

УДК 612.015.13:152.34.611

Ендогенний інгібітор цистеїнового катепсину В із тканин головного мозку

О.Л. Лянна

Дніпропетровська медична академія МОЗ України, Дніпропетровськ, Україна

Запропоновано схему виділення та очищення ендогенного інгібітора лізосомного цистеїнового катепсину В, яка дозволила за 5 етапів (гомогенізація, висолування сульфатом амонію (30–80% насичення), гель-фільтрація на сефадексі G-150, іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ сефадексі А-50, гель-хроматографія на сефадексі G-100) очистити антипротеїназу неокортексу людини у 640 разів. Методами графічного аналізу ферментативної кінетики проаналізовано характер взаємодії виділеного ендогенного інгібітора мозку із цистеїновим катепсином В, а також оцінено можливий механізм взаємодії отриманого інгібітора з даним ферментом. Виділений та очищений тканинний ендогенний білковий інгібітор є термостабільним, за механізмом зворотного конкурентного інгібування проявляє високий ступінь пригнічення активності цистеїнового катепсину В відносно специфічного хромогенного субстрату р-нітроаніліду N,α-бензоіл-D,L-аргініну. Запропонована схема виділення та очищення ендогенного інгібітора цистеїнового катепсину В із неокортексу людини має велике прикладне значення, оскільки завдяки досить нескладним маніпуляціям дозволяє отримати високоочищений препарат інгібітора цистеїнового катепсину В та провести аналіз кінетичних характеристик виділеного інгібітора, оцінити можливий механізм взаємодії з лізосомним цистеїновим катепсином В.

Ключові слова: методи білкової хімії; інгібітори протеолізу; катепсин В; неокортекс людини

An endogenous inhibitor of cysteine cathepsin B from brain tissues

O.L. Lyanna

Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine, Dnipropetrovsk, Ukraine

Lysosomes are the key degradative compartments of the cell in which the processes of protein degradation take place. Lysosomal cathepsins, which are enclosed in the lysosomes, help to maintain the homeostasis of the cell's metabolism by participating in the degradation of heterophagic and autophagic material. When breaking down the integrity of lysosomal membranes the cathepsins are released into the cytosol and initiate the development of numerous pathological states. Breakdown in the control of protease activity leads to undesired and unregulated proteolysis. This is a cause of many diseases, such as Alzheimer's disease, cancer, viral infections, cataracts etc. For this reason inhibitors of proteases have the potential to provide successful treatment for a wide range of diseases. Cathepsin B is one of the most abundant and ubiquitously expressed cysteine peptidases of the papain family. It is implicated in a number of pathological states including: inflammatory diseases of the airways, bone and joint disorders, acute pancreatitis, tumour metastasis, Alzheimer's disease and ischemic neuronal death. The study of specific inhibitors for cathepsin B is considered important for chemotherapy and treatments of other diseases. This article represents part of a complex study of the lysosomal proteolytic-antiproteolytic system and its breakdown in the process of illness. In this article we present a scheme for extraction, purification and characterization of endogenous inhibitors of lysosomal cysteine cathepsin B. The cathepsin inhibitor was purified to homogeneity from the human neocortex. The purification was carried out in several successive stages: ammonium sulfate precipitation, followed by gel-filtration on Sephadex G-150, and ion exchange chromatography using DEAE-Sephadex A-75, followed by gel filtration on Sephadex G-100. Throughout the purification procedure, cathepsin inhibitory activity was controlled against the substrate p-nitroanilide N,α-benzoyl-D,L-arginine. Using graphic methods for analysis of enzymatic kinetics we proposed a mechanism of interaction of the endogenous inhibitor with cysteine cathepsin B. This scheme could prove useful for the understanding of biochemical mechanisms occurring in normal and, especially, in pathological human brain processes.

Keywords: protein chemistry methods; inhibitors of proteolysis; cathepsin B; human brain neocortex

Вступ

Для нормального функціонування організму надзвичайно важлива протеолітична активність. Серед усіх органел клітин тканин організму лізосоми володіють одним із найпотужніших гідролітичних потенціалів, через який і реалізується деградація білків (Kirkegaard et al., 2008; Voysa, 2012). Особливе місце серед лізосомних протеаз відводиться катепсинам, які представлені цистеїновими катепсинами та катепсином Д (Cherna et al., 2013). Активовані катепсини набувають величезної руйнівної сили. Їх загальна концентрація в лізосомах може перевищувати 1 мМ, тому для запобігання потенційно небезпечної надмірної деградації білків її необхідно ретельно контролювати. Порушення механізмів біологічного контролю протеолітичної активності супроводжує розвиток багатьох захворювань, серед яких рак, ревматоїдний артрит і остеоартрит, хвороба Альцгеймера, множинний склероз, м'язова дистрофія тощо (Turk, 2003; Mohamed et al., 2006; Conus et al., 2010; Reiser et al., 2010; Cherna et al., 2013). Одночасно із дослідженнями протеолітичних ферментів ведеться інтенсивне вивчення регуляторів їх дії – інгібіторів протеїназ (Katunuma, 2010; Turk et al., 2012).

Серед багатьох антипротеїназ крові та тканин ендогенні інгібітори цистеїнових катепсинів найменше вивчені, незважаючи на їх поширеність і високу ефективність відносно лізосомних ендопептидаз (Grzonka et al., 2001; Cherna et al., 2013). У літературі наведено результати досліджень інгібіторів, які містяться у печінці (Hirado et al., 1981), нирках (Leutscher et al., 1982), плазмі крові (Lenney et al., 1982), сечі (Taniguchi et al., 1981). Недостатньо вивченим є спектр антипротеїназ мозку, який має значний протеолітичний потенціал з істотним вмістом цистеїнових катепсинів. Цистеїновий катепсин В являє собою потужну та широко розповсюджену протеїназу, яка і досі викликає надзвичайний інтерес до вивчення через участь у патогенезі багатьох патологічних станів, зокрема пухлинної інвазії та метастазування (Gondi et al., 2013). Дослідження даного протеолітичного ферменту, а також шляхів регуляції його активності актуальне з метою з'ясування механізмів злоякісного росту та пошуку нових лікарських препаратів для нормалізації протеолізу в онкологічних хворих. Мета цієї роботи – виділити, очистити та охарактеризувати властивості ендогенного інгібітора лізосомної цистеїнової протеїнази мозку людини – катепсину В, описати деякі його фізико-хімічні властивості. Дана інформація може мати суттєве значення при дослідженні кількісних і якісних змін у метаболічних процесах мозку при патогенезі, особливо при онкологічних захворюваннях.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – неокортекс головного мозку людини. Мозок людини отримували в Дніпропетровській обласній клінічній лікарні ім. І.І. Мечникова від жертв нещасних випадків. Аутопсію матеріалу проводили через 12 годин після смерті людей, які не мали ушкоджень ЦНС. Усі операції з головним мозком проводили

при 0...+4 °С. Гомогенати готували у співвідношенні 1 : 9 на 0,025 М трис-*HCl* буфері (*pH* 7,4), що вміщував 1 мМ ЕДТО та 0,15 М *NaCl*. Отримані гомогенати фракціонували сульфатом амонію в діапазоні 30–80% насичення. Надосадову фракцію піддавали діалізу проти дистильованої води, що вміщувала 0,15 М *NaCl*, або застосовували гель-фільтрацію на сефадексі G-25. Для подальшого виділення та очищення інгібітора головного мозку проводили гель-фільтрацію на колонці із сефадексом G-150 та іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ сефадексі А-50. Всі колонки врівноважували 0,1 М фосфатним буфером, *pH* 6,0. Елюцію білків, що не зв'язалися з ДЕАЕ сефадексом А-50, проводили буфером, яким урівноважували колонку. Зв'язані з ДЕАЕ сефадексом А-50 білки елюювали 0,1 М фосфатним буфером, що вміщував 0,3 М *NaCl*. Визначення молекулярної маси проводили за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН.

Для оцінки інгібіторної активності препаратів, отриманих із тканини мозку, їх піддавали попередній інкубації із 10% гомогенатом при температурі +37 °С протягом 15 хв. Далі до інкубаційної суміші додавали хромогенний субстрат *p*-нітроанлід *N*, α -бензоіл-ДЛ-аргінін (БАПА) «Fluka» (Швейцарія), за допомогою якого реєстрували залишкову активність катепсину В спектрофотометричним методом і виражали в одиницях активності (ОА) – мкмоль *p*-нітроанліліну (*p*-НА) за 1 хв при +37 °С на 1 мг білка. Загальний білок вимірювали методом Бредфорд (Bradford, 1979).

Тип інгібування та кінетичні параметри взаємодії очищеного інгібітора із ферментом визначали, використовуючи методи графічного аналізу Лайнуївера, Берка та Діксона (Webb, 1966). Вибірки порівнювали з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

При гель-фільтрації діалізату після 80% насичення сульфатом амонію на колонці із сефадексом G-150 виявляли одну фракцію, що вміщувала переважну кількість інгібітора, піддавали її подальшому очищенню. Ступінь очищення приблизно у 5 разів забезпечується гель-фільтрацією і зростає приблизно у 130 разів на етапі іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ сефадексі А-50 відносно гель-фільтрації. Профіль елюції білка має вигляд трьох піків, найбільший з яких представлений білками (рис. 1), що зв'язалися з носієм колонки та елюювалися натрій-фосфатним буфером із 0,3 М *NaCl*, *pH* 6,0. Аналіз інгібіторної активності свідчить про те, що мінімальне значення активності катепсину В припадає на 12–13-ту фракції з третього піка білка (див. рис. 1). Для подальших досліджень використовували фракції з номерами 12–14, які наносили на колонку із сефадексом G-100 та елюювали 0,1 М натрій-фосфатним буфером із *pH* 6,0.

За результатами гель-фільтрації на сефадексі G-100 встановлено, що максимальне пригнічення активності катепсину спостерігається при використанні вмісту фракцій 5–6 (рис. 2).

За даними ЕФ у ПААГ із ДСН встановлено, що величина молекулярної маси отриманого ендогенного інгібітора цистеїнових катепсинів головного мозку людини в нормі дорівнює 7,5 кДа.

Виділений і очищений у 640 разів відносно гомогенату ендogenousний інгібітор катепсину В із неокортексу людини піддавали визначенню типу інгібування. Для цього використовували кінетичні залежності за Міхаелісом-Ментен, а для уточнення взаємодії виділеного інгібітора та катепсину В мозку людини застосовували залежність за Лайнуївером, Берком і Діксоном (Lyanna, 2007). Виділений нами інгібітор проявляє характер зворотного конкурентного інгібування. Відомо, що інгібітор, виділений із нирки людини, також виявляє конкурентний характер інгібування (Kirpichenok, 1987), при цьому встановлено значне споріднення даного білка

до катепсину В і папаїну. За даними літератури (Cherna, 2013), інактивація цистеїнових протеїназ відбувається конкурентним, зворотним інгібуванням. На відміну від інгібіторів серинових протеїназ, інгібітори цистеїнових протеїназ також формують комплекси із цистеїновими протеїназами, активні центри яких реагують із тіолблокувальними реагентами.

Із даних таблиці 1 випливає, що запропонована схема виділення дозволила за п'ять етапів очистити препарат тканинного ендogenousного білкового інгібітора цистеїнового катепсину В нервової тканини, який пригнічує активність даного ферменту на 88%.

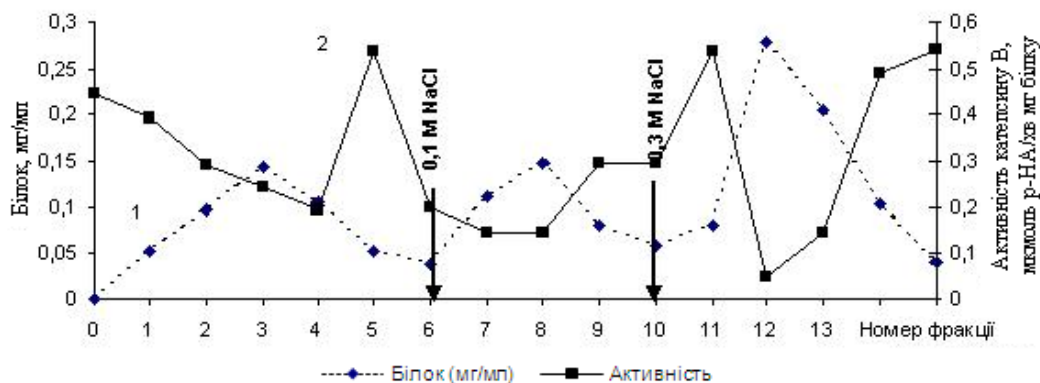


Рис. 1. Аналіз інгібіторної активності на етапі іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ сефадексі А-50

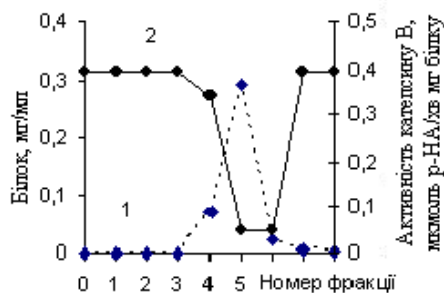


Рис. 2. Профілі елюції на колонці із сефадексом G-100: 1 – білок інгібіторного препарату, 2 – активність катепсину В

гання (1–2 тижні) при +4 °С. Даний препарат інгібітора пригнічує на 88% активність виділеного та очищеного катепсину В. Існують докази того, що інгібітори цистеїнових протеїназ – надзвичайно стійкі білки, які проявляють резистентність відносно інактивувальної дії високих температур і лужних значень *pH* (Lenpey, 1979).

Отриманий ендogenousний білковий інгібітор цистеїнових катепсинів проявляє високу стійкість до температурного впливу при інгібуванні катепсину В (Lyanna, 2007). За результатами визначених молекулярних мас і фізико-хімічних властивостей отриманий інгібітор можна віднести до родини цистатинів.

Із цитозолу головного мозку щура в 1983 році виділено та очищено ендogenousний білковий інгібітор цистеїнових пептидгідролаз цереброцистатин (Kopitar et al., 1983). Це білок з *M_r* 12,5 кДа, який складається з одного поліпептидного ланцюга та пригнічує папаїн і катепсин В. Доведено, що цереброцистатин імунологічно ідентичний до цистатину С людини (Kopitar et al., 1983). У цитозолі головного мозку людини описані інгібітори цистеїнових пептидаз із низькою молекулярною масою 2,5–3,0 кДа, які пригнічують активність папаїну та катепсину В головного мозку та печінки людини, реагують з антитілами до цистатину С (Suhar et al., 1988).

Досліджується ще одна гіпотеза природи низькомолекулярних ендogenousних інгібіторів цистеїнових протеїназ: припускається, що невеликі за розміром інгібітори являють собою пропептиди, відщеплені під час процесингу лізосомних ферментів (Lalmanach et al., 1998). Відомі продукти пропептидів, які пригнічують активність зрілих цистеїнових пептидгідролаз, таких як катепсини В, L, К та S (Chagas et al., 1996).

У таблиці 2 наведено кінетичні показники отриманого ендogenousного інгібітора, визначені графічними методами аналізу. Ферменти із блокованим активним цен-

Таблиця 1
Етапи очищення тканинного ендogenousного білкового інгібітора цистеїнових катепсинів із неокортексу головного мозку людини

Етапи очищення інгібітора	Активність ферментів за присутності інгібітора, ОА/мг білка	Ступінь пригнічення, %
10% гомогенат (без інгібітора)	0,400	1
Діаліз препарату інгібітора	0,390	13
Гель-фільтрація на сефадексі G-150 (фракція 1)	0,280	28
Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-сефадексі А-50 (фракція 12)	0,048	88
Хроматографія на сефадексі G-100 (фракція 5)	0,048	88

Дослідження спектра інгібіторної активності виділеного препарату показало, що він здатний пригнічувати активність цистеїнового катепсину В за тривалого збері-

тром все ще здатні зв'язуватись з інгібіторами, хоча і з меншою афінністю (Abrahamson, 1993; Otto et al., 1997). Це вказує на те, що взаємодія цистеїнових протеїназ із цистатинами заснована не на простій реакції з каталітичним цистеїновим залишком цього ферменту, а на гідрофобних взаємодіях між активними областями цистатинів та відповідними залишками, які формують сайт зв'язування ферменту.

Таблиця 2

**Фізико-хімічні та кінетичні властивості
тканинного ендogenous білкового інгібітора
катепсину В із головного мозку в нормі**

M _r	7,5 кДа	V _{max}	51,6
K _i	2,4·10 ⁻⁹ М	V _{maxi}	51,6
K _M	3,9·10 ⁻⁴ М	ступінь пригнічення	88 %
K _{Mi}	2,2·10 ⁻⁴ М	тип інгібування	конкурентний

Дослідження ендogenous інгібіторів лізосомних протеїназ мозку, а також змін рівнів активності цистеїнових катепсинів мозку, викликаних дією цих інгібіторів, має суттєве значення для формування об'єктивної оцінки реакції тканини головного мозку на патологічні процеси в експериментальних та клінічних умовах, що необхідно для підвищення ефективності терапії та моніторингу перебігу захворювань.

Висновки

За допомогою запропонованої схеми із тканин здорового головного мозку вдалося виділити та очистити термостабільний тканинний ендogenous білковий інгібітор, який за механізмом зворотного конкурентного інгібування проявляє високий ступінь пригнічення активності цистеїнового катепсину В. Дана процедура виділення та очищення ендogenous інгібітора цистеїнового катепсину В із неокортексу людини має велике прикладне значення, оскільки завдяки достатньо простим маніпуляціям дозволяє отримати високоочищений препарат інгібітора цистеїнового катепсину В та провести аналіз кінетичних характеристик виділеного інгібітора, оцінити можливий механізм взаємодії з лізосомним цистеїновим катепсином В.

Подяка

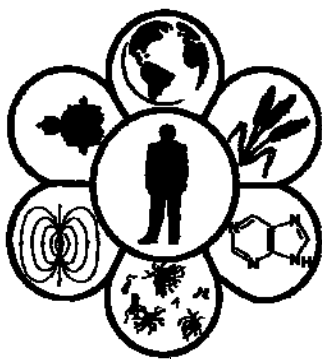
Автор висловлює подяку д-ру біол. наук, проф. В.І. Чорній.

Бібліографічні посилання

Abrahamson, M., 1993. Cystatins: Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *Cienc. Cult.* 45(5), 299–304.
Boya, P., 2012. Lysosomal function and dysfunction: Mechanism and disease. *Antioxid. Redox. Sign.* 17(5), 766–774.
Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
Chagas, J., Martino, M., Gautier, F., Lalmanach, G., 1996. Inhibition of cathepsin B by its propeptide: Use of overlapping peptides to identify a critical segment. *FEBS Lett.* 392, 233–236.

Cherna, V.I., Lyanna, O.L., 2013. Lysosomal cysteinovi protease: Molekulyarna struktura ta funkcii. *Ecograf, Kharkiv* (in Ukrainian).
Conus, S., Simon, H., 2010. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss. Med. Wkly.* 140, 1–8.
Gondi, C.S., Rao, J.S., 2013. Cathepsin B as a cancer target. *Expert. Opin. Ther. Tar.* 17(3), 281–291.
Grzonka, Z., Jankowska, E., 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim. Pol.* 48(1), 1–20.
Hanada, K., Tamai, M., Yamagish, M., 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42, 523–528.
Hirado, M., Iwata, D., 1981. Purification and properties of thiol proteinase inhibitor from rat liver cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* 669(1), 21–27.
Katunuma, N., 2010. Posttranslational processing and modification of cathepsins and cystatins. *J. Sign. Transduct.*, 1–8.
Kirkegaard, T., Jäättelä, M., 2008. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 746–754.
Kirpichenok, L.N., Scherbak, I.G., 1987. Endogenous inhibitor of cysteinovih proteinas iz pochki cheloveka. *Ukr. Biokhim. Zh.* 59(1), 10–15 (in Russian).
Kopitar, M., Stern, F., Marks, N., 1983. Cerebrocystatin suppresses degradation of myelin basic protein by purified brain cysteine proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 112(3), 1000–1006.
Lalmanach, G., Lecaille, F., Chagas, J., Authie, E., Scharfstein, J., Juliano, M., 1998. Inhibition of tripanosomal cysteine proteinases by their propeptides. *J. Biol. Chem.* 273(39), 25112–25116.
Lenney, J., Liao, J., Sugg, S., 1982. Low molecular weight inhibitor of cathepsins B, H and L in human serum, sinovial fluid and CSF. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 108(4), 1581–1587.
Lenney, J.F., Tolan, J.R., 1979. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H. *Eur. J. Biochem.* 101(1), 153–161.
Leutscher, J.A., Bialek, J.W., Grisli, G., 1982. Human kidney cathepsin B and H activate and low molecular weight of human inactive rennin. *Clin. Exp. Hypertens.* 4(11/12), 2149–2158.
Lyanna, O.L., 2007. Role cysteine katepsiniv u degradatsii bilkiv pri patologichnih stanah: Diss. ... kand. biol. nauk. 122 p. (in Ukrainian).
Mohamed, M.M., Sloane, B.F., 2006. Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer. *Nature* 6, 764–775.
Nurhayati, T., Rusyadi, S., Suwandi, R., Nugraha, R., 2013. Purification and characterization of a cathepsin inhibitor from catfish (*Pangasius sp.*) of Indonesian water. *Int. Food Res. J.* 20(2), 941–946.
Otto, H.-H., Schirmeister, T., 1997. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97(1), 133–172.
Reiser, J., Adair, B., Reinheckel, T., 2010. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Inv.* 120(10), 3421–3431.
Suhar, A., Curin, V., Turk, V., 1988. Low Mr cysteine proteinase inhibitors from human brain. *Neurochem. Int.* 13(1), F290.
Taniguchi, K., Sasaki, M., 1981. Partial purification and properties of urinary thiol proteinase inhibitors. *J. Biochem.* 89(1), 179–184.
Turk, D., Guncar, G., 2003. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): Promising drug targets. *Acta Cryst.* 59, 203–213.
Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Tao, S., Turk, B., Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 68–88.
Uebbs, L., 1966. Inhibitori fermentov i metabolisma. Mir, Moscow (in Russian).

Надійшла до редколегії 21.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, medicina

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine.
2013. 4(2)

ISSN 2310-4155

www.medicine.dp.ua

УДК 581.5(477.87):631.842

Моніторинг вмісту нітратів в овочевих культурах Ужгородського району

І.І. Михайло, М.В. Кривцова, В.І. Ніколайчук

Ужгородський національний університет, Ужгород, Україна

Досліджено вміст нітратів в овочевих культурах Ужгородського району Закарпатської області України. На базі хіміко-токсикологічного відділу Обласної державної лабораторії ветеринарної медицини в Закарпатській області вивчено продукцію ранньовесняного (лютий – травень) та літнього (червень – вересень) періодів. Овочеві культури перевіряли на вміст нітратів за допомогою іонно-селективного методу, використовуючи іономір лабораторний AI-123. Установлено тенденцію до збільшення виробництва рослинницької продукції з високим вмістом нітратів, вищим за ГДК. Результати дослідження свідчать про перевищення гранично допустимих концентрацій нітратів у 9 видах овочевих культур із 11 відібраних для дослідження, що становило 82% загальної кількості продукції. Найсуттєвіші перевищення (у 2 і більше разів) реєстрували в огірках звичайних ранньовесняного періоду (56% загальної кількості вимірювань), помідорах звичайних ранньовесняного (20%) та літнього періодів (4%) та редьці посівній ранньовесняного періоду (8%).

Ключові слова: моніторинг нітратів; овочеві культури; гранично допустима концентрація

Monitoring of nitrate content of vegetable crops in Uzhgorod district

I.I. Mykaylo, M.V. Kryvtsova, V.I. Nikolaichuk

Uzhgorod National University, Uzhgorod, Ukraine

The aim of our research was to conduct a monitoring study of nitrate content in plant products of Uzhgorod district and to accomplish comparative analysis of the survey results in different periods of crop ripening. Selection of vegetable samples was carried out in Uzhgorod district in the early spring and summer periods. Determination of the nitrate content was performed using an ion-selective method at the Chemical and Toxicological Department of the Regional State Veterinary Medicine Laboratory in the Transcarpathian region of Ukraine. Vegetables were tested for nitrate content using the ion-selective method with the laboratory ion meter AI-123. Core investigation samples were crushed and homogenized. A 10.0 g weight of the investigated product, which was prepared according to MIR № 5048-89, was placed in a flat-bottomed or a conical flask, which was then filled with 50 cm³ potassium alumens solution and shaken in a shaking-machine for 5 minutes and then transferred into a measuring glass. The nitrate weight fraction in milligrams per kilogram was obtained together with the weight concentration value of nitrate ions in solution. For our study we selected vegetables grown in both public and private gardens of Uzhgorod district, namely: common onions, radishes, garden parsley, cucumbers, tomatoes, bell peppers, white cabbages, carrots and table beets. 25 samples were selected for each type of vegetable. Nitrate content was determined in the early spring growing period (from February 9 to May 27, 2011) and in the summer growing period (from June 3 to September 28, 2011), because in these particular periods we recorded the most frequent cases of food poisoning from nitrates among the population of the region. A clear trend has been traced towards increasing the nitrate content in food plant production, at levels which exceed the maximum permissible concentration (MPC). The results of our research demonstrate that the nitrate content exceeded the maximum permissible concentration in 9 kinds of vegetables out of the 11 selected for the investigation, which composes 82% of total production. In particular, among the selected vegetables an excess of nitrate content, above MPC was recorded in 100% of cucumbers, 92% of carrots, 40% samples of green onions, 40% of radishes, 40% of tomatoes, 28% bell peppers, and 16% of early white cabbages. However, the most significant nitrate excess, which was more than double the MPC, was observed in 56% of cucumbers, 20% of tomatoes, 8% of radishes in the early spring period and 4% of tomatoes in the summer period. Consequently, it has been established that the consumption of early vegetable production contributes to the ingestion by humans of significant amounts of nitrates. The application of an agrochemical system based upon sound measurement of the nitrate content would allow

Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, 88000, Ужгород, Україна
Uzhgorod National University, 32, Voloshyna str., 88000, Uzhgorod, Ukraine
Tel.: +38050-549-92-96. E-mail: irin.mikaylo@gmail.com

Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med. 2013. 4(2)

us to solve the task of increasing soil fertility and to form a deficit-free and positive balance of biogenic elements and humus in the "soil – plant – fertilizer" system and develop a system of crop production which is balanced in its chemical composition and nutritional value. To sum up, detailed determination of the factors that lead to the accumulation of nitrates in vegetable crops and the development of methods to reduce nitrate concentrations in crop production require further investigation.

