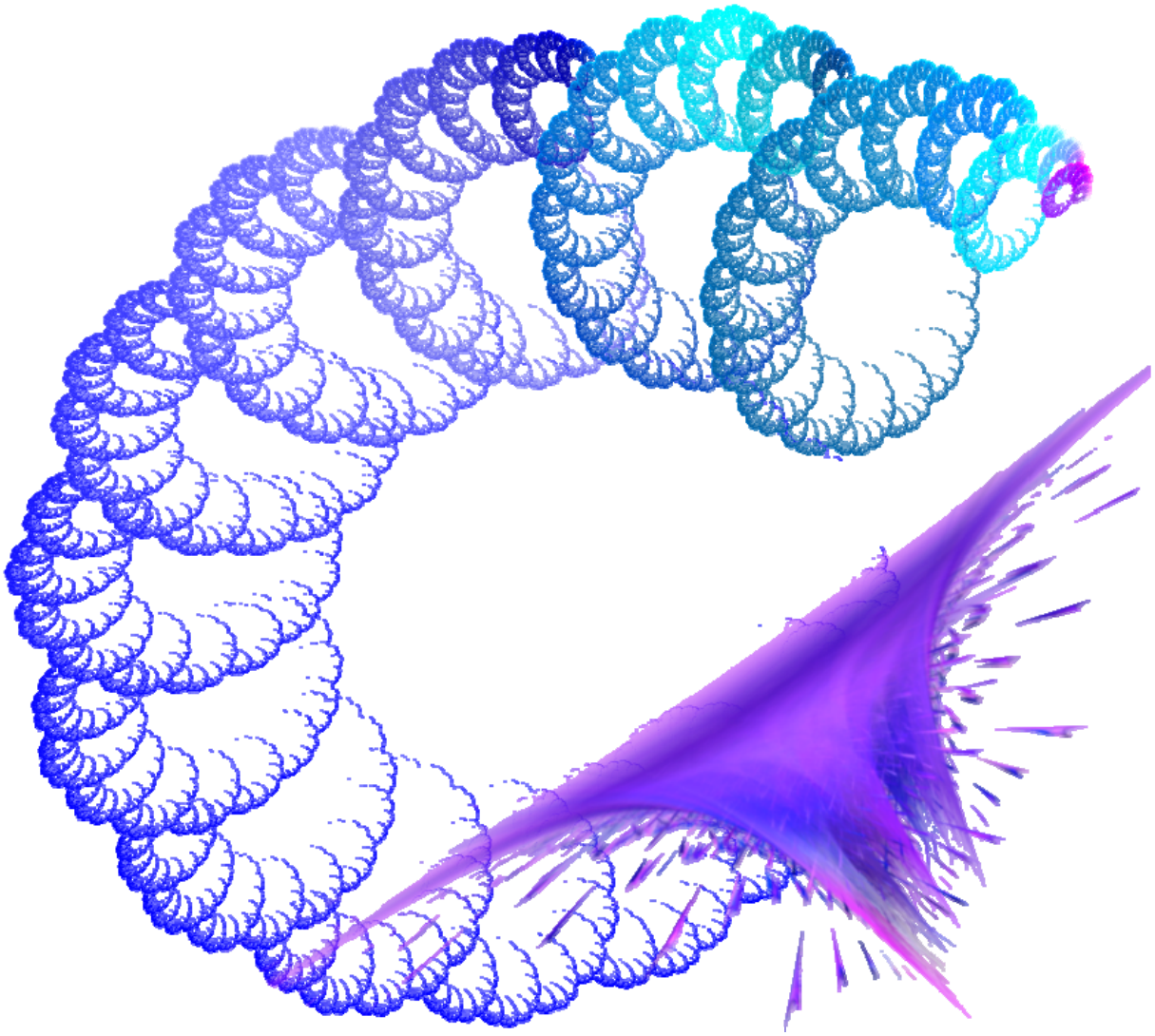
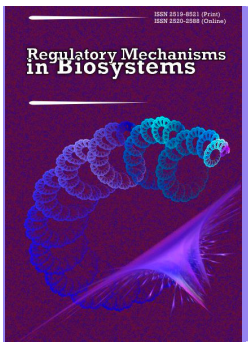
ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Regulatory Mechanisms in Biosystems



Volume 8(3)



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Aims and scope. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* publishes peer-reviewed original research and review articles across all aspects of regulatory mechanisms in biological systems from the molecular level of organisation to the level of the organism. This journal mostly focuses on physiological mechanisms of regulation of metabolic processes, biochemical and physiological features of any species including human beings. This journal covers a wide range of regulatory mechanisms in biological systems that are associated both with natural processes and those transformed under the influence of chemicals and drugs, and any other man-made factors. We will publish papers concerned solely with clinical case studies and clinical trials if such articles address important questions in regulatory mechanisms in biosystems. *Regulatory Mechanisms in Biosystem*s focuses on good-quality research, reporting scientifically sound observations and valid conclusions, which bring new and important information to the attention of the wider international scientific community. The journal publishes contributions in the following basic areas: biochemistry, bioinformatics, biophysics, cell biology, endocrinology, genetics, immunology, microbiology, molecular biology, physiology, neuroscience, pharmacology, toxicology.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

Prof., D. Sc., *O. Y. Pakhomov*, Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

Deputy Editors:

Prof. *I. M. Bondarenko*, M. D., Chief of Department of Oncology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof. *J. A. McLachlan*, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tulane University, New Orleans, USA;

Dr. *I. Melamed*, M. D., Department of Neurosurgery, Soroka Medical Center, Ben-Gurion University of the Negev, Beersheba, Israel;

Prof., Ph. D., *S. G. Pierzynowski,* Department of Biology, Lund University, Lund, Sweden;

Executive Editor:

As. Prof., Ph. D., *V. V. Brygadyrenko*, Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

Editorial Board:

Prof. *P. P. Bachynsky*, M. D., Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., Dr. hab., *W. Barabasz*, Department of Microbiology, Agricultural University of Krakow, Poland;

D. Sc., *Z. Bedő*, Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary;

Prof. *Y. S. Bereznytsky*, M. D., Department of Surgery No 1, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Dr. *M. Boyko*, Ph. D., Department of Anesthesiology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beersheba, Israel;

P. W. Bradbeer, Alfred Nobel University, Dnipro, Ukraine;

Prof. A. D. Diudiun, *M. D.,* Department of Dermatovenerology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

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

As. Prof., Ph. D., *V. Y. Gasso,* Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

A. O. Huslystyi, Department of Geobotany, Soil Science and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

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

Prof. *G. M. Kremenchutsky*, M. D., Department of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof., D. Sc., *F. I. Kulikova*, M. D., Department of X-ray Diagnostics, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Ukraine;

Dr., *P. Kuschk*, Department of Environmental Biotechnology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany;

Prof. *O. Y. Loskutov*, M. D., Department of Traumatology and Orthopaedics, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof., D. Sc., *O. A. Lykholat*, Department of Goods Knowledge and Custom Expertise, University of Custom Business and Finance, Ukraine;

Prof., D. Sc., *A. V. Matsyura*, Department of Ecology and Zoology, Bogdan Khmelnitsky Melitopol State Pedagogical University, Ukraine;

Prof., D. Sc., *V. S. Nedzvetsky*, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., D. Sc., *V. P. Semenchenko*, Laboratory of Hydrobiology, SSIU "SIC NAS Belarus on Bioresources", Republic of Belarus;

Prof., D. Sc., *O. V. Severynovska*, Department of Human and Animals Physiology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., D. Sc., *T. M. Shevchenko*, Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Sc. D., *P. B. Tchounwou*, NIH-RCMI Center for Environmental Health, College of Science, Engineering & Technology, Jackson State University, Jackson, USA;

Prof. *S. M. Tymchuk*, M. D., Department of ENT-Oncology, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Ukraine;

Prof., D. Sc., *G. O. Ushakova*, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., D. Sc., *A. I. Vinnikov*, Department of Microbiology, Virology and Biotechnology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof. *T. M. Yeroshkina*, M. D., Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

Literary Editors: *P. W. Bradbeer*, *M. O. Tikhomyrov*, *V. D. Malovyk*. **Cover Design:** *A. O. Huslystyi*, *P. S. Usenko*. **Text Layout:** *V. V. Brygadyrenko.*

Publication information. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, ISSN 2519-8521 (Print), ISSN 2520-2588 (Online). Subscription prices are available upon request from the Publisher or from the journal's website (www.medicine.dp.ua). Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by standard mail (surface within Europe, air delivery outside Europe). Priority rates are available upon request. Claims for missing issues should be made within six months of the date of dispatch.

Approved by the Scientific Council of Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 313–316
doi: 10.15421/021749

Experimental study of action of autostrains *Aerococcus viridans* on the model *Pseudomonas* infection

D. O. Stepanskyi, G. M. Kremenchutskyi, I. P. Koshova

Dnipro Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 20.05.2017
Accepted 23.05.2017

Dnipro Medical Academy of Health Ministry of Ukraine, Sq. Cathedral, 4, Dnipro, 49027, Ukraine.
E-mail: koshevaya.ip@gmail.com

Stepanskyi, D. O., Kremenchutskyi, G. M., & Koshova, I. P. (2017). Experimental study of action of autostrains Aerococcus viridans on the model Pseudomonas infection. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 313–316. doi: 10.15421/021749

The paper presents the results of a study of the action of A*erococcu*s autostrains on the model of a chronic blue pus infection. For the study of the action of *Aerococcus* autosymbiont strains on *Pseudomonas aeruginosa*, three of the most biochemically and antagonistically active isolates were selected: 1) 5m2015 (isolated from mice); 2) 3k2015 (isolated from rats); 3) 3ch2015 (isolated from humans). Experiments were conducted on 84 white outbred mice weighing 16–17 g, 60 were used as the experimental, and 24 as the control group. In the experimental group of animals, infected wounds were treated by *Aerococcus* autosymbiont strains once daily (0.2 billion ml^{-1}) till recovery. The drug was administered under the scab with a syringe. In the control animals the wound was treated by isotonic sodium chloride solution (concentration 0.9%) with the same route of administration and for the same period of time. It was found that from the very first days of application of *Aerococci* autosymbiont strains, perifocal inflammation was less severe in most animals in the research group compared with the control group. Starting from the fourth day of usage of *Aerococcus* autosymbiont strains the number of pseudomonades, contained in secretions from wounds in the experimental group of mice was significantly lower than in the control animals. It was revealed that in case of application of *Aerococcu*s strain (5m2015) isolated from mice, the animals had better indicators of recovery, dynamics of local clinical signs of inflammation and the number of pseudomonades contained in the wound in comparison with other *Aerococcus* autostrains isolated from rats and humans. The wounds purified from pus and covered with dry scab faster. For example, wounds completely healed with dry scab rejection by the 11th day of observation in 44 of 58 surviving mice (75.9%). In the control group a similar pattern was observed in only 3 of 17 mice (17.6%) by that period. The number of *Pseudomonas aeruginosa* (equivalent to 1 ml of secretions wounds), expressed in logarithms, was 5.00 ± 0.16 on average on the 4th day in the treated mice, while the control group had the same amount of pseudomonades detected in the wounds (lg 5.22 ± 0.38; lg 5.12 ± 0.30) only on the 13–14th days of observation. We found different activity of strains, depending on the origin of microorganism and type host. *Aerococcus viridians* autosymbionts showed higher rates in the study of their activity in terms of the blue pus infection model in the treatment of the host and lower activity in treatment.of other species. The obtained data may warrant further study of application of *Aerococcus* autostrains for treatment and prevention of wound infection caused by pseudomonades.

Keywords: wound infections; *Pseudomonas*; autoprobiotics; *Aerococcus*

Експериментальне вивчення дії аутоштамів *Aerococcus viridans* на моделі синьогнійної інфекції

Д. О. Степанський, І. П. Кошова, Г. М. Кременчуцький

Дніпровська медична академія МОЗ України, Дніпро, Україна

Наведено результати вивчення дії аутоштамів аерококів на моделі хронічної синьогнійної інфекції, викликаної псевдомонадами. Для експерименту з вивчення дії аутосимбіонтних штамів аерококів на *Pseudomonas aeruginosa* вибрано три найактивніші у біохімічному та антагоністичному відношенні ізоляти: 1) 5м2015 (виділений від мишей), 2) 3к2015 (виділений від щурів), 3) 3ч2015 (виділений від людини). У більшості тварин дослідних груп уже з перших днів застосування аутосимбіонтних штамів аерококів перифокальне запалення було менш вираженим порівняно з контрольною групою мишей, а кількість псевдомонад, що містилися у виділеннях ран дослідних груп мишей, починаючи з четвертої доби застосування аутосимбіонтних штамів аерококів, перебувала на достовірно нижчому рівні, ніж у контрольних тварин. Під час застосування штаму аерококів 5м2015, виділеного від мишей, у тварин спостерігали кращі показники одужання, динаміку розвитку місцевих клінічних симптомів запалення та більшу кількість псевдомонад, які містилися у рані, порівняно з іншими аутоштамами аерококів, виділених від щурів і людини. Рани швидше очищалися від гною та покривалися сухим струпом. Наприклад, до 11-ї доби спостереження рани повністю гоїлися з відторгненням сухого струпа у 44 з 58 мишей, що вижили (75,9%). У контрольній групі тварин до зазначеного терміну аналогічна картина спостерігалася лише у 3 із 17 мишей (17,6%). У лікованих мишей

вже на четверту добу кількість синьогнійної палички (у перерахунку на 1 мл виділень ран, виражена в логарифмах) склала в середньому 5,0 ± 0,16, у контрольній групі така ж кількість псевдомонад (lg 5,22 ± 0,38; lg 5,12 ± 0,30) виявлялася в ранах лише на 13–14-ту добу спостереження. Охарактеризовано закономірності різної антагоністичної активності аутоштамів *Aerococcus viridans*, яка залежить від походження мікроорганізму та виду господаря. Отримані дані можуть служити підставою для подальшого вивчення застосування аутоштамів аерококів для лікування ран, ускладнених синьогнійною інфекцією.

Ключові слова: ранові інфекції; псевдомонади; аутопробіотики; аерококи

Вступ

Гнійно-запальні захворювання та післяопераційні гнійні ускладнення – актуальна проблема сучасної клінічної хірургії. Незважаючи на постійне удосконалення методик оперативних втручань, частота інфекційних ускладнень у хірургії становить у середньому 3–15%, а за даними окремих авторів сягає 30%. Нині 35–40% хворих хірургічного профілю становлять пацієнти з гнійно-запальними захворюваннями (Leaper et al., 2010; Marwick et al., 2011; Vil'canjuk and Hutorjans'kij, 2012; Gupta et al., 2015; Nešpor et al., 2015). Особливість лікування ранової інфекції на сучасному етапі – полірезистентність збудників до антибіотиків (Riou et al., 2010; Narendra et al., 2017; Wei et al., 2017), що мають різні молекулярні механізми дії. Це змушує лікарів застосовувати нові схеми лікування, наприклад, комбінації антибіотиків нових поколінь (Drinka et al., 2012; Leaper et al., 2010; Campos Furtado et al., 2007; McCay et al., 2010).

У питаннях вивчення госпітальної інфекції проблему патогенезу та лікування ран, ускладнених синьогнійною інфекцією, відносять до найважливіших (Hossam Mohamed, 2016; Zhao Yan et al., 2016). Летальність, пов'язана з гнійно-септичними захворюваннями (ГСЗ), зумовленими *Pseudomonas aeruginosa*, досить висока – 34–48% (Oliver et al., 2015; Suárez et al., 2010).

Боротьба з рановою інфекцією стає все складнішою проблемою, потребує пошуку та залучення препаратів, ефективних до нозокоміальної інфекції. Сформована ситуація вимагає пошуку нових засобів та підходів до лікування. Один з обговорюваних в останні роки підходів до профілактики та лікування кишкових інфекцій – застосування пробіотиків (Lytvyn et al., 2016; Olveira and González-Molero, 2016).

Спектр показань для застосування пробіотиків широкий: їх використовують для стимуляції клітинних і гуморальних чинників імунітету, активізації обмінних процесів і нормалізації травлення, лікування та профілактики дисбактеріозу, шлунково-кишкових захворювань інфекційної та аліментарної етіології, нормалізації мікрофлори травного тракту після лікування антибіотиками та іншими антибактеріальними засобами. Спектр застосування пробіотиків у клінічній практиці може бути суттєво розширено за рахунок антимікробної терапії зовнішніх гнійно-запальних процесів. Багатьма дослідниками встановлено важливу роль нормальної мікрофлори організму людини у підтриманні його фізіологічного стану, забезпеченні гомеостазу та життєдіяльності (Shenderov, 2011).

Найбільшої уваги, на наш погляд, заслуговують аутопробіотики (Il'in et al., 2013; Shumikhina et al., 2015; Simanenkov et al., 2014). Особливу цікавість викликає *Aerococcus viridans*, оскільки він – представник нормальної мікрофлори людини. Застосування цього мікроорганізму має цілу низку переваг: відсутність побічного впливу на організм, висока адгезивна здатність, можливості використання у сенсибілізованих до антибіотиків та хіміотерапевтичних препаратів пацієнтів, імуностимулювальна дія на організм людини. Також *A. viridans* має виражені антагоністичні властивості відносно різних умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів (Kremenchutskiy, 2001).

Саме тому мета дослідження – оцінити дію аутоштамів аерококів на синьогнійну паличку.

Матеріал і методи досліджень

Часто випробування препаратів за синьогнійної інфекції проводили на моделях, що відтворюють види гострих інтоксикацій у лабораторних тварин, а не інфекційний процес, із яким найчастіше стикаються клініцисти. Спроби створити хронічну модель синьогнійної інфекції з переважним проявом місцевих симптомів закінчувалися отриманням запальної реакції, що розвивалась через 12 годин після інокуляції мікроорганізмів, яка вщухла на 7–9-ту добу від моменту введення інфікувальної дози. Отже, для вивчення дії аутоштамів аерококів обрано модель, яка приблизно відтворювала перебіг хронічної синьогнійної інфекції, тобто мала вогнище запалення та пролонговану дію.

Для створення експериментальної моделі опіків, інфікованих *P. aeruginosa*, тваринам проводили загальну анестезію тіопенталом натрію, після цього на депільовану бокову поверхню тварини наносили травму через металічне кільце (діаметр 2 см) ватним тампоном, змоченим у спирті та підпаленим. Рану підсушували стерильним тампоном і у центр опіку вносили інфікувальну дозу *P. aeruginosa* (1 мл 10^9 клітин), чекаючи на повне всмоктування. Через 20–24 години вдруге уводили *P. aeruginosa* під утворену до цього часу кірку (1–2) * 10^9 мікробних клітин. Вторинне уведення культури синьогнійної палички в рану сприяло тяжкості розвитку патологічного процесу з тривалішим періодом прояву клінічних симптомів запалення.

Для зараження використовували два вірулентні штами: № АТСС 27853 – музейний штам і № 23, виділений із рани хворого з важкою опіковою травмою (табл. 1).

Таблиця 1
Характеристика штамів *Pseudomonas aeruginosa*

Властивості штамів	№ АТСС 27853	№ 23
Джерело отримання	музейний штам	клінічний штам
Утворення піоціаніну	+	+
Забарвлення за Грамом	–	–
Гідроліз желатину	+	+
Утворення цитохромоксидази	+	+
Гемоліз еритроцитів	+	+
Ріст при 42 ºС	+	+
Ферментація вуглеводів:		
глюкоза	К	К
галактоза	К	К
маноза	К	К
сахароза	–	–
лактоза	–	–
мальтоза	–	–
маніт	–	–
ксилоза	К	К
фруктоза	К	К
Відновлення нітратів у нітрити	+	+
Згортання молока	+	+
Гідроліз казеїну	+	+
Рухливість	+	+
Серогрупа	2	6
LD_{50} (внутрішньочеревинне уведення)	$5,3 \cdot 10^8$	$4,03 \cdot 10^6$

Примітки: «+» – наявність реакції; «–» – відсутність реакції; К – утворення кислоти.

Із метою вивчення динаміки обсіменіння інфікованих ран псевдомонадами проводили бактеріологічне дослідження вмісту ран у різні терміни після вторинного інфікування. Відбирали проби таким чином: до поверхні рани прикладали стандартний диск із фільтрувального паперу, потім поміщали його в 1 мл ізотонічного розчину хлориду натрію (концентрація 0,9%), ретельно струшували 10–15 хв і змив мірно засівали на селективне середовище – поживний агар із цетилпеpидиніум-хлоридом (ЦПХ-агар). Після 48-годинної інкубації за 37 ºС враховували кількість колоній *P. aeruginosa*, що виросли на живильному середовищі. Для експерименту з вивчення дії аутосимбіонтних штамів аерококів на *P. aeruginosa* відібрано три найактивніші у біохімічному та антагоністичному відношенні ізоляти аерококів: 1) 5м2015 (виділений від мишей),

2) 3к2015 (виділений від щурів), 3) 3ч2015 (виділений від людини). Експерименти з вивчення дії аутосимбіонтних штамів аерококів поставлені на 84 безпородних білих мишах масою 16–17 г, із яких 60 тварин склали дослідну групу, а 24 – контрольну. У дослідних тварин інфіковані рани щодня одноразово обробляли аутосимбіонтними штамами аерококів (0,2 млрд в 1 мл) до одужання. Препарат уводили під струп за допомогою шприца. У контрольних тварин так само й у ті ж терміни рану обробляли ізотонічним розчином хлориду натрію (концентрація 0,9%).

