентрации АТФ.

Экспериментальные данные свидетельствуют также о том, что сокращение энергетического заряда не обязательно подразумевает сопутствующее сокращение размера пула аденилатов. Его расширение может также наблюдаться (Ataullakhanov and Vitvitsky, 2002; Cheng, 2012; Dotsenko et al., 2013; Dudzinska, 2014). В этом случае неясно, как отрегулирован аденилатный метаболизм и связано ли увеличение содержания АТФ с работой только аденилатного цикла. Атауллахановым (Ataullakhanov and Vitvitsky, 2002) высказана гипотеза о том, что уменьшение энергетического заряда, вследствие увеличенного энергопотребления, регулирует активности ферментов так, что потоки из синтеза АМФ переключаются на потоки его деградации. Высокие концентрации АМФ активируют АМФ-дезаминазу, обладающую очень высокой активностью. Запускаемые процессы дезаминирования АМФ позволяют быстро стабилизи-

ровать энергетический заряд, однако аденилатный пул будет снижен. При низких концентрациях АМФ активна 5'-НТ, однако ее активность на два порядка ниже АМФ-дезаминазы (Martinov et al., 2000; Plaideau et al., 2012). Переключение на 5'-НТ путь деградации АМФ и снижение скорости катаболизма позволяет стабилизировать аденилатный пул. Детали этого процесса автор не оговаривает, возможно, это происходит с участием аденилаткиназной и аденозинкиназной реакций.

Необходимо учесть, что эритроциты являются уникальными среди тканей и клеток человека, потому что они не содержат достаточно аденилосукцинат синтетазы для поддержания измеримого анаболического потока от инозинмонофосфата (ИМФ) к аденозинмонофосфату. Непосредственным метаболическим следствием является неспособность синтезировать адениннуклеотиды *de novo* (Sabina et al., 2009). Несмотря на наличие ферментов ресинтеза АМФ непосредственно из аденозина и аденина, циркулирующие уровни обоих соединений, как правило, являются довольно низкими, т. е. <1 мкМ. Следовательно, эритроциты имеют строго ограниченные возможности для поддержания пула адениновых нуклеотидов и связанных с ними энергетических запасов клетки. Это особенно очевидно в условиях энергетического дисбаланса, в результате усиления процессов использования АТФ, что может привести к активации ферментов катаболизма и ускоренной потере адениннуклеотидов.

S. Schuster (Schuster and Kenanov, 2005) предложил еще один механизм стабилизации уровня АТФ. Изучая пути ресинтеза АТФ в эритроцитах путем расчета элементарных способов потока, выяснили, что накопление продуктов деградации АМФ (аденозина, инозинмонофосфата и инозина) способствует возвращению потока в пентозофосфатный путь и частично в путь Эмбдена – Мейергофа, в результате чего эритроцит может дополнительно синтезировать АТФ и D23PG.

Таким образом, механизмы, ответственные за процессы восстановления величины аденилатного пула и вклад в эти процессы метаболизма аденилатов, до конца не ясны. Представляет также интерес исследование механизма катаболизма АМФ в условиях увеличенной энергетической нагрузки, а именно при истощении по глюкозе и дополнительном внешнем воздействии.

Цель работы состояла в экспериментальном исследовании механизмов регуляции метаболизма аденилатов в эритроцитах человека, принципов взаимодействия аденилатного и энергетического метаболизма в эритроцитах с измененным энергетическим зарядом.

Материал и методы исследований

В экспериментах использовали свежую кровь доноров примерно одной возрастной группы и одного пола. Эритроциты осаждали центрифугированием, после чего их 4-кратно отмывали от плазмы Трис-*HCl* (0,05 М, *pH* 7,4), содержащим 0,15 М *NaCl* (буферный раствор 1).

После центрифугирования удаляли надосадочную жидкость и белый опалесцирующий слой лейкоцитов, располагающийся над осадком эритроцитов. Полученная паста эритроцитов использовалась для приготовления суспензии, с содержанием гемоглобина $0,9 \pm 0,06$ мг/мл. В качестве среды инкубирования использовали буферный раствор 1. Суспензию эритроцитов подвергали действию низкочастотной вибрации в интервале частот 8–32 Гц, с шагом 4 Гц амплитудой $0,5 \pm 0,04$ мм в течение 3 часов. Вибрацию совершали при помощи вибростенда, состоящего из генератора низкочастотных сигналов синусоидальной формы, усилителя и вибратора, совершающего колебания в вертикальной плоскости с заданной частотой и амплитудой. Экспериментальную кювету, заполненную суспензией эритроцитов, вертикально закрепляли на подвижной части вибратора (в этом случае механические колебания передаются в экспериментальную кювету с незначительными потерями мощности). Активность мембраносвязанной (eN) и цитоплазматической (cN-IA) форм 5'-НТ исследовали в тених и в гемолизатах эритроцитов соответственно, активность АМР-деаминазы (АМРДА) – в гемолизатах до начала эксперимента и затем каждые 20 мин в процессе вибрационного воздействия. В качестве контроля использовали активности изучаемых ферментов до начала эксперимента. Отдельно изучали влияние среды инкубирования на динамику изменения активностей этих же ферментов.

Активности eN и cN-IA изучали с помощью реакции гидролиза АМР с последующим определением неорганического фосфата (Pi) (Rozhkovskij and Kresjun, 1991). Активности ферментов выражали в мкМ Pi, образующегося в течение 1 мин, отнесенных к количеству белка в пробе (мкМ/мин·г белка). Активность АМРДА определяли кинетическим спектрофотометрическим методом, основанным на регистрации накопления IMP в реакции деаминации. Оптическую плотность измеряли при 285 нм автоматически в течение 10 мин, шаг регистрации – 1 с. Для расчета активности фермента использовали наклон полученной линейной зависимости и разность экстинкций для АМР и IMP, равную 0,3 (Lushchak and

Storey, 1994). Активность АМРДА выражали в мкМ/мин·г белка.

Содержание гемоглобина в эритроцитарной пасте определяли гемиглобинцианидным унифицированным методом по стандартным наборам.

При построении зависимостей, приводимых ниже, использовались усредненные данные. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Statistica. Достоверность различий между среднегрупповыми показателями оценивали с помощью непараметрического рангового критерия Уилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Процессы катаболизма АМР контролируют два цитоплазматических фермента АМРДА и 5'-НТ (cN-IA), изменение активностей которых в эритроцитах, инкубируемых в среде, не содержащей глюкозы в течение 3 часов, показано на рисунке 1. Известно, что эритроциты, помещенные в среду, не содержащую глюкозу, быстро истощаются по АТР, и через некоторое время в клетках устанавливается новый стационарный уровень АТР, намного ниже исходного. Ранее нами было показано (Dotsenko et al., 2013), что инкубирование эритроцитов в среде такого же состава в течение 3 часов приводит к падению уровня АТР на 28–30%, росту концентрации неорганического фосфата (Pi) в 3,0–3,2 раза относительно начального уровня. Эта информация согласуется с данными, полученными другими авторами, изучавшими метаболизм эритроцитов в режиме их истощения по глюкозе, несмотря на то, что состав среды инкубирования мог отличаться. По данным работы (Bontemps et al., 1986), уровень АМР при 4-часовом инкубировании эритроцитов в режиме истощения по глюкозе возрастает в 30 раз, в то время как АДФ – в 2,5 раза. При таких условиях происходит падение энергетического заряда в эритроцитах и появление дисбаланса в соотношении адениннуклеотидов. Рост концентрации АМР, являющегося субстратом для АМРДА и 5'-НТ, может быть причиной для усиления процессов катаболизма.

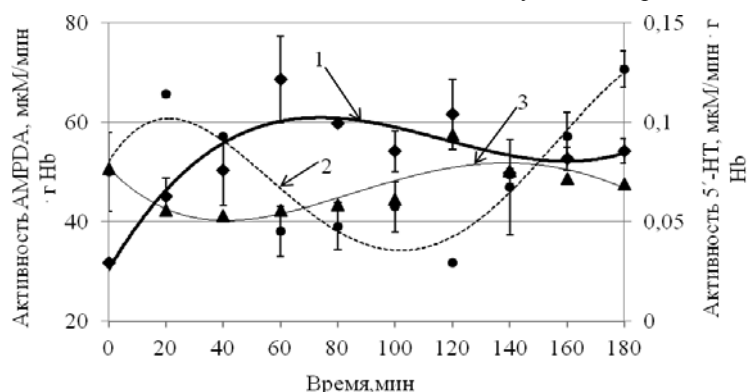


Рис. 1. Изменение активностей мембраносвязанной и цитоплазматической форм 5'-НТ, АМРДА эритроцитов (мкМ/мин·г Нб) при их инкубировании в среде, не содержащей глюкозы:
1 – АМРДА, 2 – cN-IA, 3 – eN; среда инкубирования – Трис-НСl 0,05 М, pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl

Согласно литературным данным (Bontemps et al., 1986), в условиях истощения по глюкозе, 75% потока катаболизма АМР идет по пути 5'-НТ, АДО-деаминаза. В условиях эксперимента увеличение активности 5'-НТ в 1,2–1,5 раза фиксировали только в течение 40 мин ин-

кубирования, после чего активность этого фермента существенно снижалась (рис. 1). В течение второго часа инкубирования активность 5'-НТ устанавливалась на уровне ниже начального на 40–60%. В это время катаболизм АМР переключался на путь АМРДА, IMP-аза

(сN-II), о чем свидетельствует рост активности AMPDA в 1,9–2,2 раза. Полученные нами данные согласуются с результатами экспериментов других авторов, которые также наблюдали фазовый характер изменений активностей ферментов катаболизма АМР, в частности, 5'-НТ (Kudina et al., 2003). Высокие концентрации АМР активируют AMPDA (сигмоидная зависимость реакции от концентрации АМР известна из литературы (Lian and Harkness, 1974; Sasaki et al., 1976; Ogasawara et al., 1986; Mosharov et al., 1998) и инактивируют 5'-НТ. *In vitro* активность цитоплазматической 5'-НТ (сN-IA) из очищенной печени крысы показала колоколообразную зависимость от энергетического заряда (Itoh, 1981; Martinov et al., 2000). Сродство этого фермента к АМР определялось энергетическим состоянием клетки и существенно возрастало в случае снижения аденилатного энергетического заряда до определенного уровня.

В течение третьего часа инкубирования активность AMPDA снижалась, однако оставалась выше контрольного уровня в $1,64 \pm 0,07$ раза (см. рис. 1). На снижение активности этого фермента может существенно влиять неорганический фосфат (Mosharov et al., 1998; Dudzinska et al., 2010), содержание которого к этому моменту увеличивалось более чем в 3 раза (Dotsenko et al., 2013). Кроме того, наблюдалась активация 5'-нуклеотидазы, активность которой через три часа воздействия возросла в 1,6 раза. Процессы переключения двух способов катаболизма АМР создают условия для восстановления энергетического заряда и стабилизации концентрации АТР, хотя и на уровне ниже начального.

Ранее нами был показан разный характер изменения содержания АТР в эритроцитах в зависимости от частоты вибрационного воздействия. Вибрационное воздействие частотного интервала 8–16 Гц приводило к снижению АТР до определенного стационарного уровня. При действии вибрации интервала 20–28 Гц концентрация АТР снижалась в начале эксперимента, однако восстанавливалась до начальной величины к концу воздействия. При вибрационном воздействии с частотой 32 Гц концентрация АТР возрастала в течение эксперимента до уровня, более чем в 2 раза превышающего начальный. Представляло интерес проследить, связан ли прирост содержания АТР с особенностями функционирования цикла адениновых нуклеотидов.

На рисунках 2 и 3 показано изменение активностей AMPDA и цитоплазматической 5'-НТ эритроцитов, подвергавшихся вибрационному воздействию в изучаемом диапазоне частот. Явление перекрестной активности АМР-деаминазы и цитоплазматической 5'-НТ зафиксировано только при действии вибрации в интервале частот 8–12 Гц. При вибрационном воздействии с частотой 8 Гц (рис. 2 а), через 60–80 мин вибрационного воздействия наблюдали снижение активности АМР-деаминазы на 18–24%. Прирост активности 5'-НТ в 1,7 раза наблюдали через 20 мин воздействия. Дальнейшее вибрационное воздействие привело к росту активности АМР-деаминазы и снижению активности 5'-НТ. Через 140 мин воздействия активность АМР-деаминазы была максимальной и в 1,4 раза превышала уровень контроля. Через 160 мин наблюдали снижение активности АМР-деаминазы и увеличение активности 5'-НТ (рис. 2 а), которое составило $36,5 \pm 12,7\%$ относительно начального уровня.

При вибрационном воздействии в интервале частот 12–16 Гц снижение уровня АТР после трехчасового воздействия составило $20,0 \pm 8,9\%$ (12 Гц) и $12,0 \pm 3,7\%$ (16 Гц) относительно начального уровня (Dotsenko et al., 2013). На рисунке 2 б показано изменение активности изучаемых ферментов при воздействии с частотой 16 Гц. В этом случае не обнаружено существенных изменений активности цитоплазматической формы 5'-НТ (колебания активности в процессе воздействия составили 10% от исходного уровня). Катаболизм АМР осуществлялся AMPDA, активность которой возрастала в 2 раза после 20 мин воздействия и в 2,9 раза через 140 мин.

При вибрационном воздействии в интервале частот 20–28 Гц получили похожие изменения активностей AMPDA и 5'-НТ (сN-IA). Во всех случаях наблюдали сигмоидную зависимость активности AMPDA, которая достигала максимальных значений во временном интервале 60–80 мин (увеличение активности в $1,56 \pm 0,20$ раза при воздействии с частотой 20 Гц, $1,40 \pm 0,12$ раза – 24 Гц, $1,85 \pm 0,05$ раза – 28 Гц). К концу эксперимента активность AMPDA снижалась (в наибольшей степени при вибрации с частотой 24 Гц) (рис. 3 а). На этом фоне фиксировали монотонный рост активности цитоплазматической формы 5'-НТ, который к концу эксперимента составил $50,0 \pm 4,5\%$ при воздействии 20 Гц, $34,3 \pm 12,8\%$ – при воздействии 24 Гц, более 100% – при воздействии 28 Гц (рис. 3 а).

При вибрационном воздействии с частотой 32 Гц рост активности AMPDA (40–45%) фиксировали только к концу эксперимента. При этом активация 5'-НТ составила в конце эксперимента $35,0 \pm 2,3\%$ (рис. 3 б).

Незначительный прирост активностей ферментов катаболизма АМР (особенно сN-IA) в эритроцитах, подвергавшихся вибрационному воздействию, свидетельствует о том, что в регулировании концентрации АТР задействованы также и другие механизмы, тесно связанные с работой этих ферментов. Возможность дополнительного синтеза АТР за счет возврата потока из цикла метаболизма пуринов в гликолитический путь нами не рассматривалась из-за отсутствия аденозина в среде инкубирования (Kim, 1990; Komarova et al., 1999; Dudzinska et al., 2010) и незначительной активации сN-IA. Единственным средством восстановления концентрации АТР в эритроцитах, истощенных по глюкозе и подвергающихся дополнительному воздействию, является активация АМР-киназы (АМРК), являющейся высококонсервативным энергетическим сенсором (Föller et al., 2009). АМРК активируется изменением внутриклеточного соотношения АМР/АТР (Plaideau, 2012). АДР и АМР, аденилатный заряд клетки являются важными физиологическими медиаторами активности АМРК (Oakhill et al., 2011, 2012). Таким образом, ингибирование АМР метаболизирующих ферментов может быть средством активации АМРК в клетках. В работе (Plaideau et al., 2012) показано, что именно снижение активности сN-IA важно для активации этого фермента. После активации АМРК фосфорилирует несколько метаболических целей, что приводит к снижению потребления АТР. Падение активности Na-K-зависимой АТРазы в эритроцитах, подвергавшихся вибрации 20–32 Гц в среде без глюкозы, показано ранее. Инактивация Na-K-зависимой АТРазы в эритроцитах при вибрационном воздействии 32 Гц составила более 80% (Dotsenko et al., 2013).

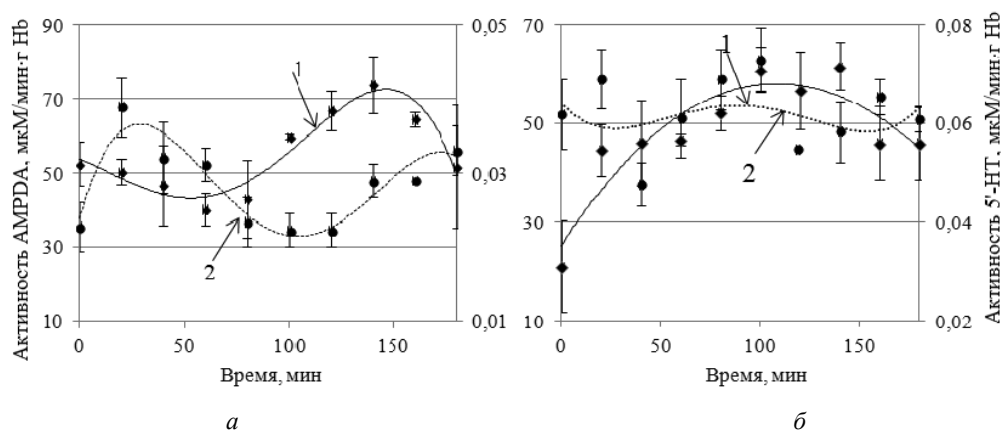


Рис. 2. Изменение активностей ферментов катаболизма АМР (мкМ/мин·г Нб) при действии вибрации на суспензию эритроцитов: а – вибрационное воздействие с частотой 8 Гц, б – с частотой 16 Гц, амплитуда $0,5 \pm 0,04$ мм; 1 – АМРДА, 2 – сN-IA

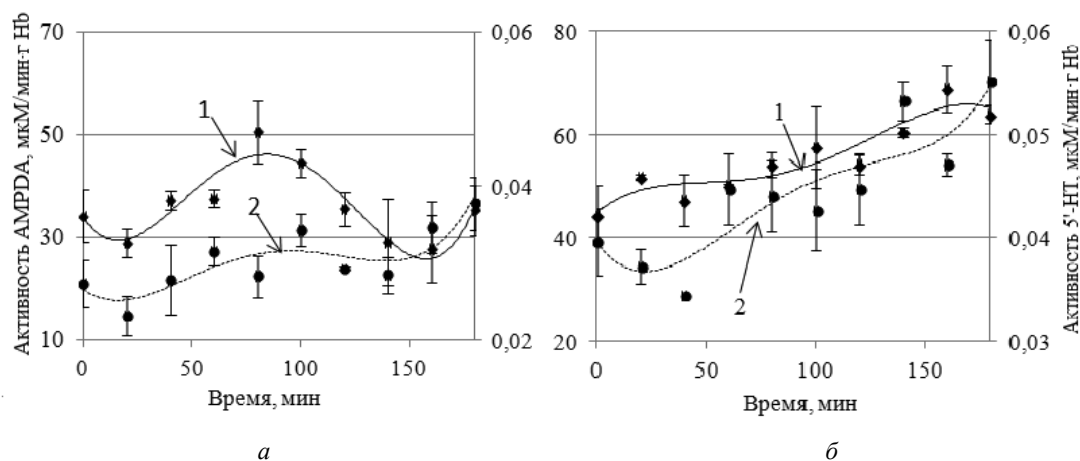


Рис. 3. Изменение активностей ферментов катаболизма АМР (мкМ/мин·г Нб) при действии вибрации на суспензию эритроцитов: а – вибрационное воздействие с частотой 24 Гц, б – с частотой 32 Гц, амплитуда $0,50 \pm 0,04$ мм; 1 – АМРДА, 2 – сN-IA

Мембраносвязанная форма 5'-нуклеотидазы (eN) связывается с липидным бислоем клетки через гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ-якорь) и это взаимодействие существенно влияет на активность фермента (Bianchi and Sychala, 2003; Pexa and Deussen, 2005; Colgan et al., 2006; Fujita and Jigami, 2008; Bogan and Brenner, 2010). Данные работы (Danylova et al., 2003) свидетельствуют о том, что этот фермент является маркером мембранных рафтов – сфинголипидхолестероловых микродоменов, характеризующихся специфическим липидным и белковым составом и включающихся в большое число клеточных функций. Индивидуальные, неассоциированные рафты представляют собой относительно небольшие структуры, содержащие не больше нескольких десятков белковых молекул (Pralle et al., 2000). Высказана гипотеза, что индивидуальные рафты не способны поддерживать высокий уровень активности ассоциированных с ними сигнальных молекул и только вследствие их ассоциации в большие структуры этот уровень может превышать порог, необходимый для возникновения стабильного сигнала (Yegutkin, 2008; Knapp et al., 2012). Взаимодействие eN с рафтами мембраны дает возможность рассматривать свойства этого фермен-

та в более широком аспекте. Изменение активности мембраносвязанной формы 5'-НТ в экспериментах без действия вибрации показано на рисунке 1. Видно, что активность eN уменьшалась через 40 минут на $59,2 \pm 8,2\%$ относительно начального уровня и удерживалась на этом уровне в течение 100 мин эксперимента. Дальнейшее инкубирование эритроцитов в среде без глюкозы приводило к восстановлению активности фермента до уровня контроля. На рисунке 4 показано изменение eN в эритроцитах, подвергавшихся действию вибрации.

Активный центр экто-5'-НТ расположен снаружи и обращен в среду инкубирования. Отсутствие субстрата (АМР) в среде инкубирования должно приводить к инактивации фермента (Pexa and Deussen, 2005). Эти процессы наблюдаются в начале эксперимента как без вибрационного воздействия, так и при действии вибрации. Затем во временном интервале 60–120 мин фиксировали рост активности eN (рис. 4). Такое повышение активности может быть связано с перестройкой липидного бислоя и ассоциацией рафтов. Процессы, косвенно свидетельствующие о перестройке липидного бислоя эритроцитов, подвергающихся действию вибрации в среде без глюкозы, наблюдались нами ранее (Dotsenko et al., 2012, 2013).

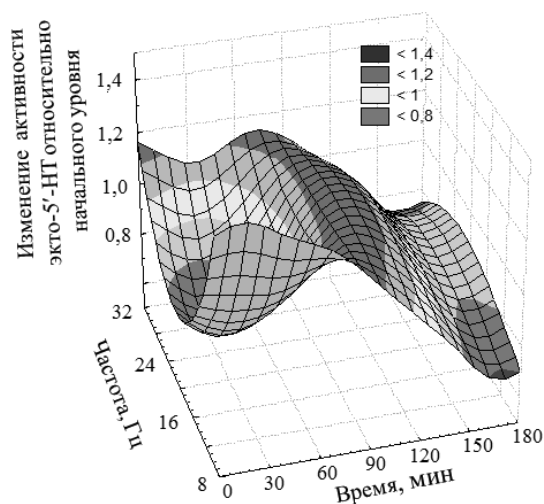


Рис. 4. Частотно-временная зависимость изменения активности экто-5'-нуклеотидазы относительно начального уровня

Дальнейшее снижение активности eN может быть связано с повреждением ГФИ-якоря, вызванного перестройкой липидного бислоя или повреждением мембраны (Fujita and Jigami, 2008, Korylchuk et al., 2009), либо с той же причиной – отсутствием субстрата в среде инкубирования. Таким образом, фиксируемое увеличение активности eN можно рассматривать как маркер перестройки липидного бислоя эритроцитов под действием внешнего фактора.

Выводы

Экспериментально показано, что процессы переключения двух способов катаболизма AMP создают условия для восстановления энергетического заряда и стабилизации концентрации АТФ, хотя и на уровне ниже начального. Незначительный прирост активностей ферментов катаболизма AMP, особенно cN-IA, в эритроцитах, истощенных по глюкозе и подвергающихся дополнительной нагрузке (вибрационному воздействию), свидетельствует о том, что в регулировании концентрации АТФ задействованы также другие механизмы, тесно связанные с работой этих ферментов. Активность экто-5'-НТ можно рассматривать как маркер перестройки липидного бислоя эритроцитов под действием внешнего фактора.

Библиографические ссылки

Ataullakhanov, F.I., Vitvitsky, V.M., 2002. What determines the intracellular ATP concentration. *Biosci. Rep.* 22(5), 501–511.

Atkinson, D.E., 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem.* 7(11), 4030–4034.

Baranowska-Bosiacka, I., Hlynczak, A.J., Wiszniewska, B., Marchlewicz, M., 2004. Disorders of purine metabolism in human erythrocytes in the state of lead contamination. *Pol. J. Environ. Stud.* 13(5), 467–476.

Bianchi, V., Szychala, J., 2003. Mammalian 5'-nucleotidases (minireview). *J. Biol. Chem.* 278(47), 46195–46198.

Bogan, K.L., Brenner, C., 2010. 5'-nucleotidases and their new roles in NAD⁺ and phosphate metabolism. *New J. Chem.* 34, 845–853.

Bontemps, F., Van den Berghe, G., Hers, H.G., 1986. Pathways of adenine nucleotide catabolism in erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 77, 824–830.

Chapman, A.G., Atkinson, D.E., 1973. Stabilization of adenylate energy charge by the adenylatedeamine reaction. *J. Biol. Chem.* 248, 8309–8312.

Cheng, J., Morisaki, H., Toyama, K., Ikawa, M., Okabe, M., Morisaki, T., 2012. AMPD3-deficient mice exhibit increased erythrocyte ATP levels but anemia not improved due to PK deficiency. *Genes Cells* 17(11), 913–922.

Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T., Thompson, L.F., 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2, 351–360.

Danylova, V.M., Andruhova, O.V., Babichuk, V.S., 2003. Katalychni vlastyvyosti 5'-nukleotyduzy u skladi membrannyykh raftiv klityn gladen'kyh m'jaziv [Catalytic properties of 5'-nucleotidase within membrane rafts of smooth muscle cells]. *Ukrainian Journal of Biochemistry* 75(3), 71–76 (in Ukrainian).

Dotsenko, O.I. Troshchynskaya, Y.A., Konyukhova, N.R., 2012. Izuchenie processov obrazovaniya membranosvjazannogo gemoglobina v jerytrocitah pod dejstviem nizkochastotnoj vibracii [Studying of processes of formation of membrane-bound hemoglobin in erythrocytes under the influence of low-frequency vibration]. *Problems of Ecology and Nature Protection of Techogen Region* 12, 274–280 (in Russian).

Dotsenko, O.I., Konyukhova, N.R., Troshchynskaya, Y.A., 2013. Regulacija strukturnogo stanu bilkiv cytosketu erytrocyt pry dii' na nyh nyz'kochastotnoi' vibracii' [Regulation of erythrocytes cytoskeleton proteins structural state at low-frequency vibration action]. *Visnyk Donec'kogo Nacional'nogo Universytetu. Ser. A: Pryrodnychi Nauky* 1, 149–156 (in Ukrainian).

Dudzinska, W., 2014. Purine nucleotides and their metabolites in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *J. Biomed. Sci. Eng.* 7, 38–44.

Dudzinska, W., Hlynczak, A.J., Skotnicka, E., Suska, M., 2006. The purine metabolism of human erythrocytes. *Biochemistry (Moscow)* 71(5), 467–475.

Dudzinska, W., Lubkowska, A., Dolegowska, B., Safranow, K., Jakubowska, K., 2010. Adenine, guanine and pyridine nucleotides in blood during physical exercise and restitution in healthy subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 110, 1155–1162.

Föller, M., Sopjani, M., Koka, S., Gu, S., Mahmud, H., Wang, K., Floride, E., Schleicher, E., Schulz, E., Münzel, T., Lang, F., 2009. Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *FASEB J.* 23(4), 1072–1080.

Fujita, M., Jigami, Y., 2008. Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. *Biochim. Biophys. Acta* 1780(3), 410–420.

Hardie, D.G., Ashford, M.L.J., 2014. AMPK: Regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology* 29, 99–107.

Itoh, R., 1981. Regulation of cytosol 5'-nucleotidase by adenylate energy charge. *Biochim. Biophys. Acta* 659, 31–37.

Khlyntseva, S.V., Vishnikin, A.B., Bazel', Y.R., Andruh, V., 2009. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *J. Analyt. Chem.* 64(7), 657–673.

Kim, H.D., 1990. Is adenosine a second metabolic substrate for human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1036, 113–120.

Knapp, K., Zebisch, M., Pippel, J., El-Tayeb, A., Müller, C.E., Sträter, N., 2012. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): Insights into the regulation of purinergic signaling. *Cell Press* 20(12), 2161–2173.

- Komarova, S., Mosharov, E.V., Vitvitskii, V., Ataulakhanov, F.I., 1999. Adenine nucleotide synthesis in human erythrocytes depends on the mode of supplementation of cell suspension with adenosine. *Blood Cells Mol. Dis.* 25, 170–179.
- Kopylchuk, Y.P., Buchkovska, I.M., Voloschuk, O.M., 2009. 5'-Nukleotydazna ta AMR-dezaminazna aktyvnosti postnuklearnoi' frakcii' pechenky ta syrovatky krovi shhuriv iz transplantovanoju karcynomoju gerena [5'-Nucleotidase and AMP-deaminase activities of liver postnuclear fraction and blood serum of rats with transplanted Guerin's carcinoma]. *Stud. Biol.* 3(3), 69–74 (in Ukrainian).
- Kudina, N.G., Andriychuk, T.R., Tsudzevich, B.O., 2003. Aktyvnist' fermentiv purynovogo obminu v tymocytah shhuriv za promenevogo urazhennja ta vvedennja i'm ryboksynu [Purine metabolism enzymes activity in rat's thymocytes after irradiation and after the riboxine injection]. *Ukrainian Journal of Biochemistry* 75(2), 109–112 (in Ukrainian).
- Lian, C.-Y., Harkness, D.R., 1974. The kinetic properties of adenylate deaminase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 341, 27–40.
- Lushchak, V.I., Storey, K.B., 1994. Effect of exercise on the properties of AMP-deaminase from trout white muscle. *Int. J. Biochem.* 26(10), 1305–1312.
- Martinov, M.V., Plotnikov, A.G., Vitvitsky, V.M., Ataulakhanov, F.I., 2000. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1474(1), 75–87.
- Mosharov, E.V., Vitvitsky, V.M., Ataulakhanow, F.I., 1998. Product activation of human erythrocyte AMP deaminase. *FEBS Lett* 440, 64–66.
- Oakhill, J.S., Scott, J.W., Kemp, B.E., 2012. AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrin. Met.* 23(3), 125–132.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., Kemp, B.E., 2011. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332, 1433–1435.
- Ogasawara, N., Goto, H., Yamada, Y., Hasegawa, I., 1986. Deficiency of erythrocyte type isozyme of AMP deaminase in human. *Adv. Exp. Med. Biol.* 195A, 123–127.
- Pexa, A., Deussen A., 2005. Modulation of ecto-5'-nucleotidase by phospholipids in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372, 131–138.
- Plaideau, C., Liu, J., Hartleib-Geschwindner, J., Bastin-Coyette, L., Bontemps, F., Oscarsson, J., Hue, L., Rider, M.H., 2012. Overexpression of AMP-metabolizing enzymes controls adenine nucleotide levels and AMPK activation in HEK293T cells. *FASEB J.* 26, 2685–2694.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.-L., Simons, K., Hörber, K.H., 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 148(5), 997–1008.
- Rozhkovskij, J.V., Kresjun, V.I., 1991. Aktivnost' markernih fermentov i sostojanie lipidnogo matriksa membran jeritrocytov pri stresse i ego medikamentoznoj korrekcii [The activity of marker enzymes and the state of the lipid matrix of membranes of red blood cells under stress and its medical correction]. *Ukrainian Journal of Biochemistry* 63(4), 74–80 (in Russian).
- Sabina, R.L., Wandersee, N.J., Hillery, C.A., 2009. *Br. J. Haematol.*, 144(3), 434–445.
- Sasaki, R., Ikura, K., Ciba, H., 1976. Regulation of human erythrocyte AMP deaminase by ATP and 2,3-bisphosphoglycerate. *Agr. Biol. Chem.* 40, 1797–1803.
- Schuster, S., Kenanov, D., 2005. Adenine and adenosine salvage pathways in erythrocytes and the role of S-adenosylhomocysteine hydrolase. A theoretical study using elementary flux modes. *FEBS J.* 272, 5278–5290.
- Walther, T., Novo, M., Rössger, K., Létisse, F., Loret, M.O., Portais, J.C., François, J.M., 2010. Control of ATP homeostasis during the respiration-fermentative transition in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 6, 344.
- Yegutkin, G.G., 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergetic signaling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 673–694.

Надійшла до редколегії 21.04.2014



УДК 577.3+57.043

Кислотно-гемолитическая устойчивость эритроцитов напряженного эритропоэза в условиях низкочастотной вибрации

О.И. Доценко

Донецкий национальный университет, Донецк, Украина

Исследовано 14-дневное влияние вибрации с частотами 8, 16, 24 и 32 Гц, амплитудой $0,8 \pm 0,12$ мм на кислотно-резистентность эритроцитов мышей. Вибрация с частотами 8, 16 и 24 Гц вызывает напряженный эритропоэз. Высокая активность стресс-реализующих механизмов приводит к падению общего содержания эритроцитов в крови, снижению доли «старых», низкостойких эритроцитов и общему повышению их устойчивости к кислотному гемолизу. Вибрация с частотой 32 Гц блокирует эритропоэз, следствием чего является быстрое истощение резерва зрелых эритроцитов и снижение их кислотной устойчивости.