Keywords: nitrates; nitrates monitoring; vegetables; maximum permissible concentration

Вступ

Останні десятиліття характеризуються інтенсифікацією впливу ксенобіотиків (у тому числі нітратів) на всі ланки трофічних ланцюгів (Nikolaichuk, 2008). Водночас упровадження промислових технологій вирощування сільськогосподарських культур неможливе без застосування мінеральних добрив, яке забезпечує одержання високих урожаїв (Brito et al., 1999; Silgram and Shepherd, 1999). Серед антропогенних джерел надходження нітрогену до ґрунту слід відзначити азотні добрива, викиди промислових підприємств, транспорту тощо (Gabovich and Priputina, 1987). Потрапляючи у ґрунт, воду та атмосферне повітря, полютанти здійснюють міграцію та акумуляцію у трофічних ланцюгах (Brown, 1996; Firdevs et al., 2010; Erisman et al., 2013), беруть участь у міграційних і транслокаційних процесах у ґрунті, поверхневих і ґрунтових водах (Mudrij and Lep'oshkin, 2005; Cardenas et al., 2011). У зв'язку з інтенсифікацією надходження нітратів у ґрунт прослідковується чітка тенденція до збільшення виробництва рослинницької продукції (особливо овочевої) з умістом нітратів, що перевищує гранично допустиму норму (Kennedy, 2003; Rahmani, 2006; Susin et al., 2006; Gholami et al., 2012). Згідно з даними МОЗ України, вміст нітратів у 10% рослинної продукції постійно перевищує гранично допустимі концентрації (ГДК), тому їх вміст в овочевій продукції нормується (Prugar and Prugarova, 1990; Ciganenko, 2004). У цілому в Україні понад 30% сільськогосподарської продукції має вміст нітратів, що перевищує допустимий рівень.

Зростання продукції з умістом нітратів, вищим за ГДК, являє небезпечну загрозу у зв'язку зі збільшенням нітрат-нітритного навантаження на організм людини. Надходження нітратів до організму у високих дозах може викликати різноманітні порушення метаболізму: метгемоглобінемію, тканинну гіпоксію, зниження імунної резистентності організму (Sylvester-Bradley and Chambers, 1999; Romyanceva, 2001). Ще одна властивість нітритів – їх здатність утворювати з аліфатичними амінами нітрозаміни, що викликають канцерогенну дію та у подальшому зумовлюють ембріотоксичну та мутагенну дію (Luzhkov, 1990; Pikul', 2003; Ziarati and Bidgoli, 2012). Мішень дії великих доз нітратів – ядра гепатоцитів і нуклеїновий обмін (VanLoon and Duffy, 2005; Degodyuk, 2007).

У рослинних продуктах установлюється максимально допустимий рівень залишкових кількостей нітратів і нітритів – гранично допустима концентрація (ГДК), при дотриманні якої не спостерігається несприятливого впливу на здоров'я, самопочуття, працездатність і гігієнічні умови життя. Для уникнення токсичних ефектів нітратів і зменшення синтезу нітрозамінів затверджено гранично допустимий вміст нітратів у сільськогосподарській продукції (Mihals'ka and Gavrilenko, 2011). У зв'язку з вищевикладеним, нормування та моніторинг

вмісту нітратів у продуктах харчування, у тому числі в овочевій продукції, має велике практичне значення.

Мета роботи – оцінити вміст нітратів у продукції рослинного походження Ужгородського району, порівняти результати для різних періодів дозрівання сільськогосподарських культур.

Матеріал і методи досліджень

Проби овочевої продукції відбирали в Ужгородському районі у ранньовесняний та літній періоди. Визначення вмісту нітратів проводили іонно-селективним методом на базі хіміко-токсикологічного відділу Обласної державної лабораторії ветеринарної медицини в Закарпатській області. Овочеву продукцію перевіряли на вміст нітратів за допомогою іонно-селективного методу, використовуючи іономір лабораторний AI-123. Середні проби дослідних зразків подрібнювали та гомогенізували. Наважку 10,0 г досліджуваного продукту, підготовленого згідно з МВ 5048-89, поміщали у плоскодонну колбу, доливали 50 см³ розчину алюмокалієвих галунів, струшували на шутель-апараті протягом 5 хв, переносили у склянку для вимірювання. Масову частку нітратів (мг/кг) отримують із значенням масової концентрації нітрат-іонів у розчині (Mihals'ka and Gavrilenko, 2011).

Для досліджень відбирали овочеву продукцію, вирощену в державних і приватних господарствах Ужгородського району: цибулю ріпчасту, редьку посівну, петрушку городню, огірки звичайні, помідори звичайні, перець овочевий, моркву посівну та буряк столовий (25 зразків для кожної овочевої культури). Вміст нітратів визначали у продукції ранньовесняного (лютий – травень) та літнього (червень – вересень 2011 року) періодів. Саме в літній період фіксували найчастіші випадки харчового отруєння нітратами серед населення.

Результати та їх обговорення

Результати лабораторного контролю свідчили про перевищення ГДК нітратів у значній кількості овочевих культур. Серед 11 видів овочевих культур у 9 реєстрували перевищення ГДК (82% загальної кількості культур). Серед відібраних овочів перевищення ГДК нітратів реєстрували у 100% огірків звичайних, 92% моркви посівної, 40% зразків листя цибулі ріпчастої, 40% редьки посівної, 40% помідорів звичайних, 28% перцю овочевого, 16% капусти білокачанної ранньовесняного періоду. Особливо суттєве перевищення ГДК нітратів (у 2 і більше разів) спостерігали у 56% огірків звичайних, 20% помідорів звичайних, 8% редьки посівної ранньовесняного періоду та 4% помідорів звичайних літнього періоду. ГДК для огірків звичайних ранньовесняного та літнього періодів становить 150 мг/кг, така сама норма і для помідорів звичайних аналогічних се-

зонних періодів. Реєстрована в цей період максимальна концентрація нітратів в огірках звичайних становила 838 мг/кг (в 5,5 раза вище норми), у зразків літнього періоду – до 215 мг/кг (в 1,4 раза вища за ГДК).

Значний відсоток перевищення ГДК фіксували для помідорів звичайних літнього періоду – 621 мг/кг (учетверо вище за ГДК) та ранньовесняного періоду – 408 мг/кг (майже утричі вище за ГДК). У цибулі ріпчастої літнього періоду реєстрували максимальну концентрацію нітратів 247 мг/кг (3 ГДК). Досліджуючи зразки пер цибулі ріпчастої фіксували майже у півтора раза вищі показники вмісту нітратів. ГДК нітратів для редьки посівної становить 1200 мг/кг, а реєстрована концен-

трація (2 820,4 мг/кг) у 2,3 раза перевищувала ГДК. Аналізуючи зразки перцю овочевого, фіксували перевищення майже вдвічі. Високі перевищення ГДК нітратів реєстрували у зразках моркви посівної літнього періоду (1,6 ГДК). Варто відзначити перевищення вмісту нітратів серед зразків капусти білокачанної ранньовесняного періоду (на 40 мг/кг вище ГДК). Найнижчий відсоток перевищення ГДК нітратів реєстрували серед буряка столового (4%), цибулі ріпчастої (4%), помідорів звичайних (зібраних у липні – серпні – 8%). Узагалі не реєстрували перевищення ГДК нітратів серед зразків картоплі, петрушки городньої та капусти білокачанної літнього періоду (табл.).

Таблиця

Аналіз вмісту нітратів в овочевій продукції Ужгородського району в ранньовесняний та літній періоди

Овочева культура	Періоди вирощення овочевих культур	M ± m	Min – Max концентрація, мг/кг	ГДК, мг/кг
Морква посівна	ранньовесняний період	140,6 ± 1,8	44,0–250,0	250
	літній період	303,6 ± 1,1	54,4–398,0	
Буряк столовий	ранньовесняний період	1264,3 ± 5,4	87,7–1408,0	1400
	літній період	1083,4 ± 6,3	108–1406,0	
Цибуля ріпчаста	ранньовесняний період	63,4 ± 1,9	41,3–81,0	80
	літній період	70,4 ± 1,8	36,5–247,0	
Цибуля ріпчаста – перо	ранньовесняний період	494,7 ± 3,2	110,0–838,0	600
Бульбоплоди картоплі	ранньовесняний період	164,3 ± 3,7	76,9–232,0	250
	літній період	185,4 ± 2,4	70,1–248,0	
Петрушка городня	ранньовесняний період	984,3 ± 2,5	196,0–1792,0	2000
Капуста білокачанна	ранньовесняний період	735,7 ± 3,1	156,0–940,0	900
	літній період	558,8 ± 3,5	51,7–858,0	
Редька посівна	ранньовесняний період	1316,3 ± 3,3	146,0–2820,4	1200
Огірок звичайний	ранньовесняний період	360,3 ± 3,8	183,0–838,0	150
	літній період	128,2 ± 3,3	43,0–215,0	
Помідор звичайний	ранньовесняний період	165,2 ± 1,6	50,5–408,0	150
	літній період	128,9 ± 2,6	24,0–621,0	
Перець овочевий	ранньовесняний період	185,4 ± 1,3	87,7–374,0	200

Примітка: * n = 25 зразків кожної культури.

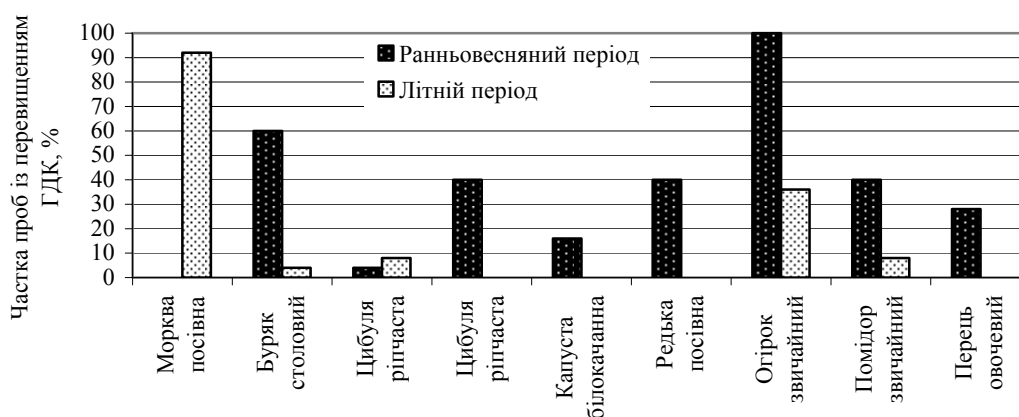


Рис. Частка зразків (%) овочевої продукції, що перевищують гранично допустимі концентрації нітратів: у зразках моркви посівної, картоплі, петрушки городньої ранньовесняних періодів і цибулі ріпчастої, картоплі, петрушки городньої, капусти білокачанної, редьки посівної, перцю овочевого літніх періодів перевищення ГДК нітратів не реєстрували

Аналогічна тенденція до збільшення продукції з підвищеним вмістом нітратів, згідно з даними літератури, реєструється в інших регіонах України та за кордоном (Romanchik et al., 2009; Du et al., 2011). Отримані результати дослідження виявлених перевищень гранично допустимих концентрацій нітратів в овочевій продукції підтверджуються працями інших

дослідників (Guardian et al., 2005; Grishina and Panasenko, 2009; Ziarati and Bidgoli, 2012). Нами показано, що найнебезпечнішою для споживання виявилась продукція ранньовесняного періоду. Така тенденція може бути пов'язана з вирощуванням овочевих культур у закритому ґрунті та їх раннім їх збиранням (див. рис.). На сьогодні відомо, що вміст нітратів у рослинах являє собою

динамічну рівновагу між темпами поглинання, асиміляції та транслокації (Maynard et al., 1976) та корелює з численними екологічними чинниками. При цьому рівень асиміляції нітратів залежить не тільки від дози внесеного добрива, а і від сортових ознак рослин, рівня родючості ґрунтів, температури, вологості ґрунту та повітря, інтенсивності та тривалості освітлення, технології вирощування. Згідно з даними літератури (Cantliffe, 1973), ключовими факторами, що впливають на вміст нітратів в овочах, є саме рівень, строки внесення азотних добрив та інтенсивність освітлення. У зв'язку з цим все більшої актуальності набувають дослідження, спрямовані на оптимізацію вмісту нітратів в овочевій продукції з урахуванням кліматично-ґрунтових умов, рівня родючості ґрунту, сортових властивостей культури, агротехнічних умов. При цьому найважливішим резервом подолання дефіциту нітрогену у землеробстві є розширення застосування бактеріальних добрив – препаратів, основою яких є азотфіксувальні бактерії (Chambers et al., 1999; Kumar et al., 2010).

Висновки

Проведені дослідження показали перевищення гранично допустимих концентрацій нітратів у більшості овочевих культур, відібраних для аналізу: у 9 з 11 відібраних для дослідження видів реєстрували підвищений вміст нітратів. Особливо небезпечними для вживання виявилися овочеві культури, в яких фіксували найвищі перевищення ГДК нітратів: в огірках звичайних (56%), помідорах звичайних ранньовесняного періоду (20%) та літнього періоду (4%), а також редьці посівній (8%) ранньовесняного періоду. Дана тенденція свідчить про необхідність жорсткого державного регулювання та контролю внесення азотних добрив на сільськогосподарських угіддях, розробки раціональних засад контролю поллютантів, дослідження міграції нітратів у трофічних ланцюгах. Отримані результати вказують на актуальність та необхідність розробки оптимальних норм і строків внесення мінеральних добрив у кліматично-ґрунтових умовах Закарпаття, що дозволить при одночасному рості врожайності забезпечити підвищення якості овочевій продукції з умістом нітратів, який не перевищує ГДК.

Бібліографічні посилання

Brito, J.M.C., Ferreira, D., Guerrero, C.A.C., Machado, A.V., Beltrão, J., 1999. Soil pollution by nitrates using sewage sludge and mineral fertilizers. *Dev. Plant Soil Sci.* 6(86), 223–227.

Brown, J.R., 1996. Soil fertilization and nitrate accumulation in vegetables. *Agron. J.* 58, 209–212.

Cantliffe, D.J., 1973. Nitrate accumulation in table beets and spinach as affected by nitrogen, phosphorous and potassium nutrition and light intensity. *Agron. J.* 65, 563–565.

Cardenas, L.M., Cuttle, S.P., Crabtree, B., Hopkins, A., Shepherd, A., Scholefield, D., del Prado, A., 2011. Cost effectiveness of nitrate leaching mitigation measures for grassland livestock systems at locations in England and Wales. *Sci. Total Environ.* 409, 1104–1115.

Chambers, B.J., Lord, E.I., Nicholson, F.A., Smith, K.A., 1999. Predicting nitrogen availability and losses following application of organic manure to arable land. *Soil Use Manage.* 15, 137–143.

Ciganenko, O.I., 2004. Nitrates in food products [Nitrati v harchovih produktah]. *Zdorov'ya, Kyiv* (in Ukrainian).

Degodyuk, E.G., 2007. Viroshuvannya ekologichno chystoji produkciji roslinnictva [Ecologically clean crop production growing]. *Urozhaj, Kyiv* (in Ukrainian).

Du, L., Zhao, T., Zhang, C., An, Z., Wu, Q., Liu, B., Li, P., Ma, M., 2011. Investigations on nitrate pollution of soil, groundwater and vegetable from three typical farmlands in Beijing region, China. *Agric. Sci. China* 10(3), 423–430.

Erismann, J.W., Galloway, J.N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Dise, N.B., Petrescu, A.M., Leach, A.M., de Vries, W., 2013. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 1621.

Firdevs, M., Sahindokuyucu, F., Erdogan, N., 2010. Nitrate and nitrite contents of some vegetables consumed in south province of Turkey. *Agric. J.* 5(3), 142–145.

Gabovich, R.D., Pripulina, L.S., 1987. Gigienicheskie osnovy ohrany produktov pitaniya ot vrednyh himicheskikh veschestv [Food protection hygienic basics from harmful chemicals]. *Zdorov'e, Kyiv* (in Russian).

Gholami, A., Forouzmand, P., Afrous, A., Panahpour, E., 2012. Studying the condition of nitrate pollution in lettuce product. *Int. J. Agri. Crop. Sci.* 4 (17), 1276–1280.

Grishina, I.O., Panasenko, T.V., 2009. Viznachennya vmistu nitrativ v ovochah [Nitrate determination in vegetables]. *Pitannya Bioindikacii ta Ekologii* 14(2), 236–241 (in Ukrainian).

Guadagnin, S.G., Rath, S., Reyes, F.G., 2005. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. *Food Addit. Contam.* 22(12), 1203–1208.

Kennedy, D., 2003. Leafy vegetables and nitrates in nitrate and nitrite in food and water. *Harwood Publishers, London*.

Kumar, V., Chandra, A., Singh, G., 2010. Efficacy of fly-ash based bio-fertilizers vs perfected chemical fertilizers in wheat (*Triticum aestivum*). *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2(7), 31–35.

Luzhkov, A.D., 1990. Skorost' vosstanovleniya nitratov do nitritov v syroj masse nekotoryh rastenij [Nitrate recovery rate to nitrite in the fresh weight of some plants]. *Gigiena i Sanitariya* 1, 29–30 (in Russian).

Maynard, D.N., Baker, A.V., Minotti, P.L., Peck, N.H., 1976. Nitrate accumulation in vegetables. *Adv. Agron.* 28, 71–118.

Mihals'ka, O.M., Gavrilenko, O.S., 2011. Vpliv sistem udobrennya na vmistu nitrativ v ovochevih kul'turah [Fertilization systems effect on nitrate content in vegetable crops]. *Naukovi Dopovidi NUBiP* 7(29), 11–17.

Mudrij, I.V., Lep'oshkin, I.V., 2005. Deyaki aspekty problemy viroshuvannya yakisnoji roslinnoji produkciji pri zastosuvanni mineral'nih dobriv ta metodichni pidhodi schodo toksikologo-gigijenichnoji jih ocinky [Some aspects of high quality plant production growing problem with the mineral fertilizers application and methodological approaches to their toxicological-hygienic evaluation]. *Problemy Harchuvannya* 4, 44–47 (in Ukrainian).

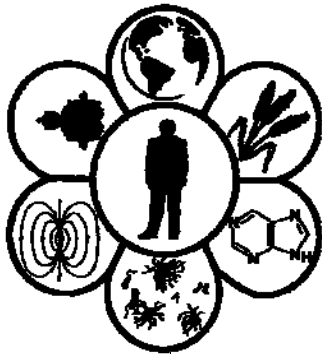
Nikolaichuk, V.I., 2008. Ecological problems in the Carpathian mountains and possible ways to overcome them. *Acta Agron. Hung.* 56(2), 235–246.

Pikul', K.V., 2003. Anomaliji rozvitku u ditej z nitratnozabrudnenoji teritoriji [Childrens abnormal development in nitrate-polluted area]. *Dovkillya ta Zdorov'ya* 2, 18–20 (in Ukrainian).

Prugar, Y., Prugarova, A., 1990. Izbytochnyj azot v ovoschah [Nitrates excess in vegetables]. *Moscow* (in Russian).

- Rahmani, H.R., 2006. Investigation of nitrate pollution in the soil, water and plants in some agricultural fields in Baraan (Esfehan Prevalence). *Env. Sci.* 11, 23–34 (in Persian).
- Romanchik, L.D., Annamammedova, O.O., Annamammedova, A.O., 2009. Osoblivosti nakopichennya nitrativ ovochevimi kul'turami v osobistih pidsobnih gospodarstvah gromadyan v pivnichnih rajonah Zhitomirshini [Nitrate accumulation features in vegetable crops of citizens private farms in the northern parts of Zhytomyr]. *Visnik Nacional'nogo Universitetu Vodnogo Gospodarstva ta Prirodokoristuvannya* 4(48), 87–94 (in Ukrainian).
- Rumyancheva, G.I., 2001. Hygiene [Gigiena]. *Geotar Medicina*, Moscow (in Russian).
- Silgram, M., Shepherd, M., 1999. The effects of cultivation on soil nitrogen mineralization. *Adv. Agron.* 65, 267–311.
- Susin, J., Kmecl, V., Gregoric, A., 2006. A survey of nitrite content of fruit and vegetables grown in Slovenia during 1996–2002. *Food Add. & Contem.* 23(4), 385–390.
- Sylvester-Bradley, R., Chambers, B.J., 1992. The implications of restricting use of fertiliser nitrogen for the productivity of arable crops, their profitability and potential pollution by nitrate. *Aspect Appl. Biol.* 30, 85–94.
- VanLoon, G.W., Duffy, S.J., 2005. *Environmental chemistry – A global perspective*. Oxford University Press.
- Ziarati, P., Bidgoli, S.A., 2012. Evaluation of the nitrate content in leafy vegetables of southern parts of Tehran: A four seasonal study. *Scientific reports*. OMICS Publishing Group.

Надійшла до редколегії 14.09.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, medicina

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine.
2013. 4(2)

ISSN 2310-4155

www.medicine.dp.ua

УДК616.697-02:616.69-007.5

Вплив препаратів з антиоксидантними властивостями на стан антиоксидантної системи сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків

О.К. Онуфрович, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

При екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків, спричиненій інфекційними агентами, зростає пероксидація ліпідів сперматозоїдів, знижується активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Прослідковується тісний взаємозв'язок між низькою біологічною якістю сперматозоїдів (низька концентрація, загальна кількість і рухливість сперматозоїдів в еякуляті) з активацією процесів пероксидації ліпідів і пригніченням активності глутатіонової антиоксидантної системи. Негативного впливу активних форм кисню на супероксиддисмутазу не спостерігалося. Курс прийому препаратів з антиоксидантними властивостями (вітамінів E та C), а також цинку сульфату зумовлює поліпшення показників спермограми (в основному рухливості та морфології сперматозоїдів), зменшення кількості пероксидних сполук і активації глутатіонової антиоксидантної системи, що підтверджує перспективність використання цих препаратів у лікуванні чоловічої неплідності.

Ключові слова: чоловіча неплідність; сперматозоїди; глутатіонпероксидаза; глутатіонредуктаза; супероксиддисмутаза; антиоксиданти

Influence of drugs with antioxidant properties on the state of the sperm antioxidant system in men with excretory-toxic forms of infertility

O.K. Onufrovych, D.Z. Vorobets, Z.D. Vorobets

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Since the development of many disorders of the reproductive function in men involves processes of free radical oxidation, the purpose of this study was to form an evaluation of the pro- and antioxidant status of sperm and to restore its biological usefulness in men with excretory-toxic forms of infertility by using drugs with antioxidant properties. It is shown that excretory-toxic forms of infertility in men are mostly caused by such infectious agents as *Chlamydia* (22%), *Chlamydia + Ureaplasma* (16%), *Chlamydia + Trichomonas* (13%), *Ureaplasma* (10%). This reduces the total number of sperm in the ejaculate by 2.7 times, and motility by 1.8 times. The number of abnormal forms increases by 1.75 times. With the development of chronic inflammation of the male sex organs sperm lipid peroxidation increases by 1.3 times while the activity of glutathione peroxidase decreases (by 2.3 times) and that of glutathione reductase (by 1.7 times). We observed a close correlation between the low biological quality of sperm (low concentration, low number and motility of sperm in the ejaculate) with activation of lipid peroxidation and inhibition of activity of the glutathione antioxidant system. In the case of superoxide dismutase, the negative impact of reactive oxygen species on this enzyme was not observed. A course of drugs with antioxidant properties – vitamin E, vitamin C and zinc sulfate leads to improvement in the indicators on the spermiogram (mostly sperm mobility and morphology), to reduction of the number of peroxide compounds and activation of the glutathione antioxidant system. In this case, the activity of glutathione peroxidase is increased by 1.5 times and the activity of glutathione reductase by 1.3 times. The activity of superoxide dismutase at the same time approaches the norm for zoospermia. The data obtained show that one of the pathogenic factors of the chronic inflammation of male sex organs, considered as a main developmental reason for infertility in its excretory-toxic form, is the increase in activity of the peroxide oxygen lipids of the sperm membrane and decompensation of the enzyme activity of the glutathione antioxidant system. Our data indicate that the use as medicines of vitamin E, vitamin C and zinc sulfate combined with antibiotic therapy would be highly effective in the treatment of male infertility.