За тваринами спостерігали протягом трьох тижнів. Показниками дії аутосимбіонтних штамів аерококів служили:

1) кількість загиблих тварин;

2) інтенсивність прояву місцевих клінічних симптомів запалення, визначена під час огляду ран;

3) кількість псевдомонад, які містяться в рані.

Для статистичного аналізу використовували пакет прикладних програм Statistica 6.1 (StatSoft Inc., USA).

Результати та їх обговорення

Картина розвитку та перебігу хронічної синьогнійної інфекції представлена у трьох серіях дослідів. Наведені дані свідчать про розвиток синьогнійної інфекції з різним ступенем генералізації патологічного процесу з чітким проявом місцевих клінічних симптомів запалення. Повторне уведення культури синьогнійної палички в 17,1% випадків призвело до швидкого розвитку сепсису та загибелі мишей. Водночас, у 82,9% тварин розвивався місцевий запальний процес, переважно різко або помірно виражений (65,9%; P < 0,001), та доступний спостереженню протягом двох тижнів (табл. 2). І хоча рана до зазначеного терміну загоювалась, дуже часто в цій ділянці виявляли осумковані гнійні інфільтрати. Колонії *P. aeruginosa* виявлено у виділеннях рани аж до повного її загоєння, в максимальній кількості – на 5–6-ту добу спостереження. Отже, ця модель відтворює ранову форму синьогнійної інфекції, що дозволило використати її для оцінювання активності аутосимбіонтних штамів під час *A. viridans*-експериментального лікування синьогнійної інфекції, застосованих місцево.

Під час вивчення дії аутосимбіонтних штамів аерококів на моделі синьогнійної інфекції у тварин упродовж трьох тижнів установлено, що в контрольній групі нелікованих мишей частіше наставала загибель тварин від розвитку синьогнійного сепсису, і при цьому в більш ранні терміни (2–3-тя доба), ніж у дослідних – 29,2% випадків проти 0–5% (P < 0,05) (табл. 3).

Із даних таблиць 3 та 4 видно, що у більшості тварин дослідних груп уже з перших діб застосування аутосимбіонтних штамів аерококів перифокальне запалення було менш вираженим порівняно з контрольною групою мишей. Рани швидше очищалися від гною та покривалися сухим струпом. Наприклад, до 11-ї доби спостереження рани повністю гоїлися з відторгненням сухого струпа у 44 з 58 мишей, що вижили (75,9%).

Таблиця 2

Розвиток патологічного процесу в білих мишей за двократного інфікування рани псевдомонадами (абс.)

Серія експерименту	Загальна кількість тварин	Із них загинуло			Розвиток місцевих симптомів запалення у мишей, що вижили					Строки загоєння ран, доба
						інтенсивність запалення:				
		всього	3-тя доба	11-та доба	всього	++++	+++	++	+	
1	15	3	2	1	12	4	5	2	1	12–16
2	14	2	1	1	12	5	4	3	0	12–16
3	12	2	2	0	10	4	5	1	0	12–16
Усього (абс./%)	41/100	7/17,1	5/12,2	2/4,9	34/82,9	13/31,7	14/34,2	6/14,6	1/2,4	12–16

Примітки: інтенсивність місцевих клінічних симптомів: ++++ – гіперемія та набряк тканини, що оточує рану, різко виражені; рясне відокремлюване; +++ – гіперемія й набряк виражені помірно; менш рясне, серозне, геморагічне відокремлюване; ++ – гіперемія та набряк виражені слабко; поверхня рани покрита струпом; + – незначна гіперемія навколо рани, покритої сухим струпом.

Таблиця 3

Інтенсивність розвитку місцевих клінічних проявів запалення за синьогнійної інфекції у досліджуваних і контрольній групах тварин (абс./%) за застосування аутосимбіонтних штамів аерококів

Групи тварин	Кількість тварин	Загинуло	Розвиток гнійно-некротичного процесу з наступним видужанням					Кількість тварин зі строками загоєння ран на добу									
			усього	у тому числі з інтенсивністю													
				++++	+++	++	+	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
5м2015	20/100	–*	20/*100	10/50	6/30	2/10	2/10	9/*45	4/*20	2/10	1/5	–	1/5	2/10	1/5	–	–
3к2015	20/100	1/*5	19/*95	8/40	7/35	1/5	3/15	7/*35	4/*20	2/10	1/5	1/5	2/10	1/5	1/5	–	–
3ч2015	20/100	1/*5	19/*95	9/45	5/25	2/10	3/15	4/*20	4/*20	4/20	2/10	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	–
Контрольна	24/100	7/29,2	17/70,8	9/37,5	4/16,7	2/8,3	2/8,3	–	–	1/4,2	2/8,3	3/12,5	1/4,2	2/8,3	2/8,3	2/8,3	4/16,7
Усього	84/100	9/10,7	75/89,3	36/42,9	22/26,2	7/8,3	10/11,9	20/23,8	12/14,3	9/10,7	6/7,2	5/6,0	5/6,0	6/7,2	5/6,0	3/3,4	4/4,8

Примітки: див. табл. 2; * – P < 0,05 порівняно з контрольною групою (за двостороннім точним критерієм Фішера).

Таблиця 4

Lg числа синьогнійних паличок в перерахунку на 1 мл виділень рани (M ± m) та інтенсивність прояву місцевих клінічних симптомів запалення залежно від часу спостереження та групи тварин під час застосування аутосимбіонтних штамів аерококів

Групи тварин	Кількість тварин	Кількість діб після початку досліду															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
5м2015	20	5,22 ± 0,21 ++++	5,31 ± 0,25 +++	5,05 ± 0,22 +++	4,90* ± 0,28 +++	4,44* ± 0,19 +++	4,20* ± 0,26 +++	4,03* ± 0,17 +++	3,95* ± 0,21 +++	3,82* ± 0,14 ++	3,40* ± 0,13 ++	3,21* ± 0,17 +	3,12* ± 0,11 +	2,90* ± 0,14 ±	2,69* ± 0,12 ±	2,43* ± 0,10 –	2,24* ± 0,11 –
3к2015	20	5,52 ± 0,29 ++++	5,43 ± 0,22 +++	5,35 ± 0,27 +++	5,00* ± 0,24 +++	4,44* ± 0,22 +++	4,34* ± 0,23 +++	4,12* ± 0,25 +++	4,05* ± 0,20 +++	3,92* ± 0,16 ++	3,50* ± 0,19 ++	3,32* ± 0,15 +	3,22* ± 0,18 +	3,06* ± 0,21 ±	2,70* ± 0,15 ±	2,53* ± 0,14 –	2,47* ± 0,15 –
3ч2015	20	5,32 ± 0,34 ++++	5,47 ± 0,31 +++	5,45 ± 0,32 +++	5,10* ± 0,33 +++	4,74* ± 0,29 +++	4,34* ± 0,27 +++	4,25* ± 0,30 +++	4,08* ± 0,24 +++	3,96* ± 0,22 ++	3,57* ± 0,24 ++	3,43* ± 0,21 +	3,22* ± 0,23 +	3,10* ± 0,20 ±	2,88* ± 0,18 ±	2,62* ± 0,21 –	2,54* ± 0,17 –
Контрольна	24	5,62 ± 0,36 ++++	5,55 ± 0,34 ++++	5,48 ± 0,33 ++++	6,74 ± 0,31 ++++	6,54 ± 0,39 ++++	6,77 ± 0,43 ++++	6,54 ± 0,37 +++	6,30 ± 0,42 +++	6,02 ± 0,35 +++	5,97 ± 0,32 +++	5,63 ± 0,33 +++	5,89* ± 0,36 ++	5,22 ± 0,38 ++	5,12 ± 0,30 ++	4,63 ± 0,31 +	4,21 ± 0,28 +

Примітки: див. табл. 3.

У контрольній групі тварин до зазначеного терміну аналогічна картина спостерігалася лише у 3 з 17 мишей (17,6%; P < 0,001). Наведені в таблиці 4 результати свідчать, що незалежно від групи тварин у міру загоєння рани знижується забрудненість її синьогнійною паличкою. Водночас, кількість псевдомонад, що містяться у виділеннях ран дослідних груп мишей, починаючи вже з перших днів застосування аутосимбіонтних штамів аерококів, було на низькому рівні порівняно з контрольними тваринами. Якщо у лікованих мишей вже на 4-ту добу кількість синьогнійної палички (у перерахунку на 1 мл виділень із ран), виражена в логарифмах, склала в середньому 5,0 ± 0,16, то в контрольній групі така сама кількість псевдомонад (lg 5,22 ± 0,38; lg 5,12 ± 0,30) виявлялася в ранах лише на 13–14-ту добу спостереження.

У штаму аерококів, виділених від мишей (5м2015), були кращі показники одужання, динаміка розвитку місцевих клінічних симптомів запалення та кількість псевдомонад, які містилися у рані, порівняно з іншими аутоштамами аерококів, виділеними від щурів та людини. Це може свідчити про різну активність штамів і залежить від походження мікроорганізму та виду господаря. Аутосимбіонтні штами *A. viridans* мають вищі показники під час вивчення їх активності в умовах моделі синьогнійної інфекції у випадку лікування господаря та меншу активність в умовах лікування інших видів.

Висновки

Відтворено модель ранової форми синьогнійної інфекції, що дозволило використати її для оцінки активності аутосимбіонтних штамів аерококів: 5м2015 (виділений від мишей), 3к2015 (виділений від щурів), 3ч2015 (виділений від людини), застосованих місцево для експериментального лікування синьогнійної інфекції.

У контрольній групі нелікованих мишей достовірно частіше ставалася загибель тварин від розвитку синьогнійного сепсису та у більш ранні терміни (2–3-тя доба), ніж у дослідних.

У більшості тварин дослідних груп уже з перших днів застосування аутосимбіонтних штамів аерококів перифокальне запалення було менш вираженим порівняно з контрольною групою мишей.

У разі застосування штаму аерококів (5м2015), виділеного від мишей, у тварин були кращі показники одужання, динаміка розвитку місцевих клінічних симптомів запалення та кількість псевдомонад, які містилися у рані, порівняно з іншими аутоштамами аерококів, які виділені від щурів і людини.

Кількість псевдомонад, що містилися у виділеннях із ран дослідних груп мишей, починаючи з четвертої доби застосування аутосимбіонтних штамів аерококів, достовірно нижча порівняно з контрольними тваринами.

Виявлено різну активність штамів аерококів, яка залежить від походження мікроорганізму та виду господаря. Аутосимбіонти *A. viridans* мають вищі показники під час вивчення їх активності в умовах моделі синьогнійної інфекції у випадку лікування господаря та меншу активність в умовах лікування інших видів.

Отримані дані можуть служити підставою для подальшого вивчення застосування аутоштамів аерококів для лікувально-профілактичних заходів щодо боротьби з рановою інфекцією, викликаною псевдомонадами.

References

Campos Furtado, G. H., d'Azevedo, P. A., Santos, A. F., Gales, A. C., Campos Pignatari, A. C., & Servolo Medeiros, E. A. (2007). Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents, 30(4), 315–319.

Drinka, P., Bonham, P., & Crnich, C. J. (2012). Swab culture of purulent skin infection to detect infection or colonization with antibiotic-resistant bacteria. Journal of the American Medical Directors Association, 13(1), 75−79.

Gupta, A. K., Batra, P., Mathur, P., Karoung, A., Thanbuana, B. T., Thomas, S., Balamurugan, M., Gunjiyal, J., & Misra, M. C. (2015). Microbial epidemiology and antimicrobial susceptibility profile of wound infections in out-patients at a level 1 trauma centre. Journal of Patient Safety and Infection Control, 3(3), 126–129.

Hossam, M. (2016). One year prevalence of critically ill burn wound bacterial infections in surgical ICU in Egypt: Retrospective study. Egyptian Journal of Anesthesia, 32(3), 431–434.

Il'in, V. K., Suvorov, A. N., & Kirjuhina, N. V. (2013). Autoprobiotiki kak sredstvo profilakti kiinfekcionno-vospalitel'nyh zabolevanij u cheloveka v iskusstvennoj srede obitanija [Autoprobiotics as a prophylactic preparation for infectious–inflammatory diseases in humans in an artificial environment]. Vestnik RAMN, 2, 56–62 (in Russian).

Kremenchutskiy, G. N. (2001). Biological features of A-bacterin. Medichni Perspektivi, 6(3), 90–97 (in Russian).

Leaper, D., McBain, A. J., & Kramer, A. (2010). Healthcare associated infection: Novel strategies and antimicrobial implants to prevent surgical site infection. Annals of the Royal College of Surgeons of England, 92(6), 453–458.

Lytvyn, L., Quach, K., Banfield, L., Johnston, B. C., & Mertz, D. (2016). Probiotics and synbiotics for the prevention of postoperative infections following abdominal surgery: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Hospital Infection, 92(2), 130–139.

Marwick, C., Broomhall, J., & Mc Cowan, C. (2011). Severity assessment of skin and soft tissue infections: Cohort study of menegement and outcomes for hospitalized pations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66(2), 387−397.

Mc Cay, P. H., Ocampo-Sosa, A. A., & Fleming, G. T. (2010). Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. Microbiology, 156(1), 30–38.

Narendra, P. S., Mayuri, R., Kavita, G., Tanu, S., & Iqbal, R. K. (2017). Changing trends in antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates in a burn unit. Burns, 43(5), 1083–1087.

Nešpor, D., Fabián, J., & Němec, P. (2015). A retrospective analysis of deep sternal wound infections after longitudinal median sternotomy. Coret Vasa, 57(2), e75–e81.

Oliver, A., Mulet, X., Lopez-Causape, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updates, 21–22, 41–59.

Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. Endocrinología y Nutrición (English Edition), 63(9), 482–494.

Riou, M., Carbonnelle, S., Avrain, L., Mesaros, N., Pirnay, J., Bilocq, F., De Vos, D., Simon, A., Piérard, D., Jacobs, F., Dediste, A., Tulkens, P. M., Van Bambeke, F., & Glupczynski, Y. (2010). *In vivo* development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the lower respiratory tract of Intensive Care Unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonal therapy. International Journal of Antimicrobial Agents, 36(6), 513–522.

Shenderov, B. A. (2011). Probiotic (symbiotic) bacteria languages. Anaerobe, 17(6), 490–495.

Shumikhina, I., Sundukova, Z., Solovyeva, O., & Simanenkov, V. (2015). Su1381 autoprobiotic: Place in the prevention of postinfectious irritable bowel syndrome. Gastroenterology, 148(4), S-492.

Simanenkov, V., Suvorov, A., & Sundukova, Z. (2014). Tu1779 Personalized therapy of gastrointestinal diseases with symbiotic bacteria. Gastroenterology, 146(5), S-841.

Suárez, C., Peña, C., Gavaldà, L., Tubau, F., Manzur, A., Dominguez, M. A., Pujol, M., Gudiol, F., & Ariza, J. (2010). Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. International Journal of Infectious Diseases, 14, e73–e78.

Vil'canjuk, O. A., & Hutorjans'kij, M. O. (2012). Harakteristika zbudnykiv gnijno-zapal'nih procesiv m'jakih tkanin ta pisljaoperacijnih gnijnih uskladnen' u hvorih zagal'no-hirurgichnogo stacionaru [Characteristics of pathogens of pus-inflammatory processes in soft tissue and post-operational pus complications in patients of inflammatory-surgical stations]. Pitannja Hirurgichnoji Infekciji ta Antibiotikoterapiji, 53, 84−88 (in Ukrainian).

Wei, F., Fengjun, S., Qian, W., Wei, X., Xuewen, Q., Xiaotian, D., & Peiyuan, X. (2017). Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 8, 142–147.

Zhou, Z. Y., Hu, B. J., Gao, X. D., Bao, R., Chen, M., & Li, H. Y. (2016). Sources of sporadic *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in surgical ICUs: Association with contaminated sink trap. Journal of Infection and Chemotherapy, 22(7), 450–455.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 317–322
doi: 10.15421/021750

The impact of growth stimulators and retardants on the utilization of reserve lipids by sunflower seedlings

V. G. Kuryata, I. V. Poprotska, T. I. Rogach

Vinnytsya State Pedagogical University named after Mykhailo Kotsyubynsky, Vinnytsya

Article info

Received 24.05.2017
Received in revised form 23.06.2017
Accepted 28.06.2017

Vinnytsya State Pedagogical University named after Mykhailo Kotsyubynsky, Ostrozhskogo Str., 32, Vinnytsya, 21000, Ukraine. Tel.: +38-067-261-98-97. E-mail: i_poprotska@ukr.net

Kuryata, V. G., Poprotska, I. V., & Rogach, T. I. (2017). The impact of growth stimulators and retardants on the utilization of reserve lipids by sunflower seedlings. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 317–322. doi: 10.15421/021750

Using growth stimulators and anti-gibberillin preparations of different chemical compounds, we created different pressures in the coordinate covalent bond systems during germination of sunflower seeds. Using gibberellin and treptolem growth stimulators and Paclobutrazol and Chlormequat-Chlorid anti-gibberillin preparations is an efficient method of reconstructing coordinate covalent bond during the germination of seeds of oil-bearing crops. It allows determination of the role of the hormone factor in the utilization of reserve lipids over the heterotrophic phase of plant development. Blocking the synthesis of gibberellins by retardants caused decrease in activity of lipase, hydrolysis of reserve lipids and the meristem, which resulted in decrease in the energy of germination. Compared to the control, the impact of gibberellin increased the content of butyric acid, and the impact of Paclobutrazol reduced the content of butyric acid. Linoleic acid showed exactly the opposite changes. In relation to the control, a significant increase in the content of non-saturated linoleic acid was observed in both variants of the experiment. Gibberellic acid stimulated and Paclobutrazol slowed the usage of free higher fatty acids for the process of morphogenesis.

Keywords: *Helianthus annuus* L.; “source-sink” relations; retardants; hormonal regulation; germination of seeds

Вплив стимуляторів росту та ретардантів на утилізацію резервної олії проростками соняшнику

В. Г. Кур’ята, І. В. Попроцька, Т. І. Рогач

Вінницький державний педагогічний університет імені Михайла Коцюбинського, Вінниця, Україна

Створювали різне напруження в системі «донор – акцептор» у процесі проростання насіння соняшнику, використовуючи стимулятори росту та антигіберелінові препарати різної хімічної будови. Застосування стимуляторів росту гібереліну та трептолему та антигіберелінових препаратів паклобутразолу та хлормекватхлориду – ефективний прийом реконструкції донорно-акцепторних відносин у період проростання насіння олійних культур, що дозволяє встановити роль гормонального фактори в утилізації резервних ліпідів у гетеротрофну фазу розвитку рослини. Блокування синтезу гіберелінів ретардантами спричинило зниження активності ліпаз, гідролізу резервної олії, зниження активності меристем і відповідне зниження енергії проростання насіння. За дії гібереліну зростав, а за дії паклобутразолу зменшувався вміст олеїнової кислоти проти контролю, протилежні зміни відмічено для лінолевої кислоти. Суттєве зростання вмісту ненасиченої ліноленової кислоти відбувалося в обох варіантах досліду порівняно з контролем. Гіберелова кислота стимулювала, а ретардант паклобутразол уповільнював використання вільних вищих жирних кислот на процеси морфогенезу.

Ключові слова: *Helianthus annuus* L.; донорно-акцепторні відносини; ретарданти; гормональна регуляція; проростання насіння

Вступ

Розроблення способів регуляції донорно-акцепторної системи (система «source – sink») рослин має суттєве теоретичне та практичне значення, оскільки відкриває перспективи спрямованого перерозподілу потоків асимілятів до господарсько-цінних органів рослини. Нині у продукційному процесі рослин найкраще вивчені питання функціональної та регуляторної взаємодії фотосинтезу та росту (Kuryata, 2009; Kiriziy et al., 2014). Відповідно до сучасних уявлень вища рослина являє собою цілісну систему, де донор асимілятів – фотосинтетичні органи, перш за все листки, а інші частини рослини виступають як акцептор. Основні закономірності функціонування донорно-акцепторних відносин вивчають, в основному, під час аналізу співвідношення інтенсивності процесів росту та фотосинтезу, де процеси росту виступають як основний акцептор, а фотосинтез – як донор асимілятів (Kuryata and Polyvanyj, 2015; Rogach and Rogach, 2015; Yu et al., 2015; Kuryata et al., 2016; Rogach et al., 2016). Під асимілятами при цьому мають на увазі різні сполуки, асимільовані рослиною у процесі фотосинтезу вуглецю, у першу чергу транспортні та запасні форми вуглеводів – основу енергетичних і метаболічних процесів, а також «будівельний матеріал» у процесах росту та розвитку на всіх рівнях організації рослинного організму (Kiriziy et al., 2014). Виділяють три типи атрагувальних центрів, які відрізняються характером функ-

ціональної активності: точки росту, місця відкладання речовин у запас та місця активного метаболізму, причому встановлено, що існує позитивна кореляція між кількістю та активністю цих акцепторів і фотосинтезувальною активністю листків. Регуляція цих відносин як системи перерозподілу асимілятів між органами та тканинами рослини в онтогенезі може здійснюватися на всіх рівнях організації за участі різних механізмів (Mohammad and Mohammad, 2013; Ljung et al., 2015; Savage et al., 2015; Sugiura et al., 2015; Bonelli et al., 2016).