Ключевые слова: низкочастотная вибрация; кислотная резистентность; эритроциты; эритропоэз

Acid-hemolytic stability of erythrocytes of intense erythropoiesis under conditions of low-frequency vibration

O.I. Dotsenko

Donetsk National University, Donetsk, Ukraine

This paper deals with the peculiarities of functioning of murine erythron system under vibrational stress on the basis of experimental data about erythrocytes acid resistance. Experiments were made on the outbred male mice at about one age and weight that were maintained in vivarium conditions on usual diet. Animals were divided into 5 groups. Animals of 1–4 groups were exposed to daily thirty-minute vibration at frequencies of 8, 16, 24 and 32 Hz respectively, with amplitude of 0.8 ± 0.12 mm during 14 days. Animal exposure to vibration was provided by the electromechanical converter connected to the generator of low frequency signals. The fifth group of animals was not exposed to vibration and it was used as a control. Kinetic dependences of acid hemolysis of erythrocytes was registered daily, from the 1st to the 5th day, and further at the 7th, 9th and 14th days of experiment. Blood for analysis was taken from tail veins in 15–20 min after stopping of vibration. As the basic indicators characterizing resistance of erythrocytes to the hemolytic agent influence we used the hemolysis rate constant, i.e. the value inverse to cell half-life time. For analysis of acid erythrograms we also used such indicators as hemolysis duration, maximum erythrogram's time and width of the interval of erythrocyte group dominating in the population. We processed the results of research statistically. The study showed that acid resistance of erythrocytes decreased during the first five days of vibration influence at frequencies of 8–16 Hz. Besides, erythrocytes were divided into fractions that indicated the erythrocytes aging and strengthening of the population heterogeneity. On the fifth day of 16 Hz influence the emission of reticulocytes was recorded. At 8 Hz influence these processes were registered on the 7th day of the experiment. During the subsequent days the hemolysis curves were slightly displaced in relation to the control. Increase in hemolysis time and forms of erythrograms suggested the existence of erythrocytes fraction with increased resistance to the haemolytic factor. High activity of stress-induced mechanisms led to the drop in the general erythrocytes content in blood, and to the decrease in the share of low-resistant “old” erythrocytes and general increase in erythrocytes stability to the acid hemolysis. At 24 Hz vibration influence we observed similar processes; however, during the second week of action the content of “old” erythrocytes in murine blood was much higher, compared with “young” cells. Strengthening of erythrocytes heterogeneity was observed with the shift on the erythrograms to the left, emergence of several maxima, and reduction of half-life time of the cells. However, the hemolysis termination time was not reduced. At 32 Hz vibration the erythropoiesis was not observed within 14 days of the experiment. Stress-induced disorder of the hemopoiesis and cellular composition of peripheral blood were revealed and expressed in erythropoiesis suppression, devastation of the “old” erythrocytes’ reserve, and decrease in their acid resistance. The consequence of these processes can be hypoxia of cells and tissues, which is one of the mechanisms of organs stress injuries.

Keywords: low frequency vibration; acid resistance; erythrocytes; erythropoiesis

Введение

Вибрация является хроническим стрессирующим фактором, вызывающим в организме человека многочисленные изменения и повреждения. В результате действия вибрации отмечают изменения окислительного и энергетического метаболизма (Kapustnik and Polyakova, 2005; Antoshina and Pavlovskaya, 2009; Hughes et al., 2009; Vorobieva and Shabanov, 2012), иммунного статуса (Bobrova et al., 2002; Bodyenkova and Lizaryv, 2005), реологических свойств крови (Ziegler et al., 2005; Antoshina et al., 2009; Pattnaik et al., 2012), проницаемости мембран клеток (Vorobieva and Shabanov, 2010), дистрофических поражений мышечной и костной тканей (Sauni et al., 2009; Stoyneva and Dermendjiev, 2010; Heaver et al., 2011; Krajnak et al., 2012), минерального дисбаланса (Damijan, 2005; Kapustnik and Polyakova, 2005), нарушений липидного обмена, состояния гормональной системы (Bodyenkova and Lizaryv, 2005). На основании наших исследований и анализа данных литературы (Bobrova et al., 2002; Dotsenko et al., 2010) можно заключить, что реакция организма на вибрационное воздействие является неспецифичной. В многочисленных работах описаны закономерности неспецифической реакции кроветворных органов на действие различных стрессоров, которые проявляются в развитии эритропоэза (Paulson et al., 2011; Vemula et al., 2012; Dzierzak and Philipsen, 2013).

В числе интегральных характеристик, дающих представление о системных сдвигах в организме, может оказаться один из параметров системы эритронов, лежащий в основе гемолитической стойкости его клеток и определяемый методом кислотных эритрограмм. Этот метод был разработан в свое время как способ гематологических исследований для изучения изменений свойств эритроцитов при гемобластозах, анемиях и интоксикациях с поражением системы красной крови (Leonova, 1987). С его помощью оценивали гетерогенность эритроцитарной популяции в зависимости от возраста, поскольку кислотная стойкость эритроцитов способна выступать, помимо всего, и как функция возраста эритроцитарной клетки.

Работы, в которых метод кислотных эритрограмм применялся бы для динамической оценки состояния организма, находящегося в состоянии стресса, малочисленны. Однако показано, что этот метод может быть использован для изучения специфических гематологических и неспецифических общеорганизменных закономерностей острого стресса в раннем постагрессивном периоде (Mikhailis, 2009, 2010). Комплексное изучение влияния стресса на кроветворение и клеточный состав периферической крови имеет большое значение в понимании механизмов адаптации организма к стрессорным повреждениям. В связи с вышеизложенным, цель работы состояла в изучении особенностей функционирования системы эритронов мышей, находящихся в условиях вибрационного стресса.

Материал и методы исследований

Опыты проведены на белых беспородных мышах приблизительно одного возраста и массы, содержащихся

в условиях вивария на обычном рационе. Животные были разделены на пять групп. Животные 1–4-й групп подвергались ежедневной 30-минутной вибрации частотами 8, 16, 24 и 32 Гц, амплитудой $0,8 \pm 0,12$ мм (интенсивность вибрации 78,7–97,2 Дб) в течение 14 дней. Вибрацию животных осуществляли с помощью электромеханического преобразователя, подключенного к генератору сигналов низких частот. Пятая группа животных не подвергалась вибрации и использовалась в качестве контроля.

Кровь для анализа брали через некоторое время после окончания вибрации из хвостовых вен и использовали для изучения кинетики кислотного ($0,004$ М HCl) гемолиза. Изучение динамики кислотного гемолиза проводили на длине волны 650 нм (длина волны, при которой оптическая плотность образцов зависит от светорассеяния эритроцитомассы). Измерения оптической плотности взвеси эритроцитов после добавления равного количества гемолитика проводили с временным интервалом 1 с в автоматическом режиме. Измерение светопоглощения вели до получения совпадающих показаний оптической плотности, т.е. до завершения гемолиза (Dotsenko and Mishenko, 2011).

По спектрам поглощения гемолиза рассчитывали первые производные спектров (эритрограммы), которые использовали для определения константы скорости гемолиза ($k_{1/2}$) – величины, обратной времени полураспада клеток ($t_{1/2}$). Для анализа кислотных эритрограмм

также использовали такие показатели как продолжительность гемолиза, время, соответствующее максимумам эритрограммы, ширина интервала доминирующей группы эритроцитов в популяции.

Статистическую обработку и графическое отображение результатов осуществляли с использованием стандартных программ Excel и Statistica.

Результаты и их обсуждение

Характеристика функциональной полноценности клеток красной крови как интегрального показателя состояния организма имеет большое прогностическое значение. Совокупность физико-химических свойств мембран эритроцитов определяет их устойчивость к действию неблагоприятных факторов. В связи с этим показатели устойчивости эритроцитов широко применяются в экспериментальной медицине в целях характеристики их функционального состояния. Нефракционированные эритроциты являются совокупностью клеток разной степени зрелости и функциональной активности, время пребывания которых в крови неодинаково. В течение всей жизни эритроцита в сосудистом русле его стойкость уменьшается с возрастом. Наиболее молодые эритроциты обладают наибольшей стойкостью и занимают на эритрограмме правое положение. Процессы старения сопровождаются постоянным снижением их стойкости, что на эритрограмме отражается смещением влево. К концу жизни эритроцита его стойкость снижается до минимального значения, с которой он покидает сосудистое русло (Leonova, 1987). Таким образом, стой-

кость эритроцитарных мембран является важнейшей величиной, связанной с физиологическим состоянием и возрастом эритроцитов.

Экспериментальные данные по изучению кислотной резистентности эритроцитов показаны на рисунках 1–4. На всех рисунках кривая 1 соответствует усредненной кривой гемолиза мышей группы контроля. Для мышей этой группы эритрограмма одновершинна и для нее отсутствует строгая симметричность, которая свидетельствует о некоторой гетерогенности популяции эритроцитов. Вершина эритрограммы соответствовала времени 213 с ($t_{1/2} = 212,5$ с, $k_{t_{1/2}} = 0,0047$). Продолжительность гемолиза составляла 455 с. Незначительное растяжение и подъем правой ветви эритрограммы указывает на присутствие в кровяном русле молодых форм эритроцитов в результате умеренного напряжения эритропоэза.

На рисунке 1 приведены эритрограммы гемолиза мышей, подвергавшихся вибрации частотой 8 Гц. В первые дни воздействия кислотные эритрограммы нефрак-

ционированных эритроцитов смещены влево относительно контрольной зависимости (зависимости 2–4). $t_{1/2}$

гемолиза с первого по пятый день эксперимента составляло $104,4 \pm 25,5$, $126,1 \pm 9,3$, $117,6 \pm 8,7$, $124,1 \pm 17,7$, $138,4 \pm 22,2$ с соответственно. На эритрограммах фиксируется несколько максимумов, что указывает на усиление гетерогенности клеток, инициируемой вибрацией. На седьмой день вибрационного воздействия (рис. 1, зависимость 5) эритрограммы характеризовались увеличенным временем гемолиза и растяжением правой ветви эритрограммы, что вероятно было вызвано увеличением количества «молодых», высокостойких к гемолизу эритроцитов в кровяном русле. При этом положение по времени максимума основного пика гемолиза практически совпало с контролем, однако он имел меньшую интенсивность ($t_{1/2} = 213,1 \pm 13,8$ с, $k_{t_{1/2}} = 0,0047 \pm 0,0003$).

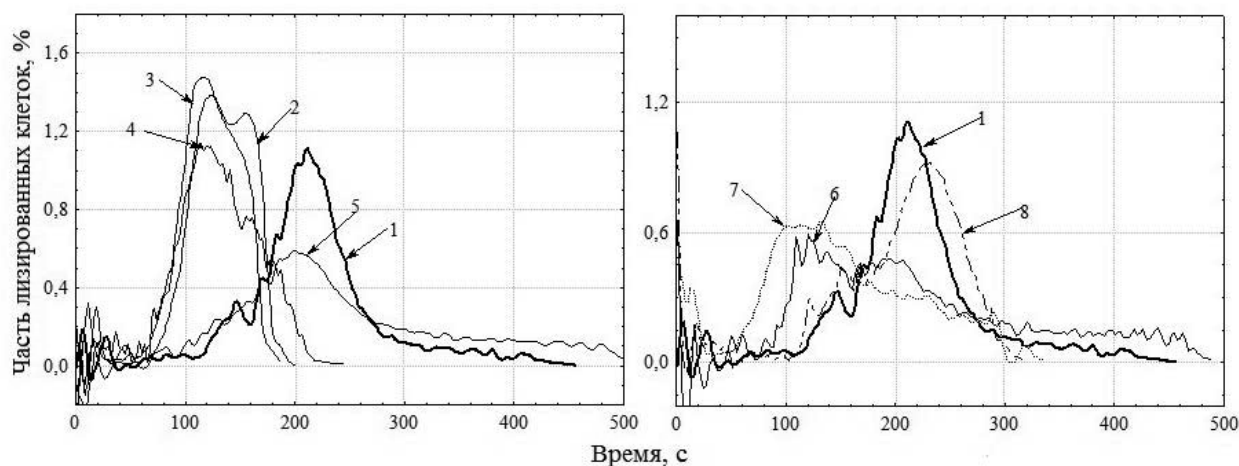


Рис. 1. Эритрограммы эритроцитов мышей, подвергавшихся вибрации частотой 8 Гц:

1 – контроль, 2 – 2-й, 3 – 3-й, 4 – 5-й, 5 – 7-й, 6 – 9-й, 7 – 11-й, 8 – 14-й дни вибрации

На девятый день воздействия регистрировали раздвоение пика эритрограмм, что свидетельствовало о наличии в кровеносном русле эритроцитов с разными свойствами биомембраны (рис. 1, зависимость 6). Видно усиление гемолиза «старых» эритроцитов (время первого интенсивного пика – 124,1 с), при этом снижение их количества на фоне молодых форм клеток привело к появлению второго пика с максимумом, соответствующим 202 с, и увеличению времени гемолиза до 490 с. На 11-й день вибрационного воздействия эритрограммы мышей снова сдвигались влево ($t_{1/2} = 138,4 \pm 20,8$ с),

однако на 14-й день максимум эритрограммы практически совпадал с контролем.

Анализ кинетических зависимостей гемолиза (данные не приведены) показал сокращение длительности латентной фазы гемолиза для всех регистрируемых эритрограмм в течение 14 дней вибрационного воздействия. Как известно, длительность латентного периода существенно зависит от состояния белков эритроцитов, в связи с чем сокращение этой стадии указывает на нарушение межбелковых контактов и белок-липидных

взаимодействий, что приводит к снижению барьера проницаемости.

На рисунке 2 приведены эритрограммы кислотного гемолиза эритроцитов мышей, подвергавшихся низкочастотной вибрации частотой 16 Гц. После однократного воздействия вибрацией регистрируемые эритрограммы практически совпадали с контролем, а на второй и третий дни эксперимента также наблюдали смещение максимумов эритрограмм влево ($t_{1/2} = 117 \pm 47,7$ и $120 \pm 41,7$ с). На третий день эксперимента у некоторых животных регистрировали тенденцию к разделению эритроцитов на фракции, отличающиеся устойчивостью к гемолитическому фактору (зависимость 3). В четвертый и пятый дни эксперимента время лизиса основной фракции эритроцитов еще незначительно сокращалось (основная фракция эритроцитов лизировалась примерно за 120 с от начала реакции), однако время окончания процесса гемолиза увеличивалось на 100 с (зависимость 4). На четвертый день эксперимента отчетливо видно появление фракции эритроцитов, устойчивых к гемолизу, что было вызвано выбросом молодых эритроцитов (ретику-

лоцитов) из костного мозга. Регистрируемая на седьмой день эритрограмма (рис. 2, зависимость 5) имела несколько максимумов: первый, с невысокой интенсивностью, регистрировали через 200 с от начала реакции, затем была видна широкая полоса, без явно выраженных максимумов, и незначительный максимум появлялся в конце процесса гемолиза через 550 с. Из эритрограмм, полученных в 9-й и 11-й дни эксперимента (рис. 2, зависимости 7, 8) видно, что количество фракции, лизирующей через 120–150 с от начала реакции, возрастало, однако время окончания процесса реакции практически не сокращалось. На кинетических кривых гемолиза четко виден изгиб и уменьшение наклона завершающей части зависимости, что связано с наличием стадий, кинетически разделенных во времени и существенно различающихся по скоростям протекания (данные не показаны). На 14-й день воздействия вибрацией также видно снижение количества основной фракции эритроцитов и наличие фракции, устойчивой к гемолитическому фактору. Из анализа кривых, приведенных на рисунке 2 видно, что вибрация с частотой 16 Гц усиливает деста-

билизацию мембран старых эритроцитов с последующей ликвидацией этих клеток. В ответ на действие вибрации у мышей начинаются процессы неконтролируемого эритропоэза (Minasyan et al., 2007).

На рисунке 3 приведены эритрограммы кислотного гемолиза эритроцитов мышей, подвергавшихся вибрации частотой 24 Гц. После однократного воздействия вибрацией (зависимость 2) максимум эритрограммы гемолиза смещался влево и соответствовал 166 с (в контроле – 212 с). Во второй, третий и четвертый дни эксперимента наблюдали еще большее смещение максимумов эритрограмм влево относительно контроля, однако между собой эритрограммы отличались мало. Максимум эритрограмм в эти дни соответствовал в среднем 100 с, изменялась полуширина и высота эритрограмм (основной пик эритрограммы становится более узким и высоким), что указывало на преобладание во фракции «старых» эритроцитов. С пятого по седьмой дни эксперимента у животных наблюдали тенденцию к разделению эритроцитов на фракции, отличающиеся устойчивостью к гемолитическому фактору (рис. 3, зависимости 6, 7).

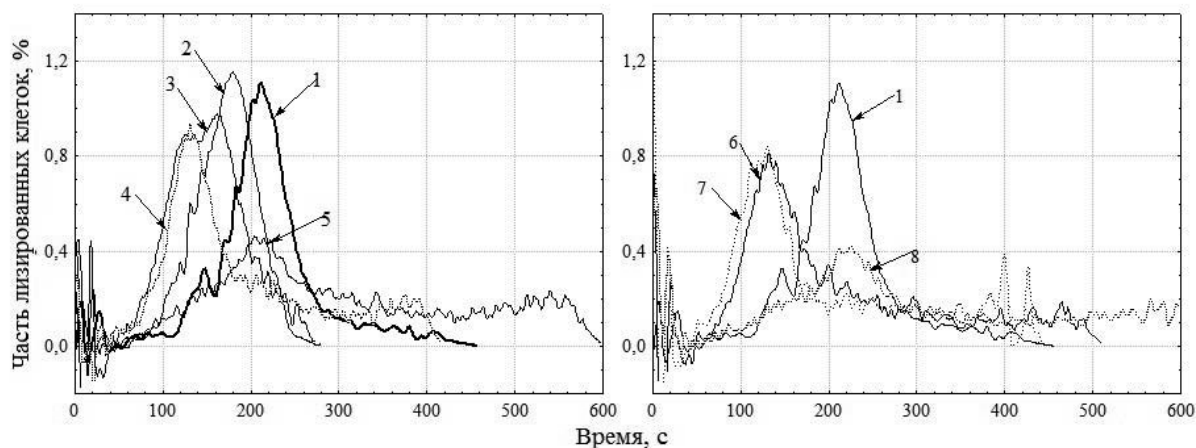


Рис. 2. Эритрограммы эритроцитов мышей, подвергавшихся вибрации частотой 16 Гц:
1 – контроль, 2 – 2-й, 3 – 3-й, 4 – 4-й, 5 – 7-й, 6 – 9-й, 7 – 11-й, 8 – 14-й дни вибрации

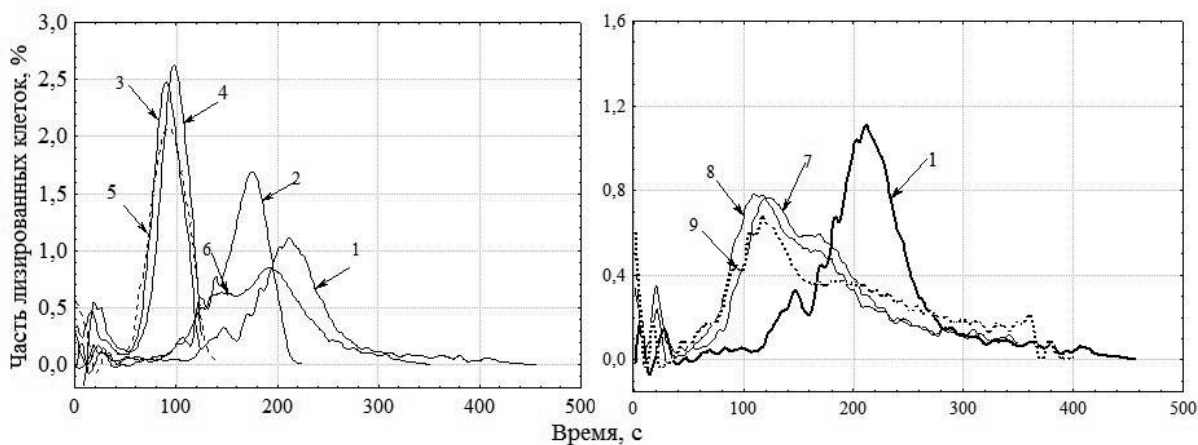


Рис. 3. Эритрограммы эритроцитов мышей, подвергавшихся вибрации частотой 24 Гц:
1 – контроль, 2 – 1-й, 3 – 2-й, 4 – 3-й, 5 – 4-й, 6 – 5-й, 7 – 9-й, 8 – 11-й, 9 – 14-й дни вибрации

Начиная с девятого дня эксперимента отчетливо видно появление фракции эритроцитов, устойчивых к гемолизу. Ширина эритрограммы увеличивалась, высота уменьшалась, на эритрограммах регистрировали несколько максимумов, и их окончание было сильно затя-

нутым. На эритрограммах, полученных с 9-го по 14-й дни эксперимента (рис. 3, зависимости 8, 9), видно, что количество фракции, лизирующей через 120–150 с от начала реакции, существенно преобладало, хотя время окончания процесса гемолиза не сокращалось.

В отличие от кинетических кривых, регистрируемых для эритроцитов группы мышей, подвергавшихся вибрации с частотой 16 Гц, латентный период гемолиза сокращался во всех регистрируемых зависимостях, что было связано с преобладанием «старых» клеток в эритроцитарной фракции.

С первого по пятый дни воздействия с частотой 32 Гц (рис. 4) эритрограммы сдвигались влево относительно контроля, $t_{1/2}$ снижалось: в первый день оно со-

ставляло $134,1 \pm 43,5$ с, во второй – $116,6 \pm 34,7$ с, в третий – $101,9 \pm 33,2$ с, в четвертый – $89,9 \pm 21,2$ с. При этом на всех эритрограммах виден малоинтенсивный пик в области 15–20 с. Характер изменений эритрограмм свидетельствовал об увеличении количества «старых» клеток в эритроцитарном пуле. Процесс кислотного гемолиза заканчивался в среднем за 200 с (рис. 4, зависимости 2, 3, 4).

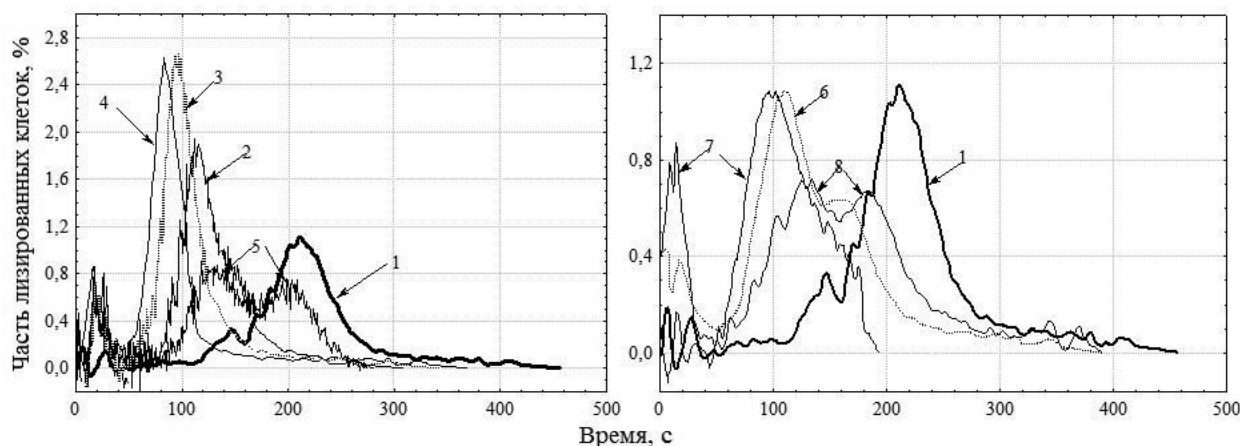


Рис. 4. Эритрограммы эритроцитов мышей, подвергавшихся вибрации частотой 32 Гц:
1 – контроль, 2 – 1-й, 3 – 3-й, 4 – 4-й, 5 – 7-й, 6 – 9-й, 7 – 11-й, 8 – 14-й дни вибрации

С пятого по 14-й дни воздействия гетерогенность эритроцитов возросла, что проявлялось в разделении основного пика гемолиза. Кроме того, возрастала интенсивность пика, соответствующего фракции эритроцитов, лизирующихся за 20 с. Вторым максимум на эритрограммах появлялся через 100–120 с, что значительно меньше показателей контрольной группы. Одновременно количество «молодых» эритроцитов, наличие которых является одним из показателей интенсивности эритропоза, снижалось. С пятого по 9-й дни эксперимента в кровотоке видимо появлялось небольшое количество молодых эритроцитов, на что указывает незначительное растяжение и подъем правой ветви эритрограммы. Как известно, следствием уменьшения или полной остановки поступления в кровяное русло «молодых» клеток является снижение кислородной емкости крови. Результатом этого является задержка в крови «старых» форм эритроцитов, что и наблюдали для мышей данной группы.

В основе патогенеза действия вибрации находится кислородное голодание тканей вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (Kapustnik and Polyakova, 2005; Dotsenko et al., 2010). В случае кислородного голодания происходит раздражение костного мозга и в кровь поступает большое количество «молодых», возможно незрелых эритроцитов, что направлено на ликвидацию дефицита кислорода и избытка углекислого газа в организме (Haase, 2013). Таким образом, снижение количества «старых» и увеличение «молодых» эритроцитов крови экспериментальных животных является компенсаторным явлением на развитие гипоксии (Haase, 2010; Paulson et al., 2011).

Изучение системы эритрона дает возможность более объективно оценить состояние организма при действии

вибрационного фактора. С этой точки зрения, вибрация в интервале частот 8–16 Гц вызывает у мышей состояние стресса, который приводит к повышению кислотности эритроцитов, что наблюдается при действии многих факторов. К типичным механизмам повышения кислотности эритроцитов можно отнести (Mikhailis, 2010): 1) разрушение наименее резистентных эритроцитов вследствие окислительной модификации белков мембраны, 2) выход менее зрелых и неповрежденных форм из депо; 3) изменения в соотношении различных фракций липидов, протеинов, полисахаридов мембран эритроцитов, приводящие к модуляции активности ферментов и их комплексов, фиксированных в мембране или связанных с ней, а также к изменению ее физико-химических свойств; 4) повышение антиоксидантной активности устойчивости эритроцитов (влияние его собственных и плазменных факторов, эритропоэтина, глюкокортикоидов); 5) стресс-стимуляция эритропоза с образованием стресс-эритроцитов, обладающих аномально высокой резистентностью. Молодые клетки, образованные в условиях напряженного эритропоза, являются качественно иными по сравнению с соответствующими клетками, продуцированными при нормальном кроветворении. В эритроцитах, образованных в условиях напряженного эритропоза, ввиду ускоренной их продукции в костном мозге, а также усиленной эксплуатации после выхода в кровяное русло, быстрее, чем в эритроцитах, образованных в условиях нормального эритропоза, наблюдается падение активности ферментов, приводящее к преждевременному старению клетки и ее элиминации из общего кровотока (Piccinini et al, 1995; Bradovich et al., 2009; Rifkind and Nagababu, 2013).

Вибрация частотой 24, а особенно 32 Гц приводит к стресс-индуцированным нарушениям гемопоэза и клеточного состава периферической крови, которые выражаются в подавлении эритропоэза и опустошении резерва эритроцитов. Подавление стрессом эритропоэза и снижение резистентности эритроцитов приводит к гипоксии клеток и тканей, что в данных условиях является одним из механизмов стрессорных повреждений внутренних органов.

Выводы

Низкочастотная вибрация частотой 8–16 Гц амплитудой $0,8 \pm 0,12$ мм вызывает дестабилизацию мембран эритроцитов с последующей ликвидацией поврежденных клеток. Высокая активность стрессреализующих механизмов приводит к падению общего содержания эритроцитов в крови, снижению доли «старых», низкостойких эритроцитов и общему повышению устойчивости эритроцитов к кислотному гемолизу. Низкочастотная вибрация частотой 32 Гц амплитудой $0,8 \pm 0,12$ мм вызывала блокирование эритропоэза, что привело к быстрому старению эритроцитов и снижению их кислотной устойчивости.

Библиографические ссылки

- Antoshina, L.I., Pavlovskaya, N.A., 2009. Biohimicheskie markery vozdejstviya vibracii na organizm rabotajushhih i ih kriterial'naja ocenka [Biochemical markers of vibration effects in workers, and their criterial evaluation]. *Medicina Truda i Promyshlennaja Jekologija* 12, 22–27 (in Russian).
- Antoshina, L.I., Saarkoppel, L.M., Pavlovskaya, N.A., 2009. Dejstvie vibracii na biohimicheskie pokazateli, harakterizujushhie okislitel'nyj metabolizm, immunitet, obmen myshechnoj i soedinitel'noj tkanej (Obzor literatury) [Influence of vibration on biochemical values characterizing oxidative metabolism, immunity, metabolism in muscular and connective tissues (review of literature)]. *Medicina Truda i Promyshlennaja Jekologija* 2, 32–37 (in Russian).
- Bobrova, S.V., Efremov, A.V., Vakulin, G.M., 2002. Funkcional'naja morfologija i ul'trastrukturnye izmenenija timusa pri vozdejstvii vibracii i ih korrekciya s ispol'zovaniem jes-sencial'nyh fosfolipidov [Functional morphology and ultra-structural changes of thymus under vibration and their correction with the help of essential phospholipids]. *Bjulleten' SO RAMN* 104(2), 129–137 (in Russian).
- Bodyenkova, C.M., Lizaryv, A.V., 2005. Patogeneticheskaja rol' narushenij immunoreaktivnosti organizma v mehanizmah vzaimosvjazi gipotalamo-gipofizarno-nadpochechnikovoj i tireoidnoj sistem pri vibracionnoj bolezni [Pathogenetic role of immune disorders in mechanisms underlying relations between hypothalamus – hypophysis – adrenals and thyroid systems in vibration disease]. *Vestnik Rossijskoj AMN* 3, 3–5 (in Russian).
- Brajovich, M.L., Rucci, A., Acosta, I.L., Cotorruelo, C., Borrás, S.G., Racca, L., Biondi, C., Racca, A., 2009. Effects of aging on antioxidant response and phagocytosis in senescent erythrocytes. *Immunol. Invest.* 38(6), 551–559.
- Damijan, Z., 2005. Changes of selected biochemical parameters of blood, densytometric and strength bones of rats under low frequency vibration. *Arch. Acoust.* 30(4), 495–505.
- Dotsenko, O.I., Dotsenko, V.A., Mischenko, A.M., 2010 Aktivnost' superoksiddismutazy i katalazy v jeritrocitah i neko-toryh tkanjah myshej v uslovijah nizkochastotnoj vibracii [The activity of erythrocytes superoxide dismutase and catalase and some other tissues at condition of low frequency vibration]. *Physics of the Alive* 18(1), 107–113 (in Russian).
- Dotsenko, O.I., Mischenko, A.M., 2011. Issledovanie vlijaniya nizkochastotnoj vibracii na kislotnuju rezistentnost' jeritrocitov [Influence of low-frequency vibration on the erythrocytes acid resistance]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 19(1), 22–30 (in Russian).
- Dzierzak, E., Philipsen, S., 2013. Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, 1–13.
- Haase, V.H., 2010. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299(1), F1–F13.
- Haase, V.H., 2013. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27(1), 41–53.
- Heaver, C., Goonetilleke, K.S., Fetguson, H., Shiralkar, S., 2011. Handarm vibration syndrome: A common occupational hazard in industrialized countries. *J. Hand Surg. Eur.* Vol. 36(5), 354–363.
- Hughes, J.M., Wirth, O., Krajnak, K., Miller, R., Flavahan, S., Berkowitz, D.E., Welcome, D., Flavahan, N.A., 2009. Increased oxidant activity mediates vascular dysfunction in vibration injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328(1), 223–230.
- Kapustnik, V.A., Polyakova, L.A., 2005. Oksidantnyj stress pri hronicheskom vozdejstvii jenergomexanicheskix kolebatel'nyh dvizhenij v proizvodstvennyx uslovijah: profilaktika i reabilitacija [Oxidative stress under chronic effect of power-mechanical oscillatory motions in working conditions: prevention and rehabilitation]. *Likars'ka Sprava* 7, 75–79 (in Russian).
- Krajnak, K., Riley, D.A., Wu, J., McDowell, T., Welcome, D.E., Xu, X.S., Dong, R.G., 2012. Frequency-dependent effects of vibration on physiological systems: Experiments with animals and other human surrogates. *Ind. Health* 50(5), 343–353.
- Leonova, V.G., 1987. Analiz jeritrocitarnyx populjacij v ontogeneze cheloveka. Nauka, Novosibirsk (in Russian).
- Mikhailis, A.A., 2009. Stress-inducirovannaja dinamika gemoliticheskoj stojkosti jeritrocitov pri razlichnyx vidax povrezhdajushhih vozdejstvij [Stress-induced dynamics of erythrocytes hemolytic resistance at various types of injury]. *Vestnik Rossijskogo Universiteta Druzby Narodov. Serija: Medicina* 4, 96–100 (in Russian).
- Mikhailis, A.A., 2010. Konceptual'naja model' stress-intucirovannoj dinamiki kislotno-gemoliticheskoj stojkosti jeritrocitov [Conceptual model a stress-induced dynamics of erythrocytes acid-hemolytic resistance]. *Sovremennye Naukoemkie Tehnologii* 10, 19–23 (in Russian).
- Minasyan, S.M., Adamyan, T.I., Gevorkyan, E.S., 2007. Izmenenie morfologicheskix pokazatelej krovi v dinamike vozdejstviya vibracii i kornej solodki [Changes of morphological indicators of blood from vibration and liquorice effect]. *Russ. J. Physiol.* 93(3), 1035–1042 (in Russian).
- Pattnaik, S., Banerjee, R., Kim, J., 2012. Spatial resonance in a small artery excited by vibration input as a possible mechanism to cause handarm vascular disorders. *J. Sound Vibration* 331(8), 1951–1960.
- Paulson, R.F., Shi, L., Wu, D., 2011. Stress erythropoiesis: New signals and new stress progenitor cells. *Curr. Opin. Hematol.* 18(3), 139–145.
- Piccinini, G., Minetti, G., Balduini, C., Brovelli, A., 1995. Oxidation state of glutathione and membrane proteins in human red cells of different age. *Mech. Ageing Dev.* 78(1), 15–26.
- Rifkind, J.M., Nagababu, E., 2013. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox Signal.* 18(17), 2274–2283.