Keywords: male infertility; sperm; glutathione peroxidase; glutathione reductase; superoxide dismutase; antioxidants

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, 79010, Львів, Україна
Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, 69 Pekarska str., 79010, Lviv, Ukraine
Tel.: +038067-494-31-54. E-mail: vorobets@meduniv.lviv.ua*

Вступ

У розвитку багатьох порушень репродуктивної функції чоловіків задіяні процеси вільнорадикального окиснення (Aitken and Bennetts, 2007; Agarwal et al., 2008; Vorobets and Kocheshkova, 2008; Aitken and Baker, 2013). Відомо, що сперматозоїдами продукуються активні форми кисню (АФК), які, за їх надлишкового накопичення, ініціюють пероксидне пошкодження клітин (Aitken and Bennetts, 2007; Vorobets and Kocheshkova, 2008). У даний час інтенсивно вивчається роль активних форм кисню у функціонуванні сперматозоїдів у нормі та при патології (Aitken and Bennetts, 2007; Agarwal et al., 2008; Ben Abdallah et al., 2011). Контрольоване продукування дуже низьких концентрацій АФК регулює здатність сперматозоїдів до запліднення (Aitken and Bennetts, 2007; Vorobets and Kocheshkova, 2008). Високий рівень АФК впливає на морфофункціональні показники сперматозоїдів, знижує їх активність та життєздатність, спричинює розвиток чоловічої неплідності (Luconi et al., 2006; Agarwal et al., 2008; Vorobets and Kocheshkova, 2008; Aitken and Baker, 2013). Оксидативний стрес може виникати внаслідок надмірного утворення АФК та при порушенні антиоксидантних захисних механізмів сперматозоїдів та індукувати низку патологій чоловічої репродуктивної системи. У знешкодженні вторинних продуктів пероксидації та інших окиснених речовин головну роль відіграють антиоксидантні ферменти, зокрема глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР), супероксиддисмутаза (СОД) (Calmera et al., 2005; Kawakami and Takemura, 2007; Vorobets and Kocheshkova, 2008).

Визначення активності пероксидації ліпідів у спермі та оцінка систем їх утилізації є важливим етапом розробки терапевтичної стратегії лікування чоловічої неплідності. У зв'язку з важливістю біологічної повноцінності сперматозоїдів здійснювались спроби вивчення можливості корекції морфофункціональних характеристик сперми за допомогою антиоксидантної терапії (Vorobets and Kocheshkova, 2008; Biswas et al., 2009; Yousef, 2010; Ben Abdallah et al., 2011; Jerysz and Lukaszewich, 2013).

Тому мета нашого дослідження – оцінити про- та антиоксидантний статус сперматозоїдів, корекцію їх біологічної повноцінності у чоловіків з екскреторно-токсичною формою неплідності за допомогою препаратів з антиоксидантними властивостями.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на зразках еякулятів, отриманих у практично здорових чоловіків ($n = 20$) та чоловіків з амнестичними даними про перенесені або рецидивні уrogenітальні інфекції ($n = 67$), віком 20–47 років. Залежно від проведеного лікування еякуляти пацієнтів поділено на групи:

– група 1 (контрольна, $n = 20$) – еякуляти практично здорових чоловіків, віком 20–47 років;

– група 2 ($n = 67$) – еякуляти чоловіків з екскреторно-токсичною формою неплідності, до початку лікування;

– група 3 ($n = 35$) – еякуляти пацієнтів, яким призначали базисне лікування, включало антибактеріальну протизапальну (етіотропну, патогенетичну), фізіо- та імунокоригувальну терапію (для підвищення неспецифічної резистентності організму);

– група 4 ($n = 32$) – еякуляти пацієнтів, яким призначали базисне лікування + препарати з антиоксидантними властивостями (вітамін Е по 600 мг/день, вітамін С по 500 мг/день), а також цинку сульфат по 250 мг/день; ці препарати, як рекомендовано, пацієнти приймали перорально протягом 3 місяців (Sen et al., 2006; Vorobets and Kocheshkova, 2008; Biswas et al., 2009; Yousef, 2010; Ben Abdallah et al., 2011; Jerysz and Lukaszewich, 2013).

Відповідні діагнози встановлювали на базі загально-визнаних критеріїв. Використано широкий комплекс загальноклінічних, лабораторних, спеціальних урологічних, інструментальних, мікробіологічних, імунологічних досліджень із метою виявлення причини неплідності.

Аналіз сперми включав такі параметри: об'єм та pH сперми; рухливість, концентрація та морфологічні характеристики сперматозоїдів. Дослідження морфологічних особливостей сперми ґрунтувалось на використанні методу Eliasson (1971). У праці використано критерії ВООЗ для оцінки морфологічних характеристик сперми (WHO).

Для отримання відмитих сперматозоїдів готували суспензію, об'ємом 5 мл (сперма + середовище відмивання ($pH 7,6$): $NaCl - 140$ мМ, $KCl - 4$ мМ, $TRIS - 50$ мМ). Суспензію центрифугували при 1 700 g, 15 хв. Після цього супернатант виливали, а осад ресуспензували в 2 мл охолодженого середовища відмивання та центрифугували при 1 700 g, 15 хв. Останню процедуру повторювали двічі. Отримані таким чином відмиті сперматозоїди поміщали в морозильну камеру при $t = -20$ °С для подальшого використання у дослідках.

Для розкриття глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної та супероксиддисмутазної латентної активності до суспензії сперматозоїдів додавали 0,2% розчин сапоніну. Вміст білка визначали методом Lowry et al. (1951). Глутатіонпероксидазну активність визначали за розвитком кольорової реакції з 5,5-дітіо-біс(2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням кольорового продукту тіонітрофенільного аніона (ТНФА), кількість якого прямо пропорційна кількості SH -груп, які прореагували з ДТНБК (Mannervik, 1971). Глутатіонредуктазну активність суспензії сперматозоїдів визначали спектрофотометрично при 340 нм в 0,2 М калійфосфатному буфері ($pH 7,0$), який містив 2 мМ ЕДТА. Супероксиддисмутазну активність визначали за Calmera et al. (2005) та Kawakami and Takemura (2007). Інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом одного з кінцевих метаболітів реакції пероксидації – малонового діальдегіду (МДА) (Mannervik, 1971).

Цифрові показники, отримані в ході досліджень, обробляли методом варіаційної статистики. У таблицях і тексті наведено $M \pm m$. Вибіркі порівнювали з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

На фоні тривалого перебігу запального процесу, спричиненого інфекційними чинниками, в умовах неефектив-

ної терапії уrogenітальних інфекцій розвиваються глибокі порушення з боку морфофункціональних і біохімічних показників сперми, системи антиоксидантного захисту та неплідність (Vorobets and Kocheshkova, 2008).

Раніше показано, що хронічні запальні процеси чоловічих статевих органів мають характер багатоголинищевих уражень (Vorobets and Kocheshkova, 2008). Послідовне залучення до запального процесу передньої уретри та її залозистого апарату, задньої уретри, сім'яного горбика, вивідних протоків, а згодом і паренхіми передміхурової залози, сім'яних міхурців і додатків яєчок взагалі є типовим для висхідних інфекцій, що передаються статевим шляхом. Проведене нами групування локалізацій запальних уражень не вичерпує всієї їх індивідуальної різноманітності. Адже у групи хворих на простатит об'єднували пацієнтів із поверхневими, вогнищевими та дифузними процесами. Крім того, патологічні зміни в уретрі в ряді випадків виявляли лише у передньому та задньому її відділах; в інших діагностовано тотальний уретрит.

У таблиці 1 наведено характеристику пацієнтів з їх розподілом за етіологічним фактором розвитку хронічної уrogenітальної захворюваності. Хронічні запальні процеси чоловічих статевих органів найбільшою мірою спричинені хламідіями (22%), хламідіями та уреоплазмами (16%), хламідіями та трихомонадами (13%). Серед обстежених був великий відсоток пацієнтів зі скаргами на хронічний біль в області таза, коли інфекційний агент при комплексному обстеженні виявити все ж не вдалося, проте виявляли лейкоцити у секреті простати, порції сечі (після масажу простати) чи спермі.

Таблиця 1

Етіологічний чинник уrogenітальних захворювань

Етіологічний чинник	Кількість хворих	Відсоток
Хламідіоз	14	22
Хламідіоз + уреоплазмоз	11	16
Хламідіоз + трихомоніаз	9	13
Уреоплазмоз	7	10
Гонорея	4	6
Трихомоніаз	6	9
Гонорея + трихомоніаз	5	8
Хронічний абактеріальний простатит / хронічний тазовий больовий синдром	11	16

При хронічних запальних процесах у сечостатевих органах спостерігається зниження практично всіх показників функціональної активності сперматозоїдів (табл. 2). Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті знижується у 2,7 раза, а їх рухливість – у 1,8 раза. Кількість патологічних форм зростає в 1,7 раза.

При лікуванні хворих із хронічними специфічними уrogenітальними інфекціями ми дотримувались класичних принципів та підходів (Vorobets and Kocheshkova, 2008). Критеріями вилікування вважали зникнення клінічних симптомів захворювання та елімінацію збудника. Також ураховували наявність змін у спермограмі та динаміку змін у системі «пероксидне окиснення ліпідів – антиоксидантна система».

Зміни морфофункціональних характеристик еякуляту чоловіків з екскреторно-токсичною формою

неплідності після проведеного лікування відображені у таблиці 3. Застосування препаратів з антиоксидантними властивостями у хворих з екскреторно-токсичною формою неплідності переважно поліпшує рухливість і морфологію сперматозоїдів.

Таблиця 2

Морфофункціональні характеристики еякуляту чоловіків з олігозооспермією при уrogenітальних інфекціях

Показники еякулятів	Група 1, контроль (n = 20)	Група 2, екскреторно-токсична форма неплідності (n = 67)
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ мл ⁻¹	63 ± 3,5	24 ± 1,6
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, 10 ⁶	145 ± 7,6	53 ± 3,2
Відносна кількість рухливих сперматозоїдів, %	62 ± 2,4	34 ± 3,5
Кількість патологічних форм, %	28 ± 2,0	49 ± 2,7
Концентрація лейкоцитів в еякуляті, 10 ⁹ л ⁻¹	0,73 ± 0,13	1,51 ± 0,46

Таблиця 3

Морфофункціональні характеристики еякуляту чоловіків груп 3 і 4 через 3 місяці після початку лікування

Показники еякулятів	Група 3 (після базисного лікування)	Група 4 (після базисної та антиоксидантної терапії)
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ мл ⁻¹	40 ± 2,5	39 ± 2,7
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, 10 ⁶	64 ± 3,5	66 ± 3,4
Відносна кількість рухливих сперматозоїдів, %	41 ± 2,3	58 ± 2,1*
Кількість патологічних форм, %	40 ± 2,0	32 ± 1,6*
Концентрація лейкоцитів в еякуляті, 10 ⁹ л ⁻¹	0,78 ± 0,074	0,76 ± 0,086

Примітка: * – різниця між основною та контрольною групами вірогідна при P < 0,05.

Оскільки дані літератури свідчать, що функціональна активність сперматозоїдів тісно пов'язана з продукуванням активних форм кисню, зокрема з пероксидацією ліпідів, ми вивчали інтенсивність ПОЛ і активність ряду ензимів антиоксидантного захисту до і після курсу лікування. Інтенсивність ПОЛ у сперматозоїдах оцінювали за вмістом МДА. У практично здорових чоловіків (група 1) вміст МДА становив 182,6 ± 4,2 нмоль/мг протеїну, у групі 2 (без антиоксидантної терапії) цей показник був вищим – 237,2 ± 22,4 нмоль/мг протеїну. У групі 4 (пацієнтам проводили базисну та антиоксидантну терапію) концентрація МДА у сперматозоїдах становила 179,2 ± 16,2 нмоль/мг протеїну.

Лікування хворих протягом трьох місяців із призначенням лише базисної терапії зумовлювало зростання глутатіонпероксидазної активності з 2,9 до 3,8 мкмоль GSH/хв-мг протеїну. Поєднання базисної та антиоксидантної терапії викликало ще більше зростання активності ензиму, а значить, активацію антиоксидантного захисту.

Активність ензимів антиоксидантної системи сперматозоїдів чоловіків з екскреторно-токсичною формою неплідності в контролях і після проведених курсів лікування

Показники про-та антиоксидантної систем	Група 1 (контроль) (n = 9)	Група 2 (n = 9)	Група 3 (n = 9)	Група 4 (n = 9)
МДА, нмоль/мг протеїну	182,6 ± 4,2	235,0 ± 6,1	237,2 ± 22,4*	179,2 ± 16,2*
СОД, ум. од./г протеїну	8,8 ± 0,4	12,1 ± 0,9	10,8 ± 0,7	9,7 ± 0,6
ГП, мкмоль GSH/хв·мг протеїну	6,7 ± 0,5	2,9 ± 0,2	3,8 ± 0,3*	5,6 ± 0,4*
ГР, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	0,55 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,36 ± 0,04*	0,46 ± 0,05*

Примітка: * – різниця між групами 3 і 4 вірогідна при $P < 0,05$.

Глутатіонредуктазна активність також відрізнялась: 0,32 нмоль NADPH/хв·мг протеїну у сперматозоїдах хворих групи 2, та 0,46 нмоль NADPH/хв·мг протеїну у сперматозоїдах хворих групи 4 по закінченні повного курсу базисного та антиоксидантного лікування.

На відміну від ГП і ГР активностей, супероксиддисмутазна активність сперматозоїдів у хворих з екскреторно-токсичною формою неплідності зростала з 8,8 до 12,1 ум. од./г протеїну. У результаті лікування (базисна + антиоксидантна терапія) ця активність знижувалась і наближалась до значень при нормозооспермії.

Із наведених даних можна прослідкувати взаємозв'язок між низькою біологічною якістю сперматозоїдів у хворих з екскреторно-токсичною формою неплідності (низька концентрація, загальна кількість і рухливість сперматозоїдів в еякуляті, збільшення кількості патологічних форм) з активацією процесів ПОЛ і пригніченням активності глутатіонової антиоксидантної системи. Щодо СОД негативного впливу АФК на цей фермент не спостерігалось. Підвищення активності СОД у сперматозоїдах при патоспермії можна пояснити компенсаторною реакцією на зростання інтенсивності вільнорадикального окиснення (Calmera et al., 2005; Kawakami and Takemura, 2007).

Лікування хворих основної групи (базисна + антиоксидантна терапія) викликає зниження процесів ПОЛ, активацію ферментів глутатіонової антиоксидантної системи. Це супроводжується зростанням якості сперми.

Наші результати узгоджуються з даними інших авторів, які демонструють значний захисний ефект антиоксидантів (зокрема вітаміну Е) на якість сперми та підтверджують доцільність їх використання при лікуванні чоловічої неплідності та зберіганні сперми (Yousef, 2010; Ben Abdallah et al., 2011; Jerysz and Lukaszewicz, 2013). Комбіноване призначення вітамінів Е та С викликає зниження продукції вільних радикалів і поліпшує якість сперми, хоча більшою ефективністю володіє вітамін Е (Yousef, 2010). Вважається, що вітамін Е захищає від пошкодження сперматозоїдів активними формами кисню (Sen et al., 2006; Yousef, 2010; Jerysz and Lukaszewicz, 2013). Так, при пероральному лікуванні антиоксидантами субфертильних чоловіків відмічалось значне зниження рівня АФК та збільшення концентрації сперматозоїдів, а також індукування акросомної реакції та зростання відсотка поліненасичених жирних кислот спермальних мембран (Jerysz and Lukaszewicz, 2013). Дослідження з використанням антиоксидантів *in vivo* та *in vitro* інколи суперечливі та вимагають подальших експериментів (Agarwal et al., 2008; Yousef, 2010; Jerysz and Lukaszewicz, 2013), тому нині проводиться подвійне

сліпе плацебо контрольоване дослідження ефективності використання комбінацій вітамінів Е та С при лікуванні чоловічої неплідності.

Висновки

Важливою причиною низької запліднювальної здатності сперматозоїдів є зниження концентрації та рухливості сперматозоїдів, порушення їх структури, що супроводжується підвищенням інтенсивності вільнорадикального окиснення – накопиченням МДА та зниженням активності ферментів глутатіонової антиоксидантної системи (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази).

Одним із факторів патогенезу хронічних запальних процесів чоловічих статевих органів як основної причини розвитку екскреторно-токсичної форми неплідності є підвищення активності пероксидного окиснення ліпідів мембран сперматозоїдів та декомпенсація ферментативної активності глутатіонової антиоксидантної системи.

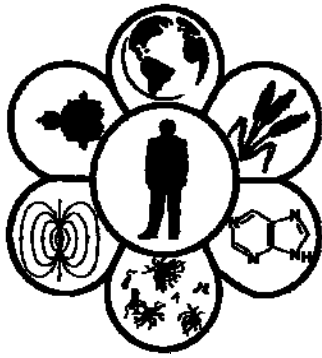
Тримісячний курс прийому препаратів з антиоксидантними властивостями (вітаміну Е 600 мг/день, вітаміну С 500 мг/день) та цинку сульфату сприяє поліпшенню показників спермограми (в основному поліпшення рухливості та морфології сперматозоїдів), зменшенню кількості пероксидних сполук і активації глутатіонової антиоксидантної системи, що в цілому поліпшує функціональні властивості сперматозоїдів.

Бібліографічні посилання

- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 59(1), 2–11.
- Aitken, R.J., Baker, M.A., 2013. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: Relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *J. Reprod. Immunol.* 100(1), 11–19.
- Aitken, R.J., Bennetts, L.E., 2007. Reactive oxygen species and their impact on fertility. *Male infertility. Diagn. Treatment.* 15(1), 255–268.
- Ben Abdallah, F., Fetoui, H., Zribi, N., Fakfakh, F., Ammar-Keskes, L., 2011. Antioxidant supplementations *in vitro* improve rat sperm parameters and enhance antioxidant enzyme activities against dimethoate-induced sperm damages. *Andrologia* 44(1), 272–279.
- Biswas, A., Mohan, J., Sastry, K., 2009. Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. *Br. Poult. Sci.* 50(6), 733–738.

- Calmera, J., Buffone, M., Ollero, M., 2005. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenonormozoospermic, and polyzoospermic semen samples. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 422–430.
- Eliasson, R., 1971. Standart for investigation of human semen. *Andrologia* 2(10), 3–49.
- Jerysz, A., Lukaszewicz, E., 2013. Effect of dietary selenium and vitamin *E* on ganders' response to semen collection and ejaculate characteristics. *Biol. Trace Elem. Res.* 153(1–3), 196–204.
- Kawakami, E., Takemura, A., 2007. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. *J. Vet. Med. Sci.* 69(2), 133–136.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–279.
- Luconi, M., Forti, G., Baldi, E., 2006. Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci.* 11, 1433–1447.
- Mannervik, B., 1971. Glutathione peroxidase. *Meth. in Enzym.* 77, 13–33.
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S., 2006. Tocotrienols: Vitamin *E* beyond tocopherols. *Life Sci.* 78(18), 2088–2098.
- Vorobets, D.Z., Kocheshkova, N.S., 2008. Infertility and erectile dysfunction: Biochemical and clinical aspects. *Ukrmedknyga, Ternopil* (in Ukrainian).
- WHO laboratory manual for the examination of Human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd and 4th ed., 1992 and 1999. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Yousef, M.I., 2010. Vitamin *E* modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits. *Food. Chem. Toxicol.* 48(5), 1152–1159.

Надійшла до редколегії 18.10.2013



УДК 577.152.3

Властивості Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролази лімфоцитів крові у хворих на реактивний артрит

О.В. Мельник, О.П. Корнійчук, О.І. Першин, З.Д. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Установлено зміни та проаналізовано кінетичні властивості оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФазної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові практично здорових осіб і хворих на реактивний артрит (РеА). У лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА первинно-активне транспортування іонів Na^+ , K^+ відбувається повільніше і менш інтенсивно порівняно з практично здоровими донорами, але характеризується приблизно однаковою ємністю з донорами. Константа афінності до АТФ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА перевищує її значення порівняно з практично здоровими донорами у 2,9 раза. За умов розвитку ревматичної патології в імунокомпетентних клітинах інгібування активності Na^+ , K^+ -АТФази відбувається не за рахунок зменшення кількості обертів ензиму, а шляхом підвищення спорідненості оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ. Водночас, Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів хворих на РеА залишається нативною. Афінність Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові донорів до іонів K^+ перевищує афінність у хворих на РеА у 2,4 раза. Na^+ , K^+ -АТФаза лімфоцитів периферичної крові хворих на РеА зберігає свої нативні рецепторні властивості: чутливість до інгібування оубаїном не змінюється. Припускається, що за умов розвитку ревматичної патології вплив на структуру Na^+ , K^+ -АТФази здійснюється як із зовнішньоклітинної, так і з цитоплазматичної поверхні мембрани.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТФаза; реактивний артрит; лімфоцити

Properties of Na^+ , K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolyze of blood lymphocytes in patients with reactive arthritis

O.V. Melnyk, O.P. Kornijchuk, O.I. Pershyn, Z.D. Vorobets

Danylo Halytski Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

A significant role in the development and course of reactive arthritis (ReA) is played by T-lymphocytes as their development and systemic manifestations are based on immunological mechanisms. Additionally, the pathogenesis of many diseases is linked to changes in the structure and function of ion-transporting systems. Therefore, the aim of the study was to find out the kinetic properties of ATP-hydrolysis reaction involving Na^+ , K^+ -ATPase of peripheral blood lymphocytes of healthy individuals and patients with ReA. We used the current methodological approaches to the study of ATPase activity in saponin permeabilized cells. We conducted an analysis of the kinetic properties of ouabainsensitive Na^+ , K^+ -ATPase activity of saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (ReA). We found out that in peripheral blood lymphocytes of patients with ReA primary active transport of Na^+ , K^+ ions is slower and less intensive, though characterised by the same capacity, as in healthy donors. The affinity constant for ATP in peripheral blood lymphocytes in patients with ReA is greater by 2.9 times than its value in comparison with healthy donors. We established that in conditions of rheumatic pathology in immunocompetent cells, inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity is not caused by reduction of speed of enzyme work, but by increase of affinity of ouabainsensitive Na^+ , K^+ -ATPase to ATP. At the same time, the Mg^{2+} -binding center of Na^+ , K^+ -ATPase in patients with ReA is endogenous. We also found that affinity Na^+ , K^+ -ATPase to the ions K^+ in peripheral blood lymphocytes of healthy donors is 2.4 times higher than in patients with ReA. We observed that Na^+ , K^+ -ATPase of peripheral blood lymphocytes of patients with ReA retains its endogenous receptor properties – sensitivity to ouabain does not change. It is assumed that under conditions of rheumatic pathology the impact on the Na^+ , K^+ -ATPase structure occurs both externally and on the cytoplasmic membrane surface. The above experimental data can be used for further clarification of the membrane mechanisms of ion exchange in immunocompetent cells of patients suffering from autoimmune diseases.

Keywords: Na^+ , K^+ -ATPase; reactive arthritis; lymphocytes

Вступ

Реактивний артрит (РеА) є одним із найрозповсюдженіших запальних аутоімунних захворювань суглобів. Високі показники поширення та захворюваності, схильність до прогресування, розвиток непрацездатності серед осіб середнього віку зумовлюють високу медико-соціальну значимість цієї патології (Berezhnyi et al., 2013; Kovalenko, 2011; Spaska, 2011). РеА – системне захворювання, яке розвивається внаслідок урогенітальної (найчастіше хламідійної), кишкової або носоглоткової інфекції (Zeidler et al., 2004; Hamdulau et al., 2006; Kim et al., 2009; Kohnke, 2009; Spaska, 2011; Berezhnyi et al., 2013).

Згідно із сучасними уявленнями, значна роль у розвитку та перебігу артритів належить Т-лімфоцитам. В основі РеА та його системних проявів лежать імунологічні механізми (Colmegna and Espinoza, 2005; Leirisalo-Repo, 2005; Leirisalo-Repo and Sieper, 2006; Lychkovska, 2011). Тому актуальними є питання, які стосуються саме імунопатології ревматичних захворювань, їх механізмів виникнення та розвитку.