У практичному плані для оптимізації ростових процесів і продуктивності рослин застосовують синтетичні регулятори росту, в тому числі ретарданти (Ramburan and Greenfield, 2007; Kumar et al., 2012; Tae-Yun and Jung-Hee, 2012; Pavlista, 2013; Yan et al., 2013; Sang-Kuk and Hak-Yoon, 2014; Sardoei et al., 2014; Yan et al., 2015; Panyapruek et al., 2016; Wang et al., 2016). Разом із цим, значно менше інформації про функціонування цієї системи в гетеротрофну фазу розвитку рослини (період проростання насіння, бульб, кореневищ, цибулин). У цей період відбувається використання на потреби морфогенезу депонованих в органах запасання резервних сполук різної хімічної будови (вуглеводів, азотумісних сполук і олії). Існуюча інформація свідчить про можливість регуляції швидкості утилізації резервних сполук на потреби росту та розвитку зовнішніми та внутрішніми чинниками.

Швидкість росту стебла залежить від меристематичної активності субапікальної зони, яка значною мірою контролюється гіберелінами (Minguet et al., 2014; Hedden and Thomas, 2016). Фотоморфогенез (розвиток на світлі) та скотоморфогенез (розвиток у темряві) потребують різного рівня забезпечення пластичними речовинами (Golovatskaya and Karnachuk, 2007; Kutschera and Briggs, 2013; Wu, 2014; Franklin, 2016; Poprotska and Kuryata, 2017). Посилення ростової функції паростками картоплі у темряві супроводжується підвищенням активності амілази та інтенсивнішим використанням запасного крохмалю бульб (Rogach et al., 2016). Серед внутрішніх факторів регуляції напруження донорно-акцепторних відносин ключову роль відіграє гормональна система. Фітогормони включені в систему трансдукції світлового сигналу (Hornitschek et al., 2012; Zhang et al., 2014; Humplík et al., 2015; De Wit and Pierik, 2016; Van Hook, 2016). Зокрема, за дії світла змінюється метаболізм і чутливість рослин до гіберелінів (Zhang et al., 2014). Проростання насіння та органів запасання, які містять як основну резервну речовину крохмаль, супроводжується ініційованим гібереліном синтезом *de novo* та виділенням зародком в ендосперм чотирьох ізоферментів α-амілази, що викликає розщеплення крохмалю у крохмальних зернах. Застосування екзогенного гібереліну також спричиняє посилення цих процесів та стимуляцію росту проростка. З іншого боку, застосування інгібіторів росту – ретардантів, які за механізмом дії – антигібереліни, дозволяє зменшити «запит» на асиміляти внаслідок блокування синтезу гіберелінів, активності амілазного комплексу та зниження інтенсивності функціонування меристем.

Четвертинні амонієві, фосфонієві та сульфонієві солі (АМО 1618, ССС, ДХІБ, фосфон D) переривають біосинтез гіберелінів в одній ланці цього процесу, а основа сильнішої рістгальмівної дії триазолпохідних ретардантів (паклобутразолу, уніконазолу, BAS 111 тощо) – блокування ферментів синтезу гіберелінів на трьох етапах. Ці дані підтверджуються тим, що ретардантні ефекти дії четвертинних та триазолових сполук усуваються введенням екзогенної гіберелової кислоти (Kuryata, 2009). Таким чином, з'являється можливість, використовуючи під час проростання насіння екзогенний стимулятор росту (гіберелін або ретардант), змінювати напруженість донорно-акцепторних відносин у рослині шляхом стимулювання або інгібування інтенсивності росту проростка. Зокрема, вивчення впливу гібереліну та антигіберелінового препарату хлормекватхлориду на газообмін та використання резервних сполук у проростків гарбуза у процесі проростання на світлі та у темряві показало, що за умов скотоморфогенезу у проростків гарбуза посилення або гальмування росту спричинило підвищення інтенсивності дихання. У випадку перемикання типу живлення на світлі з гетеротрофного на автотрофний обробка гібереліном збільшувала частку асиміляційних процесів у вуглекислотному газообміні проростків, а гальмування росту ретардантом спричинювало збільшення дихальних витрат.

Формування проростками «запиту» на резервні асиміляти з сім'ядоль великою мірою визначається зміною активності субапікальних меристем, що проявляється у прискоренні проростання насіння, посиленні гістогенезу за дії гібереліну та послаблення цих процесів за впливу ретарданту (Poprotska and Kuryata, 2017).

Швидкість росту стебла залежить від меристематичної активності субапікальної зони, яка значною мірою контролюється гіберелінами. Встановлено тісний зв'язок між змінами ростових характеристик за дії ретардантів і активністю гормону: за впливу паклобутразолу, хлормекватхлориду та декстрелу відмічено зменшення активності вільних гіберелінів у пагонах малини в умовах вегетаційного та польового дослідів, у той час як уведення екзогенної гіберелової кислоти суттєво підвищувало їх активність у тканинах стебла. Разом із цим, зводити ростову реакцію рослин лише до вмісту та активності гіберелінів було б, на нашу думку, неправильним, оскільки вирішальну роль відіграє баланс, співвідношення та послідовність дії різних груп фітогормонів.

Застосування різних груп ретардантів за гальмування росту пагонів малини суттєво зменшило вміст вільної індолілоцтової кислоти (Kuryata, 2009). Відмічалися також зміни у співвідношенні зеатинрибозиду та зеатину за дії паклобутразолу у бік менш активної, транспортної форми гормону (зеатинрибозиду). Застосування хлормекватхлориду та паклобутразолу впливало не лише на активність фітогормонів – стимуляторів росту, а і на вміст абсцизової кислоти (АБК) у пагонах рослин – зростав уміст вільної форми фітогормону. При цьому застосування етиленпродуцента декстрелу, який не впливає на синтез гібереліну, а блокує активність уже синтезованого гормону, значно менше впливало на вміст АБК. Збільшення вмісту АБК у тканинах рослин у період активного росту за дії хлормекватхлориду та паклобутразолу за одночасного зменшення вмісту гіберелінів пояснюється тим, що синтез абсцизової кислоти та гіберелінів – гілки єдиного шляху утворення терпенів, і в обох випадках їх синтез іде через мевалонову кислоту. У метаболізмі рослини існує метаболічне розгалуження, на кінцях якого утворюються гібереліни та абсцизова кислота. У цих умовах застосування ретардантів спричиняє зміщення синтезу терпенів у бік синтезу сексвітерпенів – АБК. Такі зміни у синтезі гормонального комплексу у період проростання викликають відповідні зміни співвідношення стимулятори / інгібітори росту та гальмування ростових процесів. При цьому порівняльний вплив стимуляторів росту та ретардантів на ріст проростків і особливості використання резервної олії насіння олійних культур під час проростання, на відміну від насіння злакових, які містять резервний крохмаль, вивчено недостатньо.

У зв'язку із цим, мета цієї статті – встановити особливості використання резервних ліпідів насіння соняшнику під час моделювання різного напруження донорно-акцепторних відносин за впливу стимуляторів росту гіберелової кислоти та трептолему та інгібіторів росту хлормекватхлориду та паклобутразолу.

Матеріал і методи досліджень

Для впливу на інтенсивність проростання насіння соняшнику в різних варіантах досліду застосовували обробку стимуляторами росту гібереловою кислотою ($ГК_3$) і трептолемом, а також інгібіторами росту хлормекватхлоридом (ССС) і паклобутразолом (P_{333}). У статті описано такі препарати (Grytsayenko et al., 2008; Kuryata, 2009).

Гіберелова кислота ($C_{19}H_{22}O_6$) – біла кристалічна речовина з молекулярною масою 346,2 Да. Температура плавлення 227 °C. Речовина погано розчинна у воді та добре розчинна в органічних розчинниках. Гіберелова кислота малотоксична сполука, належить до 3-го класу токсичності. $ЛД_{50}$ для щурів – 15 630 мг/кг.

Трептолем – комплексний препарат 2,6-диметилпіридин-1-оксиду з бурштиновою кислотою (50 г/л) та Емістиму С (1 г/л).

До препарату у складі Емістиму С входять також фітогормони гіберелінової, ауксинової, цитокінінової природи, амінокислоти, вуглеводи, мікроелементи, отримані шляхом культивування грибів – ендофітів із кореневої системи рослин на штучному живильному середовищі.

Хлормекватхлорид (β-хлоретилтриметиламонійхлорид) – похідна четвертинних амонієвих солей. Це біла кристалічна речовина, молекулярна маса – 158,1 Да, температура розкладання – 300 ºС, розчинність у воді – 74% при 20 ºС. Добре розчиняється у спиртах, ацетоні та погано у вуглеводнях. $ЛД_{50}$ для білих пацюків – 600–700 мг/кг, малотоксичний для риб. Препарат малотоксичний, не виявляє канцерогенних і бластомогенних властивостей, не акумулюється і не розкладається в організмі, через 48 годин виводиться з нього. Період напіврозпаду у ґрунті, залежно від температури та вологості ґрунту, становить 3–48 діб. Паклобутразол ($Р_{333}$) – 4,4-диметил-1-(1,2,4-триазоліл-1)-1-(4-хлорфеніл)пентанол-3, похідна 1,2,4-триазолу. Характеризується низькою розчинністю у воді – 0,035 г/л, температура плавлення 165–166 ºС. $ЛД_{50}$ для білих пацюків 1356–1953 мг/кг. Висока активність паклобутразолу пов'язана зі стабільністю його молекули.

Насіння соняшника гібриду Світоч і сорту Флагман замочували розчинами препаратів у чашках Петрі на фільтрувальному папері розчинами препаратів – гіберелової кислоти ($ГК_3$, 150 мг/л), трептолему (0,033 мл/л), хлормекватхлориду (ССС, 1% водний розчин) і паклобутразолу (0,05% водний розчин) і пророщували за 20 ºС у термостаті. Контрольний варіант пророщували на дистильованій воді. Біологічна повторність досліджень п'ятиразова. На третю добу пророщування визначали енергію проростання. Оскільки інтенсивний гідроліз олії в насінні соняшнику відбувається з шостої по дванадцяту добу, на шосту добу проростки фіксували за 105 ºС та досушували за 65 ºС до повітряно-сухого стану для наступного аналізу вмісту олії та кількісного аналізу вмісту вищих жирних кислот у ній. У проростаючому насінні соняшнику на шосту добу визначали активність кислих і лужних ліпаз методом титрування. Для створення слабкого кислого середовища використовували ацетатний буфер із pH 4,7, а для створення лужного середовища – боратний буфер із pH 8,5. Для оцінювання можливої присутності крохмалю проводили якісну реакцію з реактивом Люголя. Загальний вміст олії в насінні визначали методом екстракції в апараті Сокслета, як органічний розчинник використовували петролейний ефір із температурою кипіння 40–65 ºС. У зразках виділеної олії визначали її якісні характеристики: кислотне число, число омилення, ефірне число (AOAC, 2010). Аналітична повторність досліджень – п'ятиразова.

Вміст і якісний склад вищих жирних кислот (ВЖК) визначали методом газової хроматографії на хроматографі «Кристал-2000» фірми Хроматек (Росія). Умови хроматографування: скляні колонки розміром 1 500 x 2 мм, заповнені сорбентом інтертоп-супер +5% неоплекс 400, зернистість сорбенту 0,16–0,20 мм. Газ-носій – азот, швидкість проходження газу – 70 мл/хв. Температура колонки – 200 ºС, випаровувача – 230 ºС, полум'яно-іонізаційного детектора – 240 ºС.

Результати досліджень обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). У таблицях і на рисунках наведено середньоарифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати

Пізнання механізмів утилізації резервних ліпідів важливе для розуміння функціонування донорно-акцепторної системи рослин у гетеротрофний період розвитку, оскільки саме ліпіди відкладаються як основна резервна речовина насіння у 75% видів квіткових рослин. Гідроліз резервних ліпідів здійснюється за впливу ліпаз (КФ 3.1.1.3), які розщеплюють триацилгліцериди на гліцерин та вищі жирні кислоти. Ці продукти гідролізу можуть перетворюватися на глюкозу у процесах глюконеогенезу, внаслідок чого забезпечуються процеси органо- та гістогенезу проростків. Різне напруження донорно-акцепторних відносин між зоною депонування резервних сполук і зоною росту проростка створювали в експерименті, використовуючи стимулятори росту (гіберелова кислота, трептолем) та інгібітори росту ретарданти хлормекватхлорид і паклобутразол, що спричинило зміни швидкості проростання насіння та, відповідно, використання різної кількості основної резервної речовини. Результати дослідження свідчать, що застосування гіберелової кислоти, синтетичного стимулятора росту трептолему та інгібіторів росту хлормекватхлориду та паклобутразолу викликало зміни ліпідного обміну проростків та швидкості їх проростання (табл. 1). На третю добу пророщування насіння енергія проростання за дії гібереліну та трептолему достовірно не відрізнялася від контролю. Разом із цим, застосування інгібіторів росту хлормекватхлориду та паклобутразолу в обох сортів соняшнику викликало суттєве її зниження.

Таблиця 1

Дія стимуляторів росту та ретардантів на інтенсивність проростання, вміст і якісні характеристики олії у проростках соняшнику (n = 5)

Об'єкт	Варіант досліду	Енергія проростання, %	Вміст олії, % на масу сухої речовини	Активність кислих ліпаз, мл 0,1 N NaOH/г	Активність лужних ліпаз, мл 0,1 N NaOH/г
Сорт Флагман	контроль	74,0 ± 1,4	48,5 ± 0,5	2,3 ± 0,1	3,6 ± 0,2
	трептолем	75,3 ± 3,4	46,2 ± 1,5	3,9 ± 0,2*	4,0 ± 0,2
	ССС	60,7 ± 2,2*	49,1 ± 0,6	1,0 ± 0,1*	2,1 ± 0,1*
Гібрид Світоч	контроль	99,4 ± 1,3	43,2 ± 0,5	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1
	ГК	99,8 ± 1,1	42,9 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1
	$Р_{333}$	93,6 ± 1,2*	47,9 ± 0,3*	1,3 ± 0,1*	1,5 ± 0,1*

Примітка: * – різниця достовірна за $P < 0,05$.

Аналіз вмісту олії у проростках на шостий день пророщування насіння по варіантах досліду свідчить про значне його зменшення в контролі, за впливу застосованих стимуляторів росту, і вищий вміст олії за дії хлормекватхлориду та паклобутразолу. Це – показник уповільнення утилізації резервних ліпідів під час проростання насіння за дії ретардантів. Використання резервної олії у період проростання насіння олійних культур відбувається за участі ліпаз. Ліпази синтезуються на мембранах ендоплазматичного ретикулюму та переносяться у вигляді секреторних пухирців до сферосом сім'ядоль, де після руйнування мембрани кисла ліпаза розщеплює тригліцериди до гліцерину та вищих жирних кислот. З іншого боку загальновідомо, що розщеплення ліпідів може відбуватися за впливу лужних ліпаз у гліоксісомах. Аналіз активності кислих і лужних ліпаз по варіантах досліду свідчить про вищу їх активність за дії гіберелової кислоти та трептолему, та зниження активності цих ферментів за впливу обох ретардантів (рис. 1). Привертає увагу той факт, що інтенсивність проростання у контролі та у процесі застосування стимуляторів росту достовірно не відрізнялася. На нашу думку, це свідчить про достатнє забезпечення процесу проростання насіння соняшнику синтезованими ендогенними гіберелінами, у зв'язку з чим додаткове застосування екзогенних стимуляторів мало впливало на процес. Аналогічна ситуація відмічалася для вмісту резервної олії по цих варіантах досліду – різниця була мінімальною. Разом із тим, застосування ретардантів четвертинної аміачної солі хлормекватхлориду та триазолпохідного препарату паклобутразолу викликало блокування синтезу ендогенних гіберелінів, що, на нашу думку, спричинило уповільнення процесу проростання та використання резервних

ліпідів. Відомо, що і четвертинні амонієві сполуки, і триазолпохідні препарати інгібують синтез гіберелінів, причому чим більше ланок біосинтезу гіберелінів вони блокують, тим вища їх активність. Так, четвертинні амонієві сполуки (ССС, фосфон Д, АМО-1618) інгібують активність ент-каурен-синтази під час утворення копалілпірофосфату з геранілгераніолдифосфату, а паклобутразол перериває синтез гібереліну зразу у трьох точках, із чим пов'язана його вища активність (Kuryata, 2009).

Застосування гістохімічної реакції з реактивом Люголя на крохмаль свідчило про відсутність цього полісахариду в проростаючому насінні. Отже, для культури соняшнику посилення проростання не супроводжується синтезом амілаз *de novo*, що характерно для злакових культур. Дозрівання та проростання насіння олійних культур супроводжуються суттєвими якісними змінами складу вищих жирних кислот, хоча послідовність їх перетворення під час проростання насіння залишається значною мірою невідомою. Аналіз низки якісних характеристик олії, виділеної з насіння на 6-ту добу проростання по варіантах досліду, дає можливість оцінити загальну спрямованість процесів, які супроводжують проростання насіння соняшнику. Зокрема, за дії $ГК_3$ і різних типів ретардантів відбувалися зміни кислотного, лужного та ефірного чисел олії порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2
Дія $ГК_3$ і паклобутразолу на якісні характеристики олії насіння соняшнику гібриду Світоч (6-а доба проростання, n = 5)

Показник	Контроль	$ГК_3$, 150 мг/л	Паклобутразол, 0,05%
Кислотне число, мг КОН/г олії	4,1 ± 0,2	3,9 ± 0,1	3,6 ± 0,2
Число омилення, мг КОН/г олії	172,2 ± 7,0	189,7 ± 4,2*	177,3 ± 5,1
Ефірне число, мг КОН/г олії	168,1 ± 6,8	185,8 ± 4,1*	173,7 ± 4,9
Йодне число, г I/100 г олії	118,3 ± 1,3	128,6 ± 2,4*	121,5 ± 2,1

Примітка: * – різниця достовірна за P < 0,05.

Кислотне число характеризує кількість вільних вищих жирних кислот в олії. Отримані дані свідчать, що за впливу ретарданту паклобутразолу вміст вільних жирних кислот в олії був меншим, ніж у варіанті з $ГК_3$ і контролі. Це дозволяє зробити висновок про повільніший гідроліз олії запасних тканин насіння за дії цього рістінгібувального препарату.

Число омилення найбільше саме у варіанті із застосуванням гіберелової кислоти, а вище значення ефірного числа в олії за дії $ГК_3$ свідчить, очевидно, про уповільнене використання гліцерину на утворення цукрів у проростаючому насінні на перших етапах розвитку, ніж використання для цього жирних кислот.

Показник вмісту ненасичених ВЖК в олії – йодне число. За дії препаратів відбуваються зміни цього показника: на 6-ту добу проростання йодне число зростає у варіантах із застосуванням як гіберелової кислоти, так паклобутразолу, що свідчить про відповідне підвищення вмісту ненасичених ВЖК в олії.

Повніше уявлення про особливості складу соняшникової олії за дії препаратів може дати хроматографічне дослідження її жирнокислотного складу. Застосування ретардантів у період бутонізації спричиняє зміни профілю жирних кислот і співвідношення ненасичених і насичених жирних кислот у насінні олійних культур. Зокрема, відмічено збільшення у соняшниковій, ріпаковій, соєвій, лляній оліях зазначеного співвідношення за дії ретардантів, що корелює зі збільшенням показників йодного числа. У сої це співвідношення змінюється через збільшення вмісту незамінної лінолевої та зменшення пальмітинової та стеаринової кислот. У рослин соняшнику – те ж за рахунок лінолевої кислоти (Kuryata and Poprotska, 2016).

У рослин льону олійного за дії хлормекватхлориду достовірно зростав вміст олеїнової та ліноленової кислот (Kuryata and Khodanitska, 2012). Разом із цим, у рослин маку олійного вміст насичених і ненасичених жирних кислот не змінюється (Kuryata and Polyvanyi, 2015). Одне з важливих практичних завдань – зменшення в олії вмісту ліноленової кислоти, яка під час зберігання надає їй гіркого смаку. Ретарданти викликали зменшення вмісту цієї кислоти в ріпаковій олії, яке супроводжувалося, як правило, зростанням вмісту лінолевої кислоти (Kuryata and Poprotska, 2016). Питання утилізації ВЖК на потреби формування проростка в гетеротрофну фазу розвитку вивчені значно менше.