- Sauni, R., Pääkkönen, R., Virtema, P., Toppila, E., Uitti, J., 2009. Dose-response relationship between exposure to hand-arm vibration and health effects among metalworkers. *Ann. Occup. Hyg.* 53(1), 55–62.
- Stoyneva, Z.B., Dermendjiev, S.M., 2010. Specific features of vibration-induced disorders. *Folia Med. (Plovdiv)* 52(4), 27–31.
- Vemula, S., Shi, J., Mali, R.S., Ma, P., Liu, Y., Hanneman, P., Koehler, K.R., Hashino, E., Wei, L., Kapur R., 2012. ROCK1 functions as a critical regulator of stress erythropoiesis and survival by regulating p53. *Blood* 120(14), 2868–2878.
- Vorobieva, V.V., Shabanov, P.D., 2010. Blokatory medlennykh kal'cievykh kanalov I-tipa podderzhivajut jenergeticheskij obmen v kardiomiocitah krolika pri vozdeystvii obshhej vibracii [The blockers of I-type calcium channel support energy metabolism in rabbit cardiomyocytes in exposure of general vibration]. *Russ. J. Physiol.* 96(6), 573–581 (in Russian).
- Vorobieva, V.V., Shabanov, P.D., 2012. Stressirujushhee vozdeystvie lokal'noj vibracii na jenergeticheskij obmen serdca, pecheni i pochki krysa [Stressogenic exposure of local vibration to energetic metabolism of the heart, liver and kidney of rats]. *Russ. J. Physiol.* 98(2), 293–299 (in Russian).
- Ziegler, S., Zöch, C., Gschwandtner, M., Eckhardt, G., Windberger, U., Minar, E., Rüdiger, H., Osterode, W., 2005. Thermoregulation and rheological properties of blood in primary Raynaud's phenomenon and the vibration-induced white-finger syndrome. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78(3), 218–222.

Надійшла до редколегії 21.04.2014



УДК 598.2:591.5 (477.5)

Розмір кладки та успішність розмноження синиці великої (*Parus major*) та блакитної (*P. caeruleus*) у парках м. Харків

А.Б. Чаплигіна, Д.І. Бондарець, Н.О. Савинська

Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди, Харків, Україна

Установлено середній розмір повної кладки синиці великої $8,9 \pm 0,35$ ($n = 61$) та синиці блакитної $9,5 \pm 0,33$ ($n = 12$). У синиці великої більшу частину складають 10- (33,5%) та 9-яйцеві (16,7%) кладки. У синиці блакитної переважають 10-яйцеві (25,0%) кладки у Журавлівському гідропарку та 12-яйцеві (17,5%) – у парку імені М. Горького. Встановлено високу успішність розмноження у синиці великої (85,1%) та блакитної (84,0%). У середньому на одну пару синиці великої із гнізда злітає $5,1 \pm 0,16$ пташенят, у синиці блакитної – $8,5 \pm 0,38$ пташенят. Це свідчить про стабільність урбопопуляції. Протягом існування популяції у синиці великої виявлено залежність зменшення успішності розмноження: у Журавлівському гідропарку у рік розміщення штучних гніздівель із гнізд злітало у середньому $6,7 \pm 0,12$ пташенят на одну пару, упродовж чотирьох років ця величина зменшилась майже удвічі і становила $3,6 \pm 0,15$. У синиці блакитної такої залежності не виявлено. Найпродуктивнішими у синиці великої виявилися кладки третьої декади квітня (89,7%), що у середньому складає $8,9 \pm 0,78$ пташенят на одну пару. Найуспішнішими є 10-яйцеві кладки, частка зльоту пташенят із яких становила 98,3%, що у середньому складає $9,8 \pm 0,18$ на одну пару.

Ключові слова: синиця велика; синиця блакитна; розмір кладки; успішність розмноження; урболандшафт

Clutch size and breeding success of great tit (*Parus major*) and blue tit (*P. caeruleus*) in the parks of Kharkiv city

A. Chaplygina, D. Bondarets, N. Savynskaya

G.S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University, Kharkiv, Ukraine

The analysis of clutch size and breeding success of great tits and blue tits is conducted using 115 nests: 92 great tits and 23 blue tits. Nest boxes for small passerine birds were made in 2009–2013 and placed in the city parks in order to improve their ecological condition. Thus, the experimental plots were established in the Central park of culture and recreation named after M. Gorky in the number of 37 nest boxes in the area of about 5 ha; in the territory of Zhuravlevskiy hydropark in the amount of 30 units on two sites on each of 4 ha and 20 units on an area of 2 ha. 20 nest boxes were placed in the forest park along the central motorway of the city. All the nest boxes were placed by the group method (distance between nest boxes was about 10–15 m) at height to 3 m, and entrance diameter of 3 cm. The front wall in such nest boxes is taken out, thus facilitating their further verification carried out during the period from the first ten-day period of April till the second ten-day period of July up to ten times. It was shown that the average size of the full clutch for great tits amounted to $8,9 \pm 0,35$ ($n = 61$) and for blue tits $9,5 \pm 0,33$ ($n = 12$). The great tits has the largest proportion of 10 (33.5%) and 9 eggs (16.7%) in the clutch. For the blue tits the dominating figure was 10 egg (25.0%) in the clutch of Zhuravlevskiy hydropark and 12 eggs (17.5%) in the clutch in the Gorky park. We determined high success of reproduction for great tits (85.1%) and blue tits (84.0%). On average, per one pair of great tits and blue tits 5.1 ± 0.16 and 8.5 ± 0.38 chicks, respectively, fled the nests. The decreased parameter in breeding success during the existence of an artificial population of great tits was revealed. For example, in Zhuravlevskiy hydropark on average 6.7 ± 0.12 chicks per pair fled the nests during the year of placing the nest boxes. During four years, this value decreased almost by half and amounted to 3.6 ± 0.15 ($P < 0.05$). For blue tits this dependence was not found. The most productive clutches for great tits were clutches of the third ten-day period in April (89.7%), which on average amounted to $8,9 \pm 0,78$ chicks per pair. The most successful were ten egg clutches. Share of takeoff chicks amounted to 98.3%, which on average amounted to $9,8 \pm 0,18$ chicks per pair.

Keywords: great tit; blue tit; clutch size; breeding success; urbanized landscape

Вступ

Кількість нормальних кладок і виводків за сезон розмноження – ознака популяційна, а не видова. У птахів-дуплогнізників існування других і третіх кладок та їх розмір залежать від багатьох факторів, що впливають на розмноження. Основні із цих факторів – строки гніздування популяції та географічне місце розташування, біотоп, щільність та її віковий склад, особливості клімату та погоди (Howe, 1978; Lloyd, 1979; Becker, 1982). Відома залежність внутрішньо- та міжпопуляційної варіабельності строків відкладання та розміру кладки від кліматичних коливань у синиць великої та блакитної (Orell and Ojanen, 1983; Sanz, 2002). Проте іноді дослідники вказують на нездатність синиць адаптувати розмір кладки до умов середовища, в якому вони розмножуються (Dnondt et al., 1990).

Генетична гетерогенність популяції синиці великої є важливим параметром успішності розмноження (Tomiuk et al., 2007), яка може залежати як від особливостей зимового виживання особин (Koivula et al., 1996), так і від наслідків розпадання пар (Orell, 1994). Установлено залежність між сезонністю корму, успішністю розмноження та розміром тіла пташенят синиці блакитної (Dias and Blondel, 1996). Досліджено розмір виводка цієї синиці від наявності генетичних і екологічних складових росту, використовуючи метод гібридного схрещування (Kunz and Ekman, 2000). Позитивно на успішність розмноження впливає мікросередовище з точки зору маскування, підтримки гнізд, топографічного розташування тощо (Newell and Rodewald, 2011). На продуктивність розмноження не суттєво впливає висота гнізда, більш значущим є вік самки, рік гніздування, тип кладки та дата відкладання яєць (Lambrechts et al., 2012). З іншого боку, успішність вилуплення пташенят негативно корелює з термінами сінокошу чи затопленням у низинних луках (Broeyer, 2009).

Відомо про вплив антропогенного шуму на репродуктивні показники птахів, які населяють території, розташовані уздовж основних транспортних зв'язків (автомагістралі, залізничні колії) (Slabbekoorn and Ripmeester, 2008; Barber et al., 2009; Bobylov et al., 2014). Загалом негативний вплив шуму дорожнього руху на птахів залежить від часового та просторового перекривання з відповідними акустичними звуками (Brumm and Slabbekoorn, 2005).

Птахи використовують різні вокалізації протягом доби, проте більшість видів обмежується використанням пісні, яка є важливою для територіальної охорони, для приваблення самок на світанку (Catchpole and Slater, 2008) та оцінки якості самця (Holveck and Riebel, 2009). Перекриття між піснею на світанку та піками активності руху (наприклад, «час пік») можуть бути важливим фактором у з'ясуванні негативного впливу та залежати у першу чергу від пори року, відповідно до довготи та широти місцевості (Wagten et al., 2006). Оцінка залежності рівня шуму від часу – важливий крок до розуміння, коли шум найсильніше перекривається з вокальною активністю птахів (Slabbekoorn and Ripmeester, 2008; Barber et al., 2009). Просторове перекриття найпомітніше для вокалізації птахів на низьких частотах,

у той час як шум дорожнього руху найгучніший на низьких частотах (Pohl et al., 2009), а низькі звуки послаблюються менше з відстанню та щільністю рослинності (Padgham, 2004). Птахи можуть сприймати шумні території як низькоякісні та намагатися уникати таких територій (Slabbekoorn and Ripmeester, 2008).

Підвищення рівня шуму є причиною фізіологічного стресу через зменшення можливостей добувати корм, оскільки здобич важче знайти (Schaub et al., 2008), або тому, що більше часу доводиться витрачати для виявлення хижаків (Quinn et al., 2006). Шум може впливати на зв'язок «батьки – потомство», і дорослі можуть таким чином не бути спроможними задовольняти потреби пташенят (Leonard and Horn, 2008).

Передача шуму вуличного руху залежить від архітектури будівель навколо автомагістралі, від ґрунту та структури рослинності (Vucur, 2006). Шумова амплітуда сильно пов'язана зі швидкістю вуличного руху (Makarewicz and Kokowski, 2007). Розмір кладки, успішність вилуплення та кількість оперених пташенят позитивно корелюють зі швидкістю орієнтації птахів у шумному просторі. Природний добір може безпосередньо впливати на зміни особин у вирішенні проблем продуктивності (Cauchard et al., 2013).

Успішність розмноження та благополуччя можуть знижуватися, але щільність гніздування залишається високою за рахунок компенсації впливу шуму на темпи хижацтва (Francis et al., 2009) чи конкуренції за корм (Slabbekoorn and Halfwerk, 2009). Міжрічна пластичність концентрації кортикостерону у самців була пов'язана з наявністю достатньої кількості корму протягом року (надлишок або нестача) (Ouyang et al., 2013).

На території України синиці як група дуплогнізних птахів детально вивчені на Поділлі (Matveev, 1998). Подібні дослідження не відомі для Харківської області, що дає підстави до подальшого вивчення основних репродуктивних показників в урбанізованому ландшафті у південній межі Лісостепу. Мета наших досліджень – вивчити розмір кладки та успішність розмноження синиці великої та синиці блакитної залежно від екологічних факторів, задля поліпшення умов існування та охорони їх в урболандшафті.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили протягом 2009–2013 років у парках Харкова. Площа зелених масивів міста представлена різними насадженнями, які складають 5200 га, з них 2500 припадає на лісопарк, який є найбільшою лісопарковою зоною України. У 2009–2013 роках ми виготовили штучні гніздові для дрібних горобцеподібних птахів, розвісили у парках і скверах міста з метою поліпшення їх екологічного стану. Таким чином були закладені дослідні ділянки у Центральному парку культури та відпочинку імені М. Горького на території Харківського лісопарку (37 штучних гніздівель на площі близько 5 га), на території Журавлівського гідропарку (по 30 штук на двох ділянках по 4 га кожна та 20 – на ділянці площею 2 га), 20 штучних гніздівель у лісопарку уздовж центральної автомагістралі міста. Всі штучні гніздові розташовані груповим методом (відстань між

гніздівлями 10–15 м), на висоті до 3 м, мали льоток діаметром 3 см. Передня стінка у таких штучних гніздівель виймається, що полегшує у подальшому їх перевірку, яку здійснювали з I декади квітня по II декаду липня до 10 разів.

Знайдено 115 гнізд синиць: 92 великої та 23 блакитної. Визначення строків розмноження птахів проводили за датою відкладання першого яйця. Оцінку репродуктивних показників проводили за такими параметрами: успішність вилуплення (ефективність інкубації), успішність постембріонального гніздового періоду та успішність гніздування (Paevsky, 1985). Успішність вилуплення пташенят визначали за формулою: $n_p/n_e \cdot 100\%$; де n_e – кількість яєць, n_p – кількість пташенят, які вилупились. Успішність постембріонального гніздового періоду визначали за формулою: $n_{p2}/n_{p1} \cdot 100\%$, де n_{p1} – кількість пташенят, які вилупилися, n_{p2} – кількість пташенят, які оперились. Причини загибелі потомства визначені спостереженням за 83 гніздами синиці великої, в яких містилося 585 яєць і 13 гніздами синиці блакитної – 123 яйця на всіх ділянках міста Харкова. Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали з використанням програми Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення

У сезон розмноження синиця велика та синиця блакитна мають один цикл. Повторні кладки виникають у результаті загибелі перших. Розмір кладки може корелювати з датою відкладання яєць, яка опосередковано залежить від рівня шуму. Останній має незалежний негативний вплив на розмір кладки у самок, які відкладали у середньому на 10% менше яєць через градієнт шуму 20 дБ. Рівень шуму має негативний вплив на масу оперених пташенят. Високий рівень шуму у квітні корелює з низькою кількістю оперених пташенят. Розмір кладки може впливати на кількість оперених пташенят. Шум у діапазоні частот близько 2 кГц частково покриває нижню частину пісні великої синиці та має негативний вплив на кількість яєць, відкладених самками (Halfwerk and Slabbekoorn, 2009).

У парках міста повні кладки синиці великої ($n = 83$) становлять від 5 до 13 яєць, у середньому $8,9 \pm 0,35$. Найбільшу частку складають 10- (33,5%) та 9-яйцеві (16,7%) кладки. Аналіз окремо за кожним із парків показав, що в Журавлівському гідропарку також переважають 10- (27,5 %) та 9-яйцеві (15%) кладки. У Лісопарку та парку імені М. Горького знайдено більше 11-яйцевих кладок (по 3,5% на кожній території), 13-яйцеві (2,5%) кладки є винятком і зареєстровані тільки в лісопарку.

Повні кладки синиці блакитної ($n = 13$) становлять від 5 до 14 яєць, у середньому $9,5 \pm 0,33$. Більшу частку містять 10-яйцеві (25,0%) кладки у Журавлівському гідропарку та 12-яйцеві (17,5%) у парку імені М. Горького. У Лісопарку знайдені 12-яйцеві (8,0%) та 14-яйцеві (8,0%) кладки (табл. 1).

На успішність розмноження птахів впливають фактори зовнішнього середовища та внутрішньопопуляційні чинники. До перших можна віднести хижацтво, погодні умови, ресурси корму, строки розмноження, гніздовий паразитизм, до других – ембріональну смертність, вік батьків і сталість пар, щільність популяції та соціально зумовлену смертність пташенят, ступінь розвитку полігамії у популяції та інші особливості шлюбних систем. Під успішністю розмноження розуміють ступінь збереження яєць і пташенят до моменту вильоту із гнізд. На території Парку імені М. Горького та Лісопарку середній показник успішності розмноження синиці великої становить 64,4% ($n = 110$), що складає $5,1 \pm 0,75$ пташенят, які злетіли із гнізда на одну пару птахів; у синиці блакитної – 92,3% ($n = 50$) та $11,5 \pm 0,17$ відповідно. В окремі роки у синиці великої цей показник може змінюватись від 42,3% ($n = 26$, $2,7 \pm 0,47$ на одну пару) у 2012 до 85,7% ($n = 35$, $6,0 \pm 0,62$ на одну пару) у 2013 році (табл. 1, рис.).

На території Журавлівського гідропарку середній показник успішності розмноження синиці великої становить 76,9% ($n = 475$, $5,3 \pm 0,25$ на одну пару птахів), у синиці блакитної – 75,5% ($n = 73$, $6,1 \pm 0,25$ на одну пару птахів, які приступили до розмноження). В окремі роки у синиці великої цей показник може змінюватись від 58,2% ($n = 67$, $3,6 \pm 0,32$ на одну пару) у 2013 до 93,0% ($n = 201$, $6,7 \pm 0,34$ на одну пару) у 2010 році; у синиці блакитної – від 77,8% ($n = 9$, $7,0 \pm 0,43$ на одну пару) у 2013 до 100,0% ($n = 34$, $11,3 \pm 0,08$ на одну пару) у 2010 році (табл. 2).

Успішність розмноження синиць протягом 2010–2013 років на території Харкова висока та стабільна – 85,1% ($n = 552$) у синиці великої та 84,0% ($n = 112$) у синиці блакитної. У середньому на одну пару синиці великої з гнізда злітає $5,1 \pm 0,16$, у синиці блакитної – $8,5 \pm 0,38$ пташенят. Виявлено залежність зменшення успішності розмноження у синиці великої протягом існування штучної популяції: у Журавлівському гідропарку у рік розміщення штучних гніздівель із гнізд злетіло у середньому $6,7 \pm 0,12$ пташенят на одну пару, упродовж чотирьох років ця величина зменшилась майже удвічі – до $3,6 \pm 0,15$ ($P < 0,05$). Для синиці блакитної такої залежності не виявлено (табл. 2).

Таблиця 1

Хронологічна мінливість успішності та продуктивності розмноження ($\bar{x} \pm S_x$) синиці великої та синиці блакитної на території Парку імені М. Горького та Лісопарку, 2011–2013 рр.

Рік	<i>Parus major</i>						<i>P. caeruleus</i>					
	n	середній розмір кладки	вилупилось пташенят		вилетіло пташенят		n	середній розмір кладки	вилупилось пташенят		вилетіло пташенят	
			%	у середньому на одну пару	%	у середньому на одну пару			%	у середньому на одну пару	%	у середньому на одну пару
2011	5	$9,8 \pm 0,35$	73,5	$7,2 \pm 0,50$	65,3	$6,4 \pm 0,42$	1	12,0	100,0	12,0	100,0	12,0
2012	4	$6,5 \pm 0,23$	61,5	$4,0 \pm 0,45$	42,3	$2,7 \pm 0,47$	1	12,0	100,0	12,0	100,0	12,0
2013	5	$7,0 \pm 0,40$	85,7	$6,0 \pm 0,35$	85,7	$6,0 \pm 0,62$	2	13,0	76,9	10,0	76,9	10,0
Разом	14	110	73,6	$5,8 \pm 0,80$	64,4	$5,1 \pm 0,75$	4	$12,5 \pm 0,30$	92,3	$11,5 \pm 0,25$	92,3	$11,5 \pm 0,25$

Таблиця 2

Хронологічна мінливість успішності та продуктивності розмноження ($\bar{x} \pm S_x$) синиці великої та синиці блакитної на території Журавлівського гідропарку, 2010–2013 рр.

Рік	<i>Parus major</i>						<i>P. caeruleus</i>					
	n	середній розмір кладки	вилупилося пташенят		вилетіло пташенят		n	середній розмір кладки	вилупилося пташенят		вилетіло пташенят	
			%	у середньому на одну пару	%	у середньому на одну пару			%	у середньому на одну пару	%	у середньому на одну пару
2010	28	7,2 ± 0,54	93,03	6,7 ± 0,34	93,03	6,7 ± 0,34	3	11,3	100,0	11,0	100,0	11,3
2011	20	7,5 ± 0,37	83,9	6,3 ± 0,75	83,9	6,3 ± 0,75	2	5,0	80,0	4,0	80,0	4,0
2012	10	5,8 ± 0,45	72,4	4,2 ± 0,67	72,4	4,2 ± 0,67	3	6,7	45,0	3,0	45,0	3,0
2013	11	6,1 ± 0,39	80,6	4,9 ± 0,32	58,2	3,6 ± 0,32	1	9,0	77,8	7,0	77,8	7,0
Разом	69	6,9 ± 0,65	82,5	5,7 ± 0,25	76,9	5,3 ± 0,25	9	8,1 ± 0,18	75,7	6,1 ± 0,25	75,7	6,1 ± 0,25

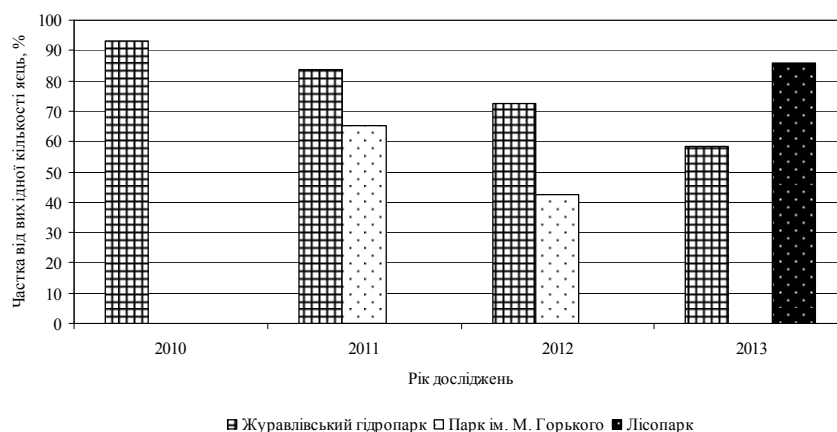


Рис. Хронологічна мінливість успішності розмноження синиці великої на території м. Харків, 2010–2013 рр.

Продуктивність розмноження синиці великої упродовж репродуктивного періоду змінюється за рахунок початку яйцевідкладання, кормових умов і піку розмноження хижаків. В особин із високою вихідною концентрацією кортикостерону на початку розмноження у березні була найвища кількість вилуплених пташенят на рік; у травні особини з низьким рівнем кортикостерону мали найвищу успішність розмноження. Крім цього, особини, які відображають сильну сезонну пластичність в основній лінії концентрації кортикостерону (висока у березні та низька у травні), мають найвищу успішність розмноження кожного року (Ouyang et al., 2013).

На території парків Харкова у синиці великої продуктивними виявилися кладки третьої декади квітня – 89,7% ($n = 40$, $8,9 \pm 0,78$ пташенят на одну пару). Високий показник розмноження синиці великої у першій та другій декадах червня вважали за виняток через незначну вибірку (табл. 3). У випадку біциклічного гніздування синиці великої в Анталії (північна Туреччина) середня

кількість оперених пташенят у парі достовірно вища у перших виводках ($P < 0,05$). Однакове співвідношення у виводку самців і самок ($0,53 / 0,47$), є результатом збалансованого статевого співвідношення, яке передбачає стабільну структуру популяції (Bekir and Tamer, 2012).

Кладки з оптимальним розміром забезпечують оптимальний рівень успішності (Lack, 1968). Аналіз успішності розмноження синиці великої від розміру кладки на територіях парків Харкова показав, що найпродуктивнішими були 10-йцеві кладки. Частка пташенят, які залишили гнізда становила 98,3% ($9,8 \pm 0,18$ на одну пару). В окремі роки частка пташенят, які залишили гнізда була 76,7% при розмірі у п'ять яєць ($3,8 \pm 0,17$ пташенят). При 100% успішності розмноження 6-йцевих кладок пташенят злітало також значно менше, ніж при 10-йцевих кладках. 13-йцеві кладки були малочисельними, тому ми їх не враховували (табл. 4).

Таблиця 3

Успішність розмноження синиці великої ($\bar{x} \pm S_x$) залежно від строків яйцевідкладання на території парків Харкова, 2010–2013 рр.

Строки початку відкладання яєць	Кількість		Вилупилося пташенят		Вилетіло пташенят	
			частка від вихідного числа яєць, %	у середньому на одну пару	частка від вихідного числа яєць, %	у середньому на одну пару
	кладок	яєць у гніздах				
21.04–30.04	40	397	93,5	$9,3 \pm 0,56$	89,7	$8,9 \pm 0,78$
01.05–10.05	8	71	76,1	$6,8 \pm 0,45$	69,0	$6,1 \pm 0,57$
11.05–20.05	5	29	75,9	$4,4 \pm 0,60$	62,1	$3,6 \pm 0,45$
21.05–31.05	6	40	67,5	$4,4 \pm 0,33$	67,5	$4,4 \pm 0,33$
01.06–11.06	1	10	100,0	10,0	100,0	10,0
11.06–20.06	1	5	100,0	5,0	100,0	5,0

Успішність розмноження синиці великої ($x \pm S_x$) залежно від розміру кладки на території парків Харкова, 2010–2013 рр.

Розмір кладки	Кількість		Вилупилося пташенят		Вилетіло пташенят	
	кладок	яєць у гніздах	частка від відкладених яєць, %	у середньому на одну пару	частка від відкладених яєць, %	у середньому на одну пару
5	6	30	92,0	$4,6 \pm 0,22$	76,7	$3,8 \pm 0,18$
6	5	30	100,0	$6,0 \pm 0,23$	100,0	$6,0 \pm 0,23$
7	4	28	81,0	$5,7 \pm 0,34$	60,7	$4,2 \pm 0,28$
8	6	48	91,7	$7,3 \pm 0,45$	91,7	$7,3 \pm 0,45$
9	10	90	85,6	$7,7 \pm 0,33$	85,6	$7,7 \pm 0,33$
10	18	180	98,3	$9,8 \pm 0,22$	98,3	$9,8 \pm 0,22$
11	7	77	78,8	$8,7 \pm 0,36$	78,8	$8,7 \pm 0,36$
12	4	48	91,7	$11,0 \pm 0,35$	72,2	$8,7 \pm 0,18$
13	1	13	92,3	12,0	92,3	12,0

Загалом закритогніздні види птахів мають високу частку успішності розмноження, бо гніздо розміщене у захищеному просторі. Успішність розмноження синиць великої та блакитної, як і інших дуплогніздних птахів, гнізда яких захищені від хижаків і впливу несприятливих абіотичних факторів, стабільно висока в усіх парках міста. Безумовно, оцінюючи успішність розмноження, не можна виключати впливу антропогенного шуму (Slabbekoorn and Ripmeester, 2008), оскільки більшість підданих впливу шуму територій розташовані уздовж основних транспортних автомагістралей (Barber et al., 2009). Таким чином, стабільність структури популяцій синиць в урболандшафті забезпечується збалансованим статевим співвідношенням особин (Bekir and Tamer, 2012) з високими показниками продуктивності відкладання яєць та успішності розмноження.

Висновки

У парках міста повні кладки синиць великої та блакитної у середньому становлять $8,9 \pm 0,35$ та $9,5 \pm 0,33$ відповідно. У синиці великої найбільшу частку складають 10- (33,5%) та 9-яйцеві (16,7%) кладки. У синиці блакитної переважають 10-яйцеві (25,0%) кладки в Журавлівському гідропарку та 12-яйцеві (17,5%) – у парку імені М. Горького. Середній показник успішності розмноження на території міста складає 85,1% у синиці великої та 84,0% у синиці блакитної. У середньому на одну пару із гнізда злітає $5,1 \pm 0,16$ у синиці великої та $8,5 \pm 0,38$ пташенят у синиці блакитної.

Протягом існування популяції синиці великої виявлене зменшення успішності розмноження: у Журавлівському гідропарку у рік розміщення штучних гніздівель із гнізд злетіло у середньому $6,7 \pm 0,12$ пташенят на одну пару, упродовж чотирьох років ця величина достовірно зменшилась майже удвічі – $3,6 \pm 0,15$ ($P < 0,05$). У синиці блакитної такої залежності не виявлено. Найпродуктивнішими у синиці великої виявилися кладки третьої декади квітня – 89,7% ($8,9 \pm 0,78$ пташенят на одну пару). Найуспішнішими є 10-яйцеві кладки, частка зльоту пташенят для яких становила 98,3% ($9,8 \pm 0,18$ на одну пару).

Бібліографічні посилання

- Barber, J.R., Crooks, K.R., Fristrup, K.M., 2009. The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends Ecol. Evol.* 25, 180–189.
- Becker, P.H., Erdelen, M., 1982. Distribution of herring gull egg size and nest density in the mellum-colony in relation to vegetation height. Moscow, *Abst. of Symposia and Poster Presentation*.
- Bekir, K., Tamer, A., 2012. Offspring sex ratios and breeding success of a population of the great tit, *Parus major*. *Zool. Middle East* 57, 27–34.
- Bobyliov, Y.P., Brygadyrenko, V.V., Bulakhov, V.L., Gaichenko, V.A., Gasso, V.Y., Didukh, Y.P., Ivashov, A.V., Kucheriavyy, V.P., Maliovanyi, M.S., Mytsyk, L.P., Pakhomov, O.Y., Tsaryk, I.V., Shabanov, D.A., 2014. *Ecology. Folio, Kharkiv (in Ukrainian)*.
- Broyer, J., 2009. Whibchat *Saxicola rubetra* reproductive success according to hay cutting schedule and meadow passerine density in alluvial and upland meadows in France. *J. Nat. Conserv.* 17, 160–167.
- Brumm, H., Slabbekoorn, H., 2005. Acoustic communication in noise. *Adv. Stud. Behav.* 35, 151–209.
- Bucur, V., 2006. *Urban forest acoustics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Catchpole, C.K., Slater, P.J.B., 2008. *Bird song: Biological themes and variations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cauchard, L., Boogert, N.J., Lefebvre, L., Dubois, F., Doligez, B., 2013. Problem-solving performance is correlated with reproductive success in a wild bird population. *Anim. Behav.* 85, 19–26.
- Dias, P.C., Blondel, J., 1996. Breeding time, food supply and fitness components of blue tits *Parus caeruleus* in Mediterranean habitats. *Ibis* 138, 644–649.
- Dnondt, A., Adriaensen, F., Matthysen, E., Kempenaers, B., 1990. Nonadaptive clutch sizes in tits. *Nature* 348, 723–725.
- Francis, C.D., Ortega, C.P., Cruz, A., 2009. Cumulative consequences of noise pollution: Noise changes avian communities and species interactions. *Curr. Biol.* 19, 1415–1419.
- Halfwerk, W.A., Slabbekoorn, H., 2009. A behavioural mechanism explaining noise-dependent frequency use in urban birdsong. *Anim. Behav.* 78, 1301–1307.
- Holveck, M.J., Riebel, K., 2009. Low-quality females prefer low-quality males when choosing a mate. *Proc. R. Soc. (Biol.)* 277, 153–160.
- Howe, H.F., 1978. Initial investment, clutch size? And brood reduction in the common grackle. *Ecology* 59, 1109–1122.