Патогенез багатьох захворювань пов'язаний зі змінами структури та функцій біомембран, у формуванні яких значна роль належить мембранозв'язаним білкам, зокрема інтегральним АТФ-залежним транспортувальним системам іонів. Na^+ , K^+ -АТФаза (ЕС 3.6.1.37) – маркерний ензим плазматичної мембрани, який селективно інгібується оубаїном, є Ca^{2+} -незалежною, Na^+ , K^+ -активованою, Mg^{2+} -АТФ-залежною транспортувальною системою, що здійснює активне трансмембранне перенесення іонів Na^+ , K^+ і тим самим підтримує їх електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітини. Активність Na^+ , K^+ -АТФази відіграє ключову роль у підтриманні внутрішньоклітинного іонного гомеостазу, осмотичного балансу та трансмембранного потенціалу клітин, змінюється під впливом гормонів, факторів росту та стресу.

Нашими попередніми дослідженнями показано (Melnyk et al., 2011), що у хворих на РеА Na^+ , K^+ -АТФаза активність лімфоцитів периферичної крові істотно відрізняється від контрольної групи, а після проведеного лікування хворих у стаціонарі спостерігається наближення активності Na^+ , K^+ -АТФази до її контрольних значень. На сьогодні нез'ясованими залишаються біохімічні механізми порушення функціональної активності Na^+ , K^+ -АТФази у лімфоцитах периферичної крові за умов розвитку аутоімунного процесу. Комплексне вивчення функціонування та ролі Na^+ , K^+ -помпи як системи енергозалежного транспортування іонів Na^+ , K^+ у регуляції функціональної відповіді клітини (з використанням фізіологічних методів дослідження на цілих об'єктах) і ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази (з використанням біохімічних методів) на одному об'єкті дасть можливість сформулювати цілісне уявлення про участь цих систем у підтриманні іонного гомеостазу клітини. З огляду на це, мета цієї роботи – з'ясувати кінетичні характеристики АТФ-гідролазної реакції за участю Na^+ , K^+ -АТФази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові клінічно здорових осіб і хворих на РеА.

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові донорів і хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. Усіх хворих поділено на дві дослідні групи: хворі на РеА до ($n = 14$) та після проведеного лікування ($n = 14$). Групу контролю становили практично (клінічно) здорові донори віком 20–30 років ($n = 15$).

Відповідні діагнози встановлювали на базі загально-визначених критеріїв. Використано широкий комплекс загальноклінічних, лабораторних, спеціальних ревматологічних, інструментальних, мікробіологічних, імунологічних досліджень з метою виявлення причини розвитку реактивного артрити (Leirisalo-Repo and Sieper, 2006).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові хворих і донорів у градієнті концентрації фікол-тріумбасту ($1,08 \text{ г/см}^3$) (Boyum, 1968). Цілісність і життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідках становила не менше 95%, оцінювали за забарвленням трипановим синім (Michell and Shiigi, 1980). Для пермеабілізації мембран лімфоцитів периферичної крові з метою розкриття латентної Na^+ , K^+ -АТФазної активності до суспензії лімфоцитів додавали 0,2% сапонін (Fafula et al., 2012). Ця методика ґрунтується на роботах, виконаних на лімфоцитах раніше. Вміст білка у лімфоцитарній суміші визначали методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Визначення загальної АТФазної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) такого складу (мМ): 30 $NaCl$, 120 KCl , 5 $MgCl_2$, 1,5 АТФ, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТФази) (Fafula et al., 2012), 20 $Hepes$ - $Tris$ -буфер 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ЕПР) (Fafula et al., 2012). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лімфоцитарної суміші – 100 мкл (кількість білка у пробі не перевищувала 50–100 мкг/мл). Тривалість інкубації – 1–15 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7% формальдегід, 14% етанол, 5% ТХО ($pH = 4,3$). Базальну Mg^{2+} -АТФазну активність лімфоцитів тестували в аналогічному середовищі інкубації, але за присутності 1 мМ оубаїну – селективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази (Tian et al., 2006). Оубаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФазну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТФазної та базальної Mg^{2+} активності.

У дослідках контролем на неензиматичний гідроліз АТФ було стандартне середовище інкубації, яке не містило досліджуваної проби. Як контроль на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P_i) в лімфоцитарній суміші використовували суспензію лімфоцитів у фізіологічному розчині. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun та V. Betlach (Rathbun and Betlach, 1969) і виражали у мкмоль P_i /хв·мг протеїну.

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролазної реакції проводили у стандартному середовищі інкубації, модифікованому за фізико-

хімічними характеристиками чи складом відповідних компонентів (час інкубації, концентрації АТФ, Na^+ , K^+ , оубаїну). Всі експерименти з вивчення властивостей Na^+ , K^+ -АТФази ферментативної реакції проводили в режимі початкової швидкості V_0 (лінійність накопичення продукту P_i у часі).

Уявні кінетичні параметри, які характеризують реакцію вивільнення неорганічного фосфору під час Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ – максимальну миттєву швидкість реакції V_0 , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції P_{max} та характеристичний час реакції (період напівнасичення) визначали як описано у статті (Keleti, 1990). Уявні кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активовану, Mg^{2+} -залежну АТФ-гідролазну реакцію – константу активації іонами, константу Міхаеліса (K_m АТФ) та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу АТФ визначали методом Лайнуївера – Берка (Keleti, 1990). Отримані концентраційні залежності швидкості ензиматичної реакції від досліджуваних реагентів реакції гідролізу будували в координатах: $\{1/V \text{ від } 1/S\}$, де S – задана концентрація реагенту, а V – швидкість ензиматичного гідролізу АТФ при заданій концентрації.

При визначенні ефективності впливу оубаїну на Na^+ , K^+ -АТФазу активність (уявної константи інгібування ($I_{0,5}$) та коефіцієнта Хілла (n_H)) лінеаризовані криві концентраційних залежностей будували у координатах Хілла $\{lg[(A_0-A)/A]; lg[I]\}$ відповідно до емпіричного рівняння Хілла:

$$lg[(A_0-A)/A] = -n_H lg I_{0,5} + n_H lg [I],$$

де A_0 та A – питома активність ензиму за відсутності та присутності у середовищі інкубації оубаїну в концентрації I .

Кінетичні та статистичні розрахунки проводили у програмному забезпеченні MS Office. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стюдента. Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує еспериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції становило 0,90–0,99. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію, за якої $P \leq 0,05$.

У дослідях використовували реактиви АТФ, Нерес, Tris, оубаїн, тапсигаргін, ЕГТА (Sigma, США). Інші використані у дослідях реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації ЧДА та ХЧ.

Результати та їх обговорення

Із метою вивчення особливостей та механізму роботи Na^+ , K^+ -АТФази визначали максимальну миттєву швидкість реакції (V_0), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції (P_{max}) та характеристичний час реакції (τ) (Keleti, 1990; Fafula et al., 2012). Для встановлення цих кінетичних параметрів Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, який каталізується Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів, досліджували динаміку накопичення продукту АТФ-гідролізної реакції. Для

цього суспензію лімфоцитів інкубували у стандартному середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (1–15 хв). Дані експериментів показали, що кінетику Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами віддзеркалюють криві, які мають тенденцію до насичення (рис. 1). Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що кінетика Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, каталізованого сапонін-перфорованими лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку в діапазоні 0–5 хв: у цьому інтервалі часу графік залежності P_i від періоду інкубації є практично лінійним.

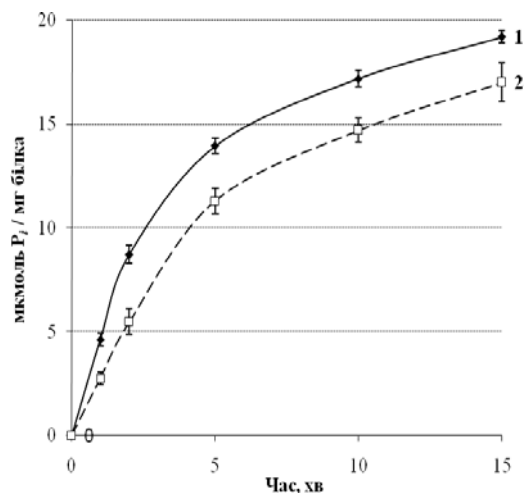


Рис. 1. Динаміка вивільнення неорганічного фосфору (P_i) у процесі Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів (1), хворих на РеА до лікування (2) ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Як випливає з рисунка 1, в усьому діапазоні часу кількість вивільненого неорганічного фосфору P_i оубаїнчутливою Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів хворих на РеА дещо нижча порівняно з величиною у донорів. Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах P/t від P обчислено основні кінетичні характеристики реакції Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами (табл. 1).

Таблиця 1

Кінетичні параметри Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА до проведеного лікування ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Кінетичні параметри	Донори	РеА
V_0 , мкмоль P_i / хв · мг протеїну	$6,08 \pm 0,45$	$3,22 \pm 0,26^*$
P_{max} , мкмоль P_i / мг протеїну	$25,0 \pm 1,0$	$28,1 \pm 0,1$
τ , хв.	$4,18 \pm 0,51$	$9,40 \pm 0,65^*$

Примітки: V_0 – максимальна миттєва швидкість реакції, P_{max} – максимальна (платова) кількість продукту реакції, τ – характеристичний час реакції (період напівнасичення); зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах в осіб групи контролю та хворих на РеА, * – $P < 0,05$.

Значення кінетичних параметрів Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфо-

рованими лімфоцитами донорів і хворих на ревматичне захворювання істотно відрізняються. За відсутності вірогідної різниці величини P_{max} гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами, виділеними у донорів і хворих на РеА, нами показано, що значення V_0 у хворих на ревматичні захворювання істотно відрізняються від контрольної групи. На основі цих даних можна припустити, що у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА транспортування іонів Na^+ та K^+ відбувається повільніше і менш активно, але характеризується практично однаковою ємністю.

Згідно з результатами каталітичного титрування суспензії лімфоцитів розчином АТФ у діапазоні концентрацій 0,1–2,0 мМ (за сталої концентрації Mg^{2+} , 5 мМ) відбувається монотонне збільшення ензиматичної активності оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази з виходом на плато (рис. 2). Можна бачити, що в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТФ активність Na^+ , K^+ -АТФази хворих на ревматичне захворювання знижена порівняно із даною величиною у донорів.

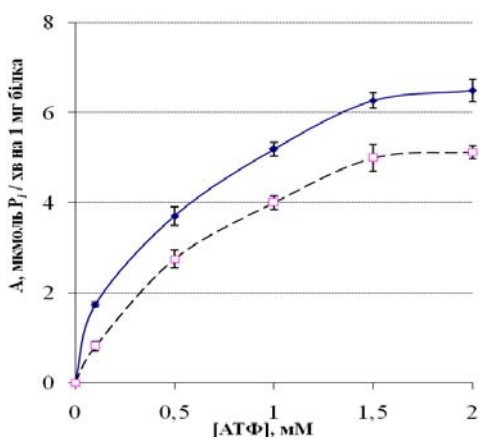


Рис. 2. Залежність впливу АТФ на активність оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів (1) і хворих на РеА до лікування (2) ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази в імунотропних клітинах хворих на РеА, шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера – Берка, проведено визначення основних кінетичних параметрів Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих (табл. 2).

Таблиця 2

Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активованій Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА від концентрації АТФ ($M \pm m$, $n = 4-8$)

Кінетичні параметри	Донори	РеА
V_{max} , мкмоль P_i / хв · мг протеїну	$6,30 \pm 0,14$	$7,76 \pm 0,58$
K_{ATP} , мМ	$0,27 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,05$ *

Примітки: V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, K_{ATP} – константа Міхаеліса за АТФ; * – зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю ($P < 0,05$).

Величини K_{ATP} знаходяться в діапазоні концентрацій 10^{-3} М, що відповідає фізіологічній концентрації $MgATP$ у цитоплазмі. Розрахунок кінетичних параметрів оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази свідчить, що максимальна швидкість гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА, визначена за АТФ, практично не відрізняється у нормі та при патології. Водночас константа афінності до АТФ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА значно зростає (у 2,9 раза порівняно з практично здоровими донорами).

При інтерпретації отриманих даних з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за АТФ, ми дійшли висновку, що за умов розвитку ревматичної патології в імунотропних клітинах інгібування активності досліджуваної ензиматичної системи відбувається не за рахунок зменшення числа обертів ензиму, а за рахунок підвищення спорідненості оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ. Оскільки центр гідролізу АТФ локалізований на цитоплазматичній поверхні мембрани, ми припускаємо, що однією з можливих причин конкурентного інгібування ензиму може бути вплив на ензим з боку інших патологічних змін і процесів у лімфоцитах, які мають місце при ревматичній патології. Під час запалення або дії цитотоксичних факторів у позаклітинному оточенні можуть створюватися високі локальні концентрації АТФ (Bodin and Burlstock, 2001). Можливо, такі зміни концентрацій АТФ і ведуть до зростання спорідненості оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ.

При вивченні впливу різних концентрацій іонів Na^+ , K^+ (мМ/мМ) на питому ензиматичну активність оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази частину KCl в інкубаційному середовищі ізотонічно замінювали на $NaCl$ (сумарна концентрація $Na^+ + K^+ = 150$ мМ). Графік залежності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на РеА та АСА має типовий куполоподібний вигляд (рис. 3). Оптимальним для функціонування ензиму є співвідношення іонів $125 K^+ : 25 Na^+$. У разі відсутності одного з іонів в інкубаційному середовищі Na^+ , K^+ -АТФаза не тестується.

Графіки залежності оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази активності лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на РеА від співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ) у висхідній частині калієвої компоненти кривих лінеаризовано у координатах Лайнуївера – Берка.

Розрахунок кінетичних параметрів оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази свідчить, що початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА, визначена за K^+ , і уявна константа активації іонами K^+ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА вірогідно відрізняються порівняно з практично здоровими донорами. Це відповідає змішаному типу інгібування ензиму.

Інтерпретуючи отримані дані з урахуванням кінетичних параметрів, визначених за K^+ , ми дійшли висновку, що за умов розвитку ревматичної патології в імунотропних клітинах інгібування активності досліджуваної ензиматичної системи відбувається внаслідок зменшення числа обертів ензиму. Можна припустити,

що зниження величини V_{max} може бути пов'язане зі зменшенням Na^+/K^+ електрохімічного градієнта цитоплазматичної мембрани лімфоцитів, зниженням кількості транспортувальних одиниць (зменшення їх експресії у мембрані) або зменшення кількості обертів ензиму. Зниження величини уявної константи активації K_K^+ за умов ревматичної патології вказує на збільшення спорідненості Na^+ , K^+ -АТФази до іонів калію. Подібні результати отримані дослідниками для H^+/K^+ -АТФази парієтальних клітин при розвитку експериментальної виразки шлунка (Strocka et al., 2010). Враховуючи те, що центр спорідненості до іонів K^+ локалізований на зовнішньоклітинній поверхні мембрани, ми припускаємо, що зміни афінності до іонів K^+ (і відповідно інгібування ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТФази) спричинені також позаклітинними впливами на структуру мембрани.

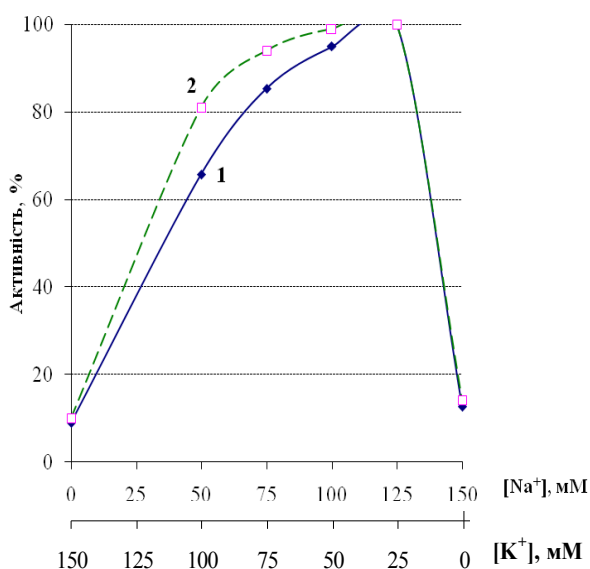


Рис. 3. Вплив зміни співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ) на активність оуабайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів (1) і хворих на РеА (2) ($M \pm m, n = 4$; за 100% прийнято ензиматичну активність за оптимального співвідношення іонів Na^+ і K^+)

Na^+ , K^+ -активована Mg^{2+} -залежна АТФаза, яка поєднує транспортно-гідролітичну та рецепторну функції, специфічно взаємодіючи з екзогенними інгібіторами – серцевими глікозидами або їх ендогенними аналогами (Karliа et al., 2006; Valente et al., 2003). Кардіоактивний стероїд оуабайн належить до високоселективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази. Оуабайн зв'язується з ензимом із зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани. Вважають, що оуабайн блокує ензим у конформації $P-E_2$, гальмуючи у такий спосіб перехід ензиму в інший конформаційний стан $P-E_1$. Оуабайн в інтервалі концентрацій 10^{-6} – 10^{-3} М дозозалежно пригнічує оуабайнчутливу Na^+ , K^+ -АТФазу активність лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на ревматичні захворювання (рис. 4). Характер інгібування оуабайном для ензиму у нормі та при патології однаковий. Для з'ясування параметрів інгібування Na^+ , K^+ -

АТФази оуабайном проведено лінеаризацію концентраційних кривих у координатах Хілла. Параметри інгібування відповідали високочутливому до оуабайну фенотипу Na^+ , K^+ -АТФази, який визначається подібністю структури рецепторної ділянки і є характерним для всіх ізоензимів Na^+ , K^+ -АТФази у людини (Karliа et al., 2006).

Таблиця 3

Кінетичні параметри, які характеризують Na^+ , K^+ -активованій, Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ сапонін-перфорованими лімфоцитами периферичної крові донорів і хворих на РеА від зміни співвідношення іонів Na^+ і K^+ (за ізотонічних умов $Na^+ + K^+ = 150$ мМ, $M \pm m, n = 4-8$)

Кінетичні параметри	Донори	РеА
V_{max} , мкмоль P_i / хв · мг протеїну	$7,74 \pm 0,29$	$5,62 \pm 0,26^*$
K_{K^+} , мМ	$66,8 \pm 3,4$	$27,6 \pm 2,28^*$

Примітки: V_{max} – початкова максимальна активність ензиму, K_{K^+} – уявна константа активації іонами K^+ ; * – зміни вірогідні стосовно величин у лімфоцитах осіб групи контролю ($P < 0,05$).

Значення уявної константи інгібування оуабайном і коефіцієнт Хілла в лімфоцитах периферичної крові донорів і хворих на РеА вірогідно не відрізняються. Отже, Na^+ , K^+ -АТФаза лімфоцитів периферичної крові хворих на РеА зберігає свої нативні рецепторні властивості – чутливість до інгібування оуабайном не змінюється. Збереження нативних рецепторних властивостей Na^+ , K^+ -АТФази до оуабайну показано у клітинах карциноми товстої кишки людини (Karliа et al., 2007). Іншими дослідниками показано, що має місце зміна кінетики зв'язування оуабайну з Na^+ , K^+ -АТФазою лімфоцитів у хворих на мігрень, і це може бути корисним інструментом у діагностиці мігрені (Scartone et al., 2007).

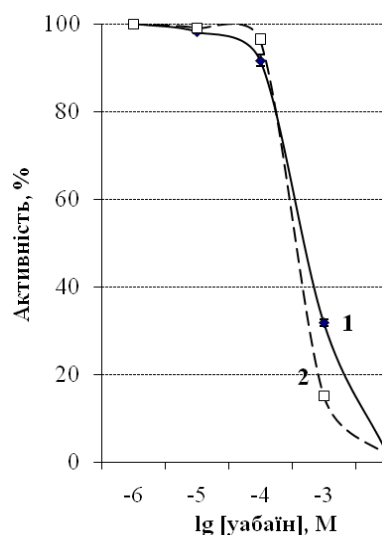


Рис. 4. Інгібування оуабайном Na^+ , K^+ -АТФазної активності сапонін-перфорованих лімфоцитів периферичної крові донорів (1) та хворих на РеА (2) ($M \pm m, n = 6$)

За 100% прийнято ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТФази за відсутності в інкубаційному середовищі оуабайну.

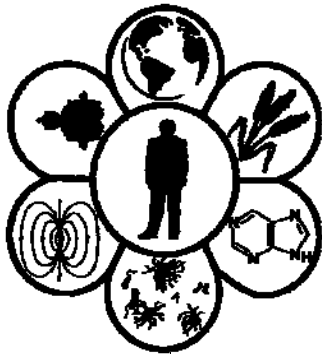
Висновки

У лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА первинно-активне транспортування іонів Na^+ , K^+ відбувається повільніше і менш інтенсивно порівняно зі здоровими донорами, але характеризується практично однаковою ємністю з донорами. За умов розвитку ревматичної патології константа афінності Na^+ , K^+ -АТФази до АТФ у лімфоцитах периферичної крові хворих на РеА зростає порівняно з практично здоровими донорами. Водночас, Mg^{2+} -зв'язувальна ділянка оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів хворих на РеА залишається нативною. Відмічається також зниження афінності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів периферичної крові до іонів K^+ і збереження рецепторних властивостей до оубаїну у хворих на РеА. Наведені експериментальні дані можуть бути використані для подальшого з'ясування мембранних механізмів іонного обміну в імунокомпетентних клітинах при автоімунних захворюваннях.

Бібліографічні посилання

- Berezhnyi, V.V., Marushko, T.V., Marushko, J.V., 2013. Clinical reumatology. Kyiv (in Ukrainian).
- Bodin, P., Burnstock, G., 2001. Purinergic signalling: ATPase. *Neurochem. Res.* 26(15), 959–969.
- Boyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(97), 77–79.
- Colmegna, I., Espinoza, L., 2005. Recent advances in reactive arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 7(3), 201–207.
- Fafula, R.V., Efremova, U.P., Lychkovska, N.E., Vorobets, Z.D., 2012. Kinetic properties of Na^+ , K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolysis of blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondyloarthritis. *Ukr. Biochem. J.* 84(3), 44–54 (in Ukrainian).
- Hamdulau, S.S., Glynn, S.J., Keat, A., 2006. When is arthritis reactive? *Postgrad. Med. J.* 82(969), 446–453.
- Kaplya, A.A., Kudryavceva, A.G., Gorchev, V.F., Osinsky, D.C., Hizhnyak, S.V., 2006. Determination of Na^+ , K^+ -ATPase activity in human colorectal carcinoma. *Ukr. Biochem. J.* 78(2), 142–148 (in Ukrainian).
- Keleti, T., 1990. General of enzymatic kinetics. Mir, Moscow (in Russian).
- Kim, P.S., Klausmeier, T.L., Orr, D.P., 2009. Reactive arthritis. *Therapia* 11(41), 38–44.
- Kohnke, S.J., 2004. Reactive arthritis. A clinical approach. *Orthop. Nurs.* 23(4), 274–280.
- Kovalenko, V.M., 2011. Optimisation of swelling and inflammatory joint syndromes' treatment in patients with rheumatic joint diseases. *Ukr. Rheumat. J.* 44(2), 74–78 (in Ukrainian).
- Leirisalo-Repo, M., 2005. Reactive arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 34(4), 251–259.
- Leirisalo-Repo, M., Sieper, J., 2006. Reactive arthritis: Epidemiology, clinical features, and treatment. *Spondylites and the spondyloarthropathies*. Philadelphia, Mosby Elsevier, 53–64.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–275.
- Lychkovska, N., Fafula, R., Efremova, U., Vorobets, Z.D., 2011. A study of Na^+ , K^+ -ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes in patient with rheumatic diseases. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklowowska* 24(1), 171–177.
- Melyk, O.V., Lychkovska, N.E., Kornijchuk, O.P., Vorobets, Z.D., 2012. ATP-hydrolase lymphocytes of peripheral blood activities in patient with reactive arthritis. *Bukov. Med. Visnyk* 16(3), 50–53.
- Mishell, B.B., Shiigi, S.M., 1980. Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman & Co, San Francisco.
- Rathbun, W., Betlach, V., 1969. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 28, 436–447.
- Spaska, G.O., 2011. Reactive arthritis: Modern look on the problem. *Ukr. Med. Chasopys* 6(86), 82–88 (in Ukrainian).
- Scarrone, S., Podestà, M., Cupello, A., Finocchi, C., Frassoni, F., 2007. Abnormalities of Na/K -ATPase in migraine aura. *Cephalalgia* 27(2), 128–132.
- Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., Lui, L., 2006. Binding of Src to Na^+ , K^+ -ATPase form a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.* 17, 317–326.
- Valente, R.C., Capella, L.S., Monteiro, R.Q., 2003. Mechanism of ouabain toxicity. *Faseb. J.* 17(12), 1700–1702.
- Zeidler, H., Kuipers, J., Kohler, L., 2004. Chlamidia-induced arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16(4), 380–392.