У зразках соняшникової олії насіння сорту Світоч на шосту добу проростання присутні 9 вищих жирних кислот: міристинова, стеаринова, пальмітинова, пальмітолеїнова, олеїнова, лінолева, ліноленова, арахінова та бегенова. Серед ненасичених ВЖК домінували олеїнова та лінолева кислоти, серед насичених – пальмітинова кислота. Застосування гіберелової кислоти та паклобутразолу зумовило зміни вмісту цих кислот в олії (табл. 3).

Таблиця 3
Вплив гіберелової кислоти та паклобутразолу на жирнокислотний складі олії насіння сорту Світоч під час проростання (% на сиру речовину, n = 5)

Назва кислоти	Контроль	Гіберелова кислота	Паклобутразол
Міристинова	0,25 ± 0,002	0,16 ± 0,001*	0,15 ± 0,002*
Стеаринова	4,05 ± 0,06	4,41 ± 0,04*	4,02 ± 0,05*
Пальмітинова	7,15 ± 0,10	5,94 ± 0,15*	6,77 ± 0,11*
Пальмітолеїнова	0,05 ± 0,001	0,04 ± 0,001*	0,05 ± 0,002
Олеїнова	35,18 ± 0,15	35,69 ± 0,11*	34,29 ± 0,06*
Лінолева	52,55 ± 0,25	52,19 ± 0,09	53,17 ± 0,06*
Ліноленова	0,36 ± 0,005	1,13 ± 0,002*	1,16 ± 0,004*
Арахінова	0,20 ± 0,003	0,22 ± 0,005*	0,19 ± 0,005
Бегенова	0,21 ± 0,002	0,22 ± 0,001*	0,20 ± 0,002*
Сума ненасичених кислот	88,1	89,1	88,7
Сума насичених кислот	11,9	10,9	11,3
Співвідношення ненасичені / насичені кислоти	7,4	8,1	7,8

Примітка: * – різниця достовірна за P < 0,05.

За дії гібереліну зростав, а за дії паклобутразолу зменшувався вміст олеїнової кислоти проти контролю та протилежні зміни відмічалися для лінолевої кислоти. Суттєве зростання вмісту ненасиченої ліноленової кислоти відбувалося також в обох варіантах досліду проти контролю. Відповідно змінювалося співвідношення ненасичені / насичені ВЖК у процесі проростання за дії препаратів. В обох варіантах досліду відбувалося підвищення цього показника. Отже, застосування екзогенного гібереліну та антигіберелінового препарату паклобутразолу викликає суттєві зміни у використанні резервної олії та її жирнокислотного складу у період проростання насіння соняшнику.

Обговорення

Застосування регуляторів росту з протилежним механізмом дії для створення різного напруження донорно-акцепторних відносин у рослині дозволяє проаналізувати особливості перерозподілу асимілятів і депонованих в органах запасу резервних речовин на різних етапах онтогенезу. Такий підхід у першу чергу дозволяє штучно перерозподіляти потоки продуктів фотосинтезу до господарсько-цінних органів, тобто оптимізувати продукційний процес рослин сільськогосподарських культур (Kuriata et al., 2016). Застосування ретардантів дозволяє також забезпечити зберігання продукції. Зокрема, обробка бульб картоплі паклобутразолом, хлормекватхлоридом суттєво гальмує проростання, що сприяє збереженню продукції (Rogach et al., 2016).

Застосування цього підходу у гетеротрофну фазу розвитку (у період проростання) дозволяє визначити ефективність використання запасних речовин у насінні з різним типом резервних сполук (крохмалю, білків та олії) встановити можливі регуляторні механізми цього процесу. Існує тісний зв'язок між змінами ростових характеристик за дії ретардантів і активністю гіберелінів. Зокрема, за впливу паклобутразолу, хлормекватхлориду та декстрелу відмічено значне зменшення активності вільних гіберелінів

у пагонах малини в умовах вегетаційного та польового дослідів, у той час як уведення екзогенної гіберелової кислоти суттєво підвищувало їх активність у тканинах стебла (Kuryata, 2009). Раніше нами було встановлено, що ріст проростків гарбуза пригнічувався на світлі, однак обробка проростків гібереловою кислотою значно знімала ефект, викликаний світлом.

У разі зменшення синтезу гібереліну за впливу ретарданту рістгальмівний ефект світла посилювався, що свідчить про те, що гібереліни – активні модифікатори фоторецепторної системи рослин (Poprotska and Kuryata, 2017). Формування проростками «запиту» на резервні асиміляти із сім'ядоль великою мірою визначається зміною активності субапікальних меристем, що проявляється у прискоренні проростання насіння, посиленні гістогенезу за дії гібереліну та послаблення цих процесів за дії ретарданту. Отримані результати щодо визначення вмісту різних форм азоту та олії в сім'ядолях гарбуза свідчать, що гібереліни – важлива ланка унікального регуляторного механізму мобілізації резервних речовин у насінні, яке проростає, незалежно від їх хімічної природи (Kuryata and Poprotska, 2016).

Особливості утилізації резервної олії, вищих жирних кислот за умов прискорення або уповільнення проростання насіння олійних культур за дії гібереліну та антигіберелінових препаратів потребують поглибленого вивчення. Отримані результати свідчать, що насіння соняшнику під час проростання достатньо забезпечене ендогенними гіберелінами, внаслідок чого додаткова обробка його гібереловою кислотою та трептолемом не спричиняла суттєвого прискорення проростання. Утилізація резервної олії в контролі та за дії стимуляторів росту відбувалася суттєво інтенсивніше, ніж у варіантах із застосуванням ретардантів хлормекватхлориду та паклобутразолу. На нашу думку, інгібування проростання та використання резервної олії на процеси морфогенезу за дії ретардантів визначалася саме блокуванням ними синтезу ендогенних гіберелінів. Дефіцит гормону спричинив зменшення гідролітичної активності резервних тканин внаслідок інгібування синтезу ліпаз і активності меристем проростків, тобто обмежувалася активність як донорної, так і акцепторної сфери рослини.

Отримані результати свідчать, що різниця в умісті олії в період проростання насіння за дії стимуляторів росту та контролю була меншою, ніж за дії ретардантів. Аналогічну закономірність спостерігалися під час вивчення проростання насіння гарбуза за дії гібереліну та хлормекватхлориду. Пояснення цьому факту полягає в тому, що у період проростання використовуються також інші сполуки, у першу чергу резервні азотумісні речовини (Poprotska and Kuryata, 2017). Проростання насіння гарбуза супроводжується не лише використанням резервної олії та азотумістних сполук, а й суттєвою перебудовою полісахаридного комплексу клітинних стінок. При цьому можливе використання як резервної речовини пентозанів клітинних стінок, відбувається зміна конформації та часткове збільшення молекулярної маси пектинів. Процес посилюється під час скотоморфогенезу внаслідок інтенсивного росту проростків за відсутності автотрофного живлення та, як наслідок, глибшої утилізації резервів донора пластичних речовин – сім'ядоль (Poprotska, 2014).

Результати свідчать, що за дії антигіберелінового препарату паклобутразолу змінюються якісні показники олії: зменшується кислотне число, число омилення та ефірне число порівняно із застосуванням гіберелової кислоти. На нашу думку, це – свідчення того, що інгібування синтезу гіберелінів за дії ретарданту викликає зменшення загальної кількості вільних ВЖК в олії, уповільнення процесів їх окиснення та інтенсивніший глюконеогенез гліцерину. Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот в олії проростаючого насіння за дії гіберелової кислоти та паклобутразолу порівняно з контролем можна пояснити різною інтенсивністю використання окремих кислот на процеси морфогенезу та процеси десатурації. На нашу думку, зростання частки ненасичених ВЖК в олії проростка за дії гіберелової кислоти може відбуватися за рахунок часткової десатурації насичених кислот. На таку можливість збільшення вмісту ненасичених жирних кислот в олії вказує Bezdudnaya (2005) під час вивчення змін жирнокислотного складу олії у процесі проростання насіння сої. Вищий вміст ненасичених ВЖК в олії проростків соняшнику за дії паклобутразолу можливо пояснити уповільненням використання ненасичених кислот у процесах морфогенезу, оскільки вміст олії у проростках цього варіанта значно вищий (табл. 1), ніж у контролі та варіанті із застосуванням гіберелової кислоти.

Висновки

Застосування стимуляторів росту та антигіберелінових препаратів (ретардантів) – ефективний прийом штучної реконструкції донорно-акцепторних відносин у період проростання насіння олійних культур, що дозволяє встановити роль гормонального фактора в утилізації резервних ліпідів у гетеротрофну фазу розвитку рослини. Встановлено відсутність резервного крохмалю під час проростання насіння соняшнику. Блокування синтезу гіберелінів ретардантами спричинило зниження активності кислих і лужних ліпаз, уповільнення гідролізу резервної олії, суттєвих змін кислотного числа та числа омилення, йодного числа в олії під час проростання, зниження активності меристем і відповідне зниження енергії проростання насіння. Дія гіберелової кислоти та трептолему протилежна. У зразках соняшникової олії насіння сорту Світоч на шосту добу проростання присутні дев'ять вищих жирних кислот (міристинова, стеаринова, пальмітинова, пальмітолеїнова, олеїновіа, лінолева, ліноленова, арахінова та бегенова). За дії гібереліну зростав, а за дії паклобутразолу зменшувався вміст олеїнової кислоти проти контролю та протилежні зміни відмічалися для лінолевої кислоти. Суттєве зростання вмісту ненасиченої ліноленової кислоти відбувалося в обох варіантах досліду проти контролю. Гіберелова кислота стимулювала, а ретардант паклобутразол уповільнював використання вільних вищих жирних кислот на процеси морфогенезу.

References

AOAC (2010). Official methods of analysis of association of analytical chemist international. 18th ed. Rev. 3.2010. Asso. of Analytical Chemist. Gaithersburg, Maryland, USA.

Bezdudnaya, E. F. (2005). Dinamika lipidov v semenah i prorostkah soi pri prorastanii [Lipid dynamics in soya seeds and seedlings during germinating]. Visnyk Kharkivskogo Natsionalnogo Universytetu imeni V. N. Karazina. Seriya: Biologiya, 709, 22–27 (in Russian).

Bonelli, L. E., Monzon, J. P., Cerrudo, A., & Rizzalli, R. H., Andrade, F. H. (2016). Maize grain yield components and source-sink relationship as affected by the delay in sowing date. Field Crops Research, 198, 215–225.

De Wit, M., & Pierik, R. (2016). Photomorphogenesis and Photoreceptors. Canopy Photosynthesis: From Basics to Applications, 42, 171–186.

Franklin, K. A. (2016). Photomorphogenesis: Plants feel blue in the shade. Current Biology, 26(24), R1275–R1276.

Golovatskaya, I. F., & Karnachuk, R. A. (2007). Dinamika rosta rastenij i soderzhanie endogennyh fitogormonov v processe skoto- i fotomorfogeneza fasoli [Dynamics of growth and the content of endogenous phytohormones during kidney bean scoto- and photomorphogenesis]. Fiziologija Rastenij, 54(3), 461–468 (in Russian).

Grytsayenko, Z. M., Ponomarenko, S. P., Karpenko, V. P., & Leontiuk, I. B. (2008). Biologichno aktyvni rechovyny v roslynnyctvi [Biologically active substances in plant growth]. NICHLAVA, Kyiv (in Ukrainian).

Hedden, P., & Thomas, S. G. (2016). Annual Plant Reviews. Vol. 49. The Gibberellins. John Wiley & Sons.

Hornitschek, P., Kohnen, M. V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. The Plant Journal, 71(5), 699–711.

Humplík, J. F., Turečková, V., Fellner, M., & Bergougnoux, V. (2015). Spatio-temporal changes in endogenous abscisic acid contents during etiolated growth and photomorphogenesis in tomato seedlings. Plant Signaling and Behavior, 10(8), e1039213.

Kumar, S., Sreenivas, G., Satyanarayana, J., & Guha, A. (2012). Paclobutrazol treatment as a potential strategy for higher seed and oil yield in field-grown *Camelina sativa* L. Crantz. BSK Research Notes 5(1), 13.

Kuriata, V. G., Rohach, V. V., Rohach, T. I., & Khranovska, T. V. (2016). The use of antigibberelins with different mechanisms of action on morphogenesis and

production process regulation in the plant *Solanum melongena* (Solanaceae). Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 230–234.

Kuryata, V. G., & Khodanitska, O. O. (2012) Osoblyvosti morfogenezu i produkcijnogo procesu l'onu-kucherjavcju za dii' hlormekvathlorydu i treptolemu [Peculiarities of morphogenesis and production process of *Linum usitatissimum* var. *humile* (Mill.) Pers. plants under the effect of chlormequat-chloride and treptolem]. Fiziologiya i Biohimiya Kul'turnikh Rasteniy, 44(6), 522–528 (in Ukrainian).

Kuryata, V. G., & Polyvanyi, S. V. (2015). Potuzhnist' fotosyntetychnogo aparatu ta nasinnyeva produktyvnist' maku oliynogo za dii' retardantu folikuru [Effect of retardant folicur on photosynthetic apparatus and seed productivity of oil poppy]. Fiziologiya Rasteniy i Genetika, 47(4), 313–320 (in Ukrainian).

Kuryata, V. G., & Poprotska, I. V. (2016). Fiziologichni osnovy zastosuvannja retardantiv na olijnyh kul'turah [The physiological basics of application of retardants to oilseeds]. Fiziologiya Rasteniy i Genetika, 48(6), 475–487 (in Ukrainian).

Kutschera, U., & Briggs, W. R. (2013). Seedling development in buckwheat and the discovery of the photomorphogenic shade-avoidance response. Plant Biology, 15(6), 931–940.

Ljung, K., Nemhauser, J. L., & Perata, P. (2015). New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. Current Opinion in Plant Biology, 25, 130–137.

Matysiak, K., & Kaczmarek, S. (2013). Effect of chlorocholine chloride and triazoles – tebuconazole and flusilazole on winter oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) in response to the application term and sowing density. Journal of Plant Protection Resesrch, 53(1), 79–88.

Minguet, E. G., Alabadi, D., & Blázquez, M. A. (2014). Gibberellin implication in plant growth and stress responses. Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications, 119–161.

Mohammad, N. K., & Mohammad, F. (2013). Effect of GA_3, N and P ameliorate growth, seed and fibre yield by enhancing photosynthetic capacity and carbonic anhydrase activity of linseed. Integrative Agriculture, 12(7), 1183–1194.

Panyapruek, S., Sinsiri, W., Sinsiri, N., Arimatsu, P., & Polthanee, A. (2016). Effect of paclobutrazol growth regulator on tuber production and starch quality of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Asian Journal of Plant Sciences, 15, 1–7.

Pavlista, A. D. (2013). Influence of foliar-applied growth retardants on russet burbank potato tuber production. American Journal of Potato Research, 90(4), 395–401.

Pobudkiewicz, A. (2014). Influence of growth retardant on growth and development of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Acta Agrobotanica, 67(3), 65–74.

Poprotska, I. V., & Kuryata, V. G. (2017). Features of gas exchange and use of reserve substances in pumpkin seedlings in conditions of skoto- and photomorphogenesis under the influence of gibberellin and chlormequat-chloride. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 71–76.

Poprotska, I. V. (2014). Zminy v polisaharydnomu kompleksi klitynnyh stinok sim'yadolej prorostkiv garbuza za riznoyi napruzhenosti donorno-aktseptornyh vidnosyn v protsesi prorostannya [Changes in polysaccharide complex of cell walls of the pumpkin seedlings cotyledons under different level of source-sink relations during germination]. Fiziologiya i Biohimiya Kulturnykh Rastenij, 46(3), 190–195 (in Ukrainian).

Ramburan, S., & Greenfield, P. L. (2007). Use of ethephon and chlormequat chloride to manage plant height and lodging of irrigatend barley (cv. Puma) when hight rates of N-fertiliser are applied. South African Journal of Plant and Soil, 24(4), 181–187.

Rogach, V. V., & Rogach, T. I. (2015). Vplyv syntetychnyh stymulyatoriv rostu na morfofiziologichni harakterystyky ta biologichnu produktyvnist' kul'tury kartopli [Influence of synthetic growth stimulators on morphological and physiological characteristics and biological productivity of potato culture]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 23(2), 221–224 (in Ukrainian).

Rogach, V. V., Poprotska, I. V., & Kuryata, V. G. (2016). Diya giberelinu ta retardantiv na morfogenez, fotosyntetychnyj aparat i produktyvnist' kartopli [Effect of gibberellin and retardants on morphogenesis, photosynthetic apparatus and productivity of the potato]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 416–419 (in Ukrainian).

Sang-Kuk, K., & Hak-Yoon, K. (2014). Effects of gibberellin biosynthetic inhibitors on oil, secoisolaresonolodiglucoside, seed yield and endogenous gibberellin content in flax. Korean Journal of Plant Resources, 27(3), 229–235.

Sardoei, A. S., Yazdi, M. R., & Shshdadneghad, M. (2014). Effect of cycocel on growth retardant cycocel on reducing sugar, malondialdehyde and other aldehydes of *Cannabis sativa* L. International Journal of Biosciences, 4(6), 127–133.

Savage, J. A., Haines, D. F., & Holbrook, N. M. (2015). The making of giant pumpkins: How selective breeding changed the phloem of *Cucurbita maxima* from source to sink. Plant, Cell and Environment, 38(8), 1543–1554.

Sugiura, D., Sawakami, K., Kojim, M., Sakakibara, H., Terashima, I., & Tateno, M. (2015). Roles of gibberellins and cytokinins in regulation of morphological and physiological traits in *Polygonum cuspidatum* responding to light and nitrogen availabilities. Functional Plant Biology, 42(4), 397–409.

Tae-Yun, K., & Jung-Hee, H. (2012). Effects of hexaconazole on growth and antioxidant potential of cucumber seedlings under UV-B radiation. Environmental Sciences, 21(12), 1435–1447.

VanHook, A. M. (2016). Rapidly inhibiting ethylene signaling with light. Science Signaling, 9(458), ec294.

Wang, Y., Gu, W., Xie, T., Li, L., Sun, Y., Zhang, H., Li, J., & Wei, S. (2016). Mixed compound of DCPTA and CCC increases maize yield by improving plant morphology and upregulating photosynthetic capacity and antioxidants. PLoS ONE, 11(2), e0149404.

Wu, S.-H. (2014). Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma. Annual Review of Plant Biology, 65, 311–333.

Yan, W., Yanhong, Y., Wenyu, Y., Taiwen, Y., Weiguo, L., & Wang, X. (2013). Responses of root growth and nitrogen transfer metabolism to uniconazole, a growth retardant, during the seedling stage of soybean under relay strip. Communications in Soil Science and Plant Analysis Intercropping System, 44(22), 3267–3280.

Yan, Y., Wan, Y., Liu, W., Wang, X., Yong, T., & Yang, W. (2015). Influence of seed treatment with uniconazole powder on soybean growth, photosynthesis, dry matter accumulation after flowering and yield in relay strip intercropping system. Plant Production Science, 18(3), 295–301.

Yu, S. M., Lo, S. F., & Ho, T. D. (2015). Source-sink communication: Regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. Trends in Plant Science, 20(12), 844–857.

Zhang, D, Jing, Y., Jiang, Z., & Lin, R. (2014). The chromatin-remodeling factor PICKLE integrates brassinosteroid and gibberellin signaling during skotomorphogenic growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 26(6), 2472–2485.