- Koivula, K., Orell, M., Rytönen, S., 1996. Winter survival and breeding success of dominant and subordinate willow tits *Parus montanus*. *Ibis* 138, 624–629.
- Kunz, E., 2000. Genetic and environmental components of growth in nestling blue tits (*Parus caeruleus*). *J. Evol. Biol.* 13, 199–212.
- Lambrechts, M.M., Aime, C., Midamegbe, A., Galan, M.J., Perret, P., Gregoire, A., Doutrelant, C., 2012. Nest size and breeding success in first and replacement clutches: An experimental study in blue tits *Cyanistes caeruleus*. *J. Ornithol.* 153, 173–179.
- Leonard, M.L., Horn, A.G., 2008. Does ambient noise affect growth and begging call structure in nestling birds? *Behav. Ecol.* 19, 502–507.
- Lloyd, C.S., 1979. Factors affecting breeding of razorbills *Alca torda* on Skokholm. *Ibis* 121, 165–176.
- Makarewicz, R., Kokowski, P., 2007. Prediction of noise changes due to traffic speed control. *J. Acoust. Soc. Am.* 122, 2074–2081.
- Matveev, M.D., 1998. Ptahy rodyni synycevi (Paridae) v umovah Podillja (struktura populacij, biologija rozmnozhenja, mizhvydovi vz'jazky) [The birds of family tits (Paridae) under conditions of Podolia (structure of populations, peculiarities of reproduction, species relations)]. Avtoreferat of dissertation for the degree of candidate of biological sciences: 03.00.08, Zoology. Kyiv (in Ukrainian).
- Newell, F.L., Rodewald, A.D., 2011. Role of topography, canopy structure, and floristics in nest-site selection and nesting success of canopy songbirds. *Forest Ecol. Manag.* 262, 739–749.
- Orell, M., Rytönen, S., Koivula, K., 1994. Causes of divorce in the monogamous willow tit, *Parus montanus*, and consequences for reproductive success. *Anim. Behav.* 48, 1143–1154.
- Orell, M., Ojanen, M., 1983. Effect of habitat, date of laying and density on clutch size of the great tit *Parus major* in northern Finland. *Ecography* 6, 413–423.
- Ouyang, J.Q., Sharp, P., Quetting, M., Hau, M., 2013. Endocrine phenotype, reproductive success and survival in the great tit, *Parus major*. *J. Evol. Biol.* 26, 1988–1998.
- Padgham, M., 2004. Reverberation and frequency attenuation in forests – implications for acoustic communication in animals. *J. Acoust. Soc. Am.* 115, 402–410.
- Paevsky, V.A., 1985. Demografija ptic [Demography of birds]. Nauka, Leningrad (in Russian).
- Pohl, N.U., Slabbekoorn, H., Klump, G.M., Langemann, U., 2009. Effects of signal features and environmental noise on signal detection in the great tit, *Parus major*. *Anim. Behav.* 78, 1293–1300.
- Quinn, J.L., Whittingham, M.J., Butler, S.J., Cresswell, W., 2006. Noise, predation risk compensation and vigilance in the chaffinch *Fringilla coelebs*. *J. Avian Biol.* 37, 601–608.
- Sanz, J.J., 2002. Climate change and breeding parameters of great and blue tits throughout the western Palaearctic. *Global Change Biol.* 8, 409–422.
- Schaub, A., Ostwald, J., Siemers, B.M., 2008. Foraging bats avoid noise. *J. Exp. Biol.* 211, 3174–3180.
- Slabbekoorn, H., Halfwerk, W., 2009. Behavioural ecology: Noise annoys at community level. *Curr. Biol.* 19, 693–695.
- Slabbekoorn, H., Ripmeester, E.A.P., 2008. Birdsong and anthropogenic noise: Implications and applications for conservation. *Mol. Ecol.* 17, 72–83.
- Tomiuk, J., Stauss, M., Segelbacher, G., Fietz, J., Kömpf, J., Bachmann, L., 2007. Female genetic heterogeneity affects the reproduction of great tits (*Parus major* L., 1758) in low-quality woodlands. *J. Zool. Sys. Evol. Res.* 45, 144–150.
- Warren, P.S., Katti, M., Ermann, M., Brazel, A., 2006. Urban bioacoustics: It's not just noise. *Anim. Behav.* 71, 491–502.

Надійшла до редколегії 25.04.2014



UDC 904: 598.2+639

Birds from the Old East Slavic settlement “Igren 8” (12th–13th century AD; Ukraine)

L.V. Gorobets¹, I.V. Matlaev²

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

²National Museum of Natural History at the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The work presents the results of the analysis of a species diversity of the Old East Slavic settlement “Igren 8” (Dnipropetrovsk, Ukraine). The settlement occupied the area of nearly 15 ha which was relatively large for this region. In Medieval period around the mouths of tributaries to the delta of the Dnieper dense forests were located, although the region is located in the south forest-steppe zone and the steppe zone. The majority of hunted birds belong to the group Anatidae (at least 72% of the minimum possible number of individuals). Poultry played the minor role in the diet of the residents of the medieval settlement “Igren 8”. We have drawn the conclusion about birds from “Igren 8” inhabiting water with thickets of the hygrophite vegetation on the periphery. Nowadays, there are many embryophytes such as *Phragmites australis*, *Typha* spp., *Glyceria maxima*, *Acorus calamus* and others in these places. Hygrophytes covering of reservoirs is typically less than 20%.

Keywords: avifauna; game bird; archeornitology; Medieval; Old Rus'

Птахи з давньослов'янського поселення «Ігрен 8» (XII–XIII ст. н.е.)

Л.В. Горобець¹, І.В. Матлаєв²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

²Національний науково-природничий музей Національної академії наук України, Київ, Україна

Ігрен 8 – унікальна археологічна пам'ятка. Культурні шари містять сліди перебування людини в даному місцезнаходженні з неоліту до монгольської навали. Люди населяють територію і сьогодні, вона входить у межі сучасного м. Дніпропетровськ. Місцезнаходження неодноразово згадане в археологічній (у тому числі археозоологічній) науковій літературі. Проте птахи з культурних шарів майже не описані (крім одноразової згадки про дрохву (*Otis tarda*)). У статті наведено результати дослідження видового різноманіття птахів із давньоруського поселення Ігрен (XII – початок XIII ст.). Згідно з результатами інших досліджень, жителі поселення споживали переважно домашні види ссавців, мисливська здобич становила меншу частку в раціоні. Із птахами ситуація протилежна. Лише 15% мінімально можливої кількості особин належало домашній курці, ще одна кістка гусці, можливо, домашній. Висока частка мисливських видів птахів вирізняє Ігрен з-поміж більшості інших давньоруських поселень тих часів. Переважна більшість кісток птахів належить диким видам качок. Видове різноманіття близьке до сучасного різноманіття качок на Дніпропетровщині, проте чирянка велика (*Anas querquedula*), яка на початку XX ст. була одним із наймасовіших видів у матеріалах про Ігрен, не є масовою в середньовічних рештках. Аналіз видового різноманіття вказує, що в околицях поселення в часи пізнього Середньовіччя були типовими водойми із заростями гідрофітної рослинності по периферії. Невелика кількість решток гусей дає підстави припускати відсутність у гирлі р. Самара заплавлених лук. Також аналіз видового складу дає підстави вважати, що більшість птахів було впольовано під час міграційних прольотів. Відмічено відсутність сірого журавля (*Grus grus*), рештки якого наявні в переважній більшості середньовічних поселень Київської Русі. Як і в більшості поселень, відсутня лиска (*Fulica atra*), яка в наші дні посідає друге місце за кількістю добутих на полюванні птахів. Відсутність решток хижих птахів пояснюємо тим, що Ігрен населяли представники незаможних класів, що підтверджено археологічними даними. Результати промірів кісток домашньої курки вказують, що у поселенні мешкали птахи помітно крупніші, ніж у решті давньоруських поселень, розташованих у лісостеповій зоні. Ймовірно домашні кури в Ігрен були завезені з інших регіонів Східної Європи. Відсутність у знахідках решток молодих курчат дає підстави припускати, що у поселенні не розводили курей, а привозили.

Ключові слова: авіафауна; дичина; археорнітологія; Середньовіччя; Давня Русь

Introduction

The Middle Ages on the territory of Ukraine was a time of increasing role of pets, including birds, in the people's nutrition. Busting of the new areas and reduction of forests have led to decrease in the variety of wild fowl (Brjuzgina, 1975). Birds of medieval settlements of Ukraine were investigated less than those of the Ancient or the Paleolithic. Some information about the birds from 42 locations is given in articles by Umanskaja (e.g. Umanskaja, 1962, 1965; Brjuzgina (Umanskaja), 1975). However, it is known that there are more numbers of known medieval settlements, but archaeo-zoological researches are limited in research of mammals. Such unequal efforts in studying are inherent for archaeo-zoology (Corona, 2010).

The South Dnieper had favorable natural and geographical conditions and attracted different tribes for a long time. Archaeological locations on the Igren's peninsula (Dnipropetrovsk, Ukraine) (48°28'38" N, 35°11'33" E) have been known since 1927. Mesolithic location "Igren 8" was studied particularly well (Telegin, 1982). However, traces of human stay in the Neolithic and the Middle Ages are also found in this location. In this article, we consider the birds of the medieval settlement in "Igren 8".

The most of medieval settlements in the southern Dnieper are located near the mouths of small tributaries of the Dnieper river. Here there are plenty of fertile alluvial soils, making the territory favorable for agriculture (Uspenskaja and Fehner, 1956). Specifically, Igren is located at the confluence of the Samara River. Around the mouths of tributaries to the Delta of the Dnieper dense forests were located (Dokuchaev, 1949), although the region is located in the south forest-steppe zone and the steppe zone. Like the most of medieval settlements, Dnieper Igren 8 was based on the island protecting it from attacks. It was important place for river crossing. The remains of pottery indicate that people lived here in the 12th – early 13th century. After the Mongol invasion the settlements disappeared (Kozlovsk'kyj, 1992).

Characteristics of the settlement are presented by A.O. Kozlovsk'kyj (Kozlovsk'kyj, 1992). The settlement occupied the area of nearly 15 hectares which was relatively large for this region. For this settlement irregular construction is inherent, and location of homes depended on microrelief. Six homes were excavated. All of them have the shape of a square or rectangle with the area from 9 to 37 m². The ethnic composition is: Slavs, who moved to the Middle Dnieper, descendants of Uliches, Alan-Bulgarians, may be Kumans. Four graves were found, all of them with the observance of the Christian ceremony. Agricultural and woodworking tools, household items and fishing gear dominated among the instruments of labor. There are small number of weapons (mainly arrowheads, one spear), instruments for hunting, including billet to the duck call.

As in the other settlements, there are many fish scales in the cultural layers of "Igren 8". Among the animals determined there were ox (980 bones, belonging to 33 individuals), sheep (181 bones, 35 individuals), goat (4 bones), lamb or goat (432 bones, 22 individuals), pig (115 bones, 23 individuals), horse (13 bones, 3 individuals), dog (8 bone, 1 individuals), hare (9 bones, 2 individuals), fox (4 bones, 2 individuals), bear (1 bone, 1 individuals), wild pig (3 bones 2

individuals), roedeer (8 bones, 3 individuals), red deer (2 bones, 1 individuals). Besides, 23 bones of birds are mentioned, among which bustards (*Otis tarda*) are defined. Therefore, the species composition indicates that pets dominated in the diet. Horse meat was consumed a little, obviously the horses were used to drive and work.

Material and methods

The reference comparative skeletal collection of NMNH Paleontology department was used to determine the bones. Also "A key for the identification of domestic bird bones in Europe" (Tomek and Bochenski, 2009) was used. Total 170 fragments of birds bones, of which 106 could be determined (Table 1). The bones are deposited in the National Museum of Natural History at the National Academy of Sciences of Ukraine (Nos. AZ 480-586).

Results and discussion

The sample is small (72 bones of game birds, 27 individuals) and doesn't represent the whole species diversity hunted by Igren people. Most likely, these species were common in this region. We'll compare the data from Igren with the modern data of these species' distribution in Dnipropetrovsk region (Bulahov et al., 2008).

Mallard (*Anas platyrhynchos*), northern shoveller (*Anas clypeata*), gadwall (*Anas strepera*), common teal (*Anas crecca*), common pochard (*Aythya ferina*), purple heron (*Ardea purpurea*) are common breeding species nowadays.

Common shelduck (*Tadorna tadorna*), widgeon (*Anas penelope*), smew (*Mergellus albellus*) are common migratory species nowadays.

Garganey (*Anas querquedula*) are regularly breeding, sometimes wintering nowadays.

Pintail (*Anas acuta*) are regularly migratory, sometimes breeding nowadays.

Greater scaup (*Aythya marila*), tufted duck (*A. fuligula*) are migratory, sometimes wintering species.

Grey partridge (*Perdix perdix*), rook (*Corvus frugilegus*) are present all year around.

This data shows that the majority of these species were hunted during the migration.

The vast majority of bird bones found in the medieval layers of "Igren 8" belonged to wild species of ducks. Species diversity of ducks is higher than, for example, in Medieval sites in Brussels (Belgium) (Thys and Van Neer, 2010), Oltina (Romania) (Gal, 2005), Kołobrzeg (Poland) (Makowiecki and Gotfredsen, 2002), but is comparable with diversity in Polissya: StrugaII (Belorussia) (Zelenkov, 2008) and Stadnyky (Gorobets, Bondarchuk and Zarutskaja, in print). Probably, it is connected with the location of Igren on Dnieper river, being an important migration way. Possibly Polissya marshes played significant role in the duck migrations.

Moreover, domesticated forms were not found among them. Only 16% of bones (15% of the minimum possible number of individuals) belonged to hen. It is a pretty low number. Number of poultry accounted for more than 50% in the most famous medieval Slavonic settlements (Brjuzgina,

1975). This result is also not consistent with the results of the study of species diversity of mammals. As mentioned earlier, the majority of residues of mammalian in the settlement belonged to home species, and only a small number belonged to wild species. So, the conclusion of A. Kozlovskyj about the low part of hunting species in the diet of the residents of the settlement Igren 8 is true only in relation to mammals. In the case of birds, the situation is the opposite, i.e. the vast majority of species were hunted.

Comparison of the Igren ducks with modern duck diversity in Dnipropetrovsk region shows that they are very much alike. Only common goldeneye (*Bucephala clangula*), some rare wintering species (*Oxyura leucocephala*, *Melanitta nigra*, *Melanitta fusca*, *Clangula hyemalis*), fish-eating (meat from these birds have bad taste) goosander (*Mergus merganser*) and red-breasted merganser (*Mergus serrator*) are not found at Igren.

Table 1

Species diversity of birds of the settlement "Igren 8"

Species	Proximal phalanges dig. majoris	Carpometacarpus	Ulna	Radius	Humerus	Coracoideum	Scapula	Furcula	Femur	Tibiotarsus	Tarsometatarsus	Total number of bones	Minimal number of individuals	Percentage of the total number of individuals
<i>Anser anser</i> (L., 1758)	–	–	–	–	2	1	–	–	–	–	–	3	1	3
<i>Tadorna tadorna</i> (L., 1758)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	1	2	1	3
<i>Anas platyrhynchos</i> L., 1758	3	3	1	–	4	9	3	2	–	1	–	26	6	18
<i>A. acuta</i> L., 1758	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	2	2	6
<i>A. chyeata</i> L., 1758	–	–	1	–	3	3	–	–	–	–	–	7	3	9
<i>A. penelope</i> L., 1758	–	–	2	–	4	5	–	–	–	–	–	11	4	12
<i>A. crecca</i> L., 1758	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1	1	3
<i>A. strepera</i> L., 1758	–	–	–	–	1	1	–	–	–	–	–	2	1	3
<i>A.s querquedula</i> L., 1758	–	–	1	–	1	1	–	–	–	1	–	4	1	3
<i>Aythya ferina</i> (L., 1758)	–	–	–	1	2	3	–	–	–	1	–	7	2	6
<i>A. marila</i> (L., 1761)	–	–	–	–	–	1	–	–	1	–	–	2	1	3
<i>A. fuligula</i> (L., 1758)	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1	1	3
<i>Mergus albellus</i> (L., 1758)	–	1	–	–	1	2	–	–	–	–	–	4	1	3
<i>Ardea purpurea</i> (L., 1766)	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	1	1	3
<i>Perdix perdix</i> (L., 1758)	–	–	–	–	1	1	–	–	–	–	–	2	1	3
<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (L., 1758)	–	–	2	1	5	1	–	–	4	3	1	17	5	15
<i>Corvus frugilegus</i> L., 1758	–	–	1	–	–	1	–	–	–	–	–	2	1	3

At the beginning of the XX century garganey (*Anas querquedula*) represented very numerous species on the territory of Dnipropetrovsk region. During the century its number decreased, because of action of the anthropogenic factors (Bulahov et al., 2008). Nevertheless, the number of Garganey bones from Igren in the 12th century is not larger compared with other ducks bones. Possibly, there were population waves.

Archaeo-zoological data supports the fact that ecological characteristics of birds did not change during the ages. Knowing the properties of the birds of our time, one may draw the conclusion regarding the biological character of the earlier environments (Gal, 2005). Over 45% of individuals belonged to species: *Anas platyrhynchos*, *A. penelope*, *A. crecca*, *A. chyeata* and *A. querquedula*. These ducks prefer open pond or open water with dense riparian vegetation. However, open ponds are also preferred by geese, especially greater white-fronted goose (*Anser albifrons*). In "Igren 8" the remains of only one goose (probably domestic) were found. May be, this bird from "Igren 8" inhabited another type of biotopes: water with thickets of the hygrophite vegetation on the periphery. It is confirmed by the fact that among the preys the birds from genus *Aythya* also enjoying this type of biotope, are available. Nowadays, there are many such embryophytes as *Phragmites australis*, *Typha* spp.,

Glyceria maxima, *Acorus calamus* and others in these places. Hygrophytes covering of reservoirs is typically less than 20% (Davydenko, 2007).

A small number of remains of geese provide reasons for assuming the lack of suitable habitat for these birds. Today, *Anser anser* in steppe zone of Ukraine prefers bottomland meadows near the river valleys. This species is a typical hunting prey, but probably in the 12th and 13th centuries this type of habitat was not present at the mouth of Samara river.

Now there are numerous eurasian coot (*Fulica atra*) (Davydenko, 2007) on such type of water bodies. Bones of this species are absent not only in "Igren 8", but in general they are rare among the bones found at the human habitation places (based on our data analysis of NMNH exhibits). Perhaps, this species in the past was much less widespread or not considered hunting prey. However, eurasian coot bones were not present in the majority of middle age East Slavonic settlements, whereas common crane (*Grus grus*) bones were found in many of them (our data). In some settlements it was the most numerous bird after the hen. For example, in Voi'n' (not far from Zheld') it made 12,5% of the number of individuals (Umanskaja, 1965).

Corvids bones are often considered as the remains of uneatable birds (e.g. Serjeantson, 2006). But it is known that in the Medieval period they were eaten in France (Clavel,

2001). Tereza Tomek regards coots as not a hunting prey. She suggests that birds with black plumage were killed with some ritual purpose (Tomek and Guminski, 2003). Perhaps for the same reasons the rook (*Corvus frugilegus*) was killed which bones are also available in the settlement. This as-

sumption can be confirmed by the fact, that in the Old Russian settlement Zheld' (10th – 12th AD) (200 km from Igren) the skeleton of crow covered with the vessel was found buried indoors in the house floor (our data; deposited in NNPM, bones Nos. AZ 1389-1407).

Table 2

Humerus distal width of *Gallus gallus domestica* (measurements are in millimeters)

Region		Age	min	max	mean	n
Mixed forest zone	Locations of the north-western part of the zone: Grodno, Lukoml' (our data)	11 th – 13 th century AD	13,1	15,7	14,5	13
	Locations of the northern part of the zone: Novgorod (our data)	10 th – 12 th century AD	12,8	16,9	15,0	20
	Locations of the southern part of the zone: Korolenko, Kodjashne, Kyiv, Rajki, Shchuchynka, Vyshgorod (our data)	10 th – 13 th century AD	13,6	15,2	14,5	14
	Ukraine Medieval site (Umanskaja, 1972)	Medieval	13,0	18,0	15,6	25
Forest-steppe zone	"Igren-8" (our data)	12 th – 13 th century AD	14,0	16,0	15,1	5
	Locations: Knjazha Hora, Donetske horodyshe, Ivan-Hora (our data)	11 th – 13 th century AD	13,4	14,7	13,7	6
	Ukraine Medieval site (Umanskaja, 1972)	Medieval	11,0	17,4	14,3	38
Steppe zone	Chersoneses (Korsun') (our data)	11 th – 12 th century AD	12,6	14,0	13,5	5
	Ukraine Medieval site (Umanskaja, 1972)	Medieval	13,7	16,8	15,4	8
Ukraine (recent outbred hen) (Umanskaja, 1972)		20 th century AD	13,4	17,0	15,0	44

Birds of prey are not found in Igren. Probably, hunting birds were rare in settlement where rich people were not found. Igren hen sizes were similar to modern outbred hen sizes (table 2). They were bigger than other hens from medieval east Slavonic settlements of the forest-steppe zone. May be, these hens were similar to those which were kept in other regions. Possibly hens were brought to Igren, but not grown there, because immature chickens were not found on this site, whereas the presence of chickens indicates that they were grown by local people (Thys and Van Neer, 2010).

Conclusions

Poultry played the minor role in the diet of residents of the medieval settlements "Igren 8" (about 15% of residues belong to hen. Maybe, there was also domestic goose). Hunting was carried out during migrations. Most of residues belonged to the ducks of genus *Anas*, in fewer to genus *Aythya*. These species prefer ponds with thickets of hygrophite vegetation on the periphery. Perhaps, it is the type of biotope which was the primary bird hunting ground. A small number of residues of geese is the evidence of the lack of floodplain meadows in the mouth of Samara river.

References

Brjuzgina (Umanskaja), A.S., 1975. Pozdneantropogenovye pticy Ukrainy i smezhnyh territorij (preimushhestvenno po materialam iz arheologicheskikh pamjatnikov) [Late anthropogenic birds Ukraine and adjacent territories (mainly on material from archaeological sites)]. Dissertation for the candidate biological sciences degree. Kyiv (in Russian).
 Bulahov, V.L., Gubkin, A.A., Ponomarenko, O.L., Pahomov, O.J., 2008. Biologichne riznomanittja Ukrai'ny. Dnipropetrov'ska oblast'. Ptahy: Negorobcepodibni (Aves; Nonpasseriformes) [Biological diversity of Ukraine. Dnipropetrovsk Region. Birds: Non passerine (Aves; Nonpasseriformes)]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).

Clavel, B., 2001. L'animal dans l'alimentation médiévale et moderne en France du Nord (XIII^e – XVII^e siècles) [The animal in medieval and modern diet in northern France (13th–17th centuries)]. Revue Archéologique de Picardie 19, 9–204 (in French).
 Corona, E.M., 2010. Some notes on the history of Archaeornithology. Groningen Archaeological Studies 12, 277–284.
 Davydenko, I.V., 2007. Suchasnyj sklad ta rozpodil myslivs'kyh vydiv ptahiv u vodno-bolotnyh ugoddjah Polissja ta Lisostepu Ukrai'ny [Recent structure and distribution of the game birds fauna in the wetlands of forest and forest-steppe zones in Ukraine]. Lisove ta myslivs'ke gospodarstvo: Suchasnyj stan ta perspektyvy rozvytku. Proc. Int. Conf. Zhytomyr, 151–155 (in Ukrainian).
 Dokuchaev, V.I., 1949. Nashi stepi prezhde i teper' [Our steppes before and now]. Sel'hozgiz, Moscow, Leningrad (in Russian).
 Gal, E., 2005. The role of archaeo-ornithology in environmental and animal history. Selected papers from the joint Archaeolinguistics-EPOCH workshop "Archaeological and Cultural Heritage Preservation within the Light of New Technologies", Százhalombatta, 49–62.
 Gal, E., Stanc, S.M., Bejenaru, L., 2010. Bird remains from the 10th–11th century settlement of Olina (Dobruja, Romania). Groningen Archaeological Studies 12, 38–44.
 Gorobets, L.V., Bondarchuk, A.A., Zarutskaja, V.V., 2014. Birds from the Old East Slavic settlement Stadnyky (11th century AD). Pryroda Zahidnogo Polissja ta Pryleglyh Terytorij (in print).
 Kozlov's'kyj, A.O., 1992. Istoryko-kul'turnyj rozvytok Pivden-nogo Podniprov'ja v IX–XIV st. [Historical and cultural development in the southern Dnieper IX–XIV centuries]. Naukova Dumka, Kyiv (in Ukrainian).
 Makowiecki, D., Gotfredsen, A.B., 2002. Bird remains of Medieval and Post-Medieval coastal sites at the Southern Baltic Sea, Poland. Acta Zool. Cracov. 45, 65–84.
 Serjeantson, D., 2006. Birds: Food and mark of status. In: C.M. Woolgar, D. Serjeantson, T. Waldron (eds), Food in medieval England, diet and nutrition. Oxford University Press, Oxford, 131–147.
 Telegin, D.J., 1982. Mezolitychni pam'jatky Ukrai'ny [Mesolithic sites of Ukraine]. Naukova dumka, Kyiv (in Ukrainian).

- Thys, S., Van Neer, W., 2010. Bird remains from Late Medieval and Postmedieval sites in Brussels. Belgium Groningen Archaeological Studies 12, 71–86.
- Tomek, T., Bochenski, Z.M., 2009. A key for the identification of domestic birdbones in Europe: Galliformes and Columbiformes. Institute of Systematics and Evolution of Animals Polish Academy of Sciences, Krakow.
- Tomek, T., Guminski, W., 2003. Bird remains from the Mesolithic and Neolithic Site Dudka Masuria NE Poland. Acta Zool. Cracov. 46(1), 9–19.
- Umanskaja, A.S., 1965. Ptahy iz slov'jans'kogo poselennja Voi'ns'ka Hreblja (XI–XII st.) [Birds of Slavic settlement Voi'ns'ka Hreblja (9th–12th century AD)]. Nazemni Tvaryny Ukrainy. Kyiv, 104–106 (in Ukrainian).
- Umanskaja, A.S., 1972. Domashnie pticy iz arheologicheskikh pamjatnikov Ukrainy [Domestic birds from archaeological site of Ukraine]. Prirodnaja Obstanovka i Fauny Proshlogo 6, 71–95 (in Russian).
- Uspenskaja, A.V., Fehner, M.V., 1956. Poselenija Drevnej Rusi [Settlement of Ancient Rus]. Proceedings of the State Historical Museum 33, 105–122 (in Russian).
- Zelenkov, N.V., 2008. Ostatki ptic iz dvuh arheologicheskikh pamjatnikov Respubliki Belarus' [Bird remains from two archaeological sites in Belarus Republic]. Ornitologija 35, 126–128 (in Russian).

Надійшла до редколегії 28.04.2014



Сезонна динаміка антиоксидантних процесів у листках *Acer negundo* за дії поллютантів

Н.О. Хромих, В.С. Більчук, Г.С. Россихіна-Галича, О.М. Вінниченко

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено сезонну динаміку активності ферментів антиоксидантного захисту в листках *Acer negundo* L. з міських екосистем із різними типами антропогенного забруднення. Найзначніші зміни сезонної динаміки активності супероксиддисмутази (SOD, EC 1.15.1.1) і каталази (CAT, EC 1.11.1.6) відбувались у листках за впливу вихлопів вантажівок і промислових викидів. Динаміка активності пероксидази (POD, EC 1.11.1.7) змінювалась несуттєво за зростання її кореляції з динамікою активності CAT, що відбиває узгодженість метаболічних шляхів знешкодження перекису водню за переважання каталазного в листках із забруднених ділянок. Виявлено різкі відмінності динаміки активності глутатіонпероксидази (GPX, EC 1.11.1.9) за всіх типів забруднення при посиленні її кореляції з динамікою SOD. За незначних змін динаміки активності глутатіон-S-трансферази (GST, EC 2.5.1.18) за дії поллютантів посилюється її від'ємний кореляційний зв'язок із динаміками активності SOD та GPX. Виявлені закономірності вказують на координованість антиоксидантного захисту за дії поллютантів як ознаку метаболічної стійкості виду *A. negundo*.

Ключові слова: *Acer negundo*; супероксиддисмутаза; каталаза; пероксидаза; глутатіонпероксидаза; глутатіон-S-трансфераза

Seasonal dynamics of antioxidative processes in *Acer negundo* leaves under pollutant action

N.A. Khromykh, V.S. Bilchuk, G.S. Rossykhina-Galycha, O.M. Vinnychenko

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Activity of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) and glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) were measured by spectrophotometrical method in *Acer negundo* leaves collected during May–August in DNU Botanical garden (control) and in Dnipropetrovsk polluted ecocenoses (plots 1, 2 and 3) in order to reveal the conformities of seasonal dynamics changes of antioxidative processes under pollutant action. The seasonal dynamics of SOD activity altered significantly under chronic pollutant action especially in leaves from plots contaminated by Lorries exhaust fumes and industrial emissions ($r = 0.45$, $r = 0.08$ and $r = 0.25$, accordingly, on plots 1, 2 and 3). The dynamics of CAT activity because of car exhaust fumes influence was similar to control ($r = 0.92$), whereas it changed more considerably under influence of two other types of contamination ($r = 0.80$). POD activity seasonal dynamics altered insignificantly in all polluted plots, and it may indicate the predomination of catalase pathway of hydrogen peroxide detoxification in *Acer negundo* leaves against the background of pollutant action. Furthermore, the increasing of correlative coefficients of seasonal dynamics of CAT and POD activity (from $r = -0.18$ on control to $r = 0.28$, $r = 0.64$ and $r = 0.73$, accordingly, on plots 1, 2 and 3) may indicate more coordinative functioning of catalase and peroxidase metabolic pathways as adaptive sign of trees from polluted urbocenoses. The seasonal dynamics of GPX activity in tree leaves sharply varied from control subject to all contaminated plots ($r = 0.04$, $r = -0.97$ and $r = -0.78$), and it was followed by enhancing positive correlative links between dynamics of GPX and SOD activities (from $r = -0.60$ on control to $r = 0.51$, $r = 0.70$ and $r = 0.93$ on polluted plots). The dynamics of GST activity in *A. negundo* leaves did not change under pollutants action, instead of this correlative analysis revealed the intensification of negative links of GST dynamics with SOD (from $r = 0.03$ on control to $r = -0.85$, $r = -0.98$ and $r = -0.93$ on plots 1, 2 and 3) and GPX dynamics (from $r = 0.25$ on control to $r = -0.88$, $r = -0.56$ and $r = -0.80$ on plots 1, 2 and 3). The established conformities indicate the coordination of antioxidative processes in *A. negundo* leaves against the background of combined chronic pollutant action and may be considered as the index of *A. negundo* species metabolic resistance to anthropogenic pollution of urban cenoses.

Keywords: *Acer negundo*; superoxide dismutase; catalase; peroxidase; glutathione peroxidase; glutathione-S-transferase

Вступ

У міських екосистемах рослини одночасно з дією природних факторів зазнають хронічного впливу техногенних чинників, таких як сполуки важких металів, оксиди азоту та сірки, вуглеводні, феноли, пил (Slushyk, 2005; Zeiger, 2006; Yadav, 2010; Bobyliov et al., 2014), які потрапляють у рослини через забруднені повітря, воду та ґрунт. Неприятлива дія поллютантів на рослини позначається скороченням періоду їх вегетації, гальмуванням ростових процесів, зменшенням площі асиміляційних органів (Wierzbička and Obidzińska, 1998; Bezsonova, 2001), зниженням вмісту фотосинтезувальних пігментів у листках (Deniz and Duzenli, 2007; Garifzyanov and Ivanyshev, 2011), порушенням фізіологічних і біохімічних регуляторних систем (Kulagin, 2002; Ramel et al., 2012). За дії стресорів онтогенез рослин забезпечується винятково за рахунок активації захисних ресурсів на різних рівнях організації рослинних організмів (Polle, 2000; Zang and Gallie, 2005; Kolupaev and Karpets, 2010), що зумовлює їх адаптацію до несприятливих умов середовища.

Стійкість рослин до впливу токсикантів визначається здатністю метаболічних систем як до їх знешкодження, так і до відновлення клітинного гомеостазу (Chirkova, 2004; Geraskin et al., 2011), у зв'язку з чим особливого значення набуває вивчення функціонування клітинних захисних механізмів. Неспецифічні стресові реакції рослин асоціюються з посиленням утворення у клітинах активних форм кисню (АФК), таких як супероксиданіон ($O_2^{\cdot-}$), перекис водню (H_2O_2) та гідропероксиди ліпідів (Faltin et al., 2010). Оскільки ці метаболіти здатні до окислювального ушкодження білків, ліпідів, нуклеїнових кислот та інших біологічних макромолекул (Zhang et al., 2007), їх внутрішньоклітинний рівень контролюється за допомогою антиоксидантних систем (Gill and Tuteja, 2010). Ферменти, які входять до їх складу (супероксиддисмутаза, SOD; каталаза, CAT; пероксидаза, POD; глутатіонпероксидаза, GPX), забезпечують нейтралізацію АФК, а також знешкодження екзогенних токсикантів (глутатіон-S-трансфераза, GST), що є передумовою відновлення клітинного гомеостазу за дії стресорів і формування метаболічної адаптації рослин до несприятливих умов середовища (Chang et al., 2009; Ramel et al., 2012).

За умов урбанізації зростає роль рослинності в очищенні повітря від викидів підприємств і транспорту (Kulagin, 2002; Geraskin et al., 2011; Matyssek et al., 2012), тому під час створення міських фітоценозів необхідно не тільки враховувати декоративні якості рослинних видів, а і прогнозувати їх стійкість до впливу поллютантів. У фітоценозах промислових міст широко розповсюджені представники роду *Acer* L., які володіють підвищеною стійкістю до задимлення та загазованості повітря (Bezsonova, 2001), зокрема, *A. negundo* (Linnaeus, 1753) має низький і середній рівні чутливості за ступенем пошкодження асиміляційних органів (Korshykov et al., 1995), однак клітинні механізми стійкості цього виду до впливу поллютантів не досліджено. Системне вивчення функціонального стану рослин за несприятливих умов середовища доцільно проводити протягом онтогенезу

рослин (Polovnikova and Voskresenskaya, 2008; Kardel et al., 2012; Nehnevajova et al., 2012), проте нині таких досліджень бракує. Мета роботи полягає у з'ясуванні закономірностей варіювання сезонної динаміки активності антиоксидантних ферментів у листках *A. negundo* за умов антропогенного забруднення.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на листках клена ясенolistого (*A. negundo*), відібраних у Ботанічному саду ДНУ (контроль) і в антропогенно забруднених міських фітоценозах: вихлопами легкового транспорту (ділянка 1), вихлопами легкового та вантажного транспорту (ділянка 2), вихлопами вантажівок і промисловими викидами (ділянка 3). Листки відбирали з однорічних пагонів із 3–5 дерев близького вікового стану на висоті 2,0–2,5 м від поверхні ґрунту, у період із травня по серпень на початку кожного місяця. Активність ферментів визначали в супернатантах, отриманих після центрифугування рослинних екстрактів (15 000 об./хв протягом 20 хв за +4 °C), і перераховували на 1 г сирової маси зразка.