Надійшла до редколегії 15.11.2013



УДК 579.852.1+631.573

Колонизация ризопланы корней огурцов микроорганизмами, входящими в состав микробного препарата «Эмбико®»

В.С. Ржевская, Л.М. Теплицкая, И.П. Отурина

Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина

Исследовано взаимодействие молочнокислых бактерий (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Lactococcus lactis*) и дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*, входящих в состав микробиологического препарата «Эмбико®», с корнями растений огурца (*Cucumis sativus* L.) сортов Конкуренс и Феникс плюс *in vitro*. Изолированные штаммы исследованных микроорганизмов образуют вокруг корней облако колонии, различное по мутности и размерам. Штаммы *L. plantarum* и *L. casei* 6 образовывали однородное облако мелких колоний, одинаковое по диаметру на всех зонах корня и постепенно уменьшающееся в зоне корневого чехлика. Штамм *S. cerevisiae* образовывал плотное облако крупных колоний, отличающееся по диаметру в разных зонах корня. Наименьшая интенсивность роста микроорганизмов наблюдалась на верхушке корня, наибольшая – в зоне корневых волосков. Штамм молочнокислого стрептококка *Lactococcus lactis* 4/6 колонизирующей способностью не обладает. При инокуляции корней микроорганизмами, ассоциированными в препарате «Эмбико®», колонизация корней происходит более активно, что свидетельствует о формировании синергических взаимоотношений между лактобациллами и сахаромидетами при совместном их культивировании. Облако колоний, образованное микробиологическим препаратом «Эмбико®», выглядело неоднородным, четко просматривались колонии разного размера и цвета. Активная микробная колонизация всех зон корней огурцов связана с потреблением исследуемыми микроорганизмами корневых экзотометолитов в качестве источников энергии и углерода. Сортовая специфика огурцов не оказывает существенного влияния на ход процесса колонизации корней. Полученные результаты дают возможность охарактеризовать микроорганизмы, входящие в состав микробиологического препарата «Эмбико®», как способные колонизировать ризоплану корней растений огурца.

Ключевые слова: микробиологический препарат «Эмбико®»; молочнокислые бактерии; дрожжи; колонизация корней; ризоплана

Colonization of rhizoplane of cucumber roots by microorganisms which are components of the microbial preparation “Embiko®”

V.S. Rzhevskaya, L.M. Teplitskaya, I.P. Oturina

Taurida V. Vernadsky National University, Simferopol, Ukraine

The ability of microorganisms belonging to the microbiological preparation “Embiko®” to colonize the rhizoplanes and rhizospheres of the Competitor and Phoenix Plus types of cucumber (*Cucumis sativus* L.) *in vitro* was investigated. The objects of study were the cultures of the lactic homofermentative streptobacteria *Lactobacillus plantarum* 20 and *L. casei* 6 and the homofermentative lactic streptococcus *Lactococcus lactis* 4/6, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 75 and the microbiological preparation “Embiko®” which includes the above-mentioned microorganisms. Germinated seeds were placed aseptically in biological test-tubes with starvation agar, where a suspension of the microbiological consortium of microorganisms had been added before. The ability of bacteria to colonize the root zone of plants was assessed visually by the intensity of formation of bacterial microcolonies on the surface of the roots of the seedlings and on the crushed micropreparations. The strain of *S. cerevisiae* colonized the entire volume of the agar along the entire length of the root, in the apical part of the root colonization was shown to be less active. With increasing duration of cultivation the intensity of colonization of the root zone by microorganisms was increased – colonies became larger. In various areas of the root the diameter of the cloud colonies *S. cerevisiae* was different in size. The strains of *L. casei* 6 and *L. plantarum* 20 colonized all the root zones, forming a cloud of small colonies around them. The strain of *L. lactis* 4/6 did not form colonies in the starvation agar and didn't colonize the root surface of the cucumber seedlings. The microbiological preparation “Embiko®” colonized the root throughout its length, gradually narrowing in the apical zone. When

inoculated with a pure culture of isolated strains the cloud was composed of monotypic colonies and looked homogeneous. When inoculated with the microbial consortium the cloud of the colonies looked heterogeneous, colonies of different sizes and colors were clearly visible. Under microscopy the preparations of the roots of the cucumber seedlings inoculated with the microbial preparation "Embiko[®]" yeast cells and cells of the lactic acid bacteria were found. This study of the ability of microorganisms from the preparation "Embiko[®]" to colonize the rhizoplane and rhizospheres of roots of cultivated plants *in vitro* showed that the different strains of microorganisms form clouds of colonies around the roots which were distinct in turbidity and size: the strain of *L. plantarum* – almost transparent, and *S. cerevisiae* – very dense. The lowest growth rate of microorganisms was observed at the apex of the root, the highest – in the zone of root hair. Clearly, root exudates of plants are the main source of carbon and energy for the inoculated bacteria. The results indicate that the investigated microbial consortium has a promising potential to inoculate plants in order to stimulate their growth and development.

Keywords: microbiological preparation «Embiko[®]»; *Lactobacillus*; yeasts; colonization of the roots; rhizoplane

Введение

Поверхность корня (ризоплана) и зона почвы, непосредственно соприкасающаяся с корнями (ризосфера), являются постоянным местом обитания разнообразных микробных ассоциаций (Costerton, 1995; Davey, 2000; Lobakova, 2005; Shaposhnikov, 2011; Galkin, 2012). Микроорганизмы ризопланы выполняют много жизненно важных для растений функций: стимулируют рост и развитие растительных организмов за счет способности к фиксации азота (Maudinas, 1981; Kundu, 1984; Mantelin, 2004), продуцирования фитогормонов (Dragovoz, 2012; Zakry Fitri Abdul Aziz, 2012), мобилизации питательных элементов из почвы (Rai, 1988; Han, 2006), повышения устойчивости растений к стрессовым факторам (Pigoleva, 2012; Zacharchenko, 2012). Отдельные виды обладают способностью к детоксикации чужеродных химических соединений в окружающей среде (Loktushov, 2011). Таким образом, устанавливая симбиотические отношения с растением, микроорганизмы ризопланы существенным образом модифицируют обмен веществ растения-хозяина.

Ведущую роль в формировании специфических ризоплановых и ризосферных микробных сообществ, отличающихся от почвенного микробиоценоза, играют корневые выделения растений (Vancura, 1972; Folman, 2001; Felix, 2002; Kravchenko, 2003, 2011). Для успешной колонизации корней важна способность бактерий утилизировать основные компоненты корневых выделений, в особенности низкомолекулярные органические кислоты (Vancura, 1972; Folman, 2001; Kravchenko, 2011), а также их способность синтезировать аминокислоты и витамины группы В (Shaposhnikov, 2011).

Одной из функций ризоплановой и ризосферной микрофлоры является защита растений от фитопатогенных микроорганизмов (Boronin, 1998; Kravchenko, 2002; Morgun, 2009; Zacharchenko, 2012; Rzevskaia, 2013), которая может быть как механической за счет перекрытия сайтов адгезии на поверхности корней, так и активной за счет продуцирования широкого спектра антибиотических веществ (Galkin, 2012). Поиск эффективных микробных антагонистов фитопатогенных бактерий целесообразно проводить среди микроорганизмов, которые, с одной стороны, способны продуцировать биологически активные метаболиты, а с другой, интегрируясь в уже состоявшиеся микробные ценозы, активно колонизировать корни растений (Kurakov, 1997; Kulrich, 2009; Sheludko, 2010; Shaposhnikov, 2011), проявляя тем самым протекторные свойства. Наиболее перспективной группой микроорганизмов, отвечающих этим требованиям, являются бактерии рода *Lactobacillus*, в основе

высокой антагонистической активности которых лежит генетически детерминированная способность к продукции веществ с антибиотической активностью (Kvasnikov, 1975).

Весьма перспективным направлением в биотехнологических исследованиях является создание инокулятов, состоящих из бактериальных ассоциаций молочнокислых бактерий, обладающих синергическим эффектом и повышающих устойчивость растительно-бактериальной системы. Эффективность использования таких микробных препаратов в значительной степени определяется свойством применяемых бактерий колонизировать поверхность корня (Shaposhnikov, 2011). В связи с этим, целью настоящего исследования является сравнительный анализ способности микроорганизмов, входящих в состав микробиологического препарата «Эмбико[®]», к колонизации ризопланы и ризосферы растений.

Материал и методы исследований

Объектами исследования служили чистые культуры молочнокислых гомоферментативных стрептобактерий рода *Lactobacillus*: *L. plantarum* 20 и *L. casei* 6, молочнокислых гомоферментативных стрептококков *Lactococcus lactis* 4/6, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 75, а также микробиологический консорциум «Эмбико[®]», включающий указанные микроорганизмы. Все штаммы, входящие в состав микробиологического консорциума, депонированы и находятся на хранении в Депозитарии Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Способность бактерий колонизировать поверхность корней исследовали на растениях огурцов (*Cucumis sativus* L.) сортов Конкурент и Феникс плюс. Простерилизованные перекисью водорода семена огурцов проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной стерильной водопроводной водой, в темноте при +28 °C в течение двух суток. Пророщенные семена асептически помещали в биологические пробирки, заполненные 7–10 мл 0,6% голодного агара, в которые предварительно вносили суспензии микроорганизмов и микробиологический консорциум (в 1 мл инокулята – 10⁷ КОЕ). Контролем служили пробирки с голодным агаром и высаженными в них растениями огурца. Лактобактерии выращивали на среде MRS, молочнокислые стрептококки – на среде S (Kvasnikov, 1975), дрожжи – на среде Сабуро в течение двух суток. Пробирки с проростками размещали на свету при температуре +25 °C и освещении 1000 люкс. Способность бактерий колонизировать прикорневую зону растений оценивали по образованию микроколоний бактерий у поверхности корня на 3–14-е сутки выращивания проростков. На 15-е сутки у семян

отделяли корневую систему и исследовали наличие на ней бактерий в давленных микропрепаратах, окрашенных метиленовым синим. Содержание микроорганизмов каждого изучаемого штамма анализировали в корневом чехлике, зоне клеточных делений, зоне растяжения, зоне всасывания и в проводящей зоне. Эксперименты проводили в 20-кратной биологической повторности.

Результаты и их обсуждение

Использование метода выращивания проростков растений в полужидком агаре, инокулированном микроорганизмами, позволяет за относительно короткий период времени сравнить способность исследуемых бактерий колонизировать поверхность корня и размножаться в ризосфере. В контрольном варианте (семена высажены в голодный агар без внесения микроорганизмов) в толще агара роста колоний не наблюдалось, все зоны корня просматривались отчетливо (рис. 1).

В опытном варианте при внесении в питательную среду штамма *S. cerevisiae* на вторые сутки вокруг корней растений образовывалось видимое облако колоний (рис. 2 а–г). Штамм *S. cerevisiae* колонизировал толщу агара по всей длине корня, начиная с его базальной части: проводящую зону, зону всасывания (зону корневых волосков), зону растяжения. В апикальной части корня

колонизация проявлялась менее активно. На третьи сутки культивирования растений облако колоний вокруг всех зон корня имело диаметр 1–2 мм (рис. 2 а, б). С увеличением времени культивирования до 14 суток интенсивность колонизации прикорневой зоны микроорганизмами возрастала, колонии становились крупнее. В различных зонах корня диаметр облака колоний отличался по размеру (рис. 2 в, г). В зоне корневого чехлика диаметр облака колоний в среднем составил 1 мм, в зоне делящихся клеток – 2 мм, в зоне корневых волосков – 5 мм, в проводящей зоне – 3 мм. Из-за высокой плотности облака колоний микроорганизмов вокруг корней корневые волоски не просматривались. Микроскопирование давленных препаратов корня показало наличие клеток *S. cerevisiae* в разных его зонах (рис. 2 д). Отличий в колонизации корней огурцов у сортов Конкурент и Феникс плюс не обнаружено.

Результаты проведенных ранее исследований показали, что штаммы *L. casei* 6 и *L. plantarum* 20 оказывают стимулирующее действие на рост проростков огурцов (Rzevskaia, 2013), проявляя высокую антагонистическую активность в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов. При внесении в голодный агар как штамма *L. casei* 6, так и штамма *L. plantarum* 20 вокруг корней огурцов обоих испытанных сортов на третьи сутки появлялось облако мелких колоний (рис. 3, 4).

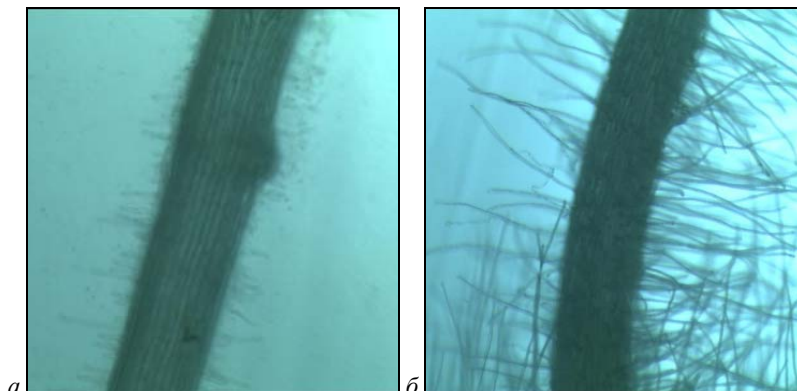


Рис. 1. Корень (зона корневых волосков) *Cucumis sativus* L. сорта Феникс плюс, выращенного в стерильных условиях (а – $\times 8$, б – $\times 98$)

Штамм *L. casei* 6 колонизировал поверхность корня по всей его длине (рис. 3 а). Высокая плотность облака бактериальных колоний вокруг корня не позволяла рассмотреть корневые волоски. На третьи сутки культивирования *L. casei* 6 сформировал облако колоний диаметром 2–3 мм, размеры которого оставались неизменными до 14-го дня исследований (рис. 3 б). Бактериальное облако, образуемое штаммом *L. plantarum* 20 на всей поверхности корня, имело размеры 1–2 мм (рис. 4 а), в зоне корневых волосков его диаметр достигал 4 мм. Плотность облака низкая, корневые волоски просматривались (рис. 4 б). Оба исследуемых штамма (и *L. casei* 6, и *L. plantarum* 20) колонизировали как корневой чехлик (рис. 3 в), так и все зоны корня (рис. 3 г, 4 в).

Исследуемый ранее штамм *L. lactis* 4/6 увеличивал энергию прорастания и всхожесть семян огурцов, проявляя высокую антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов и бактерий (Rzevskaia, 2013). Установлено, что данный штамм не образовывал колоний

в толще голодного агара и не колонизировал поверхность корня огурцов сортов Конкурент и Феникс плюс.

При инокуляции корней микробиологическим консорциумом «Эмбико[®]», включающим вышеописанные штаммы, происходила колонизация корня по всей его длине. На третьи сутки культивирования растений облако колоний вокруг корня имело диаметр 2–3 мм, постепенно сужаясь в апикальной зоне. При инокуляции чистой культурой изолированных штаммов облако состояло из одного вида колоний и на всем колонизируемом пространстве выглядело однородно. При инокуляции микробиологическим консорциумом облако колоний выглядело неоднородным, четко просматривались колонии разного размера и цвета (рис. 5 а, б). При микроскопировании препаратов корней, инокулированных микробиологическим консорциумом «Эмбико[®]», обнаружены как дрожжевые клетки, так и клетки молочнокислых бактерий (рис. 5 в–е).

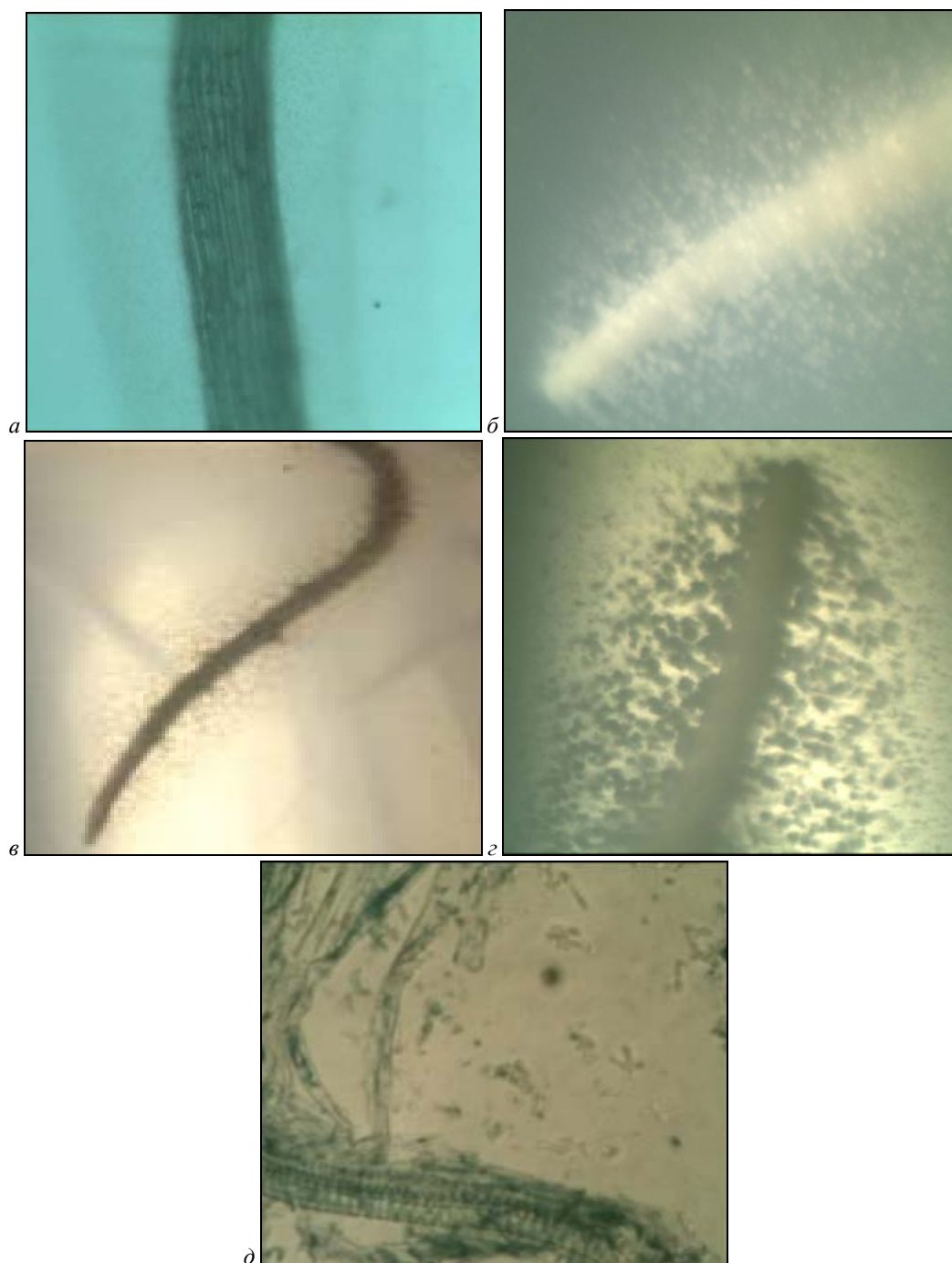


Рис. 2. Колонизация прикорневого пространства огурцов сорта Конкурент штаммом *S. cerevisiae* 75:
a – третьи сутки культивирования ($\times 8$), *б* – третьи сутки культивирования ($\times 98$), *в* – 10-е сутки культивирования ($\times 2$),
г – 10-е сутки культивирования ($\times 98$), *д* – давленный препарат на 14-е сутки культивирования ($\times 10$)

Исследуемые штаммы молочнокислых бактерий и дрожжей характеризуются выраженной способностью колонизировать поверхность корней огурцов. Колонии штаммов микроорганизмов образуют облако вокруг корней, различное по мутности и размерам. В толще агара, на расстоянии более 5 мм от поверхности корня, рост микроорганизмов не наблюдался, так как голодный агар является «бедной» питательной средой, а потому не подходит для развития молочнокислых бактерий, обладающих слабыми биосинтетическими способностями. У исследованных штаммов облако колоний отличалось по плотности: почти прозрачное у штамма *L. plantarum* и очень плотное у *S. cerevisiae*. Диаметр облака колоний (1–5 мм) на различных участках

корня также отличался. Наименьшая интенсивность роста микроорганизмов наблюдалась на верхушке корня, наибольшая – в зоне корневых волосков. Согласно А.В. Кугачков (1997), низкая заселенность микроорганизмами корневого кончика и зоны растяжения обусловлена тем, что удлинение корня происходит со скоростью более 1 000 мкм/ч, превышающей линейную скорость грибов и бактерий, и микроорганизмы не успевают колонизировать их с более старых участков. Замедление роста корня ведет к увеличению количества микроорганизмов в его апикальной зоне. Это предположение подтверждают и результаты наших исследований: на вторые сутки на кончике корня облако колоний имело меньший диаметр, чем на 14-е сутки.

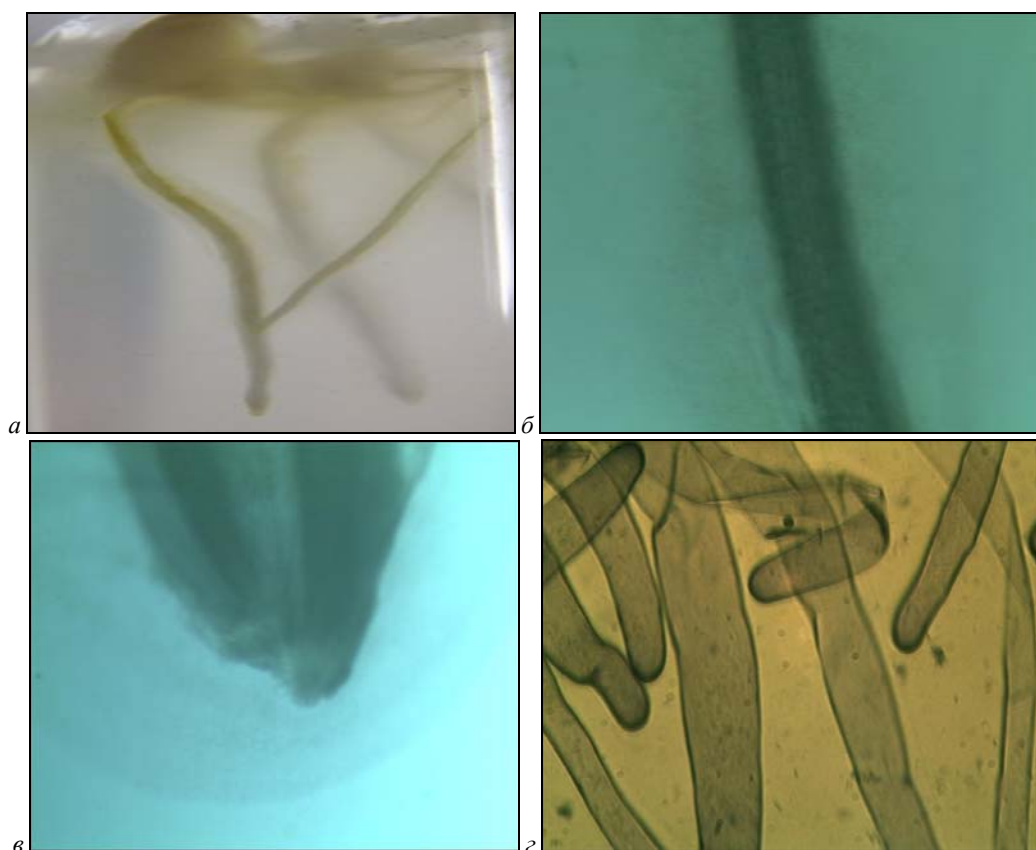


Рис. 3. Колонизация прикорневого пространства огурцов сорта Феникс плюс штаммом *L. casei* 6:
a – третьи сутки культивирования ($\times 2$), *б* – третьи сутки культивирования ($\times 8$), *в* – 14-е сутки культивирования ($\times 98$),
з – давленный препарат на 14-е сутки культивирования ($\times 20$)

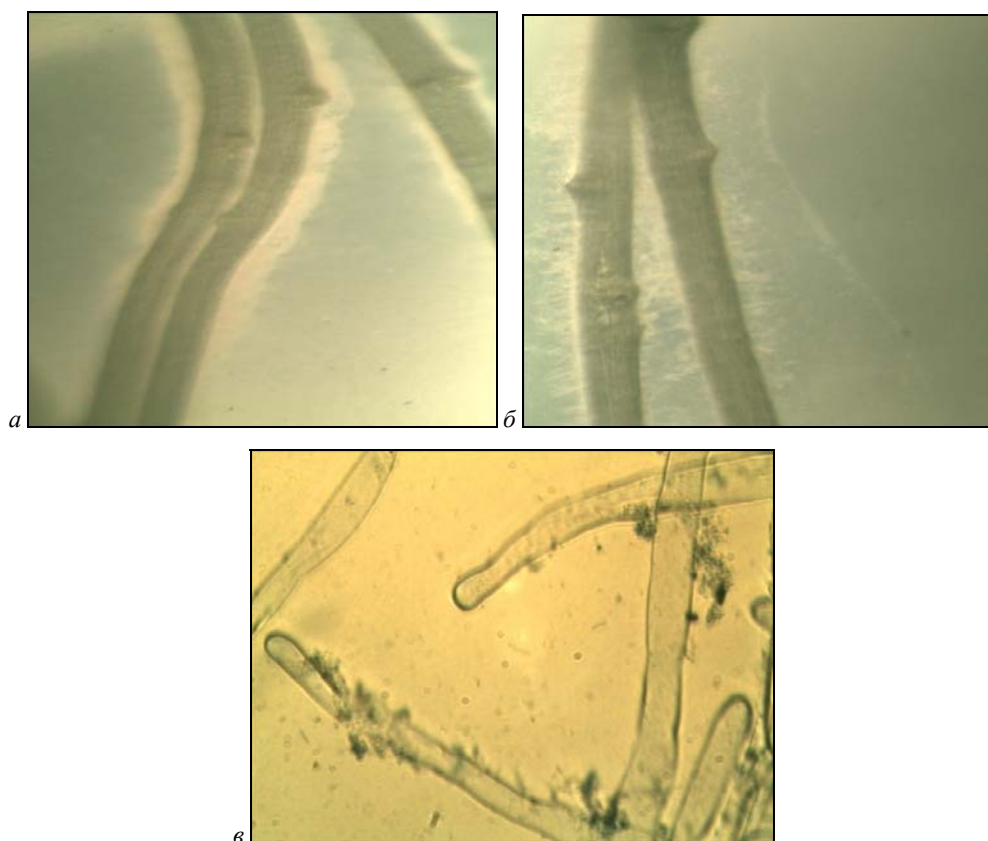


Рис. 4. Колонизация прикорневого пространства огурцов сорта Konkurent штаммом *L. plantarum* 20:
a, б – 14-е сутки культивирования ($\times 10$), *в* – давленный препарат на 14-е сутки культивирования ($\times 10$)