Zhang, W., Xu, F., Hua, C., & Cheng, S. (2013). Effect of chlorocholine chloride on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41(1), 97–103.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 323–332
doi: 10.15421/021751

Structural and functional units of parenchyma of lymph nodes of dromedaries (*Camelus dromedarius*)

P. N. Gavrilin*, O. G. Gavrilina*, V. V. Brygadyrenko*, **, D. E. Rahmoun***

**Dnipro State Agrarian-Economic University, Dnipro, Ukraine*
***Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine*
****University Bathna 1, Bathna, Algeria*

Article info

Received 17.06.2017
Received in revised form 22.07.2017
Accepted 28.07.2017

Dnipro State Agrarian-Economic University, Sergey Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine. Tel.: +38-099-545-33-31. E-mail: morfologagro@gmail.com

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine. Tel.: +38-050-939-07-88. E-mail: brigad@ua.fm

University of Batna 1, Institut des Sciences Veterinaires et des sciences agronomiques, Route de Biskra, Batna, Algeria. Tel.: +21-333-31-91-34. E-mail: deddine44@hotmail.com

Gavrilin, P. N., Gavrilina, O. G., Brygadyrenko, V. V., & Rahmoun, D. E. (2017). Structural and functional units of parenchyma of lymph nodes of dromedaries (Camelus dromedarius). Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 323–332. doi: 10.15421/021751

This article analyzes patterns of structural and functional organization of the parenchyma of different groups of lymph nodes, structural features of their connective tissue frame and lymphatic sinuses. We studied superficial and deep somatic (*Limphonodi mandibulares*, *L. cervicales superficiales*, *L. axillares proprii*, *L. poplitei*), somatovisceral (*L. retropharyngei mediales*, *L. iliaci mediales*), visceral (*L. mediastinales caudales*, *L. jejunales*) features of mature male dromedaries (*Camelus dromedarius* Linnaeus, 1758). We used a complex of traditional macroscopic and histological techniques, and also immunohistochemical staining of lymph node sections for identifying the features of localization of T- and B-lymphocyte populations in the parenchyma of the nodes. We found that the parenchyma of camels' lymph nodes is characterized by a spongy type structure in the form of a complex of partly concrescent round-oval fragments of lymphoid tissue, surrounded by large lymphatic spaces (sinuses). The connective tissue frame of the lymph nodes is represented by a two-layer (connective tissue-muscular) capsule and two types of trabeculae: two-layered (connective-muscular, type I), which contain blood and lymphatic vessels, as well as lymphatic cysternas, and single-layered, formed only by a smooth muscular system (type II). Intranodal lymphatic sinuses are subdivided into subcapsular, peritrabecular and medullary sinuses. The subcapsular sinuses and sinuses related to trabeculae of type I and their branching is the most developed. At the tissue level, the lymph node parenchyma has a clearly manifested lobular structure. Lymphoid lobules in the lymph node parenchyma are positioned diffusely (mosaically) and consist of four main cellular zones: transit and cell-cell interaction (analogous to the cortical plateau), clonal proliferation of T- and, respectively, B-lymphocytes (deep cortex units, lymphatic nodules), accumulation of plasmocytes and synthesis of antibodies (brain cords). The lymphoid lobes (compartments) of the lymph nodes parenchyma are bipolar, their tops formed by the zones of transit and cell-cell interaction, and also by the zones of proliferation of B lymphocytes, and the bases by a complex of brain cords (zone of accumulation of plasmocytes and synthesis of antibodies). The zone of T-lymphocytes proliferation is in intermediate position and underlies the subunits of the parenchyma. The tops of the lymphoid lobes are located along the sinuses of the trabeculae of type I and the bases along the sinuses of the trabeculae of type II, which form the efferent lymphatic vessels. The maximum relative capacity of all studied lymph nodes was typical for zones of plasmocyte accumulation and synthesis of antibodies (19–27%), the minimum capacity was typical for transit and cell-cell interaction zones (3–8%). The relative capacity of zones of clonal proliferation of T- and B-lymphocytes in most lymph nodes was 1.5–3.0 times less than that of the zone of plasmocyte accumulation and antibody formation and was, respectively, 8–16% and 9–18%. The study showed that the structure of the lymph nodes parenchyma of dromedaries is not absolutely unique. As in other mammal species, it is subdivided into specialized cell zones which are connected in lymphoid lobules. Specific features of parenchyma structure include: diffuse (mosaic) location of lymphoid lobules; absence of signs of regulated localization of lymphoid lobules relative to the capsule and the sinus bordering the nodes.

Keywords: compartments; lymphoid lobules; lymphatic nodules; deep cortex units; medullary cords

Структурно-функциональные единицы паренхимы лимфатических узлов одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*)

П. Н. Гаврилин*, Е. Г. Гаврилина*, В. В. Бригадиренко*, **, Д. Э. Рахмун***

*Днепровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, Украина
**Днепровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепр, Украина
***Университет Батны 1, Батна, Алжир

Проанализирована структура паренхимы, соединительнотканного остова и лимфатических синусов в лимфатических узлах самцов половозрелого одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius* Linnaeus, 1758). Использовали комплекс макроскопических, классических гистологических методик и иммуногистохимическое окрашивание срезов лимфатических узлов. Макроскопически паренхима лимфатических узлов имеет губкообразный тип строения в виде округло-овальных фрагментов лимфоидной ткани, разделенных широкими синусами. Внутриузловой соединительнотканный остов представлен трабекулами двух типов: соединительнотканно-мышечными (I тип) и гладкомышечными (II тип). Лимфатические синусы подразделяются на широкие подкапсулярные и перитрабекулярные трабекул I типа, а также менее развитые – перитрабекулярные трабекул II типа и мозговые. Микроскопически лимфоидная ткань лимфатических узлов состоит из диффузно расположенных (мозаичных) скоплений лимфоидных долек, каждая из которых образована четырьмя специализированными клеточными зонами. Вершины лимфоидных долек представлены зонами транзита и межклеточного взаимодействия и лимфатическими узелками (В-зоны), основания – комплексом мозговых тяжей (зоны аккумуляции плазмоцитов и антителообразования), центры – единицами глубокой коры (Т-зоны). Зоны транзита и межклеточного взаимодействия лимфоидных долек ориентированы вдоль синусов трабекул I типа, а основания долек – вдоль синусов трабекул II типа. Наиболее развитыми клеточными зонами лимфоидных долек являются мозговые тяжи (относительный объем – 19–27%), а наименее – зоны транзита и межклеточного взаимодействия (аналоги коркового плато, относительный объем – 3–8%). Объем зон клональной пролиферации Т- и В-лимфоцитов в 1,5–3,0 раза меньше объема мозговых тяжей, 8–16% и 9–18%, соответственно.

Ключевые слова: компартменты; лимфоидные дольки; лимфатические узелки; единицы глубокой коры; мозговые тяжи

Введение

На сегодняшний день не вызывает сомнения факт, что для паренхимы лимфатических узлов млекопитающих характерна высокая степень упорядоченности, которая заключается в зональной специализации и интеграции отдельных клеточных зон (Kelly, 1975; Konenkov et al., 2008; Butler et al., 2016).

Дискретная структура паренхимы лимфатических узлов млекопитающих является морфологическим проявлением целого комплекса процессов, которые развиваются во время реализации функции иммунологической реактивности: миграции, кооперации, клональной пролиферации различных типов иммунокомпетентных клеток, а также антителообразования (Kowala and Schoefi, 1986; Konenkov et al., 2008; Margaris and Black, 2012).

Особенности морфофункциональной дифференциации и интеграции паренхимы лимфатических узлов обусловлены в равной степени структурой их кровеносного и лимфатического русел. Кровеносные сосуды обеспечивают процесс односторонней миграции лимфоцитов из крови в паренхиму узлов, а лимфатические сосуды и синусы – беспрепятственную многовекторную миграцию антигенпрезентирующих и иммунокомпетентных клеток между лимфатическими пространствами и лимфоидными структурами узлов (Ikomi et al., 2012; Chandrasecaran and King, 2014).

Транзит лимфоцитов через стенки венул с высоким эндотелием осуществляется в периферических участках глубокой коры лимфатических узлов (паракортикальные тяжи), а также в корковом плато (интерфолликулярная зона). В этих же зонах паренхимы осуществляется взаимодействие (премирование) лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками (De Bruyn and Cho, 1990; Platt and Randolph, 2013; Ruddle, 2016; Ager, 2017).

Зоны клональной пролиферации премированных лимфоцитов в паренхиме лимфатических узлов представлены сферообразными структурами двух различных типов: лимфатическими узелками (В-зоны), которые формируются вдоль лимфатических синусов на основе коркового плато и относительно крупными округлоовальными образованиями или единицами глубокой коры (Т-зоны), расположенными в центральных участках паренхимы, которые непосредственно не контактируют с системой внутриузловых синусов (Kaldjian et al., 2001; Katakai et al., 2004; Palm et al., 2016). Концентрация плазматических клеток и антителообразование происходит в мозговых тяжах, занимающих пространство между глубокой корой и воротами узлов и образующих в совокупности мозговое вещество лимфатических узлов (Andrian and Mempel, 2003; Olson et al., 2012; Houston et al., 2016).

Структурным проявлениям интегративных процессов в паренхиме лимфатических узлов является формирование на ее основе ряда идентичных по гистоархитектонике образований, включающих все вышеуказанные клеточные зоны. Данные субъединицы в лимфатических узлах млекопитающих обозначаются как компартменты или лимфоидные дольки (Gretz, 1997; Willard-Mack, 2006; Sainte-Marie, 2010). Дольчатая структура лимфатических узлов формируется у млекопитающих в процессе эмбриогенеза в результате внедрения множества мезенхимных почек в просвет лимфатических синусов (Mebius, 2003). В дефинитивном лимфатическом узле каждой дольке его паренхимы соответствует один афферентный лимфатический сосуд (Sainte-Marie, 2010).

Общепринятое на сегодня представление о лимфоидной дольке (компартменте) лимфатических узлов было разработано на основе исследования зональной структуры паренхимы данных органов у приматов и некоторых видов лабораторных животных (Belisle and Sainte-Marie, 1981; Ikomi et al., 2012; Butler et al., 2016). Характерными чертами строения данных субъединиц являются: четко выраженная морфологическая полярность с локализацией лимфатических узелков и мозговых тяжей на противоположных полюсах компартментов и их упорядоченное линейное расположение вдоль краевого синуса узлов, что придает паренхиме лимфатических узлов слоистую структуру (Gunnes et al., 1998; Iwasaki et al., 2016).

Проведенные впоследствии более широкие исследования закономерностей строения паренхимы лимфатических узлов у различных видов млекопитающих с разной организацией основных жизнеобеспечивающих систем показали, что вышеуказанное представление о структуре компартментов паренхимы лимфатического узла не является универсальным.

При исследовании лимфатических узлов быка домашнего установлено, что, несмотря на наличие в данных органах явных признаков упорядоченного дольчатого строения паренхимы, морфологическая полярность в лимфоидных дольках не наблюдается, что связано с особым характером локализации лимфатических узелков в пределах компартментов, в которых узелки формируются как на основе коркового плато, так и в паракортикальных и мозговых тяжах (Gavrilin et al., 2013, 2017).

В большинстве работ, посвященных описанию структуры лимфатических узлов верблюда, млекопитающего, отличающегося наличием наиболее совершенных механизмов адаптации в чрезвычайно сложных природно-климатических условиях, указывается, что паренхима узлов подразделяется на ряд специализированных участков, но какая-либо определенная закономерность в их взаиморасположении и локализации в целом в паренхиме узла отсутствует (Abdel-Magied et al., 2001; Zidan, 2002; Zidan and Pabst, 2012). Известно также, что разноуровневый или гнездовой принцип локализации компартментов в лимфатических узлах свиньи домашней связан со специфической структурой капсулы узлов, которая образует многочисленные складки и инвагинации, глубоко внедряющиеся в их паренхиму. Кроме того, внутри складок капсулы располагаются лимфатические цистерны и интратрабекулярные лимфатические каналы, которые обеспечивают одномоментное равномерное поступление лимфы как в поверхностные,

так и в глубокие синусы узлов (Hoshi et al., 1986; Gavrilin et al., 2014). Существующие на сегодня противоречия в отношении общих закономерностей морфофункциональной дифференциации и специализации паренхимы лимфатических узлов млекопитающих препятствуют развитию и окончательному утверждению в морфологии концепции о ее универсальном дольчатом (компартментном) строении, что, в свою очередь, негативно отражается на понимании и интерпретации изменений в данных органах в норме, при экспериментальных воздействиях и развитии различных патологий. Решение данной проблемы заключается в проведении комплексного сравнительного анализа строения лимфатических узлов у представителей всех основных когорт млекопитающих с учетом степени морфологической сложности и эволюционной иерархии.

Цель исследований – определить закономерности структуры паренхимы лимфатических узлов половозрелого одногорбого верблюда в связи с особенностями строения соединительнотканного остова и внутриузлового лимфатического русла.

Материал и методы исследований

Образцы для исследования получены от 10 половозрелых трехлетних клинически здоровых самцов одногорбого верблюда после убоя животных на мясокомбинате г. Уаргла (Алжир). Материал исследования – лимфатические узлы различной локализации: поверхностные соматические: нижнечелюстные (*Limphonodi mandibulares*), поверхностные шейные (*L. cervicales superficiales*); глубокие соматические: подмышечные (*L. axillares proprii*), подколенные (*L. poplitei*); висцеральные: каудальные средостенные (*L. mediastinales caudales*), тощей кишки (*L. jejunales*); смешанные или сомато-висцеральные: медиальные заглоточные (*L. retropharyngei mediales*), медиальные подвздошные (*L. iliaci mediales*) (Zelenevsky, 2013). Всего исследовано 140 органов, так как соматические и сомато-висцеральные узлы являются парными, а висцеральные – непарными.

С целью выяснения особенностей строения и архитектоники системы лимфатических пространств лимфатических узлов осуществляли непрямую инъекцию лимфатического русла дистальных отделов грудной и тазовой конечностей суспензией черной туши на 3% желатиновом геле (Kostiyk, 2008). После наполнения соответствующей контрастной массой синусов региональных лимфатических узлов конечностей (подмышечный, подколенный) органы рассекали в различных плоскостях и проводили макроскопическую оценку степени развития и особенностей строения внутриузлового лимфатического русла.

При отборе материала для гистологических исследований учитывали особенности макроскопической структуры лимфатических узлов верблюда, которые представляют собой конгломераты из частично сросшихся между собой субъединиц без определенной закономерности в их взаиморасположении (Gavrilin et al., 2015). Для исследований от каждого лимфатического узла отбирали по 6 наиболее развитых и обособленных субъединиц. Из отобранных субъединиц вырезали тотальные фрагменты в сегментальной плоскости, фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина.

После фиксации часть фрагментов (по 3 фрагмента) лимфатических узлов заливали в парафин (гистопласт). Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (по Ван-Гизон), а также использовали для иммуногистохимических исследований. Иммуногистохимические исследования проводили прямым методом Кунса по методике Rodney and Miller (Rodney, 2001). Использовали первичные кроличьи моноклональные антитела, которые дают перекрестные реакции с лейкоцитами верблюда (антитела к CD_3 антигену (общие Т-лимфоциты) антитела к CD_{22} антигену (В-лимфоциты)). Иммуногистохимический анализ состоял из следующих основных стадий: ингибиция эндогенной пероксидазы (гидроген пероксид в метаноле); демаскировка антигенов (Tris + ЕДТА), инкубация с первичными моноклональными кроличьими антителами (CD_3, CD_{22}); обработка стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой; обработка PBS (pH 7,2), содержащим 0,05% 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорид и 0,03% перекись водорода; окраска гематоксилином Майера.

Другую часть фрагментов лимфатических узлов использовали для изготовления замороженных срезов на микротоме-криостате. Замороженные срезы импрегнировали нитратом серебра по методике Фута в авторской модификации (Gavrilin, 1999), что давало возможность для одновременной четкой визуализации всех основных компонентов паренхимы лимфатических узлов, которая обусловлена специфической для каждой зоны паренхимы архитектоникой сетей ретикулярных волокон.

Исследование гистопрепаратов проводили с использованием световых миросконов Olympus CX-41 и Leica DM 1000 (окуляр $^{x}10$, объективы $^{x}10$, $^{x}40$). В гистопрепаратах, окрашенных гематоксилином и еозином, азур-II еозином, по Ван-Гизон, а также иммуногистохимически определяли комплекс качественных характеристик исследуемых органов: степень развития и дифференцировки стромы и паренхимы узлов, особенности гистоархитектоники паренхимы, характер взаимоотношений отдельных компонентов в паренхиме узлов, принципы локализации в паренхиме узлов популяций Т- и В-лимфоцитов.

В гистопрепаратах, импрегнированных нитратом серебра, определяли процентную объемную плотность или относительный объем (V, %) стромы (капсула, трабекулы), синусов и лимфоидной ткани в лимфатических узлах в целом, а также особенности локализации лимфоидных долек на всей площади тотальных срезов и совокупный относительный объем их отдельных структурных компонентов: зона транзита и межклеточного взаимодействия (периферические участки единиц глубокой коры), зона клональной пролиферации Т-лимфоцитов (центральная зона единиц глубокой коры), зона клональной пролиферации В-лимфоцитов (лимфатические узелки), зона аккумуляции плазмоцитов и синтеза антител (мозговые тяжи).

Количественный анализ вышеуказанных компонентов проводили методом «точечного счета» (Avtandilov, 1990) с использованием окулярных тестовых систем с нанесенными равноудаленными точками (100 точек) на всей площади гистопрепарата. Относительный объем структурных компонентов лимфоидной паренхимы лимфатических узлов вычисляли по формуле:

$$V_i = P_i/P_t \cdot 100\%,$$

где V_i – относительный объем структурного компонента, P_i – число точек, попавших на структурный компонент, P_t – общее число точек тестовой системы, попавших на гистопрепарат.

Необходимое для получения достоверных данных число точек ñ (минимальный размер выборки, при котором выборочные наблюдения отклоняются от значений для генеральной совокупности не ниже чем на 5%), определяли по формуле:

$$\tilde{n} = 400\,(100 - n)\,/\,n,$$

где n – число точек, приходящихся на анализируемый компонент при предварительном подсчете 100 точек (Avtandilov, 1990).

Измерения проводили на световом микроскопе Olympus CX-41 (объектив $^{x}10/0{,}25$; $^{x}40/0{,}65$). Макрофотографии изготавливали с помощью фотокамеры Canon, а микрофотографии – с использованием микроскопов Leica DM 1000 (окуляр $^{x}4$, объектив $^{x}10/0{,}25$, $^{x}40/0{,}65$), интегрированного с персональным компьютером и Olimpus CX-41.

Результаты исследований статистически обработаны и представлены с помощью Statistica 12.0 (StatSoft Inc., USA). Вероятность разницы значений в различных группах лимфатических узлов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента ($P < 0{,}05$) после проверки нормальности распределения и разницы между генеральными дисперсиями.

Результаты и их обсуждение

При макроскопическом исследовании тотальных срезов лимфатических узлов после наполнения их лимфатических пространств (синусов) тушью установлено, что паренхима данных органов у верблюда одногорбого отличается уникальной губчатой структурой. В отличие от большинства видов млекопитающих, у

которых лимфоидная паренхима в лимфатических узлах «концентрируется» вдоль краевого синуса и максимально приближена к устью афферентных лимфатических сосудов, в соответствующих органах верблюда она равномерно распределена по всей площади среза узлов и состоит из комплекса незавершенных долек и тяжей лимфоидной ткани, ограниченных широкими лимфатическими пространствами (рис. 1).

Формирование губчато-островковой структуры паренхимы в лимфатических узлах одногорбого верблюда может быть обусловлено особым типом строения их стромального каркаса и внутриузлового лимфатического русла. Соединительнотканная строма узлов представлена капсулой и комплексом ее многочисленных производных или трабекул. Капсула лимфатических узлов верблюда имеет четко выраженное двухслойное строение. Ее внешний слой образован, преимущественно, плотной волокнистой неоформленной соединительной тканью, а внутренний – гладкой мускулатурой (Taher et al., 1989; Abdel-Magied, 2001; Zidan and Pabst, 2011). Трабекулы, в отличие от капсулы, подразделяются на два основних типа: двухслойные (соединительнотканно-мышечные) и однослойные (мышечные) (рис. 2). Трабекулы I типа отходят непосредственно от капсулы в виде ее мощных складок или инвагинаций, глубоко внедряются в паренхиму узлов, формируя древовидные внутриузловые разветвления. Трабекулы II типа могут быть производными внутреннего слоя капсулы или капсулярных трабекул I типа. Они являются более мелкими и многочисленными. Капсула и капсулярные трабекулы лимфатических узлов верблюда сопровождаются широкими, субкапсулярными и перитрабекулярными синусами, что придает паренхиме узлов характерную дискретную структуру в виде комплекса незавершенных лимфоидных долек, окруженных относительно равномерной сетью широких лимфатических пространств. При исследовании динамики относительного объема стромы в лимфатических узлах установлено, что соединительнотканный остов достаточно хорошо развит во всех исследованных органах. При этом максимальный относительный объем капсулы и трабекул характерен для соматических, особенно подкожных, лимфатических узлов (рис. 3).