Активність супероксиддисмутази визначали згідно з (Shupranova et al., 2011) за рівнем гальмування процесу відновлення нітросинього тетразолію (NBT). Реакційна суміш містила 0,1 М фосфатний буфер, розчини NBT і NADH (нікотинамідаденіндинуклеотиду), а також супернатант. Реакцію зупиняли додаванням оцтової кислоти, оптичну густину вимірювали при 540 нм, результати рахували в умовних одиницях.

Активність каталази визначали титриметричним методом за (Shupranova et al., 2011) із використанням розчину перманганату калію після інкубування супернатанту протягом 30 хв за +25 °C з перекисом водню, результати рахували в мМоль H_2O_2 /хв.

Пероксидазну активність у листках визначали згідно з (Shupranova et al., 2011) за швидкістю окислення розчину бензидину, зміни оптичної густини реакційної суміші реєстрували при 470 нм, активність ферменту рахували в одиницях оптичної густини/хв.

Активність глутатіон-S-трансферази вимірювали за (Habig et al., 1974) спектрофотометричним методом за довжини хвилі 340 нм за здатністю до кон'югації хлординітробензолу (CDNB) з відновленим глутатіоном, і рахували в нМоль CDNB, перетвореного за секунду (нкатал). Активність глутатіон-пероксидази визначали згідно з (Navrot et al., 2006) за окисленням NADHP за присутності перекису водню, зміни оптичної густини реакційної суміші реєстрували при 340 нм протягом 4 хв, активність ферменту рахували в нМоль NADHP, окисленого за секунду (нкатал).

Результати опрацьовано статистично з використанням пакета програм Microsoft Excel. Розбіжності між вибірками оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента, вважали достовірними за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Функціонування супероксиддисмутази у рослинних клітинах забезпечує дисмутацію супероксидного аніона

($O_2^{\cdot -}$), який є однією з найбільш реакційноздатних АФК, з утворенням менш шкочинного для клітин перекису водню (Zhang et al., 2007), тому рівень активності SOD характеризує інтенсивність першої ланки антиоксидантного захисту рослин за дії різноманітних стресорів. У листках *A. negundo* активність супероксиддисмутази у травні за всіх типів антропогенного забруднення перевищувала контрольний рівень, відповідно на 32, 56 і 71% на ділянках 1, 2 та 3 (рис. 1).

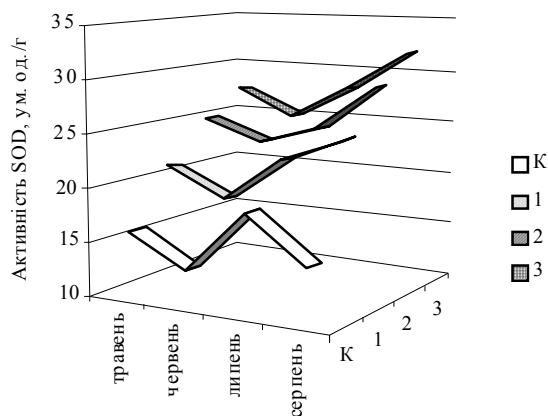


Рис. 1. Сезонна динаміка активності супероксиддисмутази у листках *A. negundo*:

K – Ботанічний сад ДНУ, 1 – за впливу вихлопів легкового транспорту, 2 – за впливу вихлопів легкового та вантажного транспорту, 3 – за впливу вихлопів вантажівок і промислових викидів

Тенденція до перебільшення контрольного рівня зберігалась на фоні зниження ферментативної активності в листках кленів з усіх фітоценозів у червні та її зростанні у липні. У серпні на фоні падіння активності SOD у листках із контрольного фітоценозу відмічена суттєва активація ферменту в листках з усіх забруднених фітоценозів (відповідно, на 68, 94 і 113% вище контролю). Таким чином, вплив поллютантів змінював як рівні, так і сезонну динаміку активності супероксиддисмутази, що підтверджують низькі коефіцієнти кореляції з контролем: $r = 0,45$, $r = 0,08$ і $r = 0,25$, відповідно для листків із забруднених ділянок 1, 2 і 3.

Накопичення перекису водню токсичне для клітин, і його знешкодження забезпечується завдяки функціонуванню каталази, яка розкладає молекули токсиканта на воду та молекулярний кисень, різноманітних пероксидаз, які перетворюють H_2O_2 завдяки окисненню органічних косубстратів та антиоксидантів (Zhang et al., 2007). За впливу несприятливих чинників ступінь активації оксидоредуктаз відбиває ефективність антиоксидантного захисту рослинних клітин (Kolupaev and Karpets, 2010).

У листках *A. negundo* з ділянок 1, 2 і 3 активність каталази (рис. 2) набагато перевищувала контрольний рівень: у травні на 65, 80 і 95% відповідно, у червні перевищення дещо знижувалось – 59, 64 і 74%.

У листках клена в контрольному фітоценозі та в забрудненому вихлопами легкового транспорту активність каталази після різкого зростання у червні надалі помітно знижувалась, при цьому в липні та серпні активність ферменту у листках із забрудненої ділянки перебільшувала контрольний рівень на 129 і 137% відповідно. Навпаки, у листках із забруднених

фітоценозів 2 та 3 ферментативна активність каталази у липні зростала, перебільшуючи контроль відповідно на 186 та 200%; у серпні на ділянці 2 перебільшення становило 165% вище контролю, тоді як на ділянці 3 – 203% вище контролю. Тобто сезонна динаміка активності САТ у листках за дії вихлопів легкового транспорту була близькою до контрольної, проте помітніше змінювалась за інших типів забруднення, про що свідчать коефіцієнти кореляції з контролем: $r = 0,92$, $r = 0,80$ і $r = 0,80$, відповідно для забруднених ділянок 1, 2 і 3.

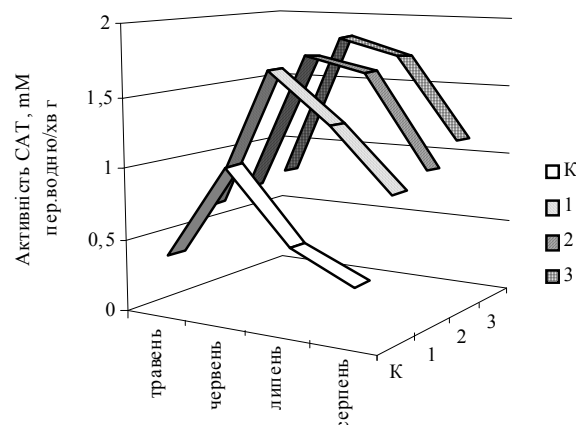


Рис. 2. Сезонна динаміка активності каталази у листках *A. negundo*: позначення див. рис. 1

Пероксидазна активність (рис. 3) у листках *A. negundo* з ділянок 1, 2 і 3 суттєво перевищувала контрольний рівень: відповідно, у травні на 82, 119 і 147%, а в червні – на 47, 117 і 153%. У липні та серпні перевищення контрольної активності ферменту у листках із забрудненого фітоценозу 1 було недостовірним, а в листках із ділянок 2 та 3 становило лише 21–35%. Отже, вплив поллютантів спричинював активацію POD у листках клена ясенolistого, не змінюючи сезонної динаміки активності ферменту на забруднених ділянках 1, 2 та 3, для кожної з яких встановлено високий рівень кореляції з контролем: $r = 0,99$, $r = 0,97$ і $r = 0,94$, відповідно.

Здатність до активації пероксидази та каталази у рослинних клітинах дослідники асоціюють зі стійкістю до стресу, спричиненого забрудненням середовища промисловими викидами, у таких видів, як *Populus balsamifera* (Kulagin, 2002), *Acer platanoides* (Garifzyanov and Ivanyshev, 2011), *Robinia pseudoacacia* (Khromykh and Rossikhina, 2011). Значне зростання каталазної та пероксидазної активності у листках *A. negundo* з антропогенно забруднених фітоценозів вказує на здатність до активації захисних антиоксидантних механізмів упродовж усього періоду вегетації рослин, що, імовірно, сприяє підвищенню стійкості рослин до хронічного впливу комплексу поллютантів.

Пероксидази надто чутливі до концентрації перекису водню, тому їх активність може зростати навіть за незначного збільшення вмісту H_2O_2 , тоді як каталаза активується за відносно більшого накопичення токсиканта, і такий перерозподіл активності оксидоредуктаз за дії стресорів пов'язують з ефективністю антиоксидантного захисту у рослинних клітинах (Mika et al., 2004; Polovnikova and Voskresenskaya, 2008). У зв'язку із цим досліджено взаємний зв'язок між сезонними змінами

рівнів активності CAT та POD у листках *A. negundo* в контрольному та забруднених фітоценозах. За відсутності впливу поллютантів коефіцієнт кореляції був незначний від'ємний ($r = -0.18$), тоді як на ділянках 1, 2 і 3 зростає залежно від типу забруднення (відповідно, $r = 0.28$, $r = 0.64$ і $r = 0.73$). Тобто за хронічної дії поллютантів у листках клена ясенolistого посилювалась координованість функціонування пероксидази та каталази, що, імовірно, сприяло стійкості рослин до впливу забруднювачів.

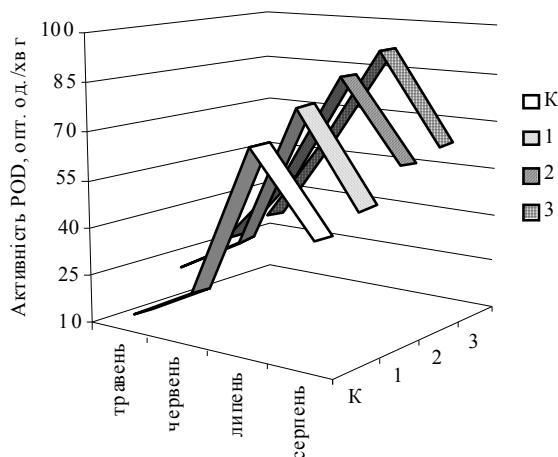


Рис. 3. Сезонна динаміка активності пероксидази у листках *A. negundo*: позначення див. рис. 1

Рослинні глутатіонпероксидази здатні (на додаток до пероксиду водню) відновлювати гідропероксиди фосфоліпідів та ліпідного комплексу біомембран, а також інші органічні гідропероксиди (Faltin et al., 2010), що визначає ключову роль цих ферментів в антиоксидантному захисті клітинних мембран і формуванні толерантності до стресів (Chang et al., 2009).

У листках *A. negundo* за контрольних умов у травні виявлено невисоку активність глутатіонпероксидази та її повільне зниження протягом вегетації (рис. 4), що узгоджується з даними G. Noctor зі співавторами (Noctor et al., 2002) про незначну активність рослинних GPX за відсутності впливу стресорів.

Індукована впливом поллютантів активність GPX у листках із забруднених фітоценозів 1, 2 та 3 суттєво перевищувала контрольний рівень: відповідно, у травні на 29, 31 і 110%, у червні на 25, 38 і 119%. У липні в листках із фітоценозу, забрудненого вихлопами легкового транспорту, активність GPX зростала відносно контролю лише на 38%, тоді як на ділянках 2 і 3 вона сягала відповідно 181 і 289% вище контролю. У серпні ж активність ферменту в забруднених фітоценозах набувала максимальних значень, і перебільшення контрольного рівня становило 137, 157 і 325%, відповідно для ділянок 1, 2 та 3.

Сезонна динаміка активності глутатіонпероксидази в листках *A. negundo* за дії поллютантів суттєво відрізнялась від контрольної залежно від типу забруднення, на що вказують коефіцієнти кореляційного зв'язку (відповідно, $r = 0.04$, $r = -0.97$ і $r = -0.78$ на ділянках 1, 2 та 3). Натомість вплив поллютантів супроводжувався посиленням позитивного кореляційного зв'язку між сезонними динаміками активності GPX та

SOD (від $r = -0.60$ у контролі до $r = 0.51$, $r = 0.70$ і $r = 0.93$ відповідно у фітоценозах 1, 2 та 3). Імовірно, вплив поллютантів одночасно спричинював інтенсифікацію процесів знешкодження супероксидного аніона та гідропероксидів у рослинних клітинах не тільки у фазі активного росту листків, а й у фазі переходу до фізіологічного спокою. Можна припустити, що здатність *A. negundo* до суттєвої та координованої активації SOD і GPX у листках протягом вегетації є проявом метаболічної стійкості рослин до хронічного комплексного впливу поллютантів.

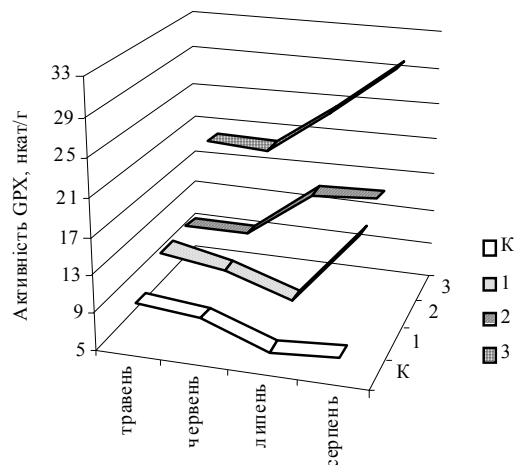


Рис. 4. Сезонна динаміка активності глутатіонпероксидази у листках *A. negundo*: позначення див. рис. 1

Глутатіон-S-трансферази є великою родиною ферментів, які мають велике протекторне значення в рослинних клітинах завдяки здатності до детоксикації різноманітних ксенобіотиків шляхом їх кон'югації з відновленим глутатіоном і подальшої локалізації кон'югатів у вакуолях (Edwards et al., 2000), а також відіграють ключову роль у вторинному метаболізмі рослин (Dixon et al., 2010).

У листках *A. negundo* у травні виявлено високу активність GST у всіх фітоценозах, при цьому на забруднених ділянках 1, 2 та 3 активність ферменту перевищувала контрольне значення лише на 12, 17 і 15% відповідно (рис. 5). Слід відзначити високий контрольний рівень активності GST у листках *A. negundo*, принаймні значно більший, ніж виявлена нами раніше (Khromykh and Rossikhina, 2011) контрольна активність ферменту у листках *Robinia pseudoacacia*. Можливо, тому для ефективного знешкодження поллютантів у листках клена ясенolistого було достатньо незначної активації ферменту.

Максимальний рівень активності GST виявлено у червні в листках з усіх ділянок, надалі відбувалось поступове зниження ферментативної активності, яке завершилось її різким зменшенням у серпні, причому перебільшення контрольного рівня у цей період не було достовірним. Тобто хронічний вплив поллютантів викликав у листках *A. negundo* активацію GST, проте майже не змінював сезонної динаміки активності ферменту порівняно з динамікою в контрольному фітоценозі, що підтверджують коефіцієнти кореляції з контролем: $r = 0.99$ для листків з усіх забруднених ділянок.

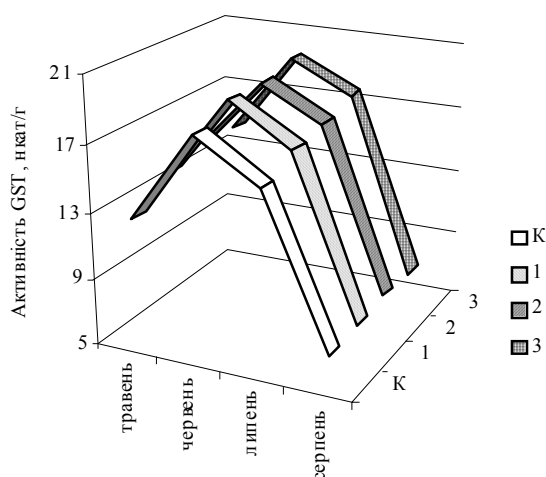


Рис. 5. Сезонна динаміка активності глутатіон-S-трансферази у листках *A. negundo*:
позначення див. рис. 1

Кореляційний аналіз також виявив посилення від'ємного зв'язку між сезонною динамікою активності GST і SOD (від $r = 0,03$ у контролі до $r = -0,85$, $r = -0,98$ і $r = -0,93$, відповідно на ділянках 1, 2 та 3) та активності GST і GPX (від $r = 0,25$ у контролі до $r = -0,88$, $r = -0,56$ і $r = -0,80$, відповідно на ділянках 1, 2 та 3). Установлені коефіцієнти можна вважати проявом узгодженості метаболічних процесів у листках *A. negundo* за хронічної дії поллютантів: у фазі активного росту рослин інтенсивне функціонування GST забезпечує зменшення накопичення токсикантів у клітинах та уповільнення процесу утворення АФК, що супроводжується зниженням інтенсивності їх знешкодження завдяки SOD і GPX; у серпні, навпаки, зниження активності GST у листках спричинювало активацію процесів знешкодження АФК. Різке зростання активності GPX у листках клена ясенolistого у цей період може бути зумовлене перебудовами у функціонуванні глутатіонової захисної системи, оскільки відомо (Noctor et al., 2002), що деякі ізоформи рослинних глутатіон-S-трансфераз здатні також і до прояву глутатіонпероксидазної активності.

Висновки

У листках *A. negundo* за хронічної дії поллютантів виявлено активацію ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза) та зміни сезонної динаміки їх активності. Сезонна динаміка активності SOD зазнала суттєвих змін, особливо у листках із ділянок, забруднених вихлопами вантажівок і промисловими викидами. Динаміка активності CAT у листках із ділянки, забрудненої вихлопами легкового транспорту, була близькою до контрольної, тоді як за інших типів забруднення помітно змінювалась. Найменшим чином за дії поллютантів змінювались сезонна динаміка та рівні активності POD, що вказує на переважання каталазного шляху знешкодження перекису водню в листках *A. negundo*. Більше того, у листках клена ясенolistого із забруднених фітоценозів виявлено посилення кореляційних зв'язків між динамікою активності CAT і

POD, що відбиває координованість функціонування ферментів і сприяє стійкості рослин до забруднювачів. Сезонна динаміка активності GPX за дії поллютантів різко відрізнялась від контрольної, натомість відбувалось посилення позитивного кореляційного зв'язку між динамікою активності GPX і SOD, що може бути показником метаболічної стійкості *A. negundo* до хронічного впливу полікомпонентних викидів. Динаміка активності GST у листках не змінювалась за дії поллютантів, натомість кореляційний аналіз виявив високий рівень від'ємного зв'язку сезонної динаміки GST з динамікою SOD та GPX. Установлені закономірності відбивають узгодженість перебудови антиоксидантних процесів у листках за хронічної дії поллютантів, що може бути передумовою метаболічної адаптації дерев *A. negundo* до умов антропогенного забруднення екосистем.

Бібліографічні посилання

- Bezsonova, V.P., 2001. Metody phytoindikatorov v otsenke ekologicheskogo stanu dookolnykh sred [Methods of phytoindication for evaluation of environmental ecological state]. Zaporizhzhya University Press, Zaporizhzhya (in Ukrainian).
- Bobyliov, Y.P., Brygadyrenko, V.V., Bulakhov, V.L., Gaichenko, V.A., Gasso, V.Y., Didukh, Y.P., Ivashov, A.V., Kucheriavyy, V.P., Maliovanyi, M.S., Mytsyk, L.P., Pakhomov, O.Y., Tsaryk, I.V., Shabanov, D.A., 2014. Ecology. Folio, Kharkiv (in Ukrainian).
- Chang, C.C.C., Slesak, I., Jorda, L., Sotnikov, A., Melzer, M., Miszalski, Z., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B., Karpinski, S., 2009. *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiol.* 150, 670–683.
- Chirkova, T.V., 2002. Fizyologicheskiye osnovy ustoychivosti rasteniy [Physiological basis of plant resistance]. St.-Petersburg Univ. Press, St.-Petersburg (in Russian).
- Deniz, M., Duzenli, S., 2007. The effect of refinery pollution on non-enzymatic foliar defense mechanisms in four evergreen plants species in Turkey. *Acta Physiol. Plant.* 29, 71–79.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R., 2010. Molecules of interest. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71(4), 338–350.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V., 2000. Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5(5), 193–198.
- Faltin, Z., Holland, D., Velcheva, M., Tsapovetsky, M., Roedel-Drevet, P., Handa, A.K., Abu-Abied, M., Friedman-Einat, M., Eshdat, Y., Perl, A., 2010. Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for *in vitro* plant differentiation. *Plant Cell Physiol.* 51(7), 1151–1162.
- Garifzyanov, A.P., Ivanyshev, V.V., 2011. Fizyologicheskiye reaktsiy *Acer platanoides* L. na stress, vyzvannyi zagryazneniem sredy tyazhelyimi metallami [Physiological reactions of *Acer platanoides* L. to stress caused by heavy metals contamination of environment]. *Fundamental Investigation* 9, 331–334 (in Russian).
- Geraskin, S., Evseeva, T., Oudalova, A., 2011. Plants as a tool for the environmental health assessment. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier Science. Vol. 1, 571–579.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(12), 909–930.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Kardel, F., Wuyts, K., Babanezhad, M., Wuytack, T., Adriaenssens, S., Samson, R., 2012. Tree leaf wettability as passive bio-indicator of urban habitat quality. *Environ Exp Botan.* 75(1), 277–285.
- Khromykh, N., Rossikhina, G., 2011. Sezonna dinamika aktivnosti zakhysnykh fermentiv u lystkakh *Robinia pseudoacacia* za umov urbocenosiv [The seasonal dynamic of protective enzymes activity in *Robinia pseudoacacia* leaves under urbocenos conditions]. *Pitannya Bioindicatsii ta Ecologyi* 16(1), 87–93 (in Ukrainian).
- Kolupaev, Y.E., Karpets, Y.V., 2010. Formirovanie adaptivnykh reaktsiy rasteniy na deystvie abioticheskikh stressorov [Formation of plants adaptive reactions to abiotic stressors influence]. *Osnova*, Kyiv (in Russian).
- Korshikov, I.I., Kotov, V.S., Mikheenko, I.P., Ignatenko, A.A., Chernyshova, L.V., 1995. Vzaimodeistvie rasteniy s tekhnogenno zagryaznennoy sredoy [Plants interaction with contaminated environment]. *Naukova Dumka*, Kiev (in Russian).
- Kulagin, A.A., 2002. Ekologo-fiziologicheskie osobennosti topolya balzamicheskogo (*Populus balsamifera* L.) v usloviyakh zagryazneniya okruzhayushey sredy metallamy [Ecology-physiological peculiarities of *Populus balsamifera* L. under metals contamination of environmet]. Dissertation Essay, Toliyatty (in Russian).
- Matyssek, R., Wieser, G., Calfapietra, C., Vries, W., Ditzengremel, P., Ernst, D., Jolivet, Y., Mikkelsen, T.N., Mohren, G.M.J., Thies, D., Tuovinen, J.-P., Weatherall, A., Paoletti, E., 2012. Forest under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future direction for research. *Environ. Pollut.* 160(1), 57–65.
- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Luthje, S., 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochem. Rev.* 3(1–2), 173–193.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasava, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., 2006. Plant glutathione peroxidases are functional peroxidoredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 142, 1364–1379.
- Nehnevajova, E., Lyubenova, L., Herzig, R., Schroder, P., Schwitzguebel, J.-P., Schmulling, T., 2012. Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adult sunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil. *Environ. Exp. Bot.* 76(2), 39–48.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* 53(372), 1283–1304.
- Polle, A., 2000. Defence against photooxidative damage in plants. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence* / Ed. Scandallious. Cold Spring Harbour Lab. Press, 623–666.
- Polovnikova, M.G., Voskresenskaya, O.L., 2008. Aktivnost komponentov antioksidantnoy zaschity i polifenoloksidazy u gazonnykh rasteniy v ontogeneze v usloviyakh gorodskoy sredy [Activity of antioxidative defense components and polyphenoloxidase of lawn plants during ontogenesis under urban conditions]. *Physiology of Plants* 55(5), 777–785 (in Russian).
- Ramel, F., Sulmon, C., Serra, A.A., Gouesbet, G., Couee, I., 2012. Xenobiotic sensing and signaling in higher plants. *J. Exp. Bot.* 63(11), 3999–4014.
- Shupranova, L.V., Bilchuk, V.S., Boguslavskaya, L.V., Ros-sikhina, G.S., Vinnychenko, O.M., 2011. Suchasni metody biochimichnogo analizu roslin [Modern methods of plants biochemical analysis]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).
- Sluchyk, I., 2005. An estimation of the urban system's mutagenic background using *Populus berolinensis* Dipp. *Visnik of L'viv Univ. Biology series* 39, 66–70 (in English).
- Wierzbicka, M., Obidzinska, J., 1998. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Sci.* 137, 155–171.
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S. Afr. J. Bot.* 76(2), 167–179.
- Zang, C., Gallie, D.R., 2005. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiol.* 138(3), 1673–1689.
- Zeiger, E., 2006. The effect of air pollution on plants. *Plant Physiology*. Fifth Edition. Essay 26.1. Online.
- Zhang, G., Tanakamaru, K., Abe, J., Morita, S., 2007. Influence of waterlogging on some anti-oxidative enzymatic activities of two barley genotypes differing in anoxia tolerance. *Acta Physiol. Plant.* 29, 171–176.

Надійшла до редколегії 29.04.2014



УДК 62.821.8:57.004:599.323.4-08

Біоінформаційний підхід у корекції негативного емоційного стану у щурів

Д.О. Бевзюк, Н.О. Левічева

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», Харків, Україна

Отримано адекватну модель негативної емоційної поведінки у щурів шляхом стимулювання заднього вентромедіального гіпоталамуса. Уведення інформації, що міститься в біопотенціалах позитивно емоціогенного вентролатерального гіпоталамуса головного мозку щура-донора щурам-реципієнтам із модельованою агресивною поведінкою, викликає рівноважний емоційний гомеостаз, що виражається у зникненні судомних компонентів та дифузних афективних пароксизмів на ЕЕГ, проявах позитивного грумінгу та спокою. Цей спосіб корекції емоційного гомеостазу уявляється ефективним для подальшого вивчення як новий шлях корекції емоційних розладів.

Ключові слова: агресивна поведінка; біопотенціали мозку; вентромедіальний гіпоталамус; ЕЕГ

Bioinformatic approach to correction of negative emotional state in rats

D.A. Bevzyuk, N.A. Levicheva

State Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the NAMS of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

One of the most important problems of modern society is the growth of aggression which leads to crimes, sadism, violence and other antisocial actions. Therefore, the study of the mechanisms of development of aggressive behavior and negative aggressive reactions is extremely urgent. Thus, in order to correct the aggressive behavior it is extremely important to develop new methodological approaches. Previous studies have shown that the brain biopotentials provide functional transfer of information. With the help of magnetic or other information carrier, the information can be stored and transmitted remotely from the donor to the recipient and, in that way, can control the behavior of the animal body. Using of biological programs, expressed via the brain biopotentials at their minimum voltage (which is indicated by the amplitude of the frequency spectrum of electrical oscillations in the EEG), it can give therapeutic effect. The aim of the paper is studying of the neurobiological mechanisms of aggressive behavior and usage of bioinformatic programs expressed via the potentials of the brain. In the course of the experiments, we have shown the possibility to use the ventromedial hypothalamic stimulation as a realistic model of negative emotional state. In this model, behavioral indexes (reactions of avoidance, increased vocalizations, negative grooming) correlated with the indexes of electrical activity of brain structures of emotional limbic-neocortical system (numerous epileptiform paroxysms, sharp shocks and complexes with epi components of peak-theta and peak-delta type). The introduction of information expressed in biopotentials of the positive emotional ventrolateral hypothalamus of the brain of donor rat to recipient rats with a model negative emotional state leads to balancing of emotional homeostasis, resulting in disappearance of convulsive components and diffuse affective paroxysms in EEG, and also in manifestations of positive grooming and tranquility. This method of emotional homeostasis correction is suggested as a new method for correction of emotional disorders and is expected to be effective for the further study.

Keywords: aggressive behavior; biopotentials; ventromedial hypothalamus; EEG

Вступ

У сучасному соціумі однією з найважливіших проблем буття є галопуюче зростання агресії, а саме спонтанної агресивності та агресивної мотивації (Shostakovich and Leonova, 2004; Bevzyuk and Kirillova, 2008; Vorobyeva et al., 2009; Avdeyenok, 2010; Bevzyuk D.A., 2012; Bevzyuk, D.O., 2012; Williams et al., 2012; Katsouni et al., 2013; Krahé and Berger, 2013; Lübke and Pause, 2013; Schutter, 2013; Shurtliff et al., 2013; Van Beek et al., 2013; Sharma and Marimuthu, 2014). Системотвірним чинником останньої є модель майбутньої позитивної емоції в акцепторі результату дії функціональної системи задоволення емоційної абстиненції. Це призводить до криміналу, садизму, насильства, аутоагресії та інших антисоціальних дій (Kulikov, 1998; Shostakovich, 2005; Kirenskaya, 2006; Borisov, 2007; Petryuk et al., 2007; Ivanov and Yegorov, 2012; Ilyuk, 2012; Samedov et al., 2012; Naumenko et al., 2013; Van Beek et al., 2014).

У зв'язку з цим украй необхідні дослідження поглиблених механізмів формування агресивності (емоційно негативної реакції) і агресивної поведінки (мотивації). Особливого значення набувають питання використання нових нанотехнологій, які б містили біологічно-інформаційне квантування: шляхом запуску атомно-молекулярної конструкції генетичних кодонів пам'яті – носіїв приватної програми еволюції, заданої, набутої, модульованої просторовим енергоінформаційним гомеостазом.

Попередніми дослідженнями показано, що функціональне перенесення інформації виконують біопотенціали мозку. За допомогою технічних магнітних або інших носіїв вона може зберігатися та передаватися дистанційно реципієнтові від донора, управляти поведінкою тваринного організму (Bakumenko et al., 1981). При цьому застосування біологічних програм, що зберігаються у біопотенціалах мозку, спрацьовує терапевтично за їх мінімальної потужності, яка визначається амплітудою та частотним спектром електричних коливань на ЕЕГ.

Метою роботи з'явився пошук в експерименті реалістичної моделі для дослідження нейробіологічних механізмів агресивної (емоційно негативної) поведінки та можливість її купірування за допомогою біоінформаційних програм, які містяться у потенціалах мозку.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проведені на 28 шурах-самцях 5–6-місячного віку. Тваринам здійснювали стереотаксичну операцію імплантації ніхромових електродів, діаметром 100 мкм у скляній ізоляції (неізольований кінчик електрода становив від 0,3 до 0,5 мм) в лімбіко-неокортикальні структури мозку білатерально: у лобно-фронтальний неокортекс, гіпокамп, гіпоталамус і базо-латеральний септум під кетаміновим наркозом із використанням атласу Фіфкової та Маршала за Бурешем (Buresh et al., 1962).

Для виникнення пароксизмальних негативних емоційних реакцій використовували електричну стимуляцію заднього вентромедіального гіпоталамуса в камері Скіннера шляхом плавного нарощування струму до величини, коли вже з'являлася негативна емоційна реакція уникнення з елементами афективної пароксизмальної та судомної активності на електроенцефалограмі (ЕЕГ). Самостимуляцію позитивних емоційогенних структур мозку здійснювали у камері Скіннера за методом J. Olds і A. Milner (Olds and Milner, 1954). Потім здійснювали запис ЕЕГ. Ця електрична активність мозкових структур, зареєстрована в електроенцефалографі, вводилася у блок комп'ютерного електроенцефалографа. З цього «банку» інформація, вкладається у біопотенціали мозку, може вилучатися і використовуватися в заданий час для корекції модельних форм поведінки, в конкретному випадку агресивної.

Реєстрацію та аналіз ЕЕГ проводили за допомогою комп'ютерного електроенцефалографа «Нейрон-спектр+». Аналіз ЕЕГ здійснювали також візуально та за допомогою математичного аналізу із застосуванням пакета комп'ютерних програм, що дозволяло визначати амплітуду (мкВ) й абсолютну спектральну щільність потужності (мкВ²/Гц). Аналізували п'ять фрагментів запису по 2 с. Для оцінки абсолютної спектральної потужності ЕЕГ виділяли такі частотні діапазони: дельта (1,0–4,0 Гц), тета (4,0–7,0 Гц), альфа (8,0–12,0 Гц), бета (15,0–35,0 Гц). Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Statistica 6.1 з використанням непараметричного критерію Вілкоксона.

Результати та їх обговорення

У фоновій ЕЕГ досліджуваних шурів у 80% випадків у лобно-фронтальному неокортексі домінувала змішана активність з епізодичними комплексами, що включають тета-, дельта-хвилі, а також гострі розряди (на рис. 1 а). У 20% випадків реєстрували десинхронізацію у лобно-фронтальному неокортексі з переважанням гострих розрядів (рис. 1 б). У гіпокампі 80% шурів домінувала низькоамплітудна активність (рис. 1 а), у 20% шурів на фоні домінуючого альфаритму регулярно реєстрували бета-веретена або домінувала активність у бета-діапазоні (рис. 1 б). У гіпоталамусі на фоні змішаної активності домінувала низькоамплітудна та високочастотна активність в альфа-бета-діапазоні. У 15% випадках аналогічні патерни ЕЕГ включали численні гострі розряди. У септумі у 80% випадках на тлі змішаної активності ділянки бета-активності постійно перемежувалися з ділянками тета- та дельта-хвиль, формуючи комплекси (рис. 1 а). У 20% випадках на різко зниженому фоні електрогенезу реєстрували поодинокі дельта-коливання та альфа-тетаритми (рис. 1 б).