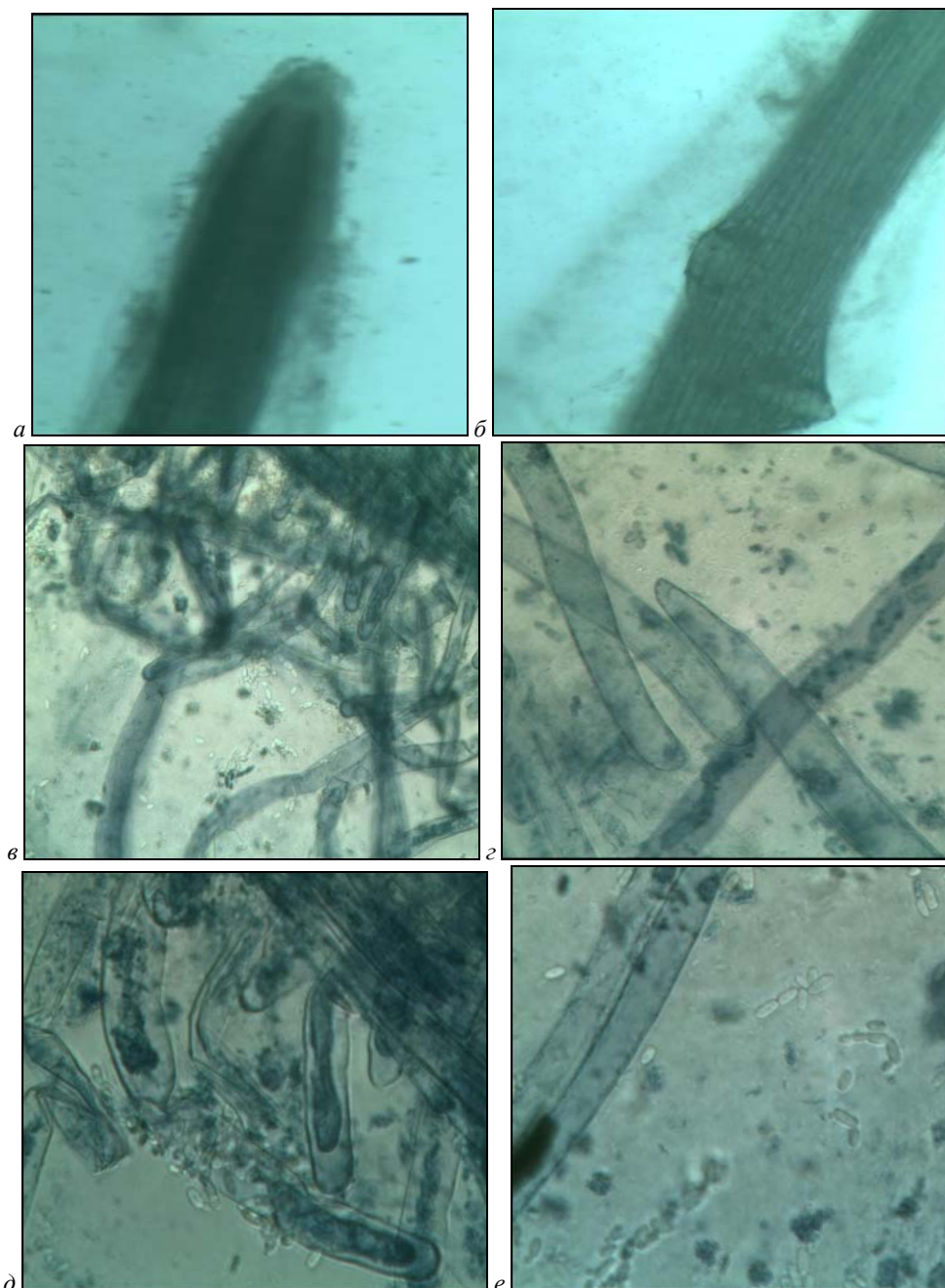


Рис. 5. Колонизация прикорневого пространства огурцов микробиологическим консорциумом «Эмбико®»:
 а – корневой чехлик ($\times 98$), б – средняя часть корня ($\times 98$), в – зона корневых волосков ($\times 10$),
 г – е – зона корневых волосков ($\times 20$)

Очевидно, корневые выделения растений являются для инокулированных бактерий основным источником углерода и энергии (Fellix, 2002; Vancura, 2002). Известно, что различные части корня отличаются по составу и интенсивности секреции экзометаболитов. Экссудаты корней растений состоят из сложной смеси органических веществ: анионов кислот, сахаров (Folman, 2001; Fellix, 2002; Vancura, 2002), аминокислот (Folman, 2001; Fellix, 2002), витаминов, пуринов, нуклеозидов, неорганических ионов, газообразных соединений, ферментов, фенольных соединений (Fellix, 2002). По-видимому, штаммовые отличия в трофических потребностях исследованных микроорганизмов, их способность потреблять те или иные компоненты корневого экссудата являются причиной их неравномерного распределения по поверх-

ности корней. Следовательно, при инокуляции бактерий в корневую зону растений именно корневые экзометаболиты и будут в значительной степени определять интеграцию микроорганизмов с растением и дальнейшее совместное их функционирование.

Выводы

Штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* 20 и *L. casei* 6, а также дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 75, входящие в состав микробиологического консорциума «Эмбико®», способны колонизировать прикорневое пространство огурцов сортов Конкурент и Феникс плюс. Штамм молочнокислого стрепто-

кокка *Lactococcus lactis* 4/6 такой характеристикой не обладает.

При инокуляции корней микроорганизмами, ассоциированными в препарате «Эмбико®», колонизация корней происходит более активно, что свидетельствует о формировании синергических взаимоотношений между лактобациллами и сахаромикетами при совместном их культивировании. Активная микробная колонизация всех зон корней огурцов связана с потреблением исследуемыми микроорганизмами корневых экзометаболитов в качестве источников энергии и углерода. В различных зонах корней интенсивность их колонизации неодинакова: наименьшая скорость образования колоний отмечена на верхушке корня, наибольшая – в зоне корневых волосков.

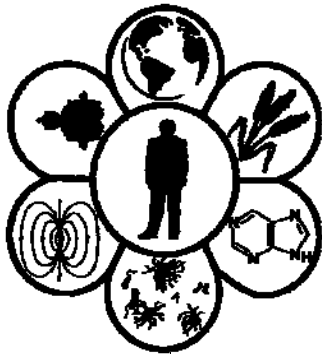
Сортовая специфика огурцов не оказывает существенного влияния на ход процесса колонизации корней.

Библиографические ссылки

- Boronin, A.M., 1998. Rizosphernii bakterii roda *Pseudomonas*, sposobstvuchie rostu i razvitiu rasteniy [Rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*, contributing to the growth and development of plants]. *Sorosovskiy Obrazovatelniy Jurnal* 10, 25–31 (in Russian).
- Costerton, J.W., 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbia* 15, 137–140.
- Davey, M.E., O'Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 64(4), 847–867.
- Dragovoz, I.V., Leonova, N.O., Avdeeva, L.V., 2012. Synthesis pozaklitinnykh fitogormoniv strains bakteriy genus *Bacillus*, vidilenimi s riznih ekologichnykh nish [Synthesis of outcell phytohormones strains bacteria genus *Bacillus*, isolated with different ecological niches]. *Mikrobnie biotekhnologii: Aktualne i maibutne – Radostim-2012: Materialy Mejdunarodnoy Nauchno-Prakticheskoy Konferencii*. Kiyv, 111–112 (in Ukrainian).
- Fellix, D.D., Donald, A.P., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245, 35–47.
- Folman, L.B., Postma, J., Van Veen, J.A., 2001. Ecophysiological characterization of rhizosphere bacterial communities at different root locations and plant developmental stages of cucumber grown on rockwool. *Microbiol. Ecol.* 42, 586–597.
- Galkin, N.B., Ivanica, V.A., 2012. Biofilm formation by bacteria of the genus *Lactobacillus* on plant roots. *Mikrobnie biotekhnologii: Aktualne i maibutne – Radostim-2012: Materialy Mejdunarodnoy Nauchno-Prakticheskoy Konferencii*. Kiyv, 82–83 (in Russian).
- Han, H.S., Supanjani, Lee, K.D., 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ.* 52(3), 130–136.
- Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Leonova-Erko, E.I., 2003. Kornevye videleniya tomato i ich vliyayie na rost i antifungalnuuktivnost shtamov *Pseudomonas* [Tomato root exudates and their impact on growth and antifungal activity of strains *Pseudomonas*]. *Mikrobiologia* 72(1), 48–53 (in Russian).
- Kravchenko, L.V., Makarova, N.M., Azarova, T.S., Provorov, N.A., Tichonovich, I.A., 2002. Vidilenie i fenotipicheskaya charakteristika rostostimuliruyuchikh bakteriy (PGPR) cochetauchich visokuu aktivnost kolonizacii kornei i ingibirovaniya fitopatogenich gribov [Isolation and phenotypic characteristics of growth-promoting bacteria (PGPR) that combine high activity of root colonization and inhibition of pathogenic fungi]. *Mikrobiologia* 71(4), 521–525 (in Russian).
- Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, N.M., Makarova, N.M., 2011. Vidovie osobennosti sostava kornevich videleniy rasteniy i ego izmenenie v rizosphere pod vliyaniem pochvennoy mikroflori [Specific features of root exudates of plants and its changes in rhizosphere under the influence soil microflora]. *Selsochozaystvennaya biologiya* 3, 71–75 (in Russian).
- Kulrich, I.K., Bulavenko, L.V., Drenko, D.I., Klimchuk, D.A., 2009. Kolonizacia rizosferi ogurcov fosfatmobilizuyuchimi bakteriyami roda *Bacillus* [Colonization of the rhizosphere of cucumber fosfatmobiliziruyuschimi bacteria of the genus *Bacillus*]. *Mikrobiologichniy Jurnal* 71(6), 14–21 (in Russian).
- Kundu, B.S., Gaur, A.C., 1984. Rice response to inoculation with *N*₂-fixing and *P*-solubilizing microorganisms. *Plant Soil* 79, 227–234.
- Kurakov, A.V., Kostina, N.V., 1997. Mikrobnaya kolonizacia poverchnosti korney na ranich stadiyakh razvitiya rasteniy [Microbial colonization of the root surface in the early stages of plant development]. *Mikrobiologia* 66(3), 394–401 (in Russian).
- Kvasnikov, E.I., Nesterenko, O.A., 1975. Molochnokislilii bakterii i puti ich ispolzovania [Lactic acid bacteria and ways to use them]. *Nauka, Moscow* (in Russian).
- Limanska, N., Basiul, O., Choiset, Y., Zlatogurska, M., Rabe-sona, H., Maslovska, N., Chobert J.-M., Ivanytsia, V., Haertle, T., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on initial stages of growth of tomatoes. *Mikrobnie Biotekhnologii: Aktualne i Maibutne – Radostim-2012: Materialy Mejdunarodnoy Nauchno-Prakticheskoy Konferencii*. Kiyv, 176–177.
- Lobakova, E.S., 2005. Associativnii mikroorganizmi rastitelnykh simbiosov [Associative microorganisms plant symbioses]. *Diss. ... doktor biol. nauk. Moscow* (in Russian).
- Loktushov, E.V., 2011. Ustoychivost kolonizirovaniy rasteniy k ksenobiotikam [Resilience colonized plants to xenobiotics]. III Obcherossiyskaya Studencheskaya Elektronnaya Nauchnaya Konferenciya «Studencheskiy forum».
- Mantelin, S., Touraine, B., 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: Impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55, 27–34.
- Maudinas, B., Chemardin, M., Yovanovich, E., 1981. Gnotobiotic cultures of rice plants up to ear stage in the absence of combined nitrogen source but in the presence of free living nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* and *Rhodopseudomonas capsulate*. *Plant Soil* 60, 85–97.
- Morgun, V.V., Kotz, Y.Y., Kirichenko, E.V., 2009. Roststimuliruyuchie rizobakterii i ich prakticheskoe primenenie [Growth-promoting rhizobacteria and their practical application]. *Fiziologia i Biochimia Kulturnich Rasteniy* 41(3), 187–207 (in Russian).
- Pigoleva, S.V., Zacharchenko, N.S., Yarmoshin, A.A., 2011. Polozitelnoe vliyanie kolonizacii sacharnoi svekli metilotropnymi bakteriyami na sistemy antioksidantnoy zashchity [Positive impact of colonization of sugar beet methylotrophic bacteria on the antioxidant defense system]. *Izvestiya Tulskego Gosudarstvennogo Universiteta* 3, 210–219 (in Russian).
- Rai, S.N., Gaur, A.C., 1988. Characterization of *Azotobacter spp.* and effect of *Azotobacter* and *Azospirillum* as inoculant on the yield and *N*-uptake of wheat crop. *Plant Soil* 109, 131–134.
- Rzevskaia, V.S., 2013. Primenenie molochnokislilich bakteriy dlia stimulacii prorstania semyan ogurca [Application of lactic acid bacteria to stimulate seed germination of cucumber]. *Vserossiyskaya Nauchnaya Konferenciya «Inovacionnie Napravleniya Sovremennoy Fiziologii Rasteniy»*. Moscow, 84 (in Russian).

- Shaposhnikov, A.I., Belimov, A.A., Kravchenko, L.V., Vivan-ko, D.M., 2011. Vzaimodeystvie rizosfernich bakteriy s rasteniyami: Mechanizmi obrazovaniya i faktori effektivnosti asociativnich simbiosov [Interaction of rhizosphere bacteria with plants: Mechanisms of formation and factors of associative symbioses efficiency]. *Sel'skookhozyaystvennaya Biologiya* 3, 16–22 (in Russian).
- Sheludko, A.V., Shirokov, A.A., Sokolova, M.K., 2010. Kolonizatsiya korney pshenicy bakteriyami *Azospirillum brasilense* s razlichnoy podvijnostyu [Colonization of wheat roots by bacteria *Azospirillum brasilense* with different mobility]. *Microbiologiya* 79(5), 696–704 (in Russian).
- Vancura, V., Hanzlikova, A., 1972. Root exudates of plants. IV. Differences in chemical composition of seed and seedlings exudates. *Plant Soil* 36, 271–282.
- Zacharchenko, N.S., Pigoleva, S.V., Kochetkov, V.V., Chepurnov, M.A., 2012. Vliyanie asociativnich pseudomonad i metilobakteriy na rost i ustoychivost rasteniy k fitopatogenam i ksenobiotikam [Impact associated pseudomonads and methyllobacteria on growth and resistance of plants to pathogens and xenobiotics]. *Phiziologiya Rasteniy* 59(1), 89–98 (in Russian).
- Zakry, F.A.A., Halimi, M.S., Khairuddin, A.R., Osumanu, H.A., 2012. Variable responses on early development of shallot (*Allium ascalonicum*) and mustard (*Brassica juncea*) plants to *Bacillus cereus* inoculation. *Malaysian J. Microbiol.* 8 (1), 47–50.

Надійшла до редколегії 05.12.2013



УДК 576.895.771

Стаціональний розподіл самок кровосисних комарів у Солом'янському районі Києва

Н.П. Кілочицька

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

На території Солом'янського району Києва зареєстровано 24 види кровосисних комарів із 6 родів. Понад 60% самок комарів зосереджуються на днівках у зонах рекреації та у житлових масивах поза приміщеннями. Значна кількість комарів (40%) виявлена на днівках у господарських приміщеннях у безпосередній близькості до житла людини – у господарських приміщеннях (сараях різного призначення), підвалах і льохах. Левова частка серед них припадає на представників роду *Anopheles* (25%), на другому місці – *Culex pipiens* (7,6%). Ці поліциклічні види – ендofільні синантропи. Зокрема, *A. maculipennis* та *A. messeae* в міських умовах є факультативно ендofільними синантропами, а *C. p. molestus* – облігатно синантропним ендofільним видом, що посилює їх роль і значення в епідеміології трансмісивних хвороб. На днівках у господарських приміщеннях зареєстровано значну кількість моноциклічних комарів роду *Ochlerotatus* (*O. cantans*, *O. sticticus* і *O. cataphylla*) та поліциклічного *Aedes v. vexans*, що раніше не було характерним для представників даних видів. Установлено прямий кореляційний зв'язок між кількістю кровосисних комарів у господарських приміщеннях і температурою навколишнього середовища.

Ключові слова: кровосисні комарі; Київ; днівки комарів; епідеміологічна ситуація

Extension of habitat of female blood-sucking mosquitoes in Solomenskiy district, Kiev

N.P. Kilochytska

Taras Shevchenko Kiev National University, Kiev, Ukraine

From the epidemiological viewpoint the greatest threat to human health is represented by female mosquitoes in the hematophagous stage. Contact with these bloodsucking insects occurs most frequently in their places of diurnal concentration. The main daytime habitats of mosquitoes in urban areas are recreational areas, especially near water – forests, parks, botanical gardens, cemeteries, green zones in residential areas, residential buildings and buildings with livestock, basements and cellars. In the context of global warming and extreme high summer temperatures a tendency has been observed for mosquitoes to make increasing use of residential premises and outbuildings as a daytime habitat. In the Solomianskiy district of Kiev a six-year monitoring programme of mosquitoes' diurnal habitat distribution was conducted. It showed that the majority of female mosquitoes which attacked humans (60%) were concentrated in areas of recreation and outdoors in residential areas. Simultaneously a significant number of mosquitoes was found to use as their daytime habitat places where they were in close proximity to humans – in domestic outbuildings (sheds under various uses), basements and cellars. The lion's share of these mosquitoes was represented by *Anopheles maculipennis* (25%) and *Culex pipiens* (7,6%). At the same time a significant number of representatives of the genera *Ochlerotatus* (*O. cantans*, *O. sticticus*, *O. cataphylla*) and *Aedes* (*Ae. v. vexans*) were also recorded using residential premises as their daytime habitat on a scale which had not been previously observed for these species of mosquito. It is possible that female mosquitoes fly into livestock buildings at twilight because they are attracted by electric light and ammonia vapors. However, these factors are almost absent in basements and cellars. It remains to be noted that mosquitoes use basements and cellars as a daytime habitat at periods of high-temperatures and low humidity in the city. To test this assumption the distribution of mosquitoes was analysed during the warm season in 2010 in Solomyanskiy district with measurement of temperature at the locations of collection. It turned out that the air temperature in the sheds was 2–4 °C lower than outside in the shade, in the basements lower by 4–11 °C, and in the cellars lower by 4–12 °C. Comparison of the temperature in the daytime habitats and number of mosquitoes found there showed a direct relation between the outdoor temperature and the number of mosquitoes in the daytime habitat on the premises. The data indicate that there is a tendency for the number of synanthropic

blood-sucking mosquito species to increase owing to the occupation of domestic premises as a daytime habitat by those species of mosquitoes for which this phenomenon was not typical earlier. If global warming and the current trend to increase in summer temperatures persist, this can cause a deterioration of the epidemiological situation in the megalopolis.

Keywords: mosquitoes; Kiev; day habitats; epidemiological situation

Вступ

Кровосисні комарі як переносники збудників хвороб людини та тварин мають значення в епідеміології та епізоотології низки трансмісивних хвороб. У зв'язку з розширенням міжнародних зв'язків і зростанням міграційних потоків, погіршенням соціальних і побутових умов життя окремих верств населення, обмеженням оперативної взаємодії органів охорони здоров'я, зниженням обсягів і якості профілактичних заходів за більшістю інфекційних захворювань, має місце погіршення епідеміологічної ситуації в умовах урбанізованого ландшафту.

Відносно невелике потепління клімату протягом останніх тридцяти років викликало численні зміни в біології патогенів та спричинюваних ними хвороб (Markovich, 2003). Воно зумовило просування ряду теплолюбних видів комарів у північні райони Європи (Minář et al., 2004). Як наслідок, на Європейському континенті спостерігається не лише поновлення таких трансмісивних захворювань як малярія, кліщовий енцефаліт, середземноморська плямиста лихоманка та лейшманіоз (Grat, 2005), а і поява нових: хвороба «блакитного язика», лихоманки Долини Рифт і Західного Нілу та лептоспіроз (Eritja et al., 2004; Dufour et al., 2008). Кліматичні зміни не обов'язково мають бути глобальними. Вони можуть бути особливо відчутними на регіональному рівні, враховуючи техногенні фактори та урбанізацію, що посилюють ефекти локальних змін (потепління) клімату за принципом «подвійного теплового удару» (Beer and Jelliner, 2004). У ряді регіонів Російської Федерації зареєстровано природні осередки японського енцефаліту, вірусів серогрупи каліфорнійського енцефаліту, лихоманок Західного Нілу, Синдбіс, а також низку інфекцій, антигени яких знайдені при обстеженні кровосисних комарів: віруси «зайця-біляка», «Астра», Зайсан, Павассан та вірус 913-64 (Fedorova et al., 2004; Chumakova et al., 2006; Degtjareva, 2007; Lopatina et al., 2007; Fedorova, 2007; Junicheva et al., 2008).

Подібні загрози вже зареєстровані у південних регіонах України. Зокрема, у північно-західному Приазов'ї у комарів виявлено антигени вірусів Західного Нілу (у *Aedes vexans*, *Culex pipiens*), Тягіня (у *Ae. vexans*) та Бетаї (у *Ochlerotatus cantans*) (Vogonova and Gorban, 2008; Vogonova et al., 2009). У м. Одеса серед обстежених 13 видів кровосисних комарів у *C. p. pipiens f. molestus* встановлено інфікованість вірусом лихоманки Західного Нілу (Rusev et al., 2011a, 2011b). Виявлено низку характеристик ВІЛ деяких двокрилих-кровососів і людського організму, що не дозволяють абсолютно виключити механічну трансмісію ВІЛ-інфекції. Теоретично обґрунтовано, що комарі *Anopheles* і *Culex* можуть виступати механічними переносниками ВІЛ-інфекції, причому в населених пунктах міського типу більш значущими є представники роду *Culex* через можливість цілодобової активності імаго (Golubtsov, 2007).

З епідеміологічної точки зору найбільшу небезпеку для здоров'я людини являють самки комарів на етапі гематофагії. Найчастіше контакти самок кровосисних комарів із населенням відбуваються в місцях концентрації комарів на днівках, чи у безпосередній близькості від них (Gorban, 2004). Імаго переважної більшості видів комарів тримаються поблизу місць виплоду (50–500 м), у місцях із підвищеною вологістю повітря, найчастіше використовуючи для днівок зарості високорослих трав і чагарники. У цих стаціях принципово можливе завершення фізіологічної підготовки функції розмноження. За наявності супутнього вітру комарі здатні, розлітаючись на значні відстані (3,0 км і більше (Gorban, 2004)), нападати для живлення кров'ю далеко від місць виплоду. Насторожує зростання серед синантропних видів комарів кількості та чисельності ендofільних видів. В Одесі серед виявлених у місті 13 видів кровосисних комарів три (*Culex pipiens*, *Culiseta annulata* та *Uranotaenia unguiculata*) постійно реєстрували в господарських приміщеннях (Rusev et al., 2011a, 2011b).

В умовах міста контакт із кровососами найчастіше відбувається в місцях їх концентрації на днівках. Основними місцями днювань комарів у міських умовах є зони рекреації (особливо поблизу водойм): ліси, парки, ботанічні сади, кладовища, зелені зони в житлових масивах, житлові та тваринницькі приміщення, підвали та льохи. В умовах глобального потепління та екстремально високих літніх температур спостерігається тенденція до збільшення частоти використання комарами як днівок житлових і господарських будівель. Картина топічного розподілу самок антропофільних видів комарів на днівках в умовах мегаполісу може бути важливою складовою загальної характеристики епідемічної ситуації міст.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом послужили збори імаго самок кровосисних комарів на території Солом'янського району Києва за 2005–2010 роки. Матеріал визначали за A.V. Gucevich et al. (1970), N.P. Kilochytska (2008) та V.P. Sheremet (1998). Комарів відловлювали методом «збирання на собі», у приміщеннях – комароловкою конструкції О.П. Кришталя. Кореляційний аналіз проведено з використанням програми Microsoft Excel 2010.