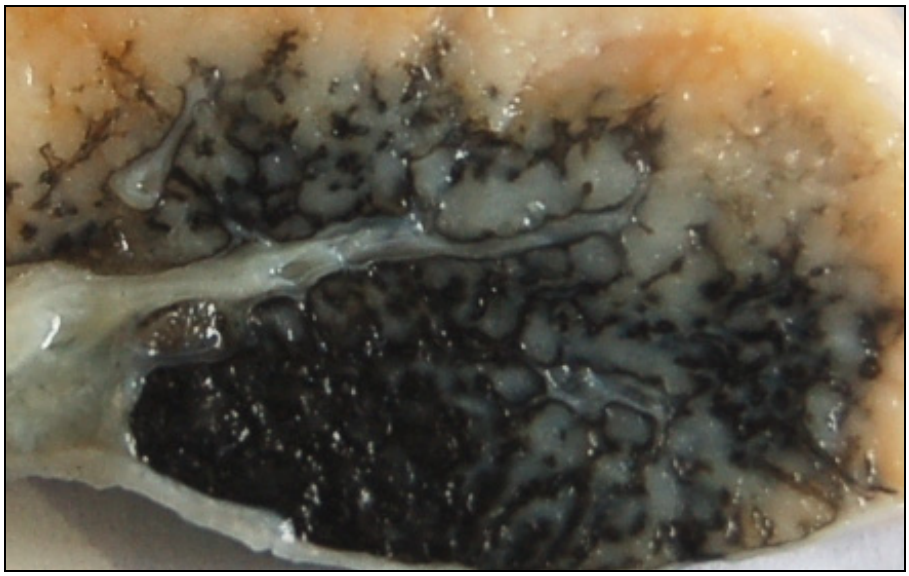


Рис. 1. Синусы подколенного лимфатического узла одногорбого верблюда, заполненные контрастной массой (суспензия черной туши на 3% желатиновом геле)

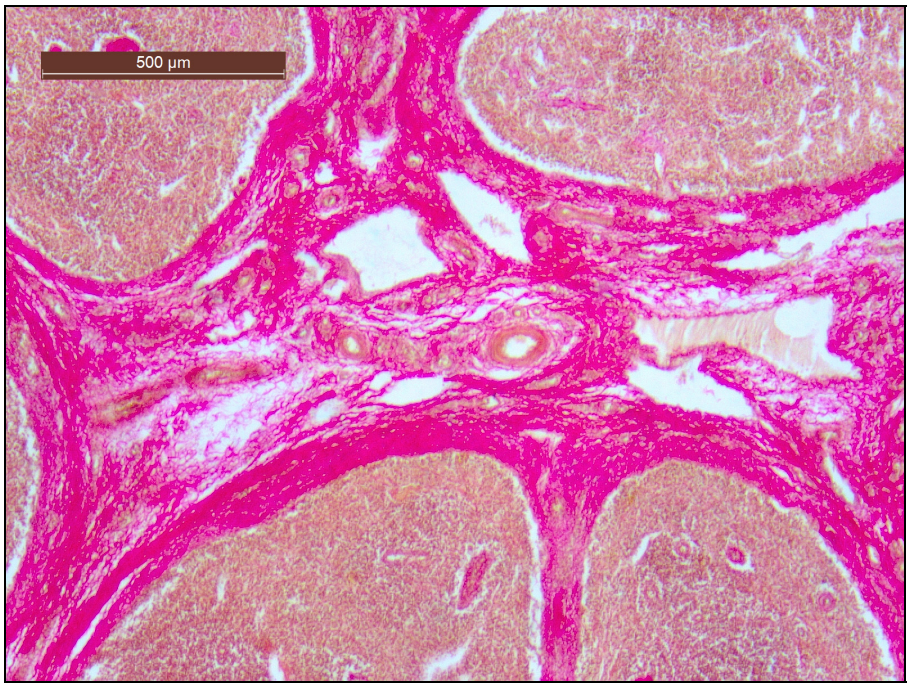


Рис. 2. Трабекулы соединительнотканно-мышечного типа в паренхиме нижнечелюстного лимфатического узла: окраска по Ван-Гизон

В более глубоких сомато-висцеральных и висцеральных лимфатических узлах относительный объем стромы существенно меньше, чем в соматических узлах обеих групп, за исключением медиального подвздошного узла, относительный объем капсулы и трабекул которого достоверно не отличается от соответствующего показателя глубоких соматических узлов. Учитывая тот факт, что основная масса синусов в лимфатических узлах верблюда располагается вдоль капсулы и трабекул, динамика их совокупного относительного объема в узлах различных групп четко взаимосвязана с изменениями объема стромы данных органов. Так, в большинстве как соматических, так и висцеральных лимфатических узлов относительный объем стромы и синусов практически равнозначен или незначительно отличается, в пределах 4–7% (рис. 4).

Исключением являются медиальный подвздошный лимфатический узел и лимфатический узел тощей кишки, где относительный объем синусов в 2,0–2,5 раза меньше, чем объем капсулы и трабекул.

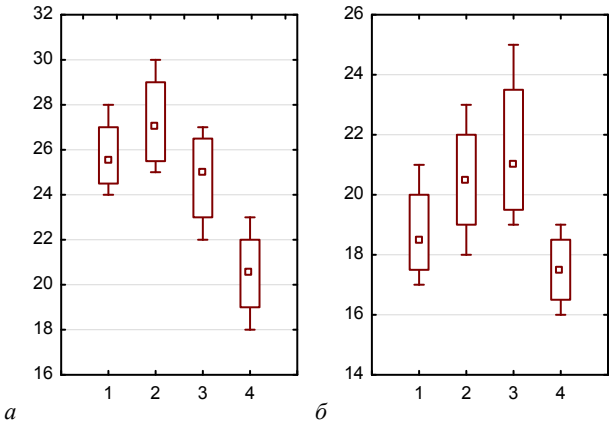


Рис. 3. Относительный объем стромы (капсулы и трабекул) на площади тотальных срединных сегментальных срезов лимфатических узлов (n = 10): *а* – соматические лимфатические узлы: поверхностные (*1* – подчелюстной, *2* – поверхностный шейный), глубокие (*3* – подмышечный, *4* – подколенный); *б* – висцеральные лимфатические узлы (*1* – каудальный средостенный, *2* – тощей кишки); сомато-висцеральные (*3* – медиальный заглоточный; *4* – медиальный подвздошный); по оси абсцисс – лимфатические узлы, по оси ординат – относительный объем стромы (%)

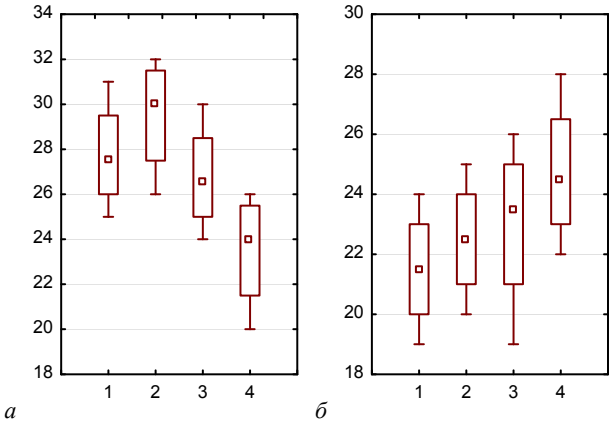


Рис. 4. Относительный объем синусов на площади тотальных срединных сегментальных срезов лимфатических узлов (n = 10): *а* – соматические лимфатические узлы: поверхностные (*1* – подчелюстной, *2* – поверхностный шейный), глубокие (*3* – подмышечный, *4* – подколенный); *б* – висцеральные лимфатические узлы (*1* – каудальный средостенный; *2* – тощей кишки); сомато-висцеральные (*3* – медиальный заглоточный; *4* – медиальный подвздошный); по оси абсцисс – лимфатические узлы, по оси ординат – относительный объем синусов (%)

Вследствие значительного развития соединительнотканного остова и системы синусов относительный объем паренхимы в лимфатических узлах различных групп практически не превышает 57% с максимальным значением данного показателя в висцеральных и сомато-висцеральных узлах, и минимальным – в поверхностных соматических (рис. 5).

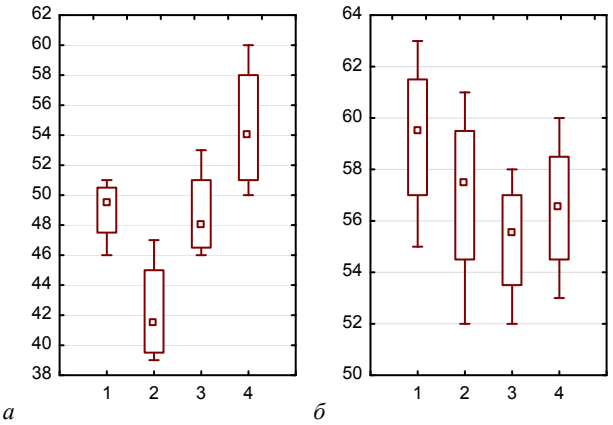


Рис. 5. Относительный объем лимфоидной паренхимы на площади тотальных срединных сегментальных срезов лимфатических узлов (n = 10): *а* – соматические лимфатические узлы: поверхностные (*1* – подчелюстной, *2* – поверхностный шейный), глубокие (*3* – подмышечный, *4* – подколенный); *б* – висцеральные лимфатические узлы (*1* – каудальный средостенный; *2* – тощей кишки); сомато-висцеральные (*3* – медиальный заглоточный; *4* – медиальный подвздошный); по оси абсцисс – лимфатические узлы, по оси ординат – относительный объем лимфоидной паренхимы (%)

При исследовании серии гистопрепаратов лимфатических узлов, окрашенных гематоксилином и эозином, по Ван-Гизон, а также импрегнированных нитратом серебра, нами установлено, что паренхима данных узлов имеет зональную структуру. При этом отдельные клеточные зоны объединяются в идентичные по строению дольки, характер локализации которых определяется особенностями развития и архитектоники различных типов трабекул и, соответственно, перитрабекулярных синусов (рис. 6). Основания лимфоидных долек направлены в сторону перитрабекулярных синусов трабекул I типа, а их противоположные полюса («вершины») граничат с соответствующими синусами трабекул II типа.

Архитектоника сетей ретикулярных волокон краевых участков паренхимы, которые непосредственно граничат с синусами, расположенными вдоль трабекул I типа, аналогична ретикулярным сетям в корковом плато (интерфолликулярной зоне) лимфатических узлов у большинства других видов млекопитающих. Интерфолликулярная зона вместе с паракортикальными тяжами относится к зоне транзита и межклеточного взаимодействия (взаимодействие лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками). Для данной зоны характерна среднепетлистая ретикулярная сеть с наличием значительного количества грубых волокнистых тяжей, которые пронизывают перитрабекулярные синусы и достигают внутреннего слоя трабекул. В зоне транзита располагаются многочисленные широкие сосуды, которые относятся к венулам с высоким эндотелием (De Bruyn and Cho, 1990; Ruddle, 2016).

Вглубь от зон транзита и межклеточного взаимодействия располагаются сферообразные участки лимфоидной паренхимы, ретикулярная строма которых имеет равномерную сотовидную крупнопетлистую архитектонику. Большая часть лимфоидных клеток данной зоны относится к Т-клеткам, что свидетельствует о том, что данный участок паренхимы представляет собой очаг клональной пролиферации соответствующей популяции лимфоцитов (рис. 7). В лимфатических узлах представителей различных видов млекопитающих с классической слоистой структурой

паренхимы зона пролиферации Т-лимфоцитов вместе с паракортикальными тяжами, которые находятся на их периферии, формируют так называемые единицы глубокой коры (Belisle and Sainte-Marie, 1981; Vyrenkov et al., 1995). Единицы глубокой коры располагаются цепочкой между корковым плато и мозговыми тяжами и в совокупности образуют глубокую кору узлов. В паренхиме лимфатических узлов верблюда аналогичные структуры отличаются менее упорядоченным характером расположения вдоль перитрабекулярных синусов трабекул I типа и их крупных ветвей, от которых они ограничены зонами транзита и межклеточного взаимодействия, которые охватывают данные структуры полукольцом (рис. 8). Свободный внутренний участок единиц глубокой коры граничит с мозговыми тяжами и образует кортико-медуллярное соединение.

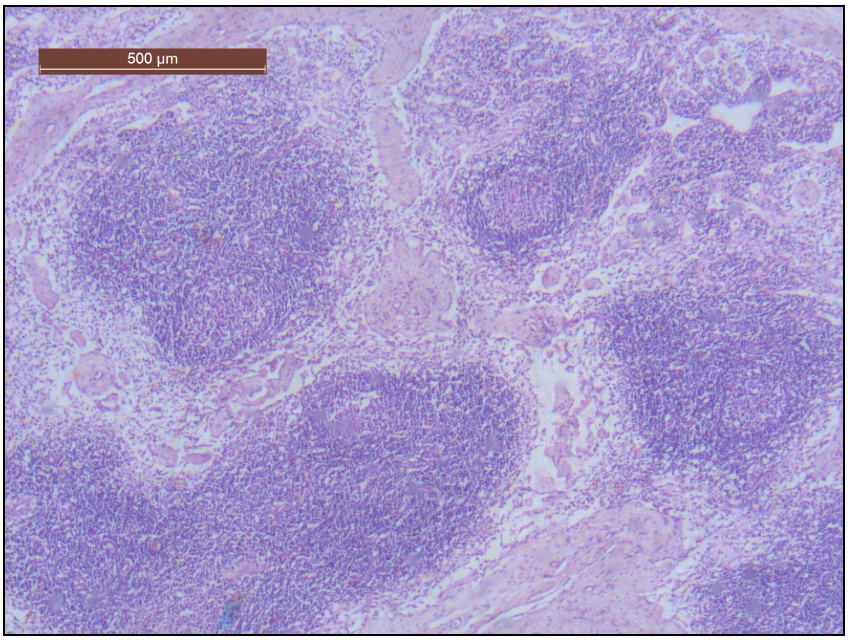


Рис. 6. Лимфоидные дольки в паренхиме лимфатического узла верблюда: окраска гематоксилином и эозином

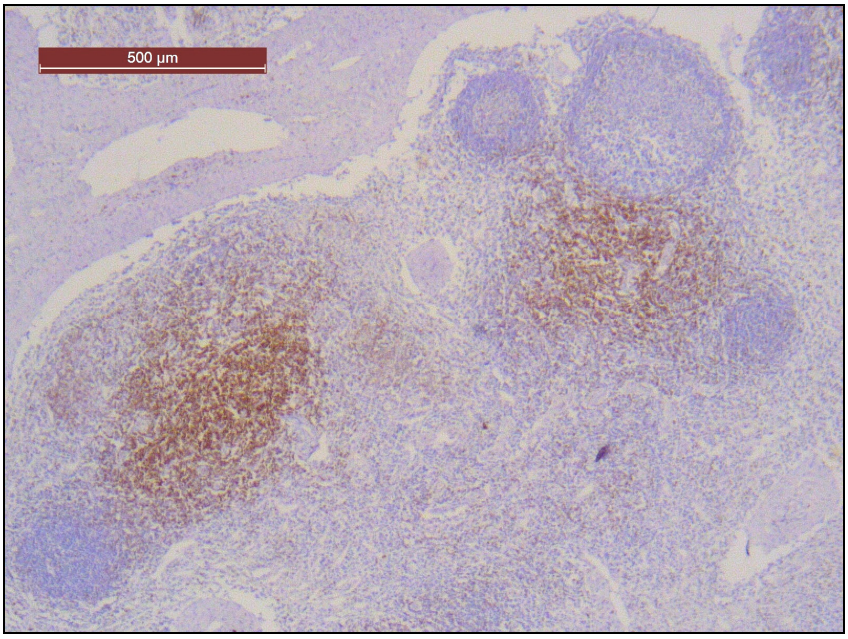


Рис. 7. Скопления Т-лимфоцитов (CD_{22}) в паренхиме лимфатического узла: иммуногистохимическое окрашивание, окраска гематоксилином Майера

Мозговые тяжи имеют характерную мелкоячеистую структуру ретикулярного остова, между мозговыми тяжами располагаются многочисленные узкие мозговые синусы. На основе зон транзита формируются лимфатические узелки, большая часть клеток которых относится к популяции В-лимфоцитов. Уникальность структуры лимфатических узелков в лимфатических узлах верблюда связана с наличием в составе их стромы многочисленных гладкомышечных клеток, которые в узелках со светлыми центрами размножения формируют специфические гладкомышечные капсулы, вероятно, обладающие сократительной способностью. Сети ретикулярных волокон в лимфатических узелках развиты, преимущественно, на их периферии в мантийных зонах в виде ретикулярных «корзиночек». В центрах узелков обнаруживаются редкие крупнопетлистые сети или отдельные фрагменты ретикулярных волокон (рис. 9). Таким образом, паренхима лимфатических узлов верблюда имеет зональную структуру. Отдельные клеточные зоны интегрируются в лимфоидные дольки или компартменты, архитектоника и принцип расположения которых имеют ряд характерных отличий. Так же, как и в лимфатических узлах лабораторных

животных и приматов, основой каждой лимфоидной дольки в лимфатических узлах верблюда являются сферообразные зоны пролиферации Т-лимфоцитов, а их периферия на одном из полюсов представлена зоной транзита и межклеточного взаимодействия и лимфатическими узелками, а на другом – комплексом мозговых тяжей. В то же время лимфоидные дольки в паренхиме лимфатических узлов верблюда расположены диффузно без каких-либо четких признаков упорядоченности, что придает паренхиме характерный мозаичный рисунок. Наряду с пространственной неупорядоченностью в паренхиме лимфатических узлов верблюда наблюдаются определенные закономерности в расположении лимфоидных долек относительно перитрабекулярных синусов трабекул различных типов. Наши исследования показывают, что транзитные зоны лимфоидных долек с лимфатическими узелками ориентированы, преимущественно, вдоль перитрабекулярных лимфатических синусов трабекул I типа с их разветвлениями, а в зоне расположения мозговых тяжей находятся в основном трабекулы II типа.

Рис. 8. Компартмент паренхимы подчелюстного лимфатического узла: зона транзита и межклеточного взаимодействия (*1*), лимфатический узелок (*2*), единицы глубокой коры (*3*), мозговые тяжи (*4*); импрегнация азотнокислым серебром $^{x}100$

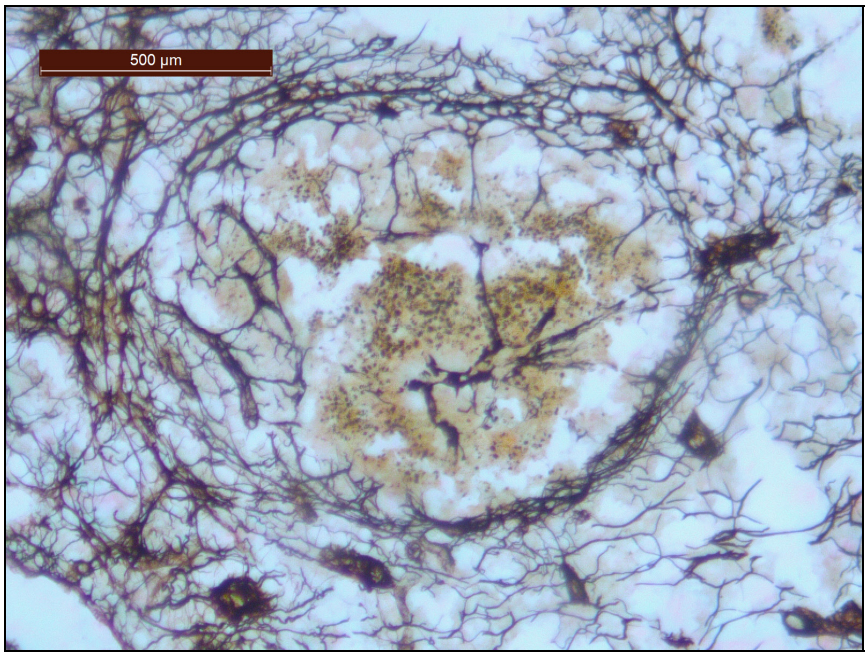


Рис. 9. Лимфатические узелки в паренхиме средостенного каудального лимфатического узла: импрегнация азотнокислым серебром

Установленная нами мозаичность структуры паренхимы лимфатических узлов верблюда может определяться рядом их структурно-функциональных особенностей. Значительное развитие в каркасе лимфатических узлов верблюда гладкой мускулатуры, вероятно, является фактором, обеспечивающим процесс принудительной внутриузловой лимфоциркуляции, что дает возможность для быстрого и глубокого проникновения в паренхиму узлов антигенпрезентирующих клеток, в результате чего очаги клональной пролиферации Т- и В-лимфоцитов могут формироваться как в поверхностных, так и глубоких участках паренхимы.

С другой стороны, мозаичная структура паренхимы в лимфатических узлах верблюда может быть связана с наличием у данного вида млекопитающих особого типа лимфоснабжения, который также характерен для лимфатических узлов слонов, дельфи-

нов, носорогов и свиней (Cave and Aumonier, 1962a, 1962b; Moskov, 1969; Hoshi et al., 1986). Вышеуказанный тип лимфоснабжения характеризуется наличием внутри сильноразвитых капсулярных трабекул I типа лимфатических цистерн и интратрабекулярных лимфатических каналов, которые одновременно сообщаются как с подкапсулярным, так и глубокими или внутренними синусами. В результате этого антигенпрезентирующие клетки проникают одномоментно в поверхностные и глубокие слои паренхимы, вызывая развитие очагов клеточной пролиферации лимфоцитов, как под капсулой, так и в других, более удаленных участках паренхимы, вдоль синусов, сопровождающих капсулярные трабекулы. В то же время зона аккумуляции плазмоцитов и синтеза антител (мозговые тяжи) формируются вдоль синусов мышечных трабекул II типа, которые, вероятно, являются истоком для эфферентных лимфатических сосудов.

Исходя из вышеуказанного, формирование всесторонне обоснованной концепции строения паренхимы лимфатических узлов у верблюда невозможно без проведения исследований структуры и взаимоотношения внутриузловой системы лимфатических пространств, кровеносных сосудов и микроциркуляторного русла.