Під час примусової стимуляції вентромедіального гіпоталамуса у досліджуваних шурів спостерігали негативні емоційні реакції, що часто переходили у пароксизми агресії. При цьому в електричній активності мозку досліджуваних тварин відбувалися

такі зміни. У неокортексі 70% щурів переважала низькоамплітудна високочастотна активність у бета-діапазоні (рис. 2 а). У 30% щурів на тлі змішаної активності домінували альфа- і тета-хвилі, що перемежались високочастотними бета-ритмом і численними гострими розрядами та надавали електричній активності пароксизмальний характер (рис. 2 б). У гіпокампі 70% щурів реєстрували комплекси повільнохвильової активності на фоні змішаної активності (рис. 2 а). У 30% тварин була тенденція до посилення амплітуди повільнохвильової активності у тета-дельта-діапазоні, до появи гострих хвиль та епі-

еквівалентів – пік-тета, пік-дельта (рис. 2 б). У гіпоталамусі 80% щурів на фоні різко зниженого електрогенезу відмічали одиничні пік-тета (рис. 2 а). У 20% щурів на фоні різко зниженого електрогенезу регулярно зустрічалися комплекси з епі-еквівалентами, що проходили через усі досліджувані структури у вигляді дифузних епілептиформних комплексів (рис. 2 б). У *septum* у всіх щурів реєстрували повільнохвильову активність, яка чергувалася з невеликими епохами бета-ритму та комплексами складної структури (рис. 2 а, б).

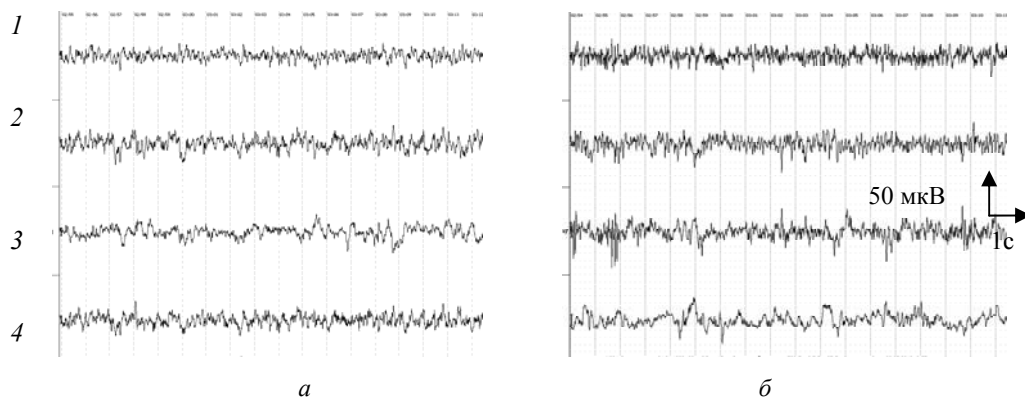


Рис. 1. Динаміка фонового запису ЕЕГ на прикладі щурів № 16 (а) і № 24 (б):

1 – лобно-фронтальний неокортекс, 2 – гіпокамп, 3 – гіпоталамус, 4 – *septum*

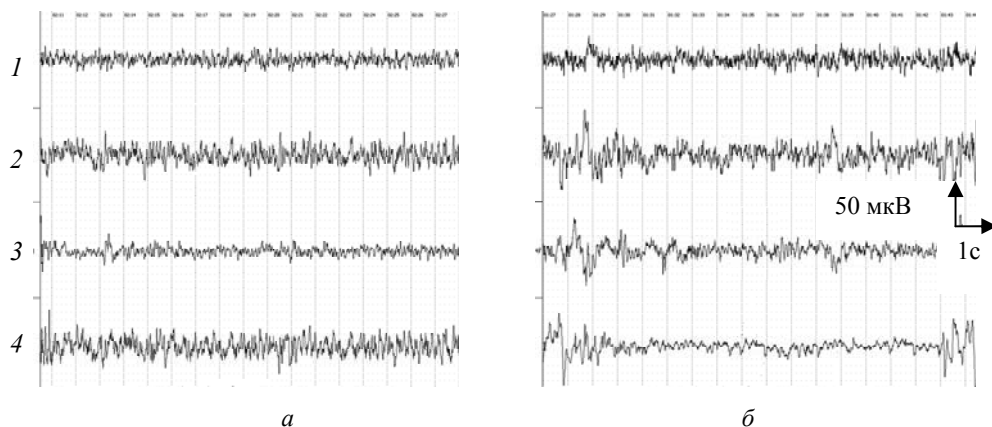


Рис. 2. Динаміка електричної активності мозку щурів № 16 (а) і № 24 (б)

після стимуляції негативно емоційного вентромедіального гіпоталамуса: позначення див. рис. 1

Амплітудна характеристика тета-, альфа- і бета-хвиль ЕЕГ під час стимуляції вентромедіального гіпоталамуса показала достовірне ($P < 0,05$) зростання цього показника порівняно з фоновими значеннями у *septum* та достовірне ($P < 0,05$) збільшення альфа-ритму в гіпокампі (табл. 1). За даними спектрального аналізу основних ритмів ЕЕГ виявлене посилення значень спектральної потужності порівняно з фоном у всіх досліджуваних структурах мозку. Вірогідне посилення спектральної потужності дельта-коливаний і тета-, альфа-ритмів виявлялося в гіпокампі. Таким чином, стимуляція вентромедіального гіпоталамуса викликала деяке пожвавлення основних ритмів на ЕЕГ і появи епі-еквівалентів пік-тета, пік-дельта в усіх досліджуваних структурах.

Використання в експерименті електроенцефалограм, що містилися в «банку» даних, було проведене тільки для апробації методу та прийняття рішення щодо його подальшого використання під час купірування пароксизмальних афективних станів.

Після проведеного курсу лікування показники електроенцефалограми дещо змінилися. Суть лікування полягала в тому, що досліджуваним щурам-реципієнтам після формування негативної емоційної поведінки, отриманої шляхом стимуляції вентромедіального гіпоталамуса, в реальному режимі часу вводили інформацію, що містилась у біопотенціалах лімбіко-неокортикальних структур мозку щура-донора, а саме ЕЕГ вентролатерального гіпоталамуса після його годинної самостимуляції (рис. 3). Вибір цієї структури зумовлений тим, що вентролатеральний гіпоталамус є

тригерною структурою у формуванні складної морфо-функціональної системної потягу до позитивних емоцій. Отже, інформація, що містилась у біопотенціалах емоційних структур головного мозку й, у першу чергу, у задньому вентролатеральному гіпоталамусі, після само-стимуляції містила у собі лікувальний потенціал, який і

був спрямований для купірування агресивної поведінки від щура-донора щурам-реципієнтам. На електро-енцефалограмі досліджуваних тварин після введення ЕЕГ донора зареєстровано зниження амплітуди альфа- і тета-активності (табл. 1). Зникли комплекси, значно зменшилася кількість гострих хвиль (рис. 4).

Таблиця 1

Динаміка показників амплітуди основних ритмів ЕЕГ у досліджуваних структурах (мкВ)

Показник	Неокортекс	Гіпокамп	Гіпоталамус	Septum
тета-ритм				
Фон	23,7 ± 2,4	32,8 ± 3,6	22,0 ± 2,2	22,2 ± 2,4
Агресія	24,2 ± 2,8	38,9 ± 5,7*	24,3 ± 3,2	26,1 ± 4,2*
Лікування	22,4 ± 2,7	35,2 ± 5,2	21,2 ± 2,3	22,7 ± 5,3
альфа-ритм				
Фон	15,3 ± 1,1	21,7 ± 2,1	15,8 ± 1,1	14,2 ± 1,8
Агресія	17,3 ± 1,6	33,4 ± 5,8*	17,1 ± 2,3*	18,2 ± 2,2*
Лікування	16,0 ± 1,6	28,1 ± 4,2	15,3 ± 2,2	14,5 ± 2,6**
бета-ритм				
Фон	16,8 ± 2,1	23,8 ± 3,0	13,4 ± 1,3	11,6 ± 1,3
Агресія	16,7 ± 2,2	24,6 ± 3,9	12,7 ± 2,4	13,6 ± 1,0*
Лікування	16,0 ± 2,2	23,9 ± 3,4	11,8 ± 1,9	11,0 ± 1,6**

Примітки: * – $P < 0,05$ порівняно з фоновими значеннями, ** – $P < 0,05$ порівняно з даними після стимуляції вентромедіального гіпоталамуса.

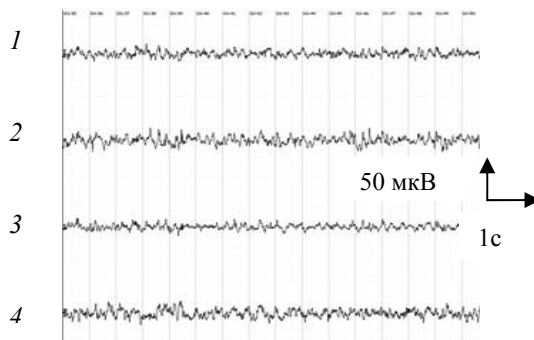


Рис. 3. Електрична активність мозку щура донора після годинної самостимуляції заднього вентролатерального гіпоталамуса: позначення див. рис. 1

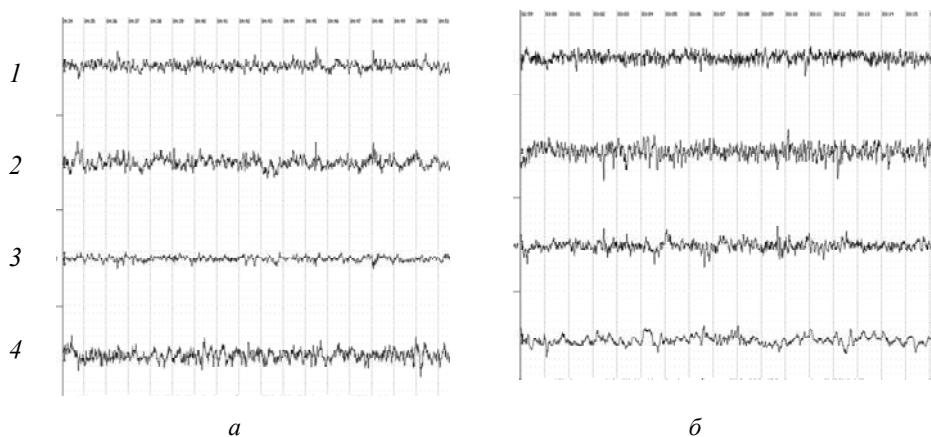


Рис. 4. Динаміка електричної активності мозку щурів № 16 (а) і № 24 (б) після введення інформації, яка містилась в електричній активності вентролатерального гіпоталамуса щура-донора: позначення див. рис. 1

За даними спектрального аналізу основних ритмів ЕЕГ виявлено зниження спектральної потужності тета-ритму у гіпокампі, а також альфа-тета-ритмів у *septum* порівняно зі стимуляцією вентромедіального гіпоталамуса. Тварини ставали спокійними, тривалий час сиділи нерухомо, реєструвався позитивний грумінг.

Висновки

Показано можливість використання стимуляції вентромедіального гіпоталамуса як реалістичної моделі негативного емоційного стану, про що свідчить пряма

кореляція поведінкових показників (реакцій уникнення, посилення вокалізації, негативного грумінгу) пароксизмальних афектів емоційних негативних реакцій із показниками електричної активності структур мозку емоціогенної лімбіко-неокортикальної системи.

Уведення інформації, що міститься у біопотенціалах позитивно емоціогенного вентролатерального гіпоталамуса головного мозку щура-донора щурам-реципієнтам із модельними негативними емоційними станами, зумовлює рівноважний емоційний гомеостаз, що виражається у зникненні судомних компонентів та дифузних афективних пароксизмів на ЕЕГ, проявах позитивного грумінгу та спокою. Цей спосіб корекції емоційного гомеостазу уявляється ефективним для подальшого вивчення як новий спосіб корекції емоційних розладів.

Бібліографічні посилання

- Avdeyenko, L.N., 2010. Psihologicheskie determinanty formirovaniya agressivnogo povedeniya u muzhchin [Psychological determinants offorming of aggressive behavior for men]. *Sibirskij Vestnik Psihatrii i Narkologii* 3, 53–55 (in Russian).
- Bevzyuk, D.A., 2012. Nejrofiziologicheskie mehanizmy transformacii sociofobij v agressivnoe povedenie v usloviyah deprivacii gedonicheskogo povedeniya [Neurophysiological mechanisms of transformation of social phobias in aggressive behavior in the conditions of deprivation of hedonic behavior]. *Ukrai'ns'kyj Visnyk Psyhonevrologii'* 20(3), 162 (in Ukrainian).
- Bevzyuk, D.A., Kirillova, N.A., 2008. Rol' ventromedial'nogo gipotalamusa i mindalividnogo kompleksa v mehanizmah formirovaniya fobii i transformacii ee v agressivnoe povedenie u krys [Role of ventromedial hypothalamus and amigdal in the mechanisms of forming of phobia and transformation of her in aggressive behavior for rats]. *IV Mizhn. Naukova Konferencija «Psihofiziologichni ta visceral'ni funkcii v normi i patologii prisvjachena 90-richchju vid dnja narodzhennja P.G. Bogach», 42–43 (in Ukrainian).*
- Bevzyuk, D.O., 2012. Nejrofiziologichni mehanizmy transformacii' zoosocial'nyh fobij v agresyvu povedinku u shhuriv za umov deryvacii i'hn'oi' motyvacii' do kanabinoi'div [Neurophysiological mechanisms of transformation of zoosocial phobias in aggressive behavior for rats at the terms of derivate of their motivation to canabis]. *Ukrai'ns'kyj Visnyk Psyhonevrologii'* 20(4), 27–31 (in Ukrainian).
- Borisov, A.I., 2007. Psihofiziologicheskie predposylki zhestokogo (agressivnogo) povedeniya [Psychophysiological preconditions of cruel (aggressive) behavior]. *Vjatskij Medicinskij Vestnik* 2, 123–125 (in Russian).
- Buresh, Y., Petran, M., Zakhar, I., 1962. Jelektrofiziologicheskie metody issledovaniya [Electro-physiological methods of research]. Publishing House of Foreign Literature, Moskow (in Russian).
- Copyright certificate [Avtorskoe svidetel'stvo] № 908378, 1981. Spособ upravleniya povedeniem zhivotnogo organizma [Management method by behavior of animal organism]. Bakumenko, L.P., Verzin, I.I., Vorobyeva, T.M., Dabagyan, A.V., Kononenko, I.V., Leshchenko, A.G., print. 02.11.1981.
- Ilyuk, R.D., 2012. Pokazateli agressii i gneva pri zavisimostjah ot razlichnyh psihoaktivnyh veshhestv [Indexes of aggression and anger at dependences on different psychoactive substances]. *Narkologija* 8, 58–66 (in Russian).
- Ivanov, O.V., Yegorov, A.Y., 2012. Agressija i suicidal'noe povedenie: nejropsihologicheskie aspekty [Aggression and suicidal behavior: neuropsychology aspects]. *Nevrologicheskij Vestnik* 3, 15–28 (in Russian).
- Katsouni, E., Zarros, A., Skandalis, N., Tsakiris, S., Lappas, D., 2013. The role of cholecystokinin in the induction of aggressive behavior: A focus on the available experimental data (review). *Acta Physiol. Hung.* 100(4), 61–77.
- Kirenskaya, A.V., 2006. Kriminal'noe agressivnoe povedenie u podrostkov s zaderzhannym psihicheskim razvitiem: Nejrofiziologicheskie faktory riska [Criminal aggressive behavior for teenagers with the detained psychical development: Neurophysiological factors of risk]. *Rossiiskij Psihiatricheskij Zhurnal* 4, 46–52 (in Russian).
- Krahé, B., Berger, A., 2013. Men and women as perpetrators and victims of sexual aggression in heterosexual and same-sex encounters: A study of first-year college students in Germany. *Aggressive Behav.* 39(5), 391–404.
- Kulikov, G.A., 1998. Nejrobiologicheskie osnovy vysshej nervnoj dejatel'nosti cheloveka (Illjuzii specifichnosti vysshej nervnoj dejatel'nosti cheloveka) [Neurobiological bases of higher nervous activity of man (Illusions of specificity of higher nervous activity of man)]. *Sorosovskij Obrazovatel'nyj Zhurnal* 6, 9–15 (in Russian).
- Lübke, K.T., Pause, B.M., 2013. Sex-hormone dependent perception of androstenone suggests its involvement in communicating competition and aggression. *Physiol. Behav.* 123, 136–141.
- Naumenko, V.S., Kozhemyakina, R.V., Plyusnina, I.Z., Popova, N.K., 2013. Agressija i reakcija akusticheskogo refleksa vzdrazgivaniya u geneticheski predraspolozhennyh k agressii i neagressivnyh molodyh krys [Aggression and reaction of acoustic reflex of starting for genetically predispositioned to aggression and non-aggressive young rats]. *Zhurnal Vysshej Nervnoj Dejatel'nosti im. I.P. Pavlova* 63(4), 479 (in Russian).
- Olds, J., Milner, P., 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 419–427.
- Petryuk, A.P., Kutko, I.I., Bevzyuk, D.A., Vorobyeva, T.M., 2007. Kliniko-nejropsihologicheskie i jelektrofiziologicheskie korreljaty agressivnogo povedeniya u lic s nepsihoticheskimi psihicheskimi rasstrojstvami [Clinical-neuropsychological and electro-physiological correlations of aggressive behavior at persons with unpsychotic psychonosemas]. *Psichichne Zdorov'ja* 14(1), 17–22 (in Ukrainian).
- Samedov, A.A., Eldarova, N.N., Gasanzade, L.A., 2012. Agressija pri rasstrojstvah lichnosti [Aggression at disorders of personality]. *Psihicheskie Rasstrojstva v Obshhej Medicine* 3, 59–61 (in Russian).
- Schutter, D.J., Harmon-Jones, E., 2013. The corpus callosum: A commissural road to anger and aggression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37(10), 2481–2488.
- Seth, A., Gitter, P.J., Ewell, R.E., Guadagno, T.F., Stillman, R.F., 2013. Baumeister virtually justifiable homicide: The effects of prosocial contexts on the link between violent video games, aggression, and prosocial and hostile cognition. *Aggressive Behav.* 39(5), 346–354.
- Sharma, M.K., Marimuthu, P., 2014. Prevalence and psychosocial factors of aggression among youth. *Indian J. Psychol. Med.* 36(1), 48–53.
- Shostakovich, B.V., 2005. Sovremennye podhody k diagnostike psihopaticheskikh rasstrojstv [Modern going near diagnostics of psychopathy disorders]. *Rossiiskij Psihiatricheskij Zhurnal* 3, 7–14 (in Russian).
- Shostakovich, B.V., Leonova, O.V., 2004. Konceptcija limbicheskoi psihoticheskoi triggernoi reakcii i ee sudebno-psihiatricheskoe znachenie (analiticheskij obzor). *Rossiiskij Psihiatricheskij Zhurnal* 1, 60–68 (in Russian).
- Shurtliff, Q.R., Murphy, P.J., Yeiter, J.D., Matocq, M.D., 2013. Experimental evidence for asymmetric mate preference and

- aggression: Behavioral interactions in a woodrat (*Neotoma*) hybrid zone. *BMC Evol. Biol.* 13, 220.
- Van Beek, J., Vuijk, P.J., Harte, J.M., Smit, B.L., Nijman, H., Scherder, E.J., 2014. The factor structure of the brief psychiatric rating scale (expanded version) in a sample of forensic psychiatric patients. *Int. J. Offender Ther. Comp. Criminol.* (in press).
- Vorobyeva, T.M., Bevzyuk, D.A., Kirillova, N.A., 2009. Rol' jemociogennyh struktur mozga v mehanizmah formirovaniya fobij i ih vozmozhnoj transformacii v agressivnoe povedenie u krys [Role of emotional structures of brain in the mechanisms of forming of phobias and their possible transformation in aggressive behavior for rats]. *Psihicheskoe Zdorov'e* 4, 46–51 (in Ukrainian).
- Williams, C., South Richardson, D., Hammock, G.S., Janit, A.S., 2012. Perceptions of physical and psychological aggression in close relationships: A review. *Aggress. Violent Beh.* 17(6), 489–494.

Надійшла до редколегії 02.05.2014



УДК 595.617:591.134

**Влияние соли железа на массу тела
Megaphyllum kievense (Diplopoda, Julidae)
и гранулометрический состав подстилки
в лабораторном эксперименте**

В.В. Бригадиренко, В.М. Иванышин

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина

Оценено воздействие $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} мг Fe / г сухой подстилки) на массу тела и трофическую активность *Megaphyllum kievense* (Lohmander, 1928). Тридцатисуточный лабораторный эксперимент по изучению влияния *M. kievense* на разложение растительных остатков в градиенте концентрации Fe показал отсутствие достоверных изменений массы тела животных. Под влиянием *M. kievense* зарегистрировано достоверное ускорение разложения подстилки при возрастании концентрации в ней Fe. Слабее масса подстилки уменьшалась в контроле (на $45,7 \pm 0,44\%$) и при концентрации 10^{-8} мг/г (на $44,9 \pm 1,00\%$), сильнее – при 10^{-1} мг/г (на $46,1 \pm 1,76\%$) и 10^{-2} мг/г Fe (на $47,0 \pm 0,72\%$). По отношению к исходным значениям до начала эксперимента масса крупной фракции подстилки ($>2,0$ мм) под влиянием питания *M. kievense* уменьшилась на 9,8%, а масса фракции 0,7–1,0 мм – возросла на 7,06%. Увеличение доли средней фракции (0,7–1,0 мм) связано с накоплением экскрементов Julidae и фрагментов измельченных листьев при мацерации растительных остатков перед их употреблением в пищу. Влияние на массу тела животных и их кормового субстрата в различных вариантах опыта было недостоверным из-за возможной активации латентных инфекций в условиях лабораторного эксперимента.

Ключевые слова: подстилочные беспозвоночные; сапрофаги; тяжелые металлы; загрязненные экосистемы

**Impact of ferric salt on body weight
of *Megaphyllum kievense* (Diplopoda, Julidae)
and litter granulometric composition in the laboratory experiment**

V.V. Brygadyrenko, V.M. Ivanyshin

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The paper evaluates the impact of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} mg of Fe / g of dry litter) on the body weight and trophic activity of *Megaphyllum kievense* (Lohmander, 1928). 30-day laboratory experiment on studying the impact of *M. kievense* on decomposition of plant residues in Fe concentration gradient showed no significant changes in the animal body weight. Under the impact of *M. kievense* the significant acceleration of litter decomposition was recorded with the increase in Fe concentration therein. The less decrease in the litter weight was observed in the control (by $45.7 \pm 0.44\%$) and at concentration of 10^{-8} mg/g (by $44.9 \pm 1.00\%$), and more pronounced one at 10^{-1} mg/g (by $46.1 \pm 1.76\%$) and 10^{-2} mg/g of Fe (by $47.0 \pm 0.72\%$). With regard to baseline values before the experiment, the weight of the large fraction of litter (> 2.05 mm) under the impact of *M. kievense* nutrition decreased by 9.8%, while the weight of fraction 0.70–1.05 mm increased by 7.06%. Increasing the share of the middle fraction (0.70–1.05 mm) is connected with accumulation of Julidae feces and fragments of crushed leaves at maceration of plant residues before eating. Effect on animals body weight and their feed substrate in different versions of the experiment was not reliably determined, because of possible activation of latent infections under conditions of the laboratory experiment.

Keywords: litter invertebrates; saprophages; Fe; heavy metals; contaminated ecosystems

Введение

Добыча железной руды в мире с каждым годом возрастает (с 1,93 млрд тонн в 2007 до 2,40 млрд тонн в 2010 году). По данным геологической службы США, Украина в 2010 году находилась на шестом месте по объемам добычи, при этом по запасам железной руды страна занимает первое место в мире (в недрах Украины находится 30 из 180 млрд тонн мировых запасов). По прогнозам геологов, в будущем объемы добычи железной руды на территории Украины будут увеличиваться (Bobyliov et al., 2014). Одни из наиболее высоких уровней добычи железной руды в мире и Европе наблюдаются в центральной части Украины на территории Днепропетровской области (Криворожский железорудный бассейн).

На участках, прилегающих к железорудным месторождениям, широко распространено аэрогенное загрязнение листы зеленых растений (Pashkevich, 2000). Вокруг железорудных карьеров на поверхности листового опада лесных насаждений происходит осаждение пыли, содержащей высокие концентрации железа (Mosinac, 1981). Содержание железа в листовом опаде и подстилке лесных насаждений Днепропетровской области, по данным Н.Н. Цветковой (Cvetkova, 1992; Cvetkova and Kulik, 1996), может колебаться в десятки и сотни раз (средний уровень – 10–25 мг/г почвы). Железо подвергается активным превращениям в верхних горизонтах почвы, при этом чем интенсивнее круговорот металла в экосистеме, тем выше его концентрация в тканях животных (Cvetkova et al., 2003; Karavanova et al., 2006).

Диплоподы способствуют ускорению минерализации листового опада на поверхности почвы (Gere, 1956; Hopkin and Read, 1992; Boccardo and Penteado, 1995; Bulakhov and Pakhomov, 2010). Лабораторные исследования интенсивности питания этой группы беспозвоночных проведены лишь для наиболее распространенных видов (Striganova and Prishutova, 1990; Hopkin and Read, 1992; Dangerfield and Milner, 1993; Brygadyrenko, 2004; Kulbachko, Didur, 2012), при этом практически не исследованными остаются более мелкие виды диплопод. В большинстве обследованных нами лесных экосистем центральной и южной Украины (Brygadyrenko, 2006; Brygadyrenko and Komarov, 2008) доминирует 1–3 вида диплопод. Плохо изученными остаются относительно малочисленные виды, такие как *Megaphyllum kievense* (Lohmander, 1928). Этот вид имеет относительно широкое распространение по территории Украины и России, однако его экологические предпочтения, воздействие на него различных антропогенных факторов остаются не проанализированными в научной литературе.

Воздействие железа на организм диплопод может иметь как анаболический, так и катаболический эффект в зависимости от концентрации. Минимальные концентрации данного техногенного поллютанта могут способствовать ускорению обмена веществ у кивсяков за счет активации отдельных ферментных систем, по примеру эффектов, наблюдаемых у других видов живых организмов (Morgan et al., 1986). Здесь могут проявляться закономерности (Souza et al., 2014), которые проявляются в человеческом организме под воздействием гомеопатических

препаратов: лечение ядами органического и неорганического происхождения в малых дозах, неспецифически стимулирующее обменные и иммунные процессы. При увеличении дозировки металла на несколько порядков должно наблюдаться ингибирование отдельных метаболических процессов, переход многоножек в индуцированную трофическими факторами диапаузу, и, возможно, при длительном воздействии высоких концентраций металла в пище – смерть отдельных особей.

До настоящего времени количественной оценки воздействия возрастающих концентраций железа в пище в лабораторном эксперименте на представителей семейства Julidae проведено не было. Отдельные исследования (Hopkin and Read, 1992; Köhler and Alberti, 1992; Köhler et al., 1995, 1996; Heikens et al., 2001) свидетельствуют о комплексном негативном воздействии промышленных загрязнений на организм диплопод. Однако способность многих видов данной группы впадать в диапаузу под воздействием высоких концентраций тяжелых металлов в пище позволяет им приспособиться к периодическому аэрогенному поступлению загрязняющих веществ в подстилочный горизонт лесных экосистем.

Цель данного исследования – оценить в условиях лабораторного эксперимента изменение массы тела и интенсивность потребления корма *M. kievense* в градиенте концентраций железа в подстилке. Перед началом исследования мы предполагали, что (1) при возрастании концентрации железа в подстилке будет наблюдаться вначале стимуляция потребления корма, а при более высоких концентрациях – уменьшение его потребления *M. kievense*, (2) максимальное увеличение массы тела животных будет наблюдаться в тех вариантах опыта, в которых концентрация железа в листовом опаде будет минимальной, (3) смертность кивсяков в течение месячного эксперимента будет находиться на стабильном уровне, не завися от концентрации поллютанта, и (4) при повышении концентрации железа в подстилке будет наблюдаться достоверное ослабление трофического воздействия *M. kievense* на отдельные фракции подстилки.

Материал и методы исследований

Экземпляры *M. kievense* собирали вручную 20.09.2013 г. в лесополосе (10 км к югу от г. Днепропетровск). В искусственной лесополосе доминировали *Robinia pseudoacacia* L. (80%) и *Fraxinus lanceolata* Borkh. (10%). Кустарниковый ярус разреженный, представлен *Sambucus nigra* L. (10%). В травостое распространен *Chelidonium majus* L. (40%) и *Galium aparine* L. (2%). Подстилка представлена преимущественно листьями *R. pseudoacacia* L.

Для стабилизации и унификации микробного населения кишечника собранные экземпляры *M. kievense* содержали в общем пластиковом садке (20 л, 12 кг подстилки) в течение 21 суток для акклиматизации к условиям лаборатории при температуре +22 °С. Подстилку, высушенную до воздушно-сухого состояния, калибровали на фракции с помощью системы сит. Для проведения эксперимента использовали фракцию подстилки 2–3 мм. При взвешивании подстилки стремились получить максимально однородные по гранулометрическому составу

образцы растительных остатков в садках. Эксперимент проводили в пластиковых стаканчиках (0,25 л), в которых размещали по 1,980–2,020 г сухой подстилки (точность взвешивания – 1 мг), увлажняли из пипетки раствором $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в восьми концентрациях (в пересчете на концентрацию металла 10^{-8} – 10^{-1} мг/г сухой подстилки) или, в контроле, дистиллированной водой. В каждом варианте опыта экспонировали по 6 садков с 4 экз. *M. kievense* (2 самца и 2 самки) и по 8 контрольных (без представителей *Julidae*). Во всех вариантах опыта использовали 216 экземпляров *M. kievense*. Перед началом эксперимента и после его окончания (после извлечения *Julidae* и доведения в течение 7 суток растительных остатков до воздушно-сухого состояния) взвесили 126 стаканчиков с подстилкой. В лаборатории добывались постоянной температуры, освещенности и увлажнения садков с различными вариантами опыта. Для устранения чрезмерных потерь влаги садки сверху накрывали листками канцелярской бумаги и периодически равномерно опрыскивали дистиллированной водой.

Средняя начальная масса тела *M. kievense* – $56,7 \pm 4,81$ мг ($n = 216$), спустя 30 суток после начала эксперимента масса животных увеличилась до $59,4 \pm 5,34$ мг ($n = 214$). Один экземпляр многоножки погиб в варианте опыта с 10^{-1} и один – в варианте с 10^{-7} мг/г железа. Для двух садков с погибшими экземплярами исходную массу животных умножали на коэффициент 0,75.

Гранулометрический анализ подстилки определяли с помощью системы лабораторных сит с ячейками 0,20, 0,35, 0,70, 1,05, 1,55 и 2,05 мм. Массу фракций подстил-

ки определяли с точностью до 1 мг. Образцы подстилки анализировали с помощью микроскопа, соединенного с цифровым фотоаппаратом.

Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ Statistica 7.0. Различия между выборками считали достоверными при $P < 0,05$, оценивали их при помощи ANOVA. В тексте и таблицах приведены среднее и среднеквадратическое отклонение ($x \pm SD$).

Результаты и их обсуждение

При возрастании концентрации *Fe* в пище *M. kievense* достоверно не изменял массы тела (табл. 1). В четырех из девяти вариантов опыта отмечалось как увеличение, так и уменьшение массы тела (*Min* – *Max*). Это свидетельствует о том, что большее влияние на массу тела *M. kievense* оказало не содержание металла, а нерегулируемые в данном эксперименте факторы, в первую очередь микробоценоз подстилки и кишечника многоножек.

В присутствии *M. kievense* лишь в трех вариантах опыта (10^{-5} , 10^{-8} мг/г *Fe* и в контроле) наблюдалось достоверное уменьшение массы кормового субстрата (табл. 2). В вариантах опыта с *M. kievense* отмечено достоверное ($P < 0,05$) ускорение потребления подстилки при возрастании концентрации в ней *Fe*: слабее масса подстилки уменьшалась в контроле (на $45,7 \pm 0,44\%$) и при концентрации 10^{-8} мг/г (на $44,9 \pm 1,00\%$), сильнее – при 10^{-1} мг/г (на $46,1 \pm 1,76\%$) и 10^{-2} мг/г *Fe* (на $47,0 \pm 0,72\%$).