Результати та їх обговорення

Протягом 6 років на території Солом'янського району Києва нами зареєстровано 24 види кровосисних комарів 6 родів: *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Ochlerotatus* та *Aedes* (табл. 1). Основними місцями днівок комарів у Солом'янському районі є зони рекреації (особливо поблизу водойм): ліси, парки, а також кладовища та зелені зони у житлових масивах.

Стаціональний розподіл самок комарів на днівках (Солом'янський р-н., 2005–2010 рр.)

Види комарів	Кількість відловлених особин комарів				усього
	поза приміщеннями	всередині приміщень			
		сараї	підвали	льохи	
1. <i>Anopheles maculipennis</i> Mg.	290	402	110	17	819
2. <i>A. messeae</i> (Fall.)	303	440	115	14	872
3. <i>A. claviger</i> Mg.	30	41	2	–	73
4. <i>Culiseta annulata</i> Schr.	2	9	–	–	11
5. <i>C. glaphyoptera</i> Schin.	3	–	–	–	3
6. <i>C. alaskaensis</i> Ludl.	121	–	–	–	121
7. <i>Coquillettidia richiardii</i> (Ficalbi)	10	–	–	1	11
8. <i>Ochlerotatus caspius</i> Pall.*	9	–	–	–	9
9. <i>O. cantans</i> (Mg.)	339	87	17	6	449
10. <i>O. behningi</i> (Mart.)	56	5	4	5	70
11. <i>O. excrucians</i> (Walk.)	73	21	2	1	97
12. <i>O. flavescens</i> (Müll.)	11	–	–	–	11
13. <i>O. cyprius</i> (Ludl.)	9	–	–	1	10
14. <i>O. communis</i> (Deg.)	4	4	5	1	14
15. <i>O. punctor</i> (Kirby)	3	3	2	–	8
16. <i>O. sticticus</i> (Mg.)	175	18	2	1	196
17. <i>O. diantaeus</i> (H.D.K.)	49	–	–	–	49
18. <i>O. intrudens</i> (Dyar)	1	4	–	–	5
19. <i>O. detritus</i> (Hal.)	3	–	–	–	3
20. <i>O. cataphylla</i> (Dyar)	59	32	10	4	105
21. <i>Aedes v. vexans</i> Mg.	434	73	6	5	518
22. <i>Ae. geniculatus</i> Ol.	170	–	–	–	170
23. <i>Ae. c. cinereus</i> Mg.	459	8	1	–	468
24. <i>Culex pipiens</i> L. * (complex)	132	111	143	91	477
Усього	2 745 (60,0%)	1 258 (27,5%)	419 (9,3%)	147 (3,2%)	4 569 (100,0%)

Таблиця 2

Температура повітря (*min-max, t*) в місцях днівок комарів (Солом'янський р-н., 2010 рік)

Місяць	На вулиці, °С	У приміщеннях, °С		
		сараї	підвали	льохи
Квітень	12–18 (15,2)	9–15 (12,7)	8–15 (11,3)	8–10 (8,3)
Травень	20–23 (21,5)	17–20 (18,4)	10–15 (12,8)	11–14 (12,2)
Червень	23–30 (26,7)	20–27 (23,2)	12–22 (15,7)	11–17 (14,3)
Липень	26–33 (29,6)	23–30 (27,0)	13–27 (18,3)	18–20 (19,1)
Серпень	23–36 (24,8)	20–23 (21,7)	15–20 (17,3)	15–20 (17,6)
Вересень	20–23 (21,5)	17–20 (19,8)	15–16 (15,5)	14–15 (14,5)

Таблиця 3

Стаціональний розподіл комарів на днівках (Солом'янський р-н., 2010 рік)

Місяць	Поза приміщеннями, екз.	Всередині приміщень, екз.			Всього, екз.
		сараї	підвали	льохи	
Квітень	0	23	22	20	65
Травень	0	0	23	13	36
Червень	116	95	69	39	319
Липень	105	113	38	51	307
Серпень	41	44	31	25	141
Вересень	3	26	17	3	49
Усього	265 (28,9%)	301 (32,8%)	200 (21,8%)	151 (16,5%)	917 (100,0%)

Привертає увагу той факт, що значна кількість комарів виявлена на днівках у безпосередній близькості до житла людини: у господарських приміщеннях (сараях різного призначення), підвалах та льохах (див. табл. 1). Левова частка серед них припадає на представників роду *Anopheles* (25,0%), на другому місці – *C. pipiens* (7,6%).

Ці поліциклічні види є ендоефільними синантропами. *A. maculipennis* та *A. messeae* в міських умовах є факультативно ендоефільними синантропами, а *C. p. molestus* – облігатно синантропним ендоефільним видом (Kilochytska, 2012), що й посилює їх значення в епідеміології трансмісивних хвороб.

На днівках у господарських приміщеннях зареєстровано значну кількість моноциклічних комарів роду *Ochlerotatus* (*O. cantans*, *O. sticticus* і *O. cataphylla*) та поліциклічного *Ae. v. vexans*, чого раніше не помічали в таких масштабах за цими комарами.

Можливо, самки комарів залітають у сараї, приваблені запахом тварин або електричним світлом у темну пору доби. Однак ці атрактивні фактори відсутні в підвалах житлових будівель і льохах. Залишається припустити, що господарські приміщення вимушено використовуються комарами як днівки у спекотні дні через високу температуру та відносно низьку вологість повітря на вулиці. Щоб перевірити цю версію, ми окремо проаналізували стаціональний розподіл комарів у тому ж Солом'янському районі протягом вегетаційного періоду 2010 року, фіксуючи температуру повітря в різних стаціях. Виявилося, що температура повітря в сараях на 2–4, у підвалах на 4–11, а в льохах – на 4–12 °С нижча, ніж на відкритому повітрі в тіні у той же період досліджень (табл. 2).

Кореляційний аналіз за коефіцієнтом Пірсона підтвердив наявність прямого позитивного взаємозв'язку між чисельністю комарів на днівках у господарських приміщеннях та температурою зовнішнього середовища.

Висновки

На території Солом'янського району Києва зареєстровано 24 види кровосисних комарів 6 родів. Основними місцями днівок комарів у міських умовах є зони рекреації (особливо поблизу водойм): ліси, парки, ботанічні сади, а також кладовища, зелені зони в житлових масивах. Значну кількість комарів (40%) виявлено на днівках у безпосередній близькості до житла людини – у господарських приміщеннях різного призначення (сараях, підвалах, льохах). Домінують представники роду *Anopheles* (25,0%), на другому місці – *C. pipiens* (7,6%). На днівках у господарських приміщеннях зареєстровано значну кількість моноциклічних комарів роду *Ochlerotatus* (*O. cantans*, *O. sticticus* і *O. cataphylla*) та поліциклічного *Ae. v. vexans*, що раніше не було характерним для представників даних видів. Установлено прямий позитивний взаємозв'язок між чисельністю комарів на днівках у господарських приміщеннях і температурою зовнішнього середовища. Можна припустити, що в умовах урбанізованого ландшафту розширення списку ендofільних видів кровосисних комарів може здійснюватись завдяки тенденції до використання у спекотні періоди року як днівок господарських приміщень людини тими видами комарів, для яких раніше це явище було не характерним. У разі подальшого зростання літніх температур це може бути одним із факторів загострення епідемічної та епізоотичної ситуацій в умовах мегаполісу.

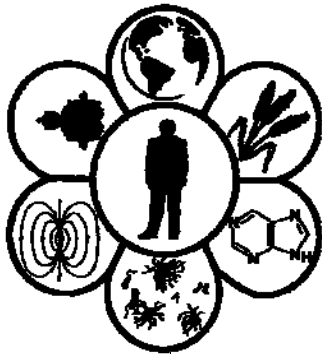
Бібліографічні посилання

Beer, S.A., Jelpiner, L.I., 2004. Parazitarnye sistemy i zaboлеваemost' parazitami v svyazi s izmenenijami klimata [Parasitic system and incidence of parasitic in connection with

- climate change]. Trudy Inst. Parazit. RAN 44, 451–482 (in Russian).
- Chumakova, Y.V., Vasylenko, N.F., Bejer, A.P., Mar'eva, T.V., Afanas'eva, E.E., Ljapyn, Y.E., 2006. Ornitofil'nye komary (Diptera, Culicidae) Stavropol'skogo kraja [Ornithophilous mosquitoes (Diptera, Culicidae) of the Stavropol Territory]. Problemy Entomologii Severo-Kavkazskogo Regiona. Stavropol', 33–35 (in Russian).
- Degtjareva, L.V., 2007. Rol' krovososushhih komarov v jepidemiologii transmissivnyh boleznej cheloveka i zhivotnyh v Rossijskoj Federacii: Obzor literatury [The role of mosquitoes in the epidemiology of humans and animals vector-borne diseases in the Russian Federation: Review]. Stavropol. N.-I. Protivochum. In-t, Stavropol', 103, 3–43 (in Russian).
- Dufour, B., Moutou, F., Hattenberger, A.M., Rodhain, F., 2008. Changements globaux: Impact gestion, approche du risque et mesures de santé – le cas de l'Europe. Off. Int. Epizoot. Rev. Sci. et Techn 27(2), 529–550.
- Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marques, E., Roiz, D., Ruiz, S., 2004. Worldwide invasion of vector mosquitoes: Present European distribution and challenges for Spain. Biol. Invasions, 7(1), 87–97.
- Golubtsov, S.I., 2007. Territorija riska (vozmozhnyj aspekt razvitiya jepidemii VICH/SPID v Ukraine) [The territory of risk (possible aspect of the AIDS in Ukraine)]. Environmental Epidemiology 1(2), 257–271 (in Russian).
- Gorban', V.V., 2004. Ekologo-biologichni ta konsortyvni osoblyvosti isnuvannja *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae) v umovah zaplavnyh dibrov stepovogo Prydniprov'ja [Ecological and biological peculiarities and consortial existence of *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae) in conditions of flood-plain oak forests Dnieper steppe]. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. Dnipropetrovsk (in Ukrainian).
- Grate, N.G., 2005. Voznikajushhie i vozobnovljajushhiesja transmissivnye zabolevanija v Evrope [Emerging and recurring of vector-borne disease in Europe]. Uspehi Sovremennoj Biologii 125(1), 3–13 (in Russian).
- Gucevich, A.V., Monchadskij, F.S., Shtakel'berg, A.A., 1970. Komary (Culicidae). Fauna SSSR. Nasekomye dvukrylye [Mosquitos (Culicidae). Fauna of the USSR. Insects Diptera]. Nauka, Leningrad, 3(4) (in Russian).
- Junicheva, J.V., Rjabova, T.E., Markovich, N.J., Bezzhonova, O.V., Ganushkina, L.A., Semenov, V.B., Tarhov, G.A., Vasilenko, L.E., Guzeeva, T.M., Shevereva, T.V., 2008. Pervye dannye o nalichii razvivajushhejsja populjacii komarov *Aedes aegypti* v rajone Bol'shogo Sochi i v otdel'nyh gorodah Abkhazii [The first evidence of a growing population of mosquitoes *Aedes aegypti* in the area of Greater Sochi and Abkhazia individual cities]. Medicinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni 3, 40–43 (in Russian).
- Kilochytska, N.P., 2008. Korotkyj vyznachnyk krovosysnyh komariv fauny Ukrai'ny [Short determinant of mosquito fauna of Ukraine]. Geoprynt, Kyiv (in Ukrainian).
- Kilochytska, N.P., 2012. Synantropy of bloodsucking mosquitoes (Diptera, Culicidae) under conditions of Kyiv. Vestnik Zoologii 46, 461–466.
- Lopatina, J.V., Bezzhonova, O.V., Fedorova, M.V., Bulgakova, T.V., Platonov, A.E., 2007. Kompleks krovososushhih komarov (Diptera, Culicidae) v ochage lihoradki Zapadnogo Nila v Volgogradskoj oblasti. III. Vidy, pitajushhiesja na ptice i cheloveke, i ritmy ih nochnoj aktivnosti [Mosquitoes complex (Diptera, Culicidae) in the outbreak of West Nile fever in the Volgograd region. III. Species feeding on birds and humans, and their nocturnal activity rhythms]. Medicinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni 4, 37–43 (in Russian).
- Markovich, N.J., 2003. Reakcija bioty na poteplenie klimata v Evrope [Biota reaction to climate warming in Europe]. Medicinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni 4, 23–26 (in Russian).

- Minář, J., Gelbič, I., Olejníček, J., 2004. Influence of climatic changes on biodiversity of mosquitoes [16 Seminar of Dipterists (1 Central European Dipterological Conference) Praha, 4-6 Sept. 2002]. *Fac. Sci. Natur. Univ. Masaric. Brun.* 11, 215–223.
- Rusev, I.T., Zakusilo, V.M., Vinnik, V.D., 2011a. Dynamika chysel'nosti ta dobovoi' aktyvnosti krovosysnyh komariv u pidvalah ta pid'i'zdah bagatopoverhovyh budynkiv m. Odesa [Dynamics of number and daily activity of mosquitoes in high-rise buildings of Odessa city]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 19(2), 114–119 (in Ukrainian).
- Rusev, I.T., Zakusilo, V.M., Vinnik, V.D., 2011b. Krovososushhie komary urbanizirovannyh biocenozov i ih rol' v cirkuljacii virusov lihoradki Zapadnogo Nila [Complex of fauna of mosquitoes in urban biocenosis and they role in circulation of West Nile virus]. *Uchenye Zapiski Tavricheskogo Nacional'nogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Biologija, Himija* 24(63), 240–248 (in Russian).
- Sheremet, V.P., 1998. Krovosysni komari Ukrai'ny [Bloodsucking mosquitoes of Ukraine]. *Kyiv University, Kyiv* (in Ukrainian).
- Voronova, N.V., Gorban', V.V., 2008. Epidemiologichne znachennja krovosysnyh komariv ta klishhiv Zaporiz'koi' oblasti [Epidemiological significance of mosquito and ticks of Zaporozhye's region]. *Visnik Zaporiz'kogo Nacional'nogo Universitetu. Biologichni Nauki* 2, 24–28 (in Ukrainian).
- Voronova, N.V., Gorban', V.V., Bilec'ka, G.V., Drul', O.S., Luginin, M.S., 2009. Epidemiologichne znachennja krovosysnyh chlenystonogyh rekreacijnyh zon pivnichno-zahidnogo Pryazov'ja [Epidemiological significance of blood-sucking arthropods of northwest Azov recreational area]. *Visnik Zaporiz'kogo Nacional'nogo Universitetu. Biologichni Nauki* 2, 126–131 (in Ukrainian).
- Fedorova, M.V., 2007. Komary (Diptera, Culicidae) – perenoschiki virusa lihoradki Zapadnogo Nila na territorii Rossii [Mosquitoes (Diptera, Culicidae) – carriers of West Nile fever virus in the territory of Russia]. *MGU imeni M.V. Lomonosova, RJeT INFO* 1, 11–15 (in Russian).
- Fedorova, M.V., Lopatyna, J.V., Hutoreckaja, N.V., Lazorenko, V.V., Platonov, A.E., 2004. Izuchenie fauny krovososushhih komarov (Diptera, Culicidae) g. Volgograda v svjazi so vspyshkoj lihoradki Zapadnogo Nila v Volgogradskoj oblasti v 1999 g. [The study of mosquito fauna (Diptera, Culicidae) in Volgograd city in light of the outbreak of West Nile fever in Volgograd region, 1999]. *Parazitologija* 38(3), 209–218 (in Russian).

Надійшла до редколегії 23.09.2013



УДК 574.632

Мікробоценози стічних вод Львова на різних етапах очищення

К.В. Шоляк, С.О. Гнатуш, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

Досліджено мікробоценози стічних вод міста Львів на різних етапах очищення. Показано якісний та кількісний склад мікроорганізмів первинного та вторинного відстійників, аеротенка та активного мулу. Охарактеризовано закономірності поширення мікроорганізмів різних фізіологічних груп на різних етапах очищення. Встановлено співвідношення мікроорганізмів різних фізіологічних груп на певному етапі очищення стічних вод. У первинному відстійнику за чисельністю переважали нітрифікувальні ($7,1 \times 10^6$ КУО), азотфіксувальні бактерії ($9,0 \times 10^6$ КУО), а також гриби ($3,4 \times 10^6$ КУО). В аеротенку чисельність мікроорганізмів зростала, однак їх видовий та відсотковий склад не змінювався. В активному мулі виявлено зростання відсотка мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми нітрогену. Визначено відсотковий вміст хромрезистентних штамів серед представників різних фізіологічних груп. Ці мікроорганізми можуть бути перспективними для розробки біотехнологічних методів очищення стічних вод від сполук хрому, які є високотоксичними для живих організмів.

Ключові слова: стічні води; фізіологічні групи бактерій; хромрезистентні штами

Microbiocenoses of Lviv sewage at various stages of purification

K.V. Sholiak, S.O. Hnatush, T.B. Peretyatko, S.P. Gudz

Ivan Franko Lviv National University, Lviv, Ukraine

The aim of this work was to investigate some physiological groups of microorganisms which are components of wastewater microbiocenoses. Microorganisms were grown in Petri dishes containing 20–30 ml agar selective medium and in 25 ml tubes at a temperature +30 °C. The selective media were: wort agar for microscopic fungi and yeasts, Hutchinson medium for the cellulose-destroying microorganisms, starch-ammonium medium for microorganisms that can utilize mineral nitrogen forms, Postgate B medium for sulfate-reducing bacteria, Vinogradsky medium for nitrifying bacteria, Ashby medium for the nitrogen-fixing bacteria, Chapek medium for the actinomycetes. 1 mM Cr (VI) (104 mg/l) in the form of $K_2Cr_2O_7$ was added to the medium. The number of colonies was determined by the Koch method. We studied wastewater microbiocenoses of Lviv city at various stages of purification. We showed that the quantitative and qualitative composition of microorganisms differed significantly in primary and secondary clarifiers, the aerotank and sludge at different stages of sewage treatment. In the initial stages of purification, in the primary sump, bacteria that reached the treatment plant with sewage were found. Nitrifying bacteria (7.1×10^6 colony forming units (CFU/ml), nitrogen-fixing bacteria (9.0×10^6 CFU/ml), and fungi (3.4×10^6 CFU/ml) dominated. The qualitative composition of microorganisms in primary clarifiers and the aerotank was similar, but their number in the aerotank was significantly higher than in the primary sump: 1.5×10^7 CFU/ml of nitrifying bacteria, 1.4×10^7 CFU/ml of nitrogen-fixing bacteria, 6.7×10^6 CFU/ml of fungi. The ratio of different physiological groups of microorganisms in the active sludge changed significantly. The predominant microorganisms were those that assimilate mineral forms of nitrogen (65%), their number was 1.6×10^8 CFU/ml. In the secondary clarifier, the largest group was cellulose-destroying microorganisms (6.0×10^5 CFU/ml). However, their numbers in the secondary sump were lower compared to their numbers in the aerotank and sludge ($1.5\text{--}3.9 \times 10^6$ CFU/ml). Among the representatives of various physiological groups of bacteria a significant number of chromium-resistant strains was detected. The largest number of chromium-resistant strains was detected in the active sludge and aerotank, which is probably due to the recirculation of microorganisms in the wastewater treatment. The highest percentage of Cr (VI) resistant microorganisms was among sulphate-reducing bacteria. An increase in the percentage of chromium-resistant microorganisms occurred together with the lowering of the total number of microorganisms of a certain physiological group. These microorganisms could prove useful for the development of biotechnological methods wastewater treatment to eliminate chromium compounds, which are highly toxic to living organisms.

Keywords: sewage; physiological groups of microorganisms; chromium-resistant strains

Вступ

У штучних екосистемах мікроорганізми активного мулу у процесі своєї життєдіяльності перетворюють органічні та неорганічні забруднення на прості та безпечні сполуки. Активний мул розглядають як угруповання про- та еукаріотичних організмів. Злагоджене функціонування організмів забезпечує очищення стічних вод, що надходять на очисні споруди (Sharapova and Nicova, 2007). Екосистема будь-яких споруд біологічного очищення може працювати стабільно та ефективно тільки в тому випадку, якщо стоки містять постійний склад забруднювачів. Зазвичай активний мул стійкий до впливу ксенобіотиків, що надходять, оскільки біоценоз гідробіонтів формується залежно від наявності певних органічних речовин і організми адаптуються до конкретного складу стоків (Kagoza, 2008). Біоценоз активного мулу формується залежно від умов середовища: складу стічних вод, концентрації розчинного кисню, температури, pH , наявності токсинів, важких металів. Зміна хоча б одного фактора спричиняє зміни та перерозподіл чисельності окремих фізіологічних груп мікроорганізмів. Процес адаптації мікробних угруповань до нових субстратів складний і може тривати декілька місяців (Zhurmins'kaja, 2005). Кількісний вміст мікроорганізмів тієї чи іншої групи є чутливим тестом на присутність у воді забруднювальної речовини певної хімічної природи (Antipchuk and Kirejeva, 2005). Важлива роль у видаленні органічних забруднень, а також різних токсичних для більшості живих організмів речовин належить мікроорганізмам. Вони краще та швидше можуть пристосовуватися до несприятливих умов навколишнього середовища, порівняно із багатоклітинними еукаріотичними організмами. Тому при надходженні на очисні споруди стічних вод, що містять токсичні речовини, часто в аеротенках виявляються лише бактерії (Golub, 2011). Мікроорганізми мають різну чутливість до підвищеного вмісту іонів важких металів (Cu , Cd , Ni , Pb , Zn), що спричинює зміни їх видового та кількісного складу (Korinova'ska and Grishko, 2011). Їх чисельність значно змінюється залежно від pH , вмісту сполук нітрогену та органічних речовин (Antipchuk and Kirejeva, 2005).

У більшості досліджень активного мулу увага акцентується на еукаріотичних організмах (Gal'perina, 2011; Sharapova and Nicova, 2007; Shved et al., 2012; Nenasheva and Korobov, 2009; Dallaeva, 2013), тоді як роль прокаріотичних залишається маловивченою.

Мета цієї роботи полягала у визначенні деяких фізіологічних груп мікроорганізмів, що входять до складу мікробіоценозу стічних вод, на різних етапах очищення.

Матеріал і методи досліджень

Мікроорганізми вирощували у чашках Петрі, що містили 20–30 мл агаризованого селективного середовища та у пробірках об'ємом 25 мл у термостаті за температури $+30$ °С. Анаеробні умови забезпечували кип'ятінням та швидким охолодженням середовища культивування, що викликає зменшення у ньому розчинного кисню, а також додаванням аскорбінової кисло-

ти чи Na_2S . Пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками. Чашки Петрі поміщали в генбокси з генераторами GENbox anaer для анаеробів. Анаеробні умови контролювали за допомогою індикатора анаеробних умов – резазурину (Oxoid, BR 0055B).

Кількість колоній визначали за допомогою методу Коха (Egorov, 1995). Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату визначали за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

де M – кількість клітин в 1 мл, a – середня кількість колоній, що виростили, V – об'єм суспензії, взятий для посіву (мл), n – розведення (разів).

Для виділення та підрахунку чисельності мікроорганізмів різних фізіологічних груп використовували селективні середовища (Gerhardt, 1983; Antipchuk and Kirejeva, 2005): сусло-агар – для грибів (включаючи дріжджі); крохмально-аміачне середовище для мікроорганізмів, які асимілюють мінеральні форми нітрогену; Гетченсона для целюлозоруйнівальних мікроорганізмів; Виноградського для нітрифікувальних бактерій; Ешбі для азотфіксаторів; Чапека для актиноміцетів; Ваксмана для грибів; Постгейта В для сульфатвідновлювальних бактерій. Щільні середовища містили 2% агару. До середовищ вносили 1 мМ (104 мг/л) Cr (VI) у формі $K_2Cr_2O_7$. Сусло-агар стерилізували в автоклаві за $0,5$ атм. 30 хв, усі інші середовища – за 1 атм. 30 хв.

Результати наведені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку.

Результати та їх обговорення

Стічні води Львова підлягають очищенню на очисних спорудах традиційним методом штучного біологічного очищення за допомогою діяльності активного мулу в аеротенках (рис. 1).

Ця технологія запропонована ще у 1914 р. і з того часу принципово не змінилась, тоді як склад стічних вод доповнюється ксенобіотиками, поверхнево-активними речовинами та іонами важких металів (Oliferchuk, 2008). За технологією стічні води проходять декілька етапів очищення: решітки для вловлювання твердих відходів, пісковловлювачі, первинний відстійник, аеротенк, в який додається активний мул, вторинний відстійник для відділення води від активного мулу.

Для дослідження мікробіоценозів стічних вод відібрано проби води з різних етапів очищення стічних вод: із первинного відстійника, аеротенка, активного мулу, вторинного відстійника. Кількісний і якісний склад мікроорганізмів у стічних водах на різних етапах очищення істотно відрізняється, залежить, перш за все, від складу стоків. На початкових етапах очищення (у первинному відстійнику) виявлено мікроорганізми, які очевидно потрапили на очисні споруди разом зі стічними водами. За чисельністю тут переважали нітрифікувальні ($7,1 \times 10^6$ КУО/мл), азотфіксувальні бактерії ($9,0 \times 10^6$ КУО/мл), а також гриби ($3,4 \times 10^6$ КУО/мл) (рис. 2 а).