Таким образом, основными особенностями внутриузловой лимфоциркуляции в лимфатических узлах верблюда является наличие в соединительнотканном каркасе узлов сократительных элементов, а также, вероятно, дополнительных структурных механизмов, которые обеспечивают одновременное поступление антигенпрезентирующих клеток как в поверхностные, так и глубокие участки паренхимы узлов. Наиболее развитым компонентом лимфоидных долек паренхимы лимфатических узлов половозрелого одногорбого верблюда являются зоны аккумуляции плазмоцитов и синтеза антител (комплекс мозговых тяжей).

Совокупный относительный объем мозговых тяжей в лимфатических узлах различных групп является относительно стабильной величиной и варьирует от 19% до 24%, за исключением подколенного лимфатического узла, объем мозговых тяжей в котором достигает почти 37%.

Зоны клональной пролиферации обеих популяций лимфоцитов развиты в меньшей степени, чем мозговые тяжи, и имеют практически одинаковые показатели относительно объема. Относительный объем зон клональной пролиферации Т-лимфоцитов варьирует от 8% до 16%, а В-лимфоцитов от 9% до 18%. (табл.).

В поверхностных соматических и висцеральных лимфатических узлах верблюда зоны клональной пролиферации В-лимфоцитов развиты в несколько большей степени, чем Т-зоны (на 1–4%), а в глубоких соматических и сомато-висцеральных узлах, наоборот, преобладают зоны клональной пролиферации Т-лимфоцитов (на 2–3%). В целом в большинстве соматических и сомато-висцеральных лимфатических узлов относительный объем зон пролиферации обеих популяций лимфоцитов примерно соответствует объему зон аккумуляции плазмоцитов и синтеза антител. То есть степень развития лимфатических узелков и единиц глубокой коры соответствует степени развития комплекса мозговых тяжей. В висцеральных лимфатических узлах совокупный относительный объем зон пролиферации обеих основных популяций лимфоцитов на 10–20% превышает объем мозговых тяжей. Относительный объем зон транзита и межклеточного взаимодействия в исследованных лимфатических узлах в 1,5–5,0 раз меньше, чем объем мозговых тяжей. Вышеуказанная зона наиболее развита в сомато-висцеральных лимфатических узлах, несколько меньше в висцеральных и большинстве соматических узлов, за исключением подмышечного, где данный показатель минимален (4,2%).

Таблица

Относительный объем отдельных структурных компонентов (специализированных клеточных зон) в лимфоидных дольках лимфатических узлов верблюда (V, %, M ± m, n = 6)

Лимфатический узел		Лимфоидные дольки (компартменты)			
		зона транзита и межклеточного взаимодействия	зона клональной пролиферации Т-лимфоцитов	зона клональной пролиферации В-лимфоцитов	зона аккумуляции плазмоцитов, синтеза антител
		II	III	IV	VII
Соматические поверхностные					
Подчелюстной	*a*	$5{,}00 \pm 0{,}41^{b,d}$	$11{,}05 \pm 0{,}41^{b,e-h}$	$12{,}78 \pm 0{,}58^{b,c,g,h}$	$19{,}63 \pm 0{,}55^{b-d,f,g}$
Поверхностный шейный	*b*	$3{,}13 \pm 0{,}31^{a,c,d,h}$	$8{,}05 \pm 0{,}31^{a,c,d,e-h}$	$9{,}10 \pm 0{,}35^{a,d,e-h}$	$22{,}98 \pm 0{,}7^{a,d,h}$
Соматические глубокие					
Подмышечный	*c*	$4{,}83 \pm 0{,}44^{b,d}$	$12{,}03 \pm 0{,}43^{b,d,e,h}$	$10{,}28 \pm 0{,}36^{a,d,e-h}$	$21{,}99 \pm 0{,}44^{a,d,f,h}$
Подколенный	*d*	$4{,}20 \pm 0{,}45^{a-c,g,h}$	$9{,}99 \pm 0{,}36^{b,c,e,h}$	$12{,}25 \pm 0{,}41^{b,c,e,g,h}$	$26{,}95 \pm 0{,}53^{a-c,e-h}$
Сомато-висцеральные					
Медиальный заглоточный	*e*	$4{,}15 \pm 0{,}30^{f,h}$	$15{,}93 \pm 0{,}53^{a-d,g,h}$	$13{,}93 \pm 0{,}38^{b-d,f-h}$	$20{,}95 \pm 0{,}29^{d,f-h}$
Медиальный подвздошный	*f*	$6{,}10 \pm 0{,}33^{b,e}$	$15{,}03 \pm 0{,}35^{a-d}$	$12{,}10 \pm 0{,}48^{b,c,e,g,h}$	$24{,}28 \pm 0{,}31^{a,c-e,g,h}$
Висцеральные					
Каудальный средостенный	*g*	$5{,}33 \pm 0{,}46^{b,d}$	$14{,}00 \pm 0{,}35^{a-d,e}$	$16{,}88 \pm 0{,}43^{a-f}$	$22{,}93 \pm 0{,}42^{a,d-f,h}$
Тощей кишки	*h*	$5{,}73 \pm 0{,}28^{b,e,d}$	$14{,}15 \pm 0{,}43^{a-d,e}$	$17{,}93 \pm 0{,}47^{a-f}$	$19{,}05 \pm 0{,}37^{b-g}$

Примечание: латинскими буквами обозначена статистическая вероятность разницы P < 0,05 относительного объема (V%) в пределах отдельных групп структурных компонентов (I–VII) в различных лимфатических узлах (*a–h*).

Таким образом, лимфоидная паренхима в лимфатических узлах верблюда, как и соответствующий компонент данных органов у других видов млекопитающих, имеет четко выраженные признаки зональной специализации и интеграции. Участки паренхимы, которые в ряде работ обозначаются как анодулярная плотная лимфоидная ткань (Abdel-Magied, 2001, Saliman and Mazher, 2005), являются, по сути, зонами транзита лимфоцитов и межклеточного взаимодействия, в совокупности с зонами клональной пролиферации Т-лимфоцитов, первые из которых, как правило, примыкают к перитрабекулярным синусам трабекул I типа, а вторые расположены в более глубоких участках паренхимы. Диффузная лимфоидная ткань представляет собой совокупность мозговых тяжей, которые обеспечивают аккумуляцию плазмоцитов и синтез антител, а в лимфатических узелках, как известно, происходит клональная пролиферация В-лимфоцитов и образование клеток памяти (Rouse et al., 1984; Palm et al., 2016).

Как и у других млекопитающих, функциональные зоны паренхимы лимфатических узлов верблюда интегрированы в лимфоидные дольки или компартменты, которые имеют особый мозаичный характер расположения, что связано с рядом уникальных черт строения соединительнотканного остова узлов, а также со спецификой лимфо- и кровоснабжения узлов и внутриузловой лимфо- и гемодинамикой.

Выводы

Основными морфофункциональными характеристиками паренхимы лимфатических узлов одногорбого верблюда являются: отсутствие морфологической полярности и слоистости данного структурного компонента, а также, соответственно, признаков концентрации лимфоидной ткани в направлении устья афферентных лимфатических сосудов; тотальный губкообразный принцип

строения лимфоидной ткани в виде комплекса незавершенных округло-овальных паренхиматозных фрагментов, разделенных широкими лимфатическими пространствами (синусами). Соединительнотканный остов лимфатических узлов верблюда отличается наличием сильно развитой внутриузловой системы капсулярных трабекул двух типов – основных или двуслойных соединительнотканно-мышечных (I тип) и дочерних однослойных, построенных из глакомышечных клеток (II тип). Трабекулы I типа содержат в своем составе лимфатические сосуды и лимфатические цистерны. Степень развития соединительнотканного остова в узлах различных групп значительно варьирует, что максимально выражено в поверхностных соматических лимфатических узлах и минимально – в висцеральных.

Основная масса лимфатических пространств в паренхиме лимфатических узлов, за исключением мозговых синусов, располагается вдоль трабекул, наиболее крупными при этом являются синусы, сопровождающие трабекулы I типа, затем следуют синусы трабекул II типа и синусы, расположенные в мозговом веществе лимфоидных долек.

Паренхима лимфатических узлов верблюда имеет четко выраженную зональную специализацию, а также дольковую (компартментную) структуру. Структурно-функциональные единицы лимфатических узлов верблюда устроены в соответствии с общими принципами морфофункциональной организации данных субъединиц у млекопитающих с наличием трех основных типов специализированных зон: транзита и межклеточной кооперации, клональной пролиферации Т- и В-лимфоцитов, аккумуляции плазмоцитов и антителообразования. Объемные количественные характеристики основных структурных компонентов лимфоидных долек в узлах различных групп являются относительно стабильными. Максимальный относительный объем имеют зоны аккумуляции плазмоцитов и антителообразования, затем следуют зоны клональной пролиферации Т- и В-лимфоцитов. Минимальный относительный объем характерен для зон транзита и межклеточной кооперации.

Для лимфоидных долек (компартментов) лимфатических узлов верблюда характерен диффузный (мозаичный) принцип расположения в пределах паренхимы в целом, а также полярный принцип строения с преимущественной локализацией зон транзита и межклеточного взаимодействия с лимфатическими узелками вдоль перитрабекулярных синусов трабекул I типа и концентрацией мозговых тяжей (зон аккумуляции плазмоцитов и синтеза антител) в направлении перитрабекулярных синусов трабекул II типа, которые, вероятно, являются «истоками» эфферентных лимфатических сосудов. Зоны клональной пролиферации Т-лимфоцитов непосредственно с перитрабекулярными синусами не граничат и концентрируются в глубоких слоях паренхимы, формируя основу или центральную зону ее компартментов. Дальнейшие исследования структуры лимфатических узлов у одногорбого верблюда будут направлены на выяснение возрастных аспектов их морфогенеза, а также закономерностей строения и взаимоотношения внутриузловой системы лимфатических пространств и различных типов кровеносных сосудов.

References

Abdel-Magied, E. M., Taha, A. M., Al-Qarawi, A. A., & Elfaki, M. G. (2001). The parotid, mandibular and lateral retropharyngeal lymph nodes of the camel (*Camelus dromedarius*). Anatomia Histologia Embryologia, 30(4), 199–203.

Ager, A. (2017). High endothelial venules and other blood vessels: Critical regulators of lymphoid organ development and function. Frontiers in Immunology, 8(3), 1–16.

Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nature Reviews Immunology, 3, 867–878.

Belisle, C., & Sainte-Marie, G. (1981). Tradimentional study of the deep cortex of the rat lymph node. III. Morphology of the deep cortex units. The Anatomical Record, 199(2), 213–226.

Butler, J., Sawtell, A., Jarrett, S., Cosgrove, J., Leigh, R., Timmis, J., & Coles, M. (2016). Imaging immunity in lymph nodes: Past, present and future. Advances in Experimental Medicine and Biology, 915, 329–346.

Cave, A. J. E., & Aumonier, F. J. (1962a). Elephant and rhinoceros lymph-node histology. Journal Rino Mikroskopik, 80, 209–214.

Cave, A. J. E., & Aumonier, F. J. (1962b). Lymph node structure in the sumatran rhinoceros. Journal Rino Mikroskopik, 81, 73–77.

Chandrasekaran, S., & King, M. R. (2014). Microenvironment of tumor-draining lymph nodes: Opportunities for liposome-based targeted therapy. International Journal of Molecular Sciences, 15(11), 20209–20239.

De Bruyn, P. P., & Cho, Y. (1990). Structure and function of high endothelial postcapillary venules in lymphocyte circulation. Current Topics in Pathology, 84(1), 85–101.

Gavrilin, P. N. (1999). Modificatsiya sposoba impregnatsii serebrom po Futy gistotopogramm organov krovetvoreniya, izgotovlennyih na microtome-kriostate [Modification of the silver impregnation method according to Fut histotopograms of hemopoietic organs made on a microtome cryostat]. Vestnik Morphologii, 5(1), 106–108 (in Russian).

Gavrilin, P. N., Gavrilina, O. G., & Kravtsova, M. V. (2017). The compartments of the parenchyma of the lymph nodes in the newborn domestic bull (*Bos taurus*). Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 169–178.

Gavrilin, P. N., Masjuk, M. O, & Tishkina, N. N. (2014). Osoblivosti makroskopichnoi strukturi limfatichnih vuzliv svini sviyskoi [Features of macroscopic structure of lymph nodes of the domestic pig]. Nauchno-Tehnicheskiy Byuleten Nauchno-Issledovatelskogo Tsentra Biobezopasnosti i Ekologicheskogo Kontrolya Resursov APK, 2(1), 32–37 (in Ukrainian).

Gavrilin, P. N., Perepechaeva, N. H., & Tishkina, N. N. (2015). Vozrastnyie preobrazovaniya gistoarhitektoniki parenhimyi limfaticheskih uzlov u krupnogo rogatogo skota v postnatalnyiy period ontogeneza [Age transformations of histoarchitectonics of parenchyma of lymph nodes in cattle in the postnatal period of ontogenesis]. Biologiya Tvarin, 17(1), 29-35 (in Russian).

Gavrilin, P. N., Prokushenkova, O. H., Masjuk, D. N., & Perepechaeva, N. H. (2013). Peculiarities of structural and functional organization of Domestic Bull's lymph nodes parenchyma (*Bos primigenius taurus* L.). Naukovyj Visnyk Nycional'nogo Universytetu Bioresursiv i Pryrodokorystuvannja Ukrai'ny, 188(1), 92–101.

Gretz, J. E., Anderson, C. C., & Shaw, S. (1997). Cords, channels, corridors and conduits, critical architectural facilitating cell interactions in the lymph node cortex. Immunological Reviews, 156, 11–24.

Gunnes, G., Press, C., Tverdal, A., & Landsverk, T. (1998). Compartments within the lymph node cortex of calves and adult cattle differ in the distribution of leukocyte population: An immunohistochemical study using computer-assisted morphometric analysis. Developmental and Comparative Immunology, 22(1), 111–123.

Hoshi, N., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., & Kudo, N. (1986). Histological and immunohistochemical studies on the architecture of lymph nodes in pig. Japan Journal Veterinary Science, 48(6), 1097–1107.

Houston, S. A., Cerovic, V., Thomson, C., Brewer, J., Mowat, A. M., & Milling, S. (2016). The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. Mucosal Immunology, 9(2), 468–478.

Ikomi, F., Kawai, Y., & Ohhashi, T. (2012). Recent advance in lymph dynamic analysis in lymphatics and lymph nodes. Annals of Vascular Diseases, 5(3), 258–268.

Iwasaki, R., Mori, T., Ito, Y., Kawabe, M., Murakmi, M., & Maruo, K. (2016). Computed tomographic evaluation of presumptively normal canine sternal lymph nodes. Journal of the American Animal Hospital Association, 52(6), 371–377.

Kaldjian, E. P., Gretz, J. E., Anderson, A. O., Shi, Y., & Shaw, S. (2001). Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: A labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. International Immunology, 13(10), 1243–1253.

Katakai, T., Hara, T., & Lee, J. H. (2004). A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: An immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. International Immunology, 16(8), 1133–1142.

Kelly, R. H. (1975). Functional anatomy of lymph nodes. The paracortical cords. International Archives of Allergy and Immunology, 48(6), 836–849.

Konenkov, V. I., Shkyrat, G. A., & Kolesnikov, A. P. (2008). Limfaticheksij uzel: Morfofunkcional'naja harakteristika i mezhkletochnaja kooperacija [Lymph node: Morphofunctional characteristic and intercellular cooperation]. Vestnik Limfologii, 4, 35–43 (in Russian).

Kowala, M. C., & Schoefi, G. I. (1986). The popliteal lymph node of the mouse: Internal architecture, vascular distribution and lymphatic supply. Journal of Anatomy, 148(1), 25–46.

Margaris, K. N., & Black, R. A. (2012). Modelling the lymphatic system: Challenges and opportunities. Journal of the Royal Society Interface, 69, 1–12.

Mebius, R. E. (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. Nature Reviews Immunology, 3(4), 292–303.

Moskov, M., Schiwatschewa, T., & Bonev, S. (1969). Vergleichshistologische Untersuchung der Lymphknoten der Sauger. Die lymphknoten des Dolphins. Anatomischer Anzeiger, 124, 49–67.

Olson, M. R., McDermott, D. S., & Varga, S. M. (2012). The initial draining lymph node primes the bulk of the CD_8 T cell response and influences memory T cell trafficking after a systemic viral infection. PLOS Pathogens, 8(12), 1–15.

Palm, E. A., Friedrich, C. H., & Kleinau, S. (2016). Nodal marginal zone B cells in mice: A novel subset with dormant self-reactivity. Scientific Reports, 6, 27687.

Platt, A. M., & Randolph, G. J. (2013). Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. Advances in Immunology, 120, 51–68.

Rouse, R. V., Reichert, R. A., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., & Bucher, E. C. (1984). Localization of lymphocyte subpopulation in peripheral lymphoid organs: Directed lymphocyte migration and segregation into specific microenvironments. American Journal of Anatomy, 170, 391–405.

Ruddle, N. H. (2016). High endothelial venules and lymphatic vessels in tertiary lymphoid organs: Characteristics, functions, and regulation. Frontiers in Immunology, 9(7), 1–7.

Sainte-Marie, G. (2010). The lymph node revisited: Development, morphology, functioning, and role in triggering primary immune responses. The Anatomical Record, 293(2), 32–37.

Saliman, S. M., & Mazher, K. M. (2005). Light and electron microscopic studies on some lymph nodes of the adult one-humped camel (*Camelus dromedarius*). Beni Suef Veterinary Medicine Journal, 15(2), 9–13.

Taher, E.-S. M., El-Sakhawy, M. A., Moussalam, E.-S., Moussa, M. H. G., El-Bargeesy, G. (1989). Studies of the lymphoid tissue of lymph nodes of one humped camel fetuses (*Camelus dromedarius*). Egypt Journal Histology, 12(1), 23–33.

Vyrenkov, Y. E., Shishlo, V. K., Antropova, J. G., & Ryzhova, A. V. (1995). Sovremennye dannye o strukturno-funkcional'noj organizacii limfaticheskogo uzla [Modern data on the structural and functional organization of the lymph node]. Morphology, 103(3), 34–40 (in Russian).

Willard-Mack, C. L. (2006). Normal structure, function, and histology of lymph nodes. Toxicologic Pathology, 34(5), 409–424.

Zelenevsky, N. V. (2013). Mezhdunarodnaja veterinarnaja anatomicheskaja nomenklatura na latinskom i russkom jazykah. Nomina Anatomica Veterinaria [International veterinary anatomical nomenclature in Latin and Russian. Nomina Anatomica Veterinaria]. Mir, Sankt-Peterburg (in Russian).

Zidan, M., & Pabst, R. (2002). Detection of apoptosis in the lymphoid organs of the dromedary camel. Journal of Camel Practice and Research, 9(2), 163–166.

Zidan, M., & Pabst, R. (2012). Histological, histochemical and immunohistochemical study of the lymph nodes of the one humped camel (*Camelus dromedarius*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 145(1–2), 191–198.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 333–342
doi: 10.15421/021752

Features of structure of motor nerve endings in the tongue of normal and dehydrated rats

S. L. Popel'*, O. T. Bylous**, I. V. Bylous*

*Vasyl Stefanik Precarpatian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine
**Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

Article info

Received 12.06.2017
Received in revised form 16.07.2017
Accepted 20.07.2017

Vasyl Stefanik Precarpatian National University, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Galitcka Str., 2, Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine. Tel.: +38-097-87-41-446. E-mail: popelsergij@gmail.com

Popel', S. L., Bylous, O. T., & Bylous, I. V. (2017). Features of structure of motor nerve endings in the tongue of normal and dehydrated rats. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 333–342. doi: 10.15421/021752

This study aims at an analytical review of scientific literature on the structure of the tongue of different animals and humans, and also at studying the features of the structure of motor nerve endings in the tongue muscles of healthy rats and rats that have undergone prolonged dehydration. Over 14 days, using histological methods we studied neuromuscular endings and peculiarities of their distribution in the tongue muscles of 25 mature rats, both in normal condition and under dehydration. The analysis of the results showed different structures of differentiated motor nerve endings among the rats in normal condition, and also revealed the peculiarities and quantitative characteristics of the components of the neuromuscular endings in relation to the duration of dehydration. The type of neuromuscular ending reflects the morphologically interdependent structure of efferent neuromediators in relation to a part of the tongue. This may determine the nature of the processes of prehension and chewing of food. The structure of neuromuscular endings of the muscles of the tip of the tongue is the most differentiated, they are more numerous and larger. The tip of the tongue of rats had a higher number of nuclei and larger size of the neuromuscular endings of the muscles than the other parts. This, perhaps, is determined by the speed of the movements of the tongue due to eating different foods. The number of nuclei and the size of neuromuscular endings are characterized by significant variations in the pattern of axon branching, which is determined by the anatomical, physiological and biomechanical conditions of functioning of the rats' tongue muscles. The quantitative analysis of structural peculiarities of axomycin synapses showed that muscle fibers of the tongue have neuroumuscular endings with regulated synaptoarchitectonics which is characterized by the sprouting of the motor axon, a certain length and width of the active zones, number and size of the synaptic folds, number of terminal neurolemmocytes, and the peculiarity in structure of the subsynaptic area. Muscle fibers in the body of the tongue have the most complex special distribution of presynaptic pole of axomuscular synapses, they also have the highest number of active zones and synaptic folds. We determined the main reactive and destructive processes while distinguishing certain phases of morphologically-functional changes in the organism under total dehydration. A complex analysis of the morpho-functional characteristics of the peripheral nervous apparatus of the tongue of rats subject to total dehydration helped reveal the structural rearrangement of the neuromuscular endings over certain periods. During first three days after the beginning of the dehydration modeling, a structural adaptation was manifested in the reorganization of the neuromuscular endings, which was followed by their destructive changes in 6–9 days, and a phase of exhaustion with disorders in the fine architectonics of neuromuscular endings after 14 days. The article discusses the peculiarities of the efferent part of the motor unit of the tongue of rats subject to prolonged dehydration.