Таблица 1

Изменение массы тела *M. kievense* (мг/экз.) на протяжении месяца в лабораторном эксперименте при питании подстилкой с различной концентрацией *Fe* ($n = 6$)

Концентрация <i>Fe</i> , мг/г подстилки	Median	$x \pm SD$	<i>Min</i> – <i>Max</i>	$F, F_{0,05} = 2,15, df_1 = 8, df_2 = 45$	<i>P</i>
10^{-1}	2,13	$2,43 \pm 1,27$	1,25–4,75	0,66	0,722
10^{-2}	3,00	$3,04 \pm 0,83$	1,75–4,25		
10^{-3}	1,63	$2,13 \pm 2,25$	–1,00–5,50		
10^{-4}	3,00	$2,46 \pm 1,17$	0,75–3,50		
10^{-5}	1,13	$0,92 \pm 1,40$	–1,50–2,75		
10^{-6}	3,63	$3,67 \pm 1,55$	2,25–6,50		
10^{-7}	2,75	$3,08 \pm 2,27$	0,00–6,75		
10^{-8}	4,13	$2,79 \pm 4,32$	–5,50–6,25		
Контроль	2,50	$3,58 \pm 4,52$	–2,00–9,75		

Таблица 2

Изменение массы подстилки на протяжении месяца в лабораторном эксперименте по изучению влияния *Fe* на скорость потребления корма *M. kievense*

Концентрация <i>Fe</i> , мг/г подстилки	Изменение массы подстилки на протяжении эксперимента в присутствии <i>M. kievense</i> , %, $x \pm SD$ ($n = 6$)	Изменение массы подстилки на протяжении эксперимента без <i>M. kievense</i> , %, $x \pm SD$ ($n = 8$)	$F, F_{0,05} = 4,74, df_1 = 1, df_2 = 12$	<i>P</i>
10^{-1}	$46,1 \pm 1,76$	$47,4 \pm 0,72$	3,49	0,086
10^{-2}	$47,0 \pm 0,72$	$48,0 \pm 1,36$	2,41	0,147
10^{-3}	$45,3 \pm 1,37$	$47,4 \pm 2,24$	4,30	0,060
10^{-4}	$45,4 \pm 0,91$	$46,4 \pm 1,33$	2,77	0,122
10^{-5}	$44,9 \pm 2,23$	$47,7 \pm 0,98$	10,68	0,007
10^{-6}	$46,2 \pm 0,55$	$46,7 \pm 0,81$	1,60	0,230
10^{-7}	$46,4 \pm 0,88$	$46,0 \pm 2,22$	0,21	0,654
10^{-8}	$45,7 \pm 0,44$	$47,5 \pm 0,66$	33,35	0,0001
Контроль	$44,9 \pm 1,00$	$47,4 \pm 0,62$	33,64	0,0001
<i>F</i> ,	$2,16 (F_{0,05} = 2,15, df_1 = 8, df_2 = 45)$		$1,82 (F_{0,05} = 2,09, df_1 = 8, df_2 = 63)$	–
<i>P</i>	0,049		0,091	

Поскольку достоверных отличий в потреблении корма *M. kievense* при различной концентрации *Fe* не обнаружено, нас заинтересовало влияние особей исследуемого вида на гранулометрический состав подстилки (табл. 3). Масса крупной фракции (>2,05 мм) под влиянием питания *M. kievense* уменьшилась на 9,78%, масса фракции 1,55–2,05 мм – возросла на 0,66%, 1,05–1,55 мм – возросла на 1,19%, 0,70–1,05 мм – возросла на 7,06%, 0,35–0,70 мм – возросла

на 1,04%, фракции 0,20–0,35 мм – недостоверно уменьшилась на 0,17%. Произошло перераспределение фракций подстилки по гранулометрическому составу: основная часть самых крупных растительных частиц превратилась в садках с *M. kievense* во фракцию 0,70–1,05 мм, преимущественно представленную слабо измельченными растительными остатками и экскрементами диплопод (Kheirallah, 1990; Köhler et al., 1991).

Таблица 3

Изменение гранулометрического состава подстилки в лабораторном эксперименте при потреблении корма *M. kievense*

Фракция подстилки	Масса фракции подстилки в присутствии <i>M. kievense</i> , %, $x \pm SD$ ($n = 53$)	Масса фракции подстилки без <i>M. kievense</i> , %, $x \pm SD$ ($n = 73$)	$F, F_{0,05} = 3,92, df_1 = 1, df_2 = 124$	P
>2,05	$58,92 \pm 5,33$	$68,69 \pm 3,00$	170,58	$4,7 \cdot 10^{-25}$
1,55–2,05	$8,44 \pm 1,01$	$7,79 \pm 1,29$	9,58	0,002
1,05–1,55	$8,91 \pm 0,98$	$7,72 \pm 1,09$	40,11	$4,0 \cdot 10^{-9}$
0,70–1,05	$12,59 \pm 2,92$	$5,52 \pm 0,72$	392,12	$3,3 \cdot 10^{-40}$
0,35–0,70	$7,67 \pm 1,74$	$6,63 \pm 0,83$	19,89	$1,8 \cdot 10^{-5}$
0,20–0,35	$3,47 \pm 0,76$	$3,64 \pm 0,42$	2,65	0,106

Результаты лабораторного эксперимента показали, что на трофическую активность *M. kievense* способны оказывать влияние многие факторы. Даже в условиях лаборатории при тщательном контроле за температурой, влажностью и однородностью пищевого субстрата отмечаются сильные колебания массы тела многоножек. Особи исследованного вида способны периодически ускорять или замедлять темпы обмена веществ. Известно (Hopkin and Read, 1992), что Julidae способны по трещинам почвы перемещаться на глубину 10–40 см, сворачиваться в клубок и переставать питаться. Индуцированная пищевыми ресурсами диапауза (низкое количество корма, не подходящее для многоножки соотношение видов растений, соотношение бактериальной или грибковой флоры подстилки, загрязнение техногенными поллютантами и др.) может длиться более 6 месяцев. Это позволяет кивсякам дожидаться новой порции листового опада, в которой концентрация загрязняющих веществ будет значительно более низкой.

Не меньшее воздействие на обмен веществ животных и их роль в экосистеме могут оказывать латентные вирусные, бактериальные, грибковые инфекции или паразитарные инвазии (Tarasevich, 1975; Byzov, 2006). Добавление в пищу отдельных видов насекомых-фитофагов органических и неорганических соединений (Tarasevich, 1975) индуцировало переход латентной формы полиэдроза в активную фазу (аминоптерин, 2,6-диаминопурин, стрептоцид), либо, напротив, снижало смертность насекомых в лабораторном эксперименте (фолиевая, *p*-аминобензойная кислота, цианокобаламин, соли *Co*). Выделить животных с латентной формой вирусной, бактериальной или грибковой инфекции, микроспоридиозом или, например, нематодной инвазией перед началом эксперимента не представляется возможным. В связи с этим колебания массы тела животных подвергаются воздействию не только содержания тяжелого металла, но и многих других характеристик внутренней среды организма кивсяка.

Интересно, что достоверного воздействия соли железа на темпы разложения подстилки в отсутствие кивсяков (см. табл. 2) получено не было: вероятно, произошло

замещение чувствительной к данному металлу микрофлоры относительно толерантными к *Fe* группами микроорганизмов (Couteaux et al., 2002). В градиенте концентрации железа *M. kievense* оказался фактором, опосредующим негативное воздействие тяжелого металла на биологическое разложение подстилки.

Выводы

Тридцатисуточный лабораторный эксперимент по изучению влияния *M. kievense* на разложение растительных остатков в градиенте концентрации *Fe* показал отсутствие достоверных изменений массы тела животных.

Под влиянием *M. kievense* зарегистрировано достоверное ускорение потребления подстилки при возрастании концентрации в ней *Fe*, слабее масса подстилки уменьшалась в контроле (на $45,7 \pm 0,44\%$) и при концентрации 10^{-8} мг/г (на $44,9 \pm 1,00\%$), сильнее – при 10^{-1} мг/г (на $46,1 \pm 1,76\%$) и 10^{-2} мг/г *Fe* (на $47,0 \pm 0,72\%$).

Масса крупной фракции (>2,05 мм) под влиянием питания *M. kievense* уменьшилась на 9,78%, масса фракции 1,55–2,05 мм – возросла на 0,66%, 1,05–1,55 мм – возросла на 1,19%, 0,70–1,05 мм – возросла на 7,06%, 0,35–0,70 мм – возросла на 1,04%, фракции 0,20–0,35 мм – недостоверно уменьшилась на 0,17%. Произошло перераспределение фракций подстилки по гранулометрическому составу. Увеличение доли фракций средней величины (0,70–1,05 мм) в садках связано с накоплением экскрементов Julidae и фрагментов измельченных листьев, при мацерации растительных остатков перед их употреблением животными в пищу.

Влияние на массу тела животных и их кормового субстрата в различных вариантах опыта было чаще всего недостоверным из-за возможной активации латентных инфекций в условиях лабораторного эксперимента. Для выявления тонких механизмов воздействия загрязняющих веществ техногенного происхождения необходимы дальнейшие исследования влияния различных концентраций наиболее распространенных тяжелых металлов на массу тела и потребление корма особями исследуемого вида.

Бібліграфічні посилання

- Bobyliov, Y.P., Brygadyrenko, V.V., Bulakhov, V.L., Gaichenko, V.A., Gasso, V.Y., Didukh, Y.P., Ivashov, A.V., Kucheriavyyi, V.P., Maliovanyi, M.S., Mytsyk, L.P., Pakhomov, O.Y., Tsaryk, I.V., Shabanov, D.A., 2014. Ecology. Folio, Kharkiv (in Ukrainian).
- Boccardo, L., Penteado, C.H.S., 1995. Locomotor and metabolic activities of *Gymnostreptus olivaceus* (Diplopoda, Spirostreptida) at different photoperiod conditions. Comp. Biochem. Physiol. 112A, 611–617.
- Brygadyrenko, V.V., 2004. The use of simulation in the study populations *Rossulus kessleri* (Diplopoda, Julidae). Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 12(4), 15–22 (in Russian).
- Brygadyrenko, V.V., 2006. The possibility of using litter invertebrates to indicate gradations edaphotop moisture in forest ecosystems. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 14(1), 21–26 (in Russian).
- Brygadyrenko, V.V., Komarov, O.S., 2008. Trophic structure of litter mesofauna: Biomass differentiation between trophic levels. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 16(2), 12–23 (in Ukrainian).
- Bulakhov, V.L., Pakhomov, O.Y., 2010. Funkcional'na zoologija [Functional zoology]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).
- Byzov, B.A., 2006. Intestinal microbiota of millipedes. In: König, H., Varma, A. (Eds) Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. Springer, Berlin, pp. 89–114.
- Couteaux, M.-M., Aloui, A., Kurz-Besson, C., 2002. *Pinus halepensis* litter decomposition in laboratory microcosms as influenced by temperature and a millipede, *Glomeris marginata*. Appl. Soil Ecol. 20, 85–96.
- Cvetkova, N.N., 1992. Osobennosti migracii organo-mineral'nyh veshchestv v lesnyh BGC stepnoj Ukrainy [Migration features of organic and mineral matter in forests of steppe zone of Ukraine]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Russian).
- Cvetkova, N.N., Kulik, A.F., 1996. Soderzhanie i zakonomernosti raspredeleniya manganca i zheleza v pochvogruntah estestvennyh biogeocenozov srednego stepnogo Pridneprov'ja [Content and patterns of distribution of iron and manganese in soils of natural steppe biogeocenosis in Naddniproshchyna]. Voprosy Stepnogo Lesovedeniya i Lesnoj Rekul'tivacii Zemel'. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk, pp. 24–35 (in Russian).
- Cvetkova, N.N., Reva, A.A., Misjura, A.N., 2003. Vliyanie lesnogo biogeocenoza Prisamar'ja na raspredelenie medi i zheleza v organah i tkanjah mikromammalij [Influence of forest biogeocenosis in Prisamaryia on distribution of copper and iron in tissues and organs of mammalia]. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 11(2), 185–190 (in Russian).
- Dangerfield, J.M., Milner, A.E., 1993. Ingestion and assimilation of leaf litter in some tropical millipedes. J. Zool. 229, 683–693.
- Gere, G., 1956. Examination of the feeding biology and humification function of Diplopoda and Isopoda. Acta Biol. Hung. 6, 257–271.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M., Hendriks, A.J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. Environ. Pollut. 113, 385–393.
- Hopkin, S.P., Read, H.J., 1992. The biology of millipedes. Oxford University Press, New York.
- Karavanova, E.I., Belyanina, L.A., Shapiro, A.D., Stepanov, A.A., 2006. Effect of litters on the mobility of zinc, copper, manganese, and iron in the upper horizons of podzolic soils. Eurasian Soil Sci. 39(1), 35–43.
- Kheirallah, A., 1990. Fragmentation of leaf litter by a natural population of the millipede *Julus scandinavicus* (Latzel, 1884). Biol. Fert. Soils 10, 202–206.
- Köhler, H.-R., Alberti, G., 1992. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. Ber. Nat.-med. Verein. Innsbruck Suppl. 10, 257–267.
- Köhler, H.-R., Alberti, G., Storch, V., 1991. The influence of the mandibles of Diplopoda on the food – a dependence of fine structure and assimilation efficiency. Pedobiologia 35, 108–116.
- Köhler, H.-R., Huttenrauch, K., Berkus, M., Graff, S., Alberti, G., 1996. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. Appl. Soil Ecol. 3, 1–15.
- Köhler, H.-R., Körtje, K.-H., Alberti, G., 1995. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). Biometals 8, 37–46.
- Kulbachko, Y.L., Didur, O.O., 2012. Trophic priorities of millipedes (Diplopoda) in process of rehabilitation of the territories disturbed by mining industry. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 20(2), 30–37.
- Morgan, A.J., Morris, B., James, N., Morgan, J.E., Leyshon, K., 1986. Heavy metals in terrestrial macroinvertebrates: Species differences within and between trophic levels. Chemistry in Ecology 2, 319–334.
- Mosinec, V.N., 1981. Ohrana okruzhajushhej sredy pri proektirovanii i jekspluatacii rudnikov [Environmental protection in the design and operation of mines]. Nedra, Moscow (in Russian).
- Pashkevich, M.A., 2000. Tehnogennye massivy i ih vozdejstvie na okruzhajushhuju sredu [Man-made arrays and their impact on the environment]. St. Petersburg Mining Institute, St. Petersburg (in Russian).
- Souza, T.S., Christofolletti, C.A., Bozzatto, V., Fontanetti, C.S., 2014. The use of diplopods in soil ecotoxicology – A review. Ecotox. Environ. Safe. 103, 68–73.
- Striganova, B.R., Prishutova, Z.G., 1990. Food requirements of diplopods in the dry steppe subzone of the USSR. Pedobiologia 34, 37–41.
- Tarasevich, L.M., 1975. Virusy nasekomyh [Insect viruses]. Nauka, Moscow (in Russian).

Надійшла до редколегії 04.05.2014



УДК 574.24:595.6

Оцінка морфологічної мінливості популяцій *Rossiulus kessleri* (Diplopoda, Julida)

А.П. Похиленко

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

За умов антропогенного навантаження ґрунтова біота однією з перших реагує на зміни середовища існування. Оскільки природний відбір відбувається за фенотипами, важливо, що на урбанізованих територіях адаптації організмів до змін природних факторів можуть бути виявлені фенетичними дослідженнями. Взаємозв'язки між морфометричними характеристиками *Rossiulus kessleri* (Lohmander, 1927) виявлено із застосуванням факторного аналізу. Обрано 14 лінійних промірів тіла (а також їх співвідношень) і частин ротового апарату диплопод. Проаналізовано екологічну мінливість популяцій в умовах байрачних і заплавних екосистем Самарського лісу (територія Новомосковського та Кочерезького лісництва) і заказника «Волошанська дача» (урочище «Затишне») Дніпропетровської області. Виявлено морфометричні характеристики, за якими спостерігається статевий диморфізм і максимальна мінливість між популяціями. За результатами більшості промірів особини з популяції Новомосковського лісництва не характеризуються статевим диморфізмом. В умовах заказника «Волошанська дача» статевий диморфізм виявлено за більшістю лінійних промірів ($P < 0,001$). Під час дослідження популяції Кочерезького лісництва визначено, що самки на 14% ширші за самців (за лінійними промірами тіла) та мають довші антени. Для популяцій Новомосковського та Кочерезького лісництва майже за всіма зазначеними співвідношеннями виявлено статевий диморфізм. Найнижчий рівень морфологічної мінливості зафіксовано в популяції з Новомосковського лісництва. Результати факторного аналізу масиву даних показали наявність двох груп *R. kessleri*.

Ключові слова: диплоподи; факторний аналіз; статевий диморфізм; лісові екосистеми

Estimation of the morphological variability of *Rossiulus kessleri* (Diplopoda, Julida) populations

A.P. Pokhylenko

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

On condition of anthropogenic pressure soil biota is one of the first reacting on environment changes. As long as natural selection occurs by phenotypes, it is important that on the urban land the organisms' adaptations to changes in natural factors can be revealed with phenetic methods. The paper analyzes the ecological modification of the diplopoda *Rossiulus kessleri* (Lohmander, 1927) in the Samarskyi Forest region environment (Novomoskovskiy forestry is the ravine ecosystem, and Kocherezhskiy forestry is short-term-flooded ecosystem) and State Reservation "Voloshanskaya Dacha" ("Zatishnoye"). Such investigation for this region is conducted for the first time. Space samples consisted of 30 individuals (males and females, proportionally) for each plot. Among others, 14 basic morphometric in-line parameters and its relation were chosen: length/width of the body, amount of segments, length of hindleg, length of telson, length/width of antenna, length/width of gnathochilarium, length/width of semiflosculous blades, length/width of promenthum, length of collum. Morphometric interconnections within the given populations were established with the help of the factor analysis. The most changeable morphometric characteristics between populations and sexes were revealed. For all the given populations sex dimorphism is pointed out for the size of gnathochilarium and the length of collum. Basing on obtained results from specimen measuring from Novomoskovsky forestry district we pointed out that both the majority of the given in-line parameters and its relation had no sex dimorphism. It also shows the stability of the environment. It is estimated that females from Kocherezhskiy forestry population have longer antennae (males have 10,2% less) and body width (females are on 14,0% wider). Body width is stable characteristic for many Diplopoda species. With high signification level for both basic in-line characters (length and width), sex dimorphism is observed in the conditions of the State Reservation "Voloshanskaya Dacha" ("Zatishnoye" stow). ANOVA-test of the given data showed that two different groups existed. Specific characters for individuals with disper-

sal index 19,2% are extensive body parameters. Spatial population structure clearly distinguishes males from the general sample. Data obtained illustrates the anthropogenic pressure and can be used to monitor populations.

Keywords: diplopoda; factor analysis; sex dimorphism; ravine ecosystem; forest ecosystem

Вступ

Ґрунтова біота однією з перших реагує на зміни середовища існування (Pylypenko, 1977; Griffiths et al., 2001; Wolters, 2001). Тому на урбанізованих територіях важливо визначити «здоров'я ґрунту» за видами-індикаторами (Doran and Zeiss, 2000; Pylypenko and Zhukov, 2001; Nahmani et al., 2006; Bobylov et al., 2014) і адаптацій організмів до змін природних факторів фенетичними дослідженнями (Didukh, 1998; Hedde et al., 2013), оскільки дослідження генотипу потребує спеціального обладнання. Населення ґрунту може бути використане як індикатор (Payne et al., 2012; Caporn et al., 2014) будь-якого виду забруднення, зокрема диплоподи (Silva Souza et al., 2014) здатні до накопичення важких металів. Вплив людини на функціонування природних екосистем потребує детального екологічного аналізу наслідків цього процесу (Pokarzhevskij et al., 1989; Baker, 1998; Kalisz and Powell, 2003; Aurambout et al., 2005; Zaitsev et al., 2014). Індикаторами стійкості популяції в умовах навколишнього середовища вважають морфологічну мінливість, генетичну мінливість, чисельність, щільність населення, температуру, вологість, інші біотичні та абіотичні фактори (Hylyarov, 1990; Bulakhov and Pakhomov, 2010). Дані з морфометрії диплопод нечисленні (Lokshina, 1969; Prishutova, 1988a, b; 2001a, b; Enghoff et al., 1993) і супроводжують визначні таблиці: для представників Julida виявлено видоспецифічні особливості будови гоноподій (Tadler, 1996), оцінено вплив ізоляції на фенотипічні особливості популяцій *Parafontaria tonominea* (Polydesmida) і будову гоноподій (Tanabe et al., 2001); майже повністю відсутні дані щодо функціональної ролі окремих частин ротового апарату диплопод, хоча деякі морфологічні відмінності жувальних частин мандибул для окремих видів виявлено (Semenyuk et al., 2011).

Мета роботи – оцінити морфологічну мінливість популяцій у природних умовах у межах Дніпропетровської області (байрачних екосистем Самарського лісу Новомосковського лісництва, заплавних лісових екосистем Кочерезького лісництва та урочища «Затишне» заказника «Волошанська дача»), виявивши ознаки, за якими спостерігається максимальна мінливість, і морфометричні характеристики, що описують статевий диморфізм популяцій *Rossiulus kessleri* (Lohmander, 1927).

Матеріал і методи досліджень

Матеріал збирали у трьох екосистемах.

Діброва Новомосковського лісництва на схилі північної експозиції байраку «Глибокий». Зімкненість крон – 75%. Ґрунт – чорнозем лісовий, байрачний, вилужений, багатогумусний, суглинистий на лесоподібних суглинках. Основні деревні породи – дуб звичайний, ясен звичайний, клен польовий. Крім основних порід присутні також клен гостролистий, в'яз. У трав'яному

ярусі панують зірочник лісовий, буги́ла лісова, розхидник плющовидний, фіалка запашна, гравілат міський. Травостій нерівномірний, загальне покриття – 50%. Лісова підстилка потужністю 3 см складається з напіврозкладеного листя, гілочок дуба, ясена, клена.

На території урочища «Затишне» заказника «Волошанська дача» матеріал знаходили у штучному кленовому насадженні (клен гостролистий, клен польовий, клен татарський із загальною зімкненістю 60%).

На ділянці Кочерезького лісництва основні деревні породи – клен польовий, ясен звичайний. Зімкненість крон – 60%. У трав'яному ярусі із загальним покриттям 80% домінують буги́ла лісова, підмаренник чіпкий, яглиця звичайна, купина багатоквіткова. Підстилка потужністю 1 см, суцільна, щільна. Досліджена ділянка розташована на III терасі долинно-терасового ландшафту. Засоленість вод і ґрунтів є визначною рисою даної тераси. Тут є ряд дрібних озер і значна площа солончаків, що впливають на загальний режим мінералізації всіх ґрунтів долини р. Самара (Travleev, 1977). Таким чином, у ґрунтовому покриві спостерігається взаємодія чорноземного, лучного, болотного процесів утворення ґрунтів і явищ осолонцювання та осолодіння (Belova and Travleev, 1999). Слід відзначити, що басейн Самари відрізняється високим рівнем розораності ґрунтів, що у поєднанні зі значними відстанями між дослідними ділянками (понад 20 км) унеможливило міграцію диплопод між ними.

Для порівняння параметрів обраного представника Julidae за статтю та популяцій між собою (Prishutova, 2001a) обрано мінімальний комплекс ознак (14 лінійних параметрів): L (довжина тіла), l (ширина тіла), S (кількість сегментів), F (довжина задньої кінцівки), T (довжина тельсона), A (довжина вусика), a (ширина вусика), G (довжина гнатохілярія), g (ширина гнатохілярія), E (довжина язичкових пластин), e (ширина язичкових пластин), U (довжина проментума), u (ширина проментума), C (довжина колума) (табл. 1). Визначені такі співвідношення обраних ознак: L/S , L/l , l/A , l/F , l/C , A/F . Таким чином, промірено 90 екземплярів (по 30 у кожній популяції). Для вимірювання відбирали статевозрілих особин. Розміри особин визначали за допомогою окуляр-мікрометра бінокуляра МБС-9.

Для виявлення достовірності відмінностей між статями та популяціями застосовували однофакторний дисперсійний аналіз і методи факторного аналізу (Kogsov, 1996). Морфометричні проміри популяцій *R. kessleri* на території Дніпропетровської області (Самарського лісу та заказника «Волошанська дача») проведено уперше.

Результати та їх обговорення

R. kessleri – еврибіонт, екологічно досить пластичний вид, світлолюбний, приурочений до екотонів «ліс – поле», «ліс – степ». Сірий ківськ – модельний вид, найдетальніше досліджені популяції цього виду у біотопах Центрально-Чорноземного заповідника (моніторинг ве-

деться з 1957 року співробітниками Інституту еволюційної морфології та екології ім. Северцева) (Pokarzhevskij, 1983). Оскільки обрані ділянки практично ізольовані одна від одної та від території міста, врахо-

вуючи міграційну здатність диплопод (Wytwer and Zalewski, 2005; Baker et al., 2013), можна вважати, що особини *R. kessleri*, які існують у межах окремих ділянок, належать до різних популяцій.

Таблиця 1

Мінливість основних морфометричних характеристик *Rossius kessleri* (Lohmander, 1927) в умовах Самарського лісу Новомосковського лісництва

Характеристика	Стать	Середнє значення та похибка, $M \pm m_{t0,05}$	Діапазон коливань, $Min-Max$	Експес, Ex	Асиметричність, As	Достовірність відмінності за статтю, $F_{0,05} = 4,19$	
						F	P
Довжина тіла (L), мм	♀	$31,70 \pm 3,43$	22,00–44,00	–0,30	0,80	0,13	> 0,05
	♂	$32,30 \pm 5,17$	28,00–36,00	–0,90	–0,20		
Ширина тіла (I), мм	♀	$3,27 \pm 2,50$	2,38–7,75	13,10***	3,53 ***	2,31	> 0,05
	♂	$2,76 \pm 0,56$	2,25–3,38	0,70	0,31		
Кількість сегментів (S)	♀	$49,50 \pm 3,54$	47–54	1,42	0,07	3,04	> 0,05
	♂	$48,10 \pm 4,96$	42–51	2,19	–1,60		
Довжина задньої кінцівки (F), мм	♀	$1,21 \pm 0,76$	0,93–2,55	12,20 ***	3,37 ***	0,12	> 0,05
	♂	$1,25 \pm 0,24$	0,92–1,42	2,28	–1,27		
Довжина тельсона (T), мм	♀	$1,38 \pm 1,02$	1,03–3,20	12,90 ***	3,47***	0,18	> 0,05
	♂	$1,33 \pm 0,24$	1,15–1,55	–1,14	0,24		
Довжина вусика (A), мм	♀	$1,95 \pm 0,58$	1,55–2,50	–1,07	0,48	4,17	0,05
	♂	$2,20 \pm 0,50$	1,70–2,80	1,60	0,50		
Ширина вусика (a), мм	♀	$0,22 \pm 0,07$	0,15–0,28	–0,40	–0,60	0,02	> 0,05
	♂	$0,22 \pm 0,06$	0,15–0,27	–0,21	–0,54		
Довжина гнатохілярія (G), мм	♀	$1,12 \pm 0,18$	0,98–1,25	–0,79	–0,08	7,44	< 0,05
	♂	$1,05 \pm 0,10$	0,97–1,15	–0,67	0,58		
Ширина гнатохілярія (g), мм	♀	$1,14 \pm 0,19$	0,95–1,35	0,76	0,28	9,96	< 0,01
	♂	$1,04 \pm 0,14$	0,90–1,18	0,46	–0,50		
Довжина язичкових пластин (E), мм	♀	$0,39 \pm 0,09$	0,32–0,47	–0,63	0,53	0,56	> 0,05
	♂	$0,37 \pm 0,10$	0,27–0,45	0,12	–0,54		
Ширина язичкових пластин (e), мм	♀	$0,18 \pm 0,06$	0,12–0,25	0,33	0,37	0,26	> 0,05
	♂	$0,19 \pm 0,04$	0,15–0,22	–0,22	–0,30		
Довжина проментума (U), мм	♀	$0,29 \pm 0,06$	0,25–0,35	0,16	0,48	5,60	< 0,05
	♂	$0,26 \pm 0,09$	0,17–0,32	–0,09	–0,75		
Ширина проментума (u), мм	♀	$0,19 \pm 0,08$	0,12–0,25	–0,94	0,27	0,44	> 0,05
	♂	$0,18 \pm 0,06$	0,12–0,22	–0,44	–0,59		
Довжина колума (C), мм	♀	$1,31 \pm 0,31$	1,02–1,60	–0,45	–0,16	5,80	< 0,05
	♂	$1,19 \pm 0,22$	0,67–1,42	0,52	–0,003		
L/S	♀	$0,67 \pm 0,09$	0,58–0,75	–0,44	–0,52	–6,22	> 0,05
	♂	$0,67 \pm 0,09$	0,58–0,75	–0,44	–0,52		
L/I	♀	$11,76 \pm 2,09$	9,92–13,33	–0,93	–0,28	–3,14	> 0,05
	♂	$11,76 \pm 2,09$	9,92–13,33	–0,93	–0,28		
I/A	♀	$1,28 \pm 0,25$	1,08–1,49	–0,92	0,22	0	1
	♂	$1,28 \pm 0,25$	1,08–1,49	–0,92	0,22		
I/F	♀	$2,23 \pm 0,69$	1,80–3,14	2,18	1,46	–2,11	> 0,05
	♂	$2,23 \pm 0,69$	1,80–3,14	2,18	1,46		
I/C	♀	$2,31 \pm 0,37$	2,02–2,71	0,20	0,58	0,01	> 0,05
	♂	$2,31 \pm 0,37$	2,02–2,71	0,20	0,58		
A/F	♀	$1,76 \pm 0,73$	1,34–2,62	2,23	1,63	–1,27	> 0,05
	♂	$1,76 \pm 0,73$	1,34–2,62	2,23	1,63		

Примітки: ♀ – самки ($n = 15$), ♂ – самці ($n = 15$); $S_{Ex} = 1,09$, $S_{As} = 0,80$; * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

За результатами більшості промірів особини з популяції Самарського лісу Новомосковського лісництва не відрізняються статевим диморфізмом (табл. 1). Виняток становить розмір гнатохілярія (у самок він на 8,8% ширший ($1,14 \pm 0,19$ для самок і $1,04 \pm 0,14$ мм для самців) і на 6,3% довший ($1,12 \pm 0,18$ для самок і $1,05 \pm 0,10$ мм для самців). Зауважимо, що в цій популяції самці довші за меншої кількості сегментів.

Взаємодії лінійних промірів у популяції можна проаналізувати за допомогою факторного аналізу. Для

визначення факторів, що впливають на популяцію, застосовано нормалізацію даних шляхом віднімання середнього значення для популяції та поділу отриманих значень на середньоквадратичне відхилення (Korosov, 1996). Дисперсію особин за промірами всередині популяцій виявили шляхом транспонування вихідної матриці. Це дозволило показати положення окремої особини у популяції та проаналізувати різні групи особин за сукупністю ознак. Результати факторного аналізу показали наявність двох різних груп *R. kessleri* за лінійними

показниками (рис. 1) в умовах байрачної екосистеми. Фактор 2 у даній вибірці описує максимальну дисперсію (45,5 %) і відображає «довжину тельсона». Крім довгого тельсона особини характеризуються меншими розмірами гнатохілярія (на 2,5% по довжині, на 8,0% по ширині) та ширшими (на 5,3%) язичковими пластинами. Для вимірювання відбирали статевозрілих особин. Постембріональний розвиток сірого ківсяка вивчено детально (Prishutova 1988a, b, 2001a, b). Для даної популяції незалежно від статі не характерне збереження близького до нормального розподілу основних характеристик тіла. Виняток становлять деякі лінійні проміри тіла самок (довжина тіла, довжина задньої кінцівки,

довжина тельсона; $t_{As} > 2,5$). За всіма зазначеними співвідношеннями для популяції байрачної екосистеми статевий диморфізм не характерний, тобто пропорції тіла залишаються незмінними.

Під час дослідження популяції Кочерезького лісництва (табл. 2) визначено, що самки за лінійними промірами більші за самців. Суттєві відмінності спостерігаються по довжині вусиків: у самок вони на 10,2% менші ($1,9 \pm 0,4$ у самок та $2,2 \pm 0,4$ мм у самців) за майже однакової ширини ($0,2 \pm 0,04$ для самок і $0,2 \pm 0,03$ мм для самців). Тіло самки на 14% ширше ($3,0 \pm 0,4$ у самок та $2,6 \pm 0,4$ мм у самців).