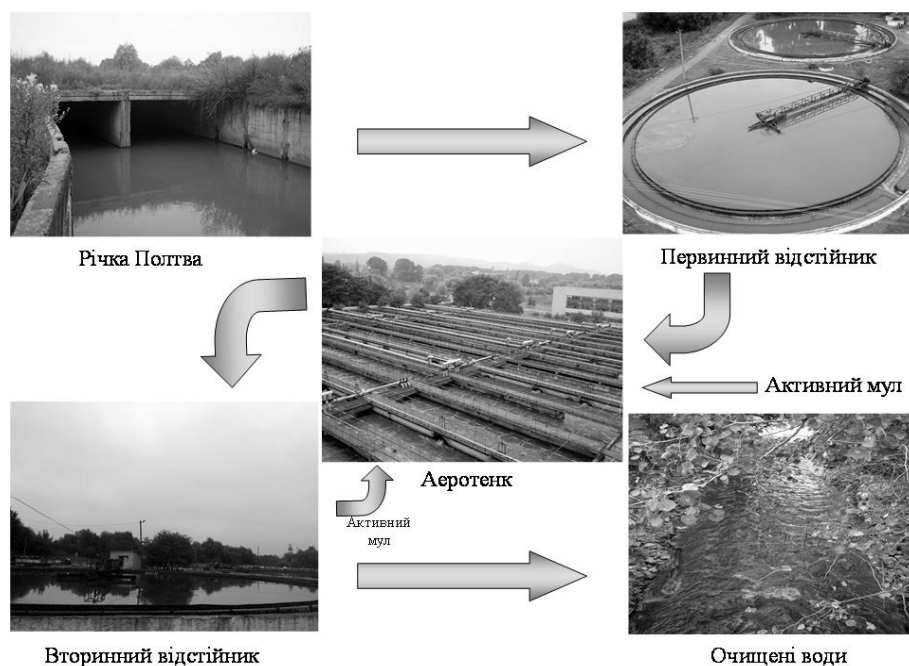


Рис. 1. Схема очищення стічних вод (м. Львів)

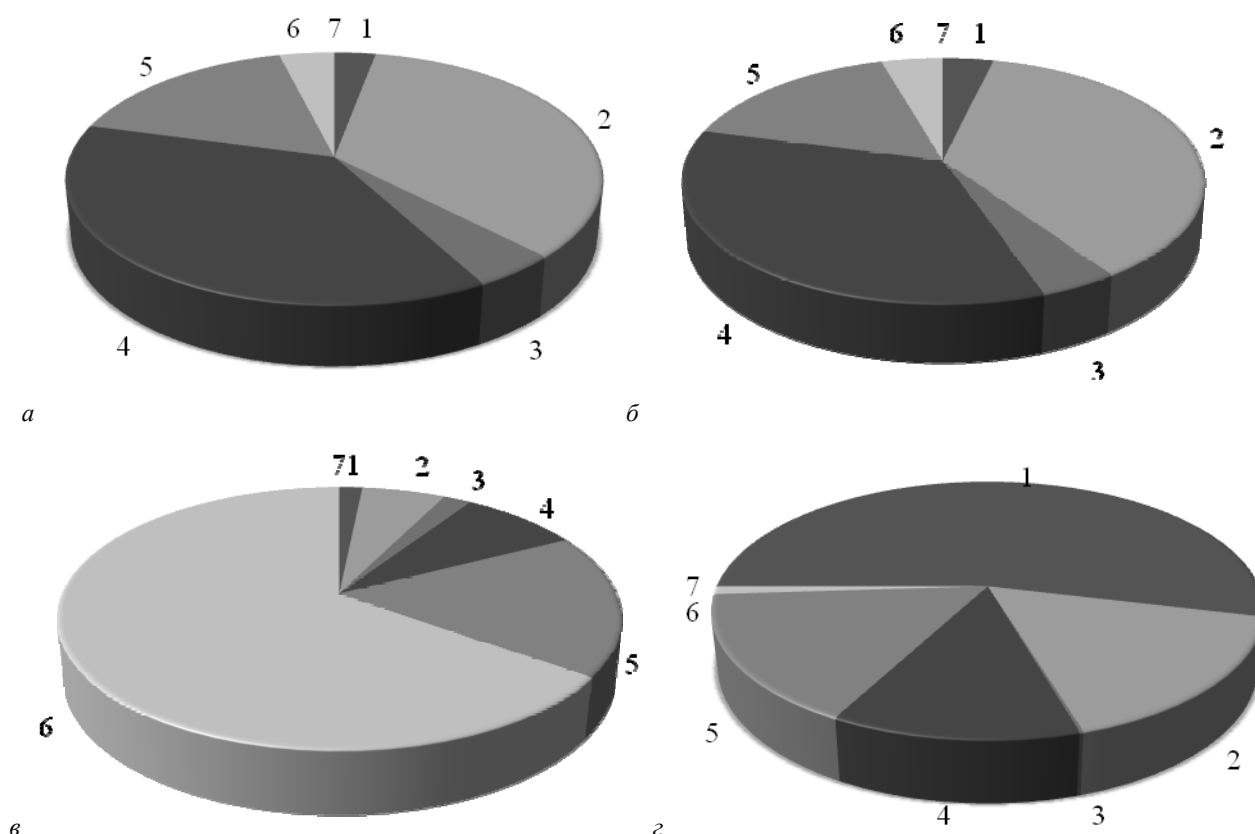


Рис. 2. Співвідношення мікроорганізмів різних фізіологічних груп у первинному відстійнику (а), аеротенку (б), активному мулі (в), вторинному відстійнику (г): 1 – целюлозоруйнівні бактерії, 2 – нітрифікувальні бактерії, 3 – актиноміцети, 4 – азотфіксувальні мікроорганізми, 5 – гриби, включаючи дріжджі, 6 – мікроорганізми, що використовують мінеральні форми нітрогену, 7 – сульфатвідновлювальні бактерії

В аеротенку чисельність аеробних мікроорганізмів зростала на порядок, порівняно з кількістю мікроорганізмів у первинному відстійнику, однак їх видовий та відсотковий склад не змінювався (рис. 2 б). Це зумовлено внесенням активного мулу та наявністю достатньої кіль-

кості органічних сполук у стічних водах. Серед мікроорганізмів значний відсоток склали нітрифікувальні ($1,5 \times 10^7$ КУО/мл) та азотфіксувальні бактерії ($1,4 \times 10^7$ КУО/мл), а також гриби ($6,7 \times 10^6$ КУО/мл).

Порівняно з аеротенком і первинним відстійником (4%), в активному мулі виявлено зростання відсотка мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми нітрогену (65%). Їх кількість становила $1,6 \times 10^8$ КУО/мл. На фоні зростання загальної кількості мікроорганізмів спостерігали зниження відсотка нітрифікувальних бактерій, хоча їх кількість залишалась такою самою, як в аеротенку ($1,4 \times 10^7$ КУО/мл). З іншого боку, відсоток грибів (включаючи дріжджі) не змінювався порівняно з аеротенком і первинним відстійником, однак їх кількість зростала до $4,1 \times 10^7$ КУО/мл (рис. 2 в).

Аналіз мікроорганізмів активного мулу очисних споруд Львова проводили також Швед та співавтори. Вони показали, що серед гідробіонтів активного мулу є значна кількість найпростіших організмів типу Ciliophora, а також велика кількість нітрифікувальних бактерій родів *Nitrosomonas* та *Nitrosobacter* (Shved et al, 2012). За нашими даними, кількість нітрифікувальних бактерій в активному мулі складала лише 6%.

Суміш активного мулу та очищених стоків потрапляє у вторинний відстійник, де відбувається відділення очищеної води від активного мулу за рахунок його осідання на дно відстійника. На цьому етапі очищення кількість мікроорганізмів зменшується порівняно із первинним відстійником чи аеротенком, про що свідчать отримані нами результати (рис. 2 з). Серед мікроорганізмів різних фізіологічних груп переважали целюлозоруйнівні мікроорганізми ($6,0 \times 10^5$ КУО/мл).

Однак їх кількість у вторинному відстійнику знижувалась порівняно із кількістю в аеротенку та активному мулі ($1,5-3,9 \times 10^6$ КУО/мл). Кількість мікроскопічних грибів становила $1,8 \times 10^5$ КУО/мл, що складало 17% загальної кількості досліджуваних мікроорганізмів.

Целюлозоруйнівні мікроорганізми є однією із найважливіших груп мікроорганізмів, що беруть участь у кругообігу карбону у водоймах. Ці мікроорганізми переробляють органічну речовину, що накопичується в риболовних ставках та інших водоймах при відмиранні рослин, і відіграють важливу роль у живленні донних тварин (Antipchuk and Kirejeva, 2005).

Установлено, що мікроорганізми можуть не лише адаптуватись до дії різних речовин, а і використовувати їх як донори чи акцептори електронів. Визначено кількість мікроорганізмів різних фізіологічних груп, стійких до іонів шестивалентного хрому. Найбільша кількість хром-резистентних мікроорганізмів на всіх етапах очищення стічних вод виявлена серед целюлозоруйнівних бактерій та дріжджів (табл. 1).

Найбільшу кількість хромрезистентних штамів мікроорганізмів виявлено в активному мулі та аеротенку, що, імовірно, зумовлено рециркуляцією мікроорганізмів у процесі очищення стічних вод і виникненням у них певних механізмів стійкості до різного типу забруднювачів (у тому числі іонів важких металів). Найвищий відсоток стійких до Cr штамів мікроорганізмів виявлено серед сульфатвідновлювальних бактерій (табл. 2).

Таблиця 1

Кількість хромрезистентних мікроорганізмів (КУО/мл) на різних етапах очищення стічних вод

Групи мікроорганізмів	Етапи очищення стічних вод			
	первинний відстійник	аеротенк	активний мул	вторинний відстійник
Дріжджі	$(1,60 \pm 0,08) \times 10^2$	$(6,00 \pm 0,24) \times 10^3$	$(1,10 \pm 0,12) \times 10^5$	$(1,00 \pm 0,01) \times 10$
Целюлозоруйнівні	$(3,10 \pm 0,15) \times 10^4$	$(3,40 \pm 0,44) \times 10^5$	$(1,10 \pm 0,06) \times 10^6$	$(3,40 \pm 0,79) \times 10^2$
Нітрифікувальні	$(10,00 \pm 1,01) \times 10^2$	$(6,70 \pm 0,28) \times 10^2$	$(5,50 \pm 0,59) \times 10^2$	$(0,30 \pm 0,02) \times 10^2$
Актиноміцети	$(0,30 \pm 0,05) \times 10$	$(0,20 \pm 0,01) \times 10^2$	$(1,20 \pm 0,09) \times 10^2$	$(0,10 \pm 0,01) \times 10^2$
Азотфіксувальні	$(4,60 \pm 0,15) \times 10^2$	$(5,60 \pm 0,71) \times 10^2$	$(9,30 \pm 2,01) \times 10^2$	$(1,00 \pm 0,09) \times 10^2$
Гриби	$(2,00 \pm 0,15) \times 10$	$(5,00 \pm 0,34) \times 10^2$	$(9,90 \pm 0,52) \times 10^2$	$(0,60 \pm 0,05) \times 10$
Мікроорганізми, що асимілюють мінеральні форми нітрогену	$(5,00 \pm 0,81) \times 10$	$(2,10 \pm 0,15) \times 10^2$	$(9,80 \pm 1,51) \times 10^2$	$(1,00 \pm 0,05) \times 10$
Сульфатвідновлювальні	$(0,60 \pm 0,05) \times 10$	$(1,00 \pm 0,01) \times 10^2$	$(9,60 \pm 0,62) \times 10$	$(0,10 \pm 0,02) \times 10$

Таблиця 2

Відсотковий вміст хромрезистентних мікроорганізмів різних фізіологічних груп

Групи мікроорганізмів	Відсоток резистентних до хрому (VI) мікроорганізмів			
	первинний відстійник	аеротенк	активний мул	вторинний відстійник
Дріжджі	0,4	1,6	6,3	0,2
Целюлозоруйнівні мікроорганізми	5,1	20,0	28,0	3,7
Нітрифікувальні бактерії	0	0,0043	0,0033	0
Актиноміцети	0	0,0017	0,0025	0
Азотфіксувальні бактерії	0	0,0040	0,0046	0
Гриби	0	0,0070	0,0024	0
Мікроорганізми, що асимілюють мінеральні форми нітрогену	0,0063	0,0100	0,0006	0,0090
Сульфатвідновлювальні бактерії	1	25	100	100

Зростання відсотка хромрезистентних мікроорганізмів відбувається на фоні зниження загальної кількості мікроорганізмів певної фізіологічної групи. Це можна пояснити тим, що підвищена концентрація іонів $Cr_2O_7^{2-}$

призводить до загибелі чутливих до цього металу мікроорганізмів, тоді як резистентні мікроорганізми залишаються життєздатними. Кількість мікроорганізмів цієї фізіологічної групи на всіх етапах очищення була досить

низькою. Очевидно, це зумовлено несприятливими для досліджуваної групи аеробними умовами. Однак майже всі виділені штами виявляли стійкість до іонів хрому (VI).

Присутність сульфатвідновлювальних бактерій в аеротенку свідчить про наявність у цих мікроорганізмів адаптаційних механізмів захисту від впливу кисню. Аеротолерантність бактерій зумовлена наявністю ферментів антиоксидантної системи, хеморецепторами на O_2 . Крім класичних супероксиддисмутази та каталази, які містять деякі сульфатвідновлювальні бактерії, в їх клітинах виявлено негемові ферумумісні білки: рубреритрин, рубредоксин, десульфоферодоксин, нееларедоксин (Brioukhanov, 2008; Brioukhanov et al., 2010). Деякі сульфатвідновлювальні бактерії утворюють скупчення клітин (флоки), що сприяє аеротолерантності. Рухливі види характеризуються негативним аеротаксисом і мігрують до анаеробних зон. Здатність до позитивного аеротаксису відіграє важливу екологічну роль у зонах переходу від аеробних до анаеробних умов, створюючи там оптимальний окисно-відновний потенціал для росту облигатних анаеробів (Brioukhanov and Netrusov, 2007).

Висновки

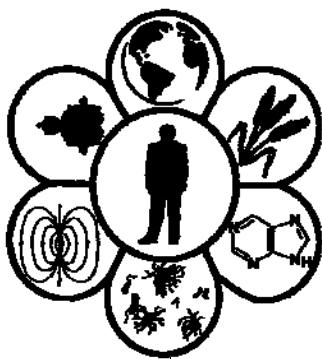
Кількісний і якісний склад мікроорганізмів різних фізіологічних груп на різних етапах очищення стічних вод суттєво відрізняється. Співвідношення мікроорганізмів у первинному відстійнику та аеротенку за якісним складом подібні, однак їх кількість в аеротенку на порядок вища, ніж у первинному відстійнику. В активному мулі співвідношення фізіологічних груп мікроорганізмів суттєво змінюється. Переважають мікроорганізми, що засвоюють мінеральні форми нітрогену. У вторинному відстійнику найбільшу кількість становлять целюлозоруйнівні бактерії. Серед представників різних фізіологічних груп бактерій виявлено значну кількість хромрезистентних штамів. Найвищий відсоток стійких до Cr (VI) мікроорганізмів серед сульфатвідновлювальних бактерій. Ці мікроорганізми можуть бути перспективними для розробки біотехнологічних методів очищення стічних вод від сполук хрому, високотоксичних для живих організмів.

Бібліографічні посилання

Antipchuk, A.F., Kirejeva, I.J., 2005. Vodna mikrobiologija [Aquatic microbiology]. Kondor, Kyiv (in Ukrainian).
Brioukhanov, A.L., 2008. Negemovye zhelezosoderzhashhie belki kak al'ternativnaja sistema antiokislitel'noj zashhity v kletkah strogo anaerobnyh mikroorganizmov [Non-heme iron proteins as an alternative antioxidant defense system in cells strictly anaerobic microorganisms]. Prikladnaja biokhimiya i Mikrobiologija 44(4), 373–386 (in Russian).
Brioukhanov, A.L., Netrusov, A.I., 2007. Ajerotolerantnost' strogo anajerobnyh mikroorganizmov: Faktory zashhity ot okislitel'nogo stressa [Aerotolerant in strictly anaerobic microorganisms: Protective factors against oxidative stress]. Prikladnaja Biokhimiya i Mikrobiologija 43(6), 635–652 (in Russian).
Brioukhanov, A., Pieulle, L., Dolla, A., 2010. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 149–159.

Dallaeva, D.S., 2013. Osobennosti mikroorganizmov aktivnogo ila [Features of microorganisms of activated sludge]. Global'nyj Nauchnyj Potencial 5(26), 7–9 (in Russian).
Egorov, N.S., 1995. Rukovodstvo po prakticheskim zanjatijam po mikrobiologii [Guide to almost classes in microbiology]. MGU, Moscow.
Gal'perina, A.R., 2011. Aborigennye mikroorganizmy zamazuchennyh stochnyh vod kak osnova ekologicheskij biotekhnologij [Aboriginal microorganisms of oil polluted waste water as a basis for ecological biotechnology]. Izvestija Samarskogo Nauchnogo Centra Rossijskoj Akademii Nauk 13(5/3), 132–135 (in Russian).
Gerhardt, F., 1983. Metody obshhej bakteriologii [Methods for general bacteriology]. Mir, Moscow (in Russian).
Golub, N.M., 2011. Vlijanie veshhestv-zagraznitatelej, sodержashhihsja v stochnyh vodah, na zhiznedejatel'nost' aktivnogo ila [Influence of substances pollutants contained in wastewater on the life of the activated sludge]. Vestnik Brjescckaga Universitjeta Seryja 5 Himija Bijalogija Navuki ab Zjamli 1, 14–19 (in Russian).
Karoza, S.J., 2008. Vlijanie ksenobiotikov stochnyh vod na sostojanie aktivnogo ila ochistnyh sooruzhenij [Influence of xenobiotics on the state of sewage activated sludge treatment facilities]. Materialy III Mezhdunar. nauch. konf. "Ksenobiotiki i zhivye sistemy" [Proc. of the III Int. scientific. conf. "Xenobiotics and Living Systems"]. Minsk, 52–54 (in Russian).
Korinovs'ka, O.M., Grishko, V.M., 2011. Chutlivist' mikromicetiv do vazhkih metaliv [Micromycetes sensitivity to heavy metals]. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med. 2(2), 49–55 (in Ukrainian).
Nenasheva, M.N., Korobov, V.J., 2009. Izuchenie vidovogo raznoobrazija gidrobiontov zakrytoj ekosistemy pri bess-tochnoj sisteme vodosnabzhenija iskusstvennogo vodoema dlja razvedenija ryby [The study of species diversity in aquatic ecosystems closed undrained water supply system of an artificial pond for fish farming]. Vestnik OGU 6, 275–277 (in Russian).
Oliferchuk, V.P., Gurla, U.R., Senjuk, A.I., Hodzins'ka, O.R., 2008. Zastosuvannja mikromicetiv dlja ochishhennja stichnih vod za dopomogoj biokonvejera [Application of micromycetes for wastewater treatment using bioconveyer]. Naukovij Visnik NLTU Ukraїni 8(3), 22–29 (in Ukrainian).
Sharapova, I.V., Hicova, L.N., 2007. O strukture i funkcional'nom znachenii protozojnogo kompleksa aktivnogo ila aerotekov ochistnyh sooruzhenij malogo goroda [The structure and functional significance of protozoan complex activated sludge treatment facilities aerotekov of small city]. Vestnik VGU: Chimija. Biologija. Farmacija 2, 123–128 (in Russian).
Shved, O.M., Vydryns'ka, O.K., Chervecova, V.G., Gubrij, Z.V., Novikov, V.P., 2012. Novi pidhody do biologichnogo ochyshhennja stichnyh vod mista L'vova [New approaches to biological wastewater treatment in Lviv]. Visnyk Nacional'nogo Universytetu "L'vivs'ka Politehnika" 726, 145–152 (in Ukrainian).
Zhurmins'kaja, O.V., 2005. Vlijanie koncentririvannyh stokov na sostojanie aktivnogo ila sooruzhenij biologicheskij ochistki stochnyh vod [Influence of concentrated industrial discharges on the state of active cludge in the Process of biological wastewater treatment]. Materialy II Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskij konferencii "Geoekologicheskie i bioekologicheskie problemy severnogo prichornomor'ja" [Proc. of the Int. conf. "Geoeological and bioecological problems of the North black sea coast"]. Tiraspol, 25–28.

Надійшла до редколегії 02.12.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, medicina

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine.
2013. 4(2)

ISSN 2310-4155

www.medicine.dp.ua

Зміст

Лянна О.Л. Ендогенний інгібітор цистеїнового катепсину В із тканин головного мозку	43
Микайло І.І., Кривцова М.В., Ніколайчук В.І. Моніторинг вмісту нітратів в овочевих культурах Ужгородського району	47
Онуфрович О.К., Воробець Д.З., Воробець З.Д. Вплив препаратів з антиоксидантними властивостями на стан антиоксидантної системи сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків	52
Мельник О.В., Корнійчук О.П., Першин О.І., Воробець З.Д. Властивості Na^+, K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролази лімфоцитів крові у хворих на реактивний артрит	57
Ржевская В.С., Теплицкая Л.М., Отурина И.П. Колонизация ризопланы корней огурцов микроорганизмами, входящими в состав микробного препарата «Эмбико®»	63
Кілочицька Н.П. Стаціональний розподіл самок кровосисних комарів у Солом'янському районі Києва	71
Шоляк К.В., Гнатуш С.О., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Мікробоценози стічних вод Львова на різних етапах очищення	76

Content

Lyanna O.L. An endogenous inhibitor of cysteine cathepsin B from brain tissues	43
Mykaylo I.I., Kryvtsova M.V., Nikolaichuk V.I. Monitoring of nitrate content of vegetable crops in Uzhgorod district	47
Onufrovych O.K., Vorobets D.Z., Vorobets Z.D. Influence of drugs with antioxidant properties on the state of the sperm antioxidant system in men with excretory-toxic forms of infertility	52
Melnyk O.V., Kornijchuk O.P., Pershyn O.I., Vorobets Z.D. Properties of Na^+, K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolyze of blood lymphocytes in patients with reactive arthritis	57
Rzhevskaya V.S., Teplitskaya L.M., Oturina I.P. Colonization of rhizoplane of cucumber roots by microorganisms which are components of the microbial preparation "Embiko®"	63
Kilochytska N.P. Extension of habitat of female blood-sucking mosquitoes in Solomenskiy district, Kiev	71
Sholiak K.V., Hnatush S.O., Peretyatko T.B., Gudz S.P. Microbiocenoses of Lviv sewage at various stages of purification	76

Друкується за рішенням вченої ради Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара згідно з планом видань на 2013 рік

Редакційна колегія (Editorial Board)

Голова редакційної колегії (Editor-in-Chief):

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:

McLachlan John A. – Tulane University, School of Medicine, Department of Pharmacology, New Orleans, USA; PhD, Prof.;

Melamed Israel – Soroka University Medical Center, Deputy Chief of Department of Neurosurgery, Beer-Sheva, Israel; MD;

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

Науковий секретар редакційної колегії:

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

Члени редакційної колегії:

Boyko Mathew – Ben Gurion University of the Negev, Faculty of Health Sciences, Beer Sheva, Israel; Dr., Assistant Prof.;

Бачинський Петро Петрович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

Березницький Яків Соломонович – Дніпропетровська державна медична академія, проф. каф. хірургії № 1; д-р мед. наук, проф.;

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

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

Дюдюк Анатолій Дмитрович – Дніпропетровська державна медична академія, завідувач каф. дерматовенерології; д-р мед. наук, проф.;

Єрошкіна Тетяна Миколаївна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

Кремленчуцький Геннадій Миколайович – Дніпропетровська державна медична академія, завідувач каф. мікробіології, вірусології, імунології і епідеміології; д-р мед. наук, проф.;

Кулікова Файна Іосифівна – Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, зав. відділення рентгендіагностики; д-р мед. наук;

Лоскутов Олександр Євгенович – Дніпропетровська державна медична академія, проф. каф. травматології та ортопедії; д-р мед. наук, проф.;

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

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

Татаровський Олександр Петрович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

Тимчук Сергій Миколайович – Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, зав. відділення лор-онкології; д-р мед. наук;

Ушакова Галина Олександрівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. біофізики та біохімії; 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.

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина

Заснований у 2010 р.

Том 4(2)

Українською, російською та англійською мовами

Свідоцтво державної реєстрації серія КВ № 7898 від 17.09.2003 р.

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

Підписано до друку 25.12.2013. Формат 60×84 ¹/₈. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 6,3. Ум. фарбовідб. 6,3. Обл.-вид. арк. 6,3. Тираж 100 пр. Вид. № 1589. Замовлене

Свідоцтво державної реєстрації № ДК – 289 від 21.12.2000 р.

Видавництво Дніпропетровського університету,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010