Таблиця 2

Мінливість основних морфометричних характеристик *Rossiulus kessleri* (Lohmander, 1927) Самарського лісу в умовах Кочерезького лісництва Павлоградського району

Характеристика	Стать	Середнє значення та похибка, $M \pm mt_{0,05}$	Діапазон коливань, $Min-Max$	Ексцес, Ex	Асиметричність, As	Достовірність відмінності за статтю, $F_{0,05} = 4,19$	
						F	P
Довжина тіла (L), мм	♀	$31,53 \pm 5,58$	27,00–35,00	-1,53	-0,31	0,69	> 0,05
	♂	$30,67 \pm 5,57$	25,00–37,00	1,20	0,41		
Ширина тіла (I), мм	♀	$3,00 \pm 0,38$	2,62–3,25	-0,64	-0,42	33,78	< 0,001
	♂	$2,58 \pm 0,40$	2,25–3,12	2,68	1,12		
Кількість сегментів (S)	♀	$50,20 \pm 3,49$	48,00–54,00	0,12	0,70	5,06	< 0,05
	♂	$48,73 \pm 3,51$	47,00–54,00	1,84 ***	7,00		
Довжина задньої кінцівки (F), мм	♀	$1,12 \pm 0,14$	1,02–1,27	0,25	0,90	0,18	> 0,05
	♂	$1,11 \pm 0,15$	1,00–1,25	-0,10	0,65		
Довжина тельсона (T), мм	♀	$1,29 \pm 0,23$	1,07–1,50	-0,31	0,22	14,70	< 0,001
	♂	$1,13 \pm 0,22$	1,00–1,45	4,35 *	1,96 *		
Довжина вусика (A), мм	♀	$1,93 \pm 0,35$	1,70–2,32	-0,15	0,74	8,35	< 0,01
	♂	$2,15 \pm 0,44$	1,75–2,50	-0,78	-0,06		
Ширина вусика (a), мм	♀	$0,23 \pm 0,04$	0,20–0,25	-1,54	-0,43	3,37	> 0,05
	♂	$0,22 \pm 0,03$	0,17–0,25	0,95	-0,68		
Довжина гнатохілярія (G), мм	♀	$1,21 \pm 0,16$	1,07–1,35	-0,96	0,09	43,31	< 0,001
	♂	$1,00 \pm 0,17$	0,87–1,35	3,73	1,52		
Ширина гнатохілярія (g), мм	♀	$1,22 \pm 0,10$	1,15–1,32	-0,34	0,35	30,89	< 0,001
	♂	$1,07 \pm 0,18$	0,90–1,27	0,97	0,49		
Довжина язичкових пластин (E), мм	♀	$0,46 \pm 0,08$	0,35–0,50	2,54	-1,51	47,92	< 0,001
	♂	$0,38 \pm 0,05$	0,35–0,42	-0,75	0,41		
Ширина язичкових пластин (e), мм	♀	$0,20 \pm 0,05$	0,17–0,25	-0,85	0,14	6,11	< 0,05
	♂	$0,18 \pm 0,04$	0,15–0,20	-0,78	-0,94		
Довжина проментума (U), мм	♀	$0,30 \pm 0,10$	0,22–0,42	0,97	0,86	1,88	> 0,05
	♂	$0,27 \pm 0,12$	0,17–0,45	4,54	1,48		
Ширина проментума (u), мм	♀	$0,19 \pm 0,06$	0,15–0,25	-0,92	0,54	5,28	< 0,05
	♂	$0,17 \pm 0,05$	0,12–0,22	1,00	0,15		
Довжина колума (C), мм	♀	$1,35 \pm 0,16$	1,25–1,50	-0,77	0,37	28,01	< 0,001
	♂	$1,18 \pm 0,18$	1,00–1,37	0,37	-0,03		
L/S	♀	$0,63 \pm 0,10$	0,54–0,71	-1,19	-0,15	0,002	> 0,05
	♂	$0,63 \pm 0,09$	0,53–0,72	0,47	0,12		
L/I	♀	$0,26 \pm 0,05$	0,21–0,31	-0,03	-0,28	19,23	< 0,001
	♂	$0,29 \pm 0,03$	0,27–0,32	-0,74	-0,48		
I/A	♀	$1,57 \pm 0,35$	1,29–1,91	-0,78	0,17	44,38	< 0,001
	♂	$1,21 \pm 0,21$	1,02–1,47	1,09	0,72		
I/F	♀	$2,69 \pm 0,35$	2,39–3,02	-0,69	0,12	35,74	< 0,001
	♂	$2,33 \pm 0,29$	2,04–2,62	0,23	-0,14		
I/C	♀	$2,23 \pm 0,38$	1,93–2,54	-1,45	0,05	0,45	> 0,05
	♂	$2,19 \pm 0,30$	2,00–2,62	3,49	1,53		
A/F	♀	$1,73 \pm 0,42$	1,44–2,27	1,75	1,26	7,55	0,01
	♂	$1,94 \pm 0,04$	1,59–2,37	0,52	0,39		

Примітки: див табл. 1.

В особин із заплавної лісової екосистеми майже за всіма співвідношеннями виявлено статевий диморфізм. Хоча по довжині вусиків і ширині проментума спостерігається статевий диморфізм, для зворотних промірів зазначених органів відмінності відсутні. Відмінностей за статтю не зареєстровано по довжині тіла, довжині задньої кінцівки, ширині вусика, довжині проментума, але за результатами факторного аналізу промірів тіла (рис. 2) для популяції *R. kessleri* із заплавних екосистем Кочерезького лісництва чітко відокремлюється група особин за фактором 1 (15,6% загальної дисперсії) – «ширина вусика».

Менш варіабельним за довжину, тому більш об'єктивним показником розмірів тіла сірого ківсяка, як і для багатьох інших видів диплопод (Latrou and Stamou, 1988; Enghoff, 1992: цит. за Prishutova, 2001a), є ширина. В умовах заказника «Волошанська дача» спостерігається статевий диморфізм за обома основними лінійними

промірами тіла на вищому рівні значимості ($P < 0,001$), у той час як для популяції *R. kessleri* з Новомосковського лісництва статевий диморфізм за обома показниками не характерний ($P > 0,05$).

Для популяції в умовах заказника статевий диморфізм виявлено за розміром голови та, відповідно, за всіма лінійними промірами частин гнатохілярія ($P < 0,001$): його шириною та довжиною, шириною та довжиною язичкових пластин, шириною та довжиною проментума, довжиною колума. Слід зазначити, що в інших популяціях статевий диморфізм за розмірами проментума виявлено за низьких рівнів значимості (в умовах Новомосковського лісництва – по довжині за $P < 0,05$; для умов Кочерезького лісництва – по ширині за $P < 0,05$). У популяції заплавної екосистеми та штучного насадження заказника для співвідношення l/C статевий диморфізм не відмічений, хоча, за обома параметрами окремо (l , C), відмінності зареєстровано ($P < 0,001$).

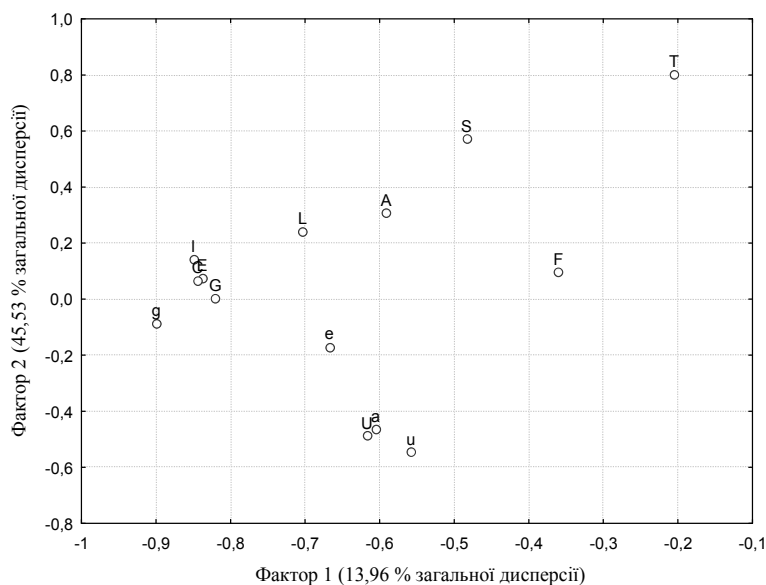


Рис. 1. Взаємне розташування морфометричних характеристик особин *R. kessleri* в ортогональних факторах: фактор 1 – «розмір гнатохілярія», фактор 2 – «довжина тельсона»; позначення характеристик – див. табл. 1

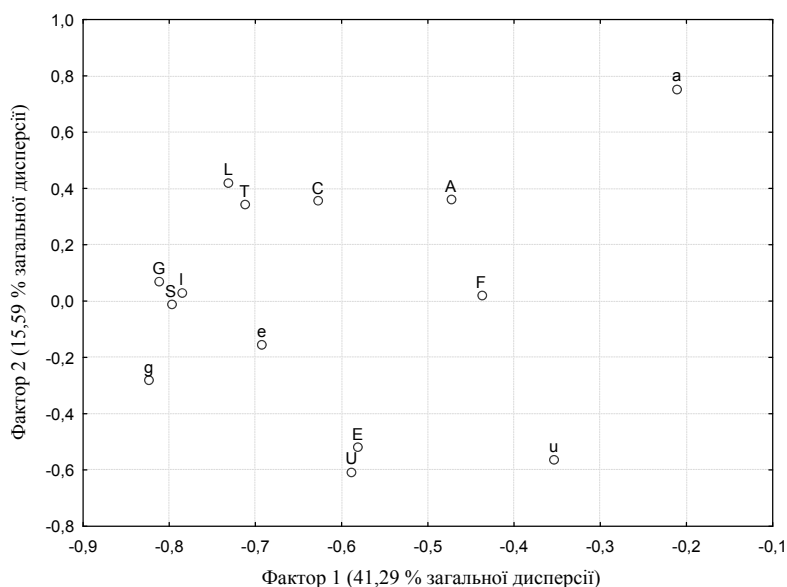


Рис. 2. Взаємне розташування морфометричних характеристик особин *R. kessleri* в ортогональних факторах: фактор 1 – «ширина вусика», фактор 2 – «розмір гнатохілярія»; позначення характеристик див. табл. 2

Мінливість основних морфометричних характеристик *Rossiulus kessleri* (Lohmander, 1927) в умовах заказника «Волошанська дача» Юріївського району Дніпропетровської області

Характеристика	Стать	Середнє значення та похибка, $M \pm m_{0,05}$	Діапазон коливань, $Min-Max$	Ексцес, $Ex \pm S_{ex0,05}$	Асиметричність, $As \pm S_{as0,05}$	Достовірність відмінності за статтєю, $F_{0,05} = 4,19$	
						F	P
Довжина тіла (L), мм	♀	41,00 ± 2,27	32,00–51,00	1,26	0,005	38,02	< 0,001
	♂	31,13 ± 2,16	21,00–39,00	1,60	–0,71		
Ширина тіла (I), мм	♀	3,65 ± 0,19	3,15–4,37	–0,15	0,64	54,13	< 0,001
	♂	2,79 ± 0,13	2,25–3,37	1,52	0,45		
Кількість сегментів (S)	♀	50,87 ± 1,86	47–63	9,40 **	2,78 **	2,79	> 0,05
	♂	49,13 ± 0,81	46–52	–0,13	–0,13		
Довжина задньої кінцівки (F), мм	♀	1,29 ± 0,07	1,07–1,50	–1,05	0,11	3,00	> 0,05
	♂	1,19 ± 0,07	0,75–1,37	6,86 *	–2,31 *		
Довжина тельсона (T), мм	♀	1,57 ± 0,12	1,22–1,90	–1,53	–0,17	24,55	< 0,001
	♂	1,22 ± 0,07	1,02–1,50	–0,64	0,38		
Довжина вусика (A), мм	♀	2,74 ± 0,25	2,00–3,62	–0,81	0,38	3,37	> 0,05
	♂	2,44 ± 0,19	1,87–3,37	1,19	0,74		
Ширина вусика (a), мм	♀	0,29 ± 0,03	0,22–0,42	0,06	1,15	2,79	> 0,05
	♂	0,26 ± 0,02	0,17–0,35	1,33	0,28		
Довжина гнатохілярія (G), мм	♀	1,31 ± 0,06	1,12–1,47	–1,05	–0,54	47,12	< 0,001
	♂	1,03 ± 0,05	0,90–1,25	–0,75	0,39		
Ширина гнатохілярія (g), мм	♀	1,39 ± 0,05	1,20–1,55	–0,88	–0,25	79,78	< 0,001
	♂	1,05 ± 0,05	0,87–1,30	1,33	0,61		
Довжина язичкових пластин (E), мм	♀	0,47 ± 0,02	0,37–0,52	–0,51	–0,50	51,02	< 0,001
	♂	0,37 ± 0,01	0,32–0,40	–0,18	–0,62		
Ширина язичкових пластин (e), мм	♀	0,23 ± 0,01	0,17–0,27	0,32	–0,61	13,55	0,001
	♂	0,19 ± 0,01	0,15–0,22	–1,51	–0,21		
Довжина проментума (U), мм	♀	0,35 ± 0,02	0,27–0,40	–0,47	–0,47	61,30	< 0,001
	♂	0,26 ± 0,01	0,22–0,30	–0,22	0,07		
Ширина проментума (u), мм	♀	0,24 ± 0,02	0,17–0,30	–1,02	0,12	25,67	< 0,001
	♂	0,18 ± 0,01	0,12–0,20	1,82	–1,32		
Довжина колума (C), мм	♀	1,57 ± 0,13	1,17–2,25	2,31	0,93	24,65	< 0,001
	♂	1,22 ± 0,04	1,00–1,35	1,54	–1,15		
L/S	♀	0,81 ± 0,04	0,65–0,89	–0,53	–0,75	36,43	< 0,001
	♂	0,63 ± 0,04	0,45–0,75	0,76	–0,69		
L/I	♀	11,27 ± 0,65	9,37–13,33	–1,12	0,31	0,07	> 0,05
	♂	11,19 ± 0,57	7,64–12,57	7,18	–2,29		
I/A	♀	1,37 ± 0,13	0,90–1,87	–0,15	–0,13	7,99	< 0,01
	♂	1,16 ± 0,07	0,95–1,48	0,56	0,73		
I/F	♀	2,86 ± 0,17	2,23–3,37	–0,50	–0,39	13,57	< 0,001
	♂	2,36 ± 0,20	2,00–3,67	8,76	2,68		
I/C	♀	2,37 ± 0,22	1,78–3,21	–0,75	0,36	0,48	> 0,05
	♂	2,29 ± 0,10	1,96–2,60	–1,22	0,13		
A/F	♀	2,12 ± 0,14	1,60–2,64	0,13	0,39	0,62	> 0,05
	♂	2,06 ± 0,19	1,50–2,83	–0,07	0,72		

Примітки: див. табл. 1.

За результатами однофакторного дисперсійного аналізу (рис. 3) максимальну загальну дисперсію (41,6%) визначено за фактором 1 – «ширина проментума». Спостерігається це за рахунок самок, які в умовах заказника більші за самців. Самки двох інших популяцій значно менші за популяцію в умовах заказника ($P < 0,001$).

Результати факторного аналізу трьох популяцій показали наявність двох груп *R. kessleri* (рис. 4). Для особин із додатними значеннями за фактором 1 (19,2% загальної дисперсії) характерні довші розміри тіла, більший тельсон. Особини з додатними значеннями за фактором 2 (12,2% загальної дисперсії) виділяються довшими вусиками (на 4,7%), вужчим гнатохілярієм (на 0,9%), більшими розмірами язичкових пластин (на 10,5% довші та на 16,7% вужчі) і проментума (на 20,0% довший та на

40,0% ширший). Постембріональний розвиток *R. kessleri* вивчено детально, і відомо (Prishutova, 2001b), що ківсяки родини Julidae линяють до X–XV віку. Виявлено (Blower and Fairhurst, 1968; цит за Prishutova, 2001b), що між загальною кількістю років і числом сегментів для окремих видів (*Cylindroiulus punctatus*, *C. latestriatus*, *Brachyiulus calcivagus*, *Rossiulus kessleri* та ін.) кореляції не визначено.

Просторова структура популяцій чітко відокремлює самців із загальної вибірки (рис. 4). Відповідно до еволюційної теорії статі (Geodakyan, 1983) це свідчить про пристосування самців до поточних умов життя та ілюструє вищу мінливість самців порівняно із самицями, характерну для переважної більшості форм живих істот. Порівнюючи характеристики особин чоловічої та жіно-

чої статі, дослідники з'ясовують напрям еволюції виду. У стабільному середовищі існування рівень статевого диморфізму мінімальний (Geodakyan, 1983), найвищий

рівень спостерігається в умовах заказника. Якщо самки *R. kessleri* більші за самців – вид еволюціонує в напрямку зменшення розмірів тіла.

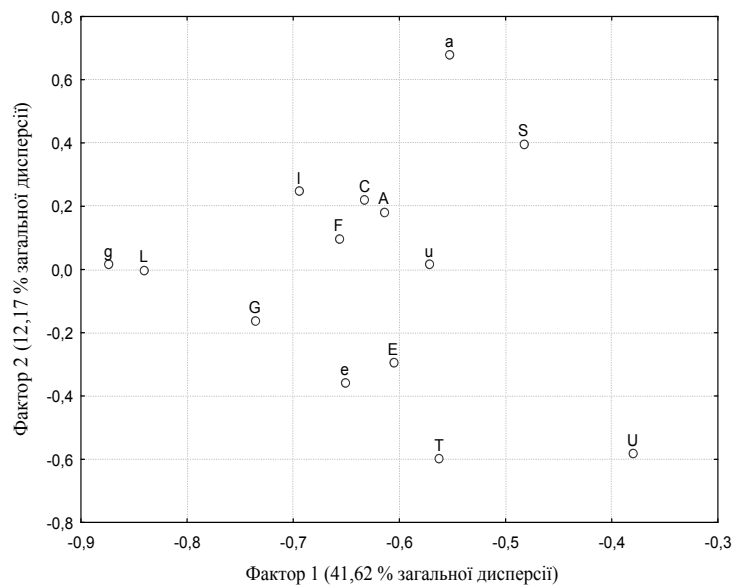


Рис. 3. Взаємне розташування морфометричних характеристик особин *R. kessleri* в ортогональних факторах: фактор 1 – «розмір гнатохілярія», фактор 2 – «ширина проментума»; позначення характеристик див. табл. 1

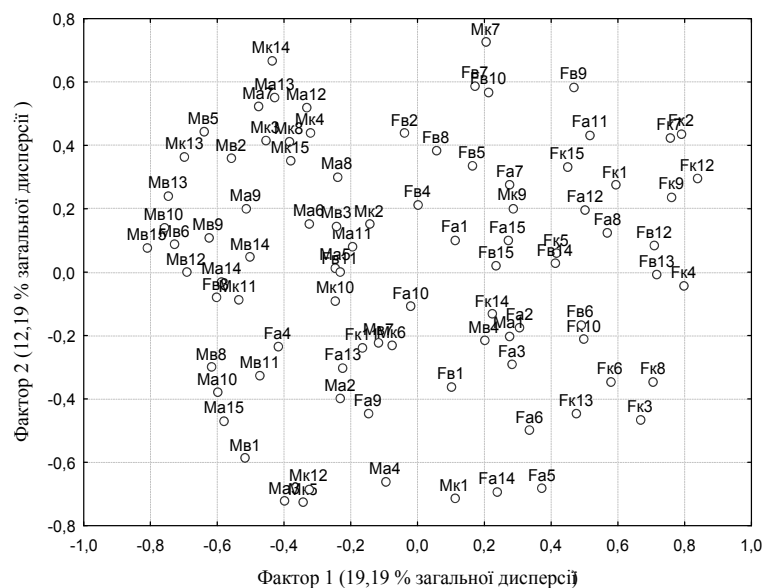


Рис. 4. Взаємне розташування особин *R. kessleri* в ортогональних факторах морфометричних характеристик: фактор 1 – «популяція», фактор 2 – «стать», *Ma*, *Fa* – самці та самки Самарського лісу Новомосковського лісництва; *Mk*, *Fk* – самці та самки Самарського лісу Кочерезького лісництва; *Mb*, *Fb* – самці та самки урочища «Затишне» заказника «Волошанська дача»; номери 1–15 відповідають дослідженим особинам

Висновки

Отримані дані, що відрізняються, дозволяють уявити населення виділених біотопів як окремі популяції. Максимальну дисперсію (19,2%) за результатами факторного аналізу даних трьох популяцій *R. kessleri* описує фактор «популяція», другорядну роль відіграє фактор «стать». Просторова структура популяцій чітко відокремлює самців із загальної вибірки. В умовах заказника «Волошанська дача» статевий диморфізм виявлено за більшіс-

тю лінійних промірів ($P < 0,001$). Для популяцій Новомосковського та Кочерезького лісництв майже за всіма зазначеними співвідношеннями виявлено статевий диморфізм. Найнижчий рівень морфологічної мінливості зафіксовано у популяції з Новомосковського лісництва. Зазначені дані на основі популяційно-фенетичного аналізу дозволяють проілюструвати антропогенний вплив на угруповання *Diplopoda*. Отримані дані можна використати під час проведення багаторічного моніторингу популяції *R. kessleri*, а також для порівняння з популяціями за інших умов існування.

Бібліографічні посилання

- Aurambout, J.P., Endress, A.G., Deal, B.M., 2005. A spatial model to estimate habitat fragmentation and its consequences on long-term persistence of animal populations. *Environ. Monit. Assess.* 109, 199–225.
- Baker, G.H., 1998. Recognising and responding to the influence of agriculture and other land-use practices in Australia. *Appl. Soil Ecol.* 9, 303–310.
- Baker, G.H., Grevinga, L., Banks, L.N., 2013. Invasions of the portuguese millipede, *Ommatoiulus moreleti*, in southern Australia. *Pedobiologia* 56(4), 213–218.
- Belova, N.A., Travleev, A.P., 1999. Estestvennye lesa i stepnye pochvy [Natural forests and steppe soils]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Russian).
- Bobyliov, Y.P., Brygadyrenko, V.V., Bulakhov, V.L., Gaichenko, V.A., Gasso, V.Y., Didukh, Y.P., Ivashov, A.V., Kucheriavyy, V.P., Maliovanyi, M.S., Mytsyk, L.P., Pakhomov, O.Y., Tsaryk, I.V., Shabanov, D.A., 2014. Ecology. Folio, Kharkiv (in Ukrainian).
- Bulakhov, V.L., Pakhomov, O.Y., 2010. Funkcional'na zoologija [Functional zoology]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).
- Caporn, S.J.M., Carroll, J.A., Dise, N.B., Payne R.J., 2014. Impacts and indicators of nitrogen deposition in moorlands: Results from a national pollution gradient study. *Ecol. Indic.* 45, 227–234.
- Didukh, Y.P., 1998. Populacionnaja jekologija [Population ecology]. Fitosociocentr, Kiev (in Russian).
- Doran, J.W., Zeiss, N.R., 2000. Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15, 3–11.
- Engelhoff, H., Dohle, W., Blower, J.G., 1993. Anamorphosis in millipedes (Diplopoda) – the present state of knowledge with some developmental and phylogenetic considerations. *Zool. J. Linn. Soc.* 109(2), 103–234.
- Geodakyan, V.A., 1983. Jevoljucionnaja logika differenciacii polov [Evolutionary logic of sex differentiation]. *Priroda* 1, 70–80 (in Russian).
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001. Functional stability, substrate utilization and biological indicators of soils following environmental impacts. *Appl. Soil Ecol.* 16, 49–61.
- Hedde, M., Renouf, E., van Oort, F., Thénard, J., Lamy, I., 2013. Dynamics of soil fauna after plantation of perennial energy crops on polluted soils. *Appl. Soil Ecol.* 66, 29–39.
- Hylyarov, M.S., 1990. Populacionnaja jekologija [Population ecology]. MSU, Moscow (in Russian).
- Kalisz, P.J., Powell, J.E., 2003. Effect of calcareous road dust on land snails (Gastropoda: Pulmonata) and millipedes (Diplopoda) in acid forest soils of the Daniel Boone National Forest of Kentucky, USA. *Forest Ecol. Manag.* 186, 177–183.
- Korosov, A.V., 1996. Jekologicheskie prilozhenija komponentnogo analiza [Ecological appendices of component analysis]. PSU, Petrozavodsk (in Russian).
- Lokshina, I.Y., 1966. Harakter raspredelenija mnogonozhek v predelah Russkoj ravniny [Principles of myriapods distribution (Diplopoda) within the bounds of Russian Plane]. *Problemy Pochvennoj Zoologii*, 82–83 (in Russian).
- Nahmani, J., Lavelle, P., Rossi, J.-P., 2006. Does changing the taxonomical resolution alter the value of soil macroinvertebrates as bioindicators of metal pollution? *Soil Biol. Biochem.* 38, 385–396.
- Payne, R.J., Thompson, A.M., Standen, V., Field, C.D., Caporn, S.J.M., 2012. Impact of simulated nitrogen pollution on heathland microfauna, mesofauna and plants. *Eur. J. Soil Biol.* 49, 73–79.
- Pokarzhevskij, A.D., 1983. Populjacii kivs'jaka *Sarmatiulus kessleri* Lohm. v lesostepnyh landshaftah Central'no-Chernozemnogo zapovednika [Populations of millipede *Sarmatiulus kessleri* Lohm. in Central'no-Chernozemnij Reservation forest-steppe landscapes]. *Vid i Ego Produktivnost' v Areale*. Nauka, Moscow, 104–115 (in Russian).
- Pokarzhevskij, A.D., Zaboev, D.P., Gordienko, S.A., Boháč, J., Gusev, A.A., 1989. Biogenic turnover of matter, soil biota and problems of agroecosystem development. *Agric. Ecosyst. Environ.* 27(1), 281–291.
- Prishutova, Z.G., 1988b. Nekotorye osobennosti jekologii kivs'jaka *Rossiulus kessleri* (Diplopoda, Julidae) v stepnoj zone [Ecological peculiarities of millipede *Rossiulus kessleri* (Diplopoda, Julidae) in the steppe zone]. *Zoologicheskij Zhurnal* 67(11), 1652–1660 (in Russian).
- Prishutova, Z.G., 1988a. Dinamika polovoj i vozrastnoj struktury populjacii i zhiznennyj cikl *Rossiulus kessleri* (Diplopoda) [Dynamics of sex- and age-structure in population and life cycle of *Rossiulus kessleri* (Diplopoda)]. *Zoologicheskij Zhurnal* 65(5), 691–697 (in Russian).
- Prishutova, Z.G., 2001a. Morfometricheskij analiz chastej tela i mezhpupuljacionnaja izmenchivost' u kivs'jaka *Rossiulus kessleri* (Julidae) [Morphometric analysis and interpopulation variability of millipede *Rossiulus kessleri* (Diplopoda, Julidae)]. *Zoologicheskij Zhurnal* 80(7), 789–796 (in Russian).
- Prishutova, Z.G., 2001b. Osobennosti postjembrional'nogo rosta kivs'jaka *Rossiulus kessleri* (Julidae) [Peculiarities of millipede's *Rossiulus kessleri* (Julidae) postembryonic growth]. *Zoologicheskij Zhurnal* 80(8), 937–945 (in Russian).
- Pylypenko, A.F., Nadvornyj, V.G., 1977. Vlijanie antropogennyh faktorov na pochvennye bespozvonochnye pojmeny biotopov nizhnego techenija reki Samary [Influence of anthropogenic factors on soil biota within bottomlands biotopes of the Samara River downstream]. *Voprosy Stepnogo Lesovedenija i Ohrany Prirody* 8, 166–173 (in Russian).
- Pylypenko, A.F., Zhukov, A.V., 2001. Rol' troficheskoj struktury pochvennoj mezofauny dlja zoologicheskij diagnostiki pochv [Significance of soil mesofauna trophic structure in zoological soil diagnostics]. *Struktura i Funkcional'naja Rol' Zhivotnogo Naselenija v Prirodnyh i Transformirovannyh Jekosistemah*. Dnipropetrovsk, 247 (in Russian).
- Semenyuk, I.I., Tiunov, A.V., Golovatch, S.I., 2011. Structure of mandibles in relation to trophic niche differentiation in a tropical millipede community. *Int. J. Myriapod.* 6, 37–49.
- Silva Souza, T., Christofoletti, C.A., Bozzatto, V., Fontanetti, C.S., 2014. The use of diplopods in soil ecotoxicology – A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103, 68–73.
- Tadler, A., 1996. Functional morphology of genitalia of four species of julidan millipedes (Diplopoda: Nemasomatidae; Julidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 118(1), 83–97.
- Tanabe, T., Katakura, H., Mawatari, S.F., 2001. Morphological difference and reproductive isolation: Morphometrics in the millipede *Parafontaria tonominea* and its allied forms. *Biol. J. Linn. Soc.* 72(1), 249–264.
- Travleev, L.P., 1977. Uslovija formirovanija, glubina zaleganija i himizm gruntovyh vod Prisamar'ja [Conformation condition, depth and chemistry of groundwater]. *Voprosy Stepnogo Lesovedenija i Ohrany Prirody* 3, 54–63 (in Russian).
- Wolters, V., 2001. Biodiversity of soil animals and its function. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 221–227.
- Wytwer, J., Zalewski, M., 2005. The role of island size and isolation in diversity of Myriapoda. *Peckiana* 4, 195–208.
- Zaitsev, A.S., Gongalsky, K.B., Nakamori, T., Kaneko, N., 2014. Ionizing radiation effects on soil biota: Application of lessons learned from Chernobyl accident for radioecological monitorin. *Pedobiologia* 57(1), 5–14.

Надійшла до редколегії 04.05.2014



Зміст

Шмараков І.О., Борщовецька В.Л., Марченко М.М. Особливості генерування активних форм кисню та азоту за гострої гепатотоксичності	3
Мельничук О.А., Мотузюк О.П., Швайко С.Є., Хома О.М. Кінетика тетанусу <i>musculus gastrocnemius</i> в алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою васкулярною ішемією задніх кінцівок за умов низькочастотної м'язової втоми	8
Швартау В.В., Вирич П.А., Маковейчук Т.И., Артеменко А.Ю. Кальцій в растительных клетках	19
Лихолат Т.Ю., Лихолат О.А., Недзвецкий В.С., Лактіонов В.В. Аліментарні тригери гормонзалежних форм раку молочної залози	33
Божко К.М. Мікроморфологічні та фізичні властивості ґрунтів південних байраків Дніпропетровської області ..	38
Доценко О.И., Трощинская Я.А. Роль ферментов катаболизма АМР в энергетическом статусе эритроцитов в условиях их истощения по глюкозе	46
Доценко О.И. Кислотно-гемолитическая устойчивость эритроцитов напряженного эритропоэза в условиях низкочастотной вибрации	53
Чаплигіна А.Б., Бондарець Д.І., Савинська Н.О. Розмір кладки та успішність розмноження синиці великої (<i>Parus major</i>) та блакитної (<i>P. caeruleus</i>) у парках м. Харків	60
Горобець Л.В., Матлаєв І.В. Птахи з давньослов'янського поселення «Ігрені 8» (XII–XIII ст. н.е.)	66
Хромих Н.О., Більчук В.С., Россихіна-Галича Г.С., Вінниченко О.М. Сезонна динаміка антиоксидантних процесів у листках <i>Acer negundo</i> за дії поллютантів	71
Бевзюк Д.О., Левічева Н.О. Біоінформаційний підхід у корекції негативного емоційного стану у щурів	77
Бригадиренко В.В., Іваньшин В.М. Влияние соли железа на массу тела <i>Megaphyllum kievense</i> (Diplopoda, Julidae) и гранулометрический состав подстилки в лабораторном эксперименте	83
Похиленко А.П. Оцінка морфологічної мінливості популяцій <i>Rossiulus kessleri</i> (Diplopoda, Julida)	88



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol. 2014. 22(1)

ISSN 2310-0842 print

ISSN 2312-301X online

www.ecology.dp.ua

Content

Shmarakov I.O., Borschovetska V.L., Marchenko M.M. Reactive oxygen and nitrogen species generation features under conditions of acute hepatotoxicity	3
Melnychuk O.A., Motuziuk O.P., Shvayko S.Y., Homa O.M. <i>Musculus gastrocnemius</i> tetanus kinetics in alcohol-intoxicated rats with experimentally-induced hindlimb vascular ischemia under conditions of low-frequency muscle fatigue	8
Schwartau V.V., Virych P.A., Makoveychuk T.I., Artemenko A.Y. Calcium in plant cells	19
Lykholat T.Y., Lykholat O.A., Nedzvetsky V.S., Laktionov V.V. Alimentary triggers of hormone dependent breast cancers	33
Bozhko K.M. Micromorphological and physical properties of southern ravine soils in Dnipropetrovsk region	38
Dotsenko O.I., Troshchynskaya Y.A. Role of AMP catabolism enzymes in the energetic status of erythrocytes under conditions of glucose depletion	46
Dotsenko O.I. Acid-hemolytic stability of erythrocytes of intense erythropoiesis under conditions of low-frequency vibration	53
Chaplygina A., Bondarets D., Savynskaya N. Clutch size and breeding success of great tit (<i>Parus major</i>) and blue tit (<i>P. caeruleus</i>) in the parks of Kharkiv city	60
Gorobets L.V., Matlaev I.V. Birds from the Old East Slavic settlement "Igren 8" (12th–13th century AD; Ukraine)	66
Khromykh N.A., Bilchuk V.S., Rossykhina-Galycha G.S., Vinnychenko O.M. Seasonal dynamics of antioxidative processes in <i>Acer negundo</i> leaves under pollutant action	71
Bevzyuk D.A., Levicheva N.A. Bioinformatic approach to correction of negative emotional state in rats	77
Brygadyrenko V.V., Ivanyshin V.M. Impact of ferric salt on body weight of <i>Megaphyllum kievense</i> (Diplopoda, Julidae) and litter granulometric composition in the laboratory experiment	83
Pokhylenko A.P. Estimation of the morphological variability of <i>Rossiulus kessleri</i> (Diplopoda, Julida) populations	88

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія

Заснований у 1993 р.

Том 22(1)

Українською, російською та англійською мовами

Свідоцтво державної реєстрації серія КВ № 19821–9621Р від 15.03.2013 р.

Редактор В.Д. Маловик
Оригінал-макет виготовив В.В. Бригадиренко

Підписано до друку 25.05.2014. Формат 60x84 ¹/₈. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 11,39.
Ум. фарбовідб. 19,3. Обл.-вид. арк. 19,3. Тираж 100 пр. Замовлене № 4926.

Віддруковано в ТОВ «Роял Принт»
пр. Кірова, 91, м. Дніпропетровськ, 49054
тел. (056) 794-61-04(05)
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
серія ДК № 4121 від 27.07.2011.