Keywords: nerve-muscle endings; tongue; muscle fibres; dehydration; rats

Особенности строения двигательных нервных окончаний языка в норме и при дегидратации организма крыс

С. Л. Попель*, О. Т. Билоус**, И. В. Билоус*

*Прикарпатский национальный университет имени Василя Стефаныка, Ивано-Франковск, Украина
**Ивано-Франковский национальный медицинский университет, Ивано-Франковск, Украина

Цель исследования – провести аналитический обзор научной литературы по вопросу структуры языка у разных животных и человека, а также изучить особенности строения двигательных нервных окончаний в мышцах языка интактных крыс после длительной дегидратации. Гистологическими методами у 25 половозрелых крыс изучали нервно-мышечные окончания и особенности их распределения в мышцах языка в норме и при дегидратации на протяжении 14 суток. Анализ полученных данных показал разную структуру дифференцированных нервных двигательных окончаний языка крыс в норме, а также выявлены особенности и дана количественная характеристика составляющих компонентов нервно-мышечного окончания в зависимости от продолжительности

дегидратации. Тип нервно-мышечного окончания отражает тесную морфологическую взаимообусловленную структуру эфферентных нервных проводников в зависимости от отдела языка. Это может определять характер процессов захватывания и пережевывания пищи. Структура нервно-мышечных окончаний мышц кончика языка более дифференцирована, они более многочисленны и большего размера. При этом число ядер и размер нервно-мышечных окончаний мышц кончика языка у крысы больше, чем в других отделах. Это, возможно, определяется скоростью движений языка по причине их питания разной пищей. Число ядер и размер нервно-мышечных окончаний отличается значительными вариациями характера разветления аксона, что определяется анатомическими, физиологическими и биомеханическими условиями функционирования мышц языка у крыс. На основе количественного анализа структурных особенностей аксомышечных синапсов установлено, что мышечные волокна языка имеют нервно-мышечные окончания с заданной синаптоархитектоникой, которая характеризуется спраутингом двигательного аксона, определенной длиной и шириной активных зон, количеством и величиной синаптических складок, числом конечных нейролеммоцитов, особенностью строения субсинаптического участка. Мышечные волокна в теле языка имеют самую сложную пространственную организацию пресинаптического полюса аксомышечных синапсов, больше всего активных зон и синаптических складок. Установлены основные реактивные и деструктивные процессы в нервно-мышечных окончаниях языка, проведено морфологическое обоснование для периодизации этих процессов с выделением отдельных фаз Морфофункциональных изменений при общей дегидратации организма. Комплексный анализ морфофункциональных показателей периферического нервного аппарата языка при общей дегидратации организма позволил выявить в отдельные сроки структурной перестройки нервно-мышечных окончаний, когда в первые трое суток после начала моделирования дегидратации организма структурным следом адаптации является перестройка нервно-мышечных окончаний, которая сменяется их деструктивными изменениями через 6–9 суток и фазой истощения с нарушением тонкой архитектоники нервно-мышечных окончаний через 14 суток. Обсуждаются особенности эфферентной части двигательной единицы языка при длительной дегидратации.

Ключевые слова: нервно-мышечные окончания; язык; мышечные волокна; дегидратация; крысы

Введение

Строению периферического нервного аппарата скелетных мышц посвящено много работ (Bayline et al., 2001; Slaughter et al., 2006; Motoyama et al., 2009). В результате многочисленных исследований структура двигательных нервных окончаний и мионевральных синапсов в разных скелетных мышцах изучена достаточно хорошо (Mu and Sanders, 2010; Zciena et al., 2013).

Существует много данных, в которых устанавлена тесная связь между строением двигательных нервных окончаний с функциональными особенностями иннервируемой скелетной мышцы (Pathi et al., 2012; Tankisi et al., 2013; Zghikh et al., 2014; Simmons, 2017). Однако несмотря на большое количество работ, которые появились в последнее время, исследований, освещающих различный характер морфологии двигательных окончаний языка, очень мало (Ye, 2010; Hua, 2013).

Еще меньше сравнительно-гистологических исследований, которые дают возможность судить о характере изменений мионевральных синапсов в связи с процессами развития организма в разные периоды пре- и постнатального онтогенеза или адаптацией животных к различным условиям существования, а также при различных видах патологии (Bayline et al., 2001; Mu et al., 2013). Что касается сравнительно-гистологических данных о периферическом нервном аппарате языка млекопитающих, то в научной литературе они довольно скудны (Zciena et al., 2013; Dana and McCaughey, 2015). Кроме того, особый интерес изучение двигательных окончаний у крысы имеет потому, что их можно с определенной степенью достоверности перенести на человека, язык которого обладает наиболее тонкими и разнообразными движениями в связи с его участием в артикуляции речи (Amir and Grinfeld, 2011).

Данных о развитии двигательных нервных окончаний в мышцах языка немного. В доступной нам литературе встретились только отдельные работы, касающиеся этих образований у мышей (Suzuki et al., 2012), кошки (Zhang et al., 2001), лошади (Robin et al., 2013) и языка человека в возрастном аспекте (Slaughter et al., 2006). В последнее время появился целый ряд сообщений об изменениях разных тканей в условиях дегидратации организма разного генеза (Mosendz and Mickan, 2012). Отдельные авторы посвятили свои исследования реакции слизистой оболочки языка при дегидратации (Davidova et al., 2016). Особое место среди проявлений данной патологии занимает поражения нервно-мышечного аппарата.

В условиях дегидратации меняется не только метаболизм мышц (Hooper et al., 2014), но и их структура (Mosendz and Mickan, 2012). К сожалению, в доступной научной литературе публикаций о влиянии общей дегидратации организма на структуру и свойства нервно-мышечного аппарата языка мы не обнаружили. К этому времени комплексно не изучались процессы морфофункциональной перестройки мышечных волокон и нервно-мышечных синапсов в различные сроки при общей дегидратации организма.

Решение этих вопросов позволит выяснить механизм и характер явлений, развивающихся в периферическом нервно-мышечном аппарате, и в значительной степени влиять на них и корректировать водно-электролитный гомеостаз.

Количество жидкости влияет на развитие организма и обеспечивает оптимальные условия его функционирования, которые неразрывно связаны с реализацией биологических и социальных функций человека (Bunn et al., 2014). Она определяет нормальный рост и дифференциацию основных систем организма, способствует наиболее полной реализации генетического потенциала, становлению и формированию вегетативных функций (Hooper and Bunn, 2014). Уровень гидратации начиная с ранних этапов онтогенеза постепенно увеличивает адаптационные ресурсы организма и его функциональные возможности. В пределах допустимого диапазона она создает основу, необходимую для формирования адаптации, которая обеспечивает жизнедеятельность организма в условиях внешней среды. При отсутствии достаточного уровня межклеточной жидкости происходит задержка роста и развития организма и дифференциации его функций, уменьшается резистентность организма к воздействию патогенных факторов (Hooper et al., 2014). Отдельные авторы сообщают о повреждении функции скелетных мышц в условиях дегидратации, что, очевидно, обусловлено ослаблением механизма физиологической регенерации поврежденных структур мышечных волокон и нейротрофического контроля, который в значительной степени зависит от структурно-функционального потенциала нервно-мышечных синапсов (Mosendz and Mickan, 2012). Однако это положение во многом остается гипотетическим и требует своего подтверждения, особенно морфологическими методами как одним из способов объективизации научных исследований. Все сказанное послужило основой для актуализации данной работы.

Цель исследования – изучить особенности строения периферического нервно-мышечного аппарата языка интактных крыс, а также динамику его морфологической перестройки в условиях общего обезвоживания организма.

Материал и методы исследований

Материалом исследования послужил язык 25 крыс-самцов. Кусочки брали из корня, тела и кончика обеих сторон языка. Производились продольные и поперечные срезы. Материал обрабатывался по методу Бильшовского – Грос с дополнительной окраской ядер гематоксилином и электронномикроскопическим методом (Mosendz and Mickan, 2012). Для установления особенностей двигательных нервных окончаний в языке определяли площадь двигательного окончания как произведение длины на ширину, что давало возможность сравнивать полученные показатели

двигательных окончаний во все сроки исследования. Длина моторной бляшки измерялась от начала деления осевого цилиндра на терминальные веточки до конца самых длинных из них, включая и ядра подошвы, расположенные по ходу терминалей. Ширина определялась расстоянием между концами боковых терминалей и имеющимися здесь ядрами шванновской глии. Измерения производили окулярным микрометром под микроскопом МБИ-1 (объектив – $^{x}40$, окуляр – $^{x}15$). Для выяснения особенностей структуры двигательных окончаний подсчитывали терминальные веточки и ядер подошвы. На основании полученных цифровых данных вычислялись средние арифметические.

Контрольная группа состояла из пяти интактных животных. С целью изучения влияния дегидратации на состояние периферического нервно-мышечного аппарата языка проводили полное ограничение питьевого режима в течение 3, 6, 9 и 14 суток. Выживание лабораторных животных составило соответственно 96,0%, 56,0% и 4,5%. Забор материала проводили согласно «Правилам гуманного обращения с экспериментальными животными».

Статистическую обработку данных проводили при помощи програмного пакета Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Использовали непараметрические методы исследования (критерий Уилкоксона, Манна – Уитни). Параметры в таблице и тексте имеют такие обозначения: x – среднее, SE – стандартная ошибка среднего. Статистические изменения считали вероятными тогда при полученном уровне вероятности отличий $P < 0,05$.

Результаты

Двигательные нервные окончания встречаются во всех мышечных слоях корня, тела и кончика языка. Нельзя указать на какие-либо существенные различия в структуре двигательных окончаний, которые могли бы быть присущи одному из отделов или определенному мышечному слою языка. Везде двигательные окончания различны по форме, типу ветвления осевого цилиндра, количеству терминальных веточек и ядер, а также по размерам окончаний. Однако двигательные окончания чаще всего встречаются в теле языка. Во всех исследованных отделах языка наблюдаются четыре типа ветвления осевого цилиндра: дихотомический (простой и сложный), рассыпной, магистральный и переходный (рис. 1).

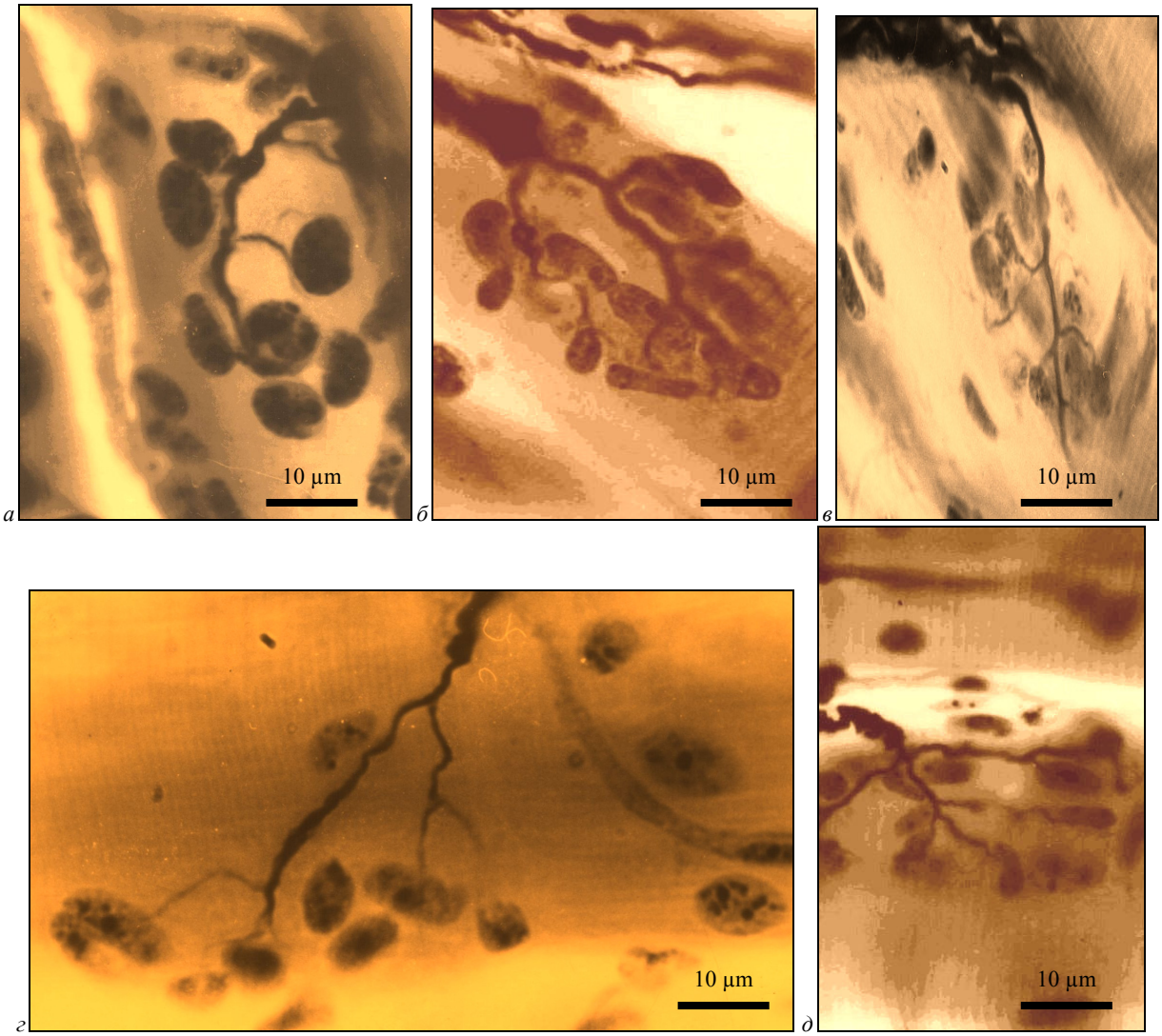


Рис. 1. Основные типы ветвления осевого цилиндра языка половозрелых крыс: *а* – простой дихотомический, *б* – сложный дихотомический, *в* – магистральный, *г* – рассыпной, *д* – переходный; импрегнация по Бильшовскому – Грос

Простой дихотомический тип ветвления характеризуется тем, что осевой цилиндр делится только на две терминальные веточки, тогда как при сложном дихотомическом типе основные терминали отдают от себя одну или ряд более мелких веточек. При рассыпном типе ветвления осевой цилиндр сразу делится на несколько веточек. При магистральном типе от ветви, являющейся главным продолжением осевого цилиндра, отходят боковые веточки с одной или двух сторон. Между этими основными типами существует переходный тип ветвления нервных терминалей. Наибольший процент двигательных окончаний простого дихотомического типа ветвления наблюдается в корне (76,0%), а наименьший – в кончике языка (28,4%) (табл. 1).

Сумма двигательных окончаний, обладающих наиболее дифференцированными типами ветвления осевого цилиндра, больше всего встречается в кончике (64,6%) и корне языка (75,5%). Самое большое количество терминальных веточек также наблюдается в кончике (4,73 ± 0,05), несколько меньше – в теле (3,52 ± 0,03) и совсем мало в корне языка (2,12 ± 0,02) (табл. 1).

Размеры и форма ядер в двигательных окончаниях разнообразны. Каждое ядро содержит одно, реже два – три ядрышка. Наибольшее число ядер конечных нейролеммоцитов обнаружено в корне (10,31 ± 1,15), а наименьшее – на боковой поверхности тела (4,04 ± 0,02) и кончике (5,81 ± 0,04) языка. При этом соотношение количества ядер в бляшке в одном отделе языка имеет незначительные колебания (от 8,42 ± 0,02 до 8,71 ± 0,05) (табл. 1).

Что касается площади бляшки, то она также оказалась наибольшей в кончике языка (1028,7 ± 68,2 мкм^2). Большую площадь бляшки, по сравнению со всеми исследованными отделами языка, за исключением тела, имеют боковые поверхности вблизи кончика (738,9 ± 23,4 мкм^2) и передняя часть тела языка (706,5 ± 21,9 мкм^2). Площадь бляшки имеет самые мелкие размеры в корне (361,0 ± 8,2 мкм^2) и в области под валикообразными сосочками слизистой оболочки языка (381,6 ± 68,2 мкм^2) (табл. 1).

После трех суток дегидратации в претерминальных участках образуются неравномерные расширения и сужения миелиновых нервных волокон, уменьшается площадь разветвления терминальных ветвей двигательного аксона, которые образуют пресинаптический полюс нервно-мышечных синапсов (рис. 2).

Возникновение варикозных деформаций связано с расслоением миелиновой оболочки (рис. 2*б*). При этом в ядрах нейролеммоцитов происходит конденсация хроматина, частичная вакуолизация цитоплазмы. В аксоплазме возрастает плотность матрикса митохондрий, расширяется периаксональное пространство и неравномерно сужается просвет прилегающих гемокапилляров.

В нервно-мышечных синапсах уменьшается периметр терминалей аксона, длина синаптических контактов, ширины и длины активных зон пресинаптической мембраны, количество синаптических везикул, уплотняется матрикс митохондрий и фрагментируются кристы. Со стороны постсинаптических структур необходимо отметить увеличение расстояния между синаптическими складками, что обусловлено их разрушением. По сравнению с контрольными показателями после 6-суточной дегидратации меняется топография эфферентных миелиновых волокон, и особенно их претерминальных отделов, растет частота и величина неравномерных расширений и сужений, уменьшается как первичный, так и вторичный спраутинг двигательных аксонов.

При электронномикроскопическом исследовании обнаружено, что в миелиновых волокнах расширяется периаксональное пространство, в аксоплазме возрастает степень агрегации филаментозно-тубулярных структур. При этом в цитоплазме нейролеммоцитов значительно увеличивается количество вакуолей, отражающее критические процессы захвата количества жидкости из межклеточного пространства, а миелиновая оболочка имеет множественные участки расслоения ламелл миелина.

В нервно-мышечных синапсах 6-суточная дегидратация вызывает дезинтеграцию большинства складок постсинаптической мембраны, расширение синаптической щели и врастание в нее отростков конечных нейролеммоцитов (рис. 3). В аксональных терминалях уменьшается число везикул и синаптических пузырьков, они приобретают разную величину, среди которых преобладают везикулы малого диаметра. Митохондрии малочисленные и, как правило, имеют просветленный матрикс и разрушеные кристы. В постсинаптическом отделе уменьшается (до 64,8%) количество синаптических складок, расстояние между ними увеличивается, ширина и длина активных зон уменьшаются соответственно на 66,6% и 46,7%. Вышеописанные изменения характерны для всех типов мышечных волокон языка, однако наибольшую устойчивость к патогенетическому воздействию дегидратации проявляют медленные оксидативные мышечные волокна, самую низкую – быстрые гликолитические, а быстрые окислительно-гликолитические мышечные волокна занимают промежуточное положение. Именно поэтому в таблице 2 представлены данные морфометрического аннализа основных структурных компонентов нервно-мышечных синапсов только быстрых гликолитических волокон.

Продление срока полного ограничения питьевой воды до 9 суток приводит к дегенеративному распаду отдельных эфферентных волокон и терминальных разветвлений двигательного аксона, что вызывает денервацию мышечных волокон. При этом в области нервно-мышечного контакта уменьшается количество нейролеммоцитов и аргирофилия их ядер (рис. 4).

Средняя площадь нервно-мышечного контакта уменьшается по сравнению с контролем на 65,6%, а по сравнению с данными предыдущего срока эксперимента – на 33,2%. Нервно-мышечные синапсы двигательных аксонов в быстрых гликолитических мышечных волокнах перегружены синаптическими пузырьками. Их количество на весь срез через активную зону синапса возрастает на 58,0% по сравнению с контрольными показателями и на 350,0‰ больше, чем на этапе 6-суточной дегидратации. В субсинаптической зоне выявляется меньшее количество рибо- и полирибосом, а также пиноцитозных пузырьков.

Таблица 1

Относительное распределение разных типов ветвления осевых цилиндров
и соотношение составных елементов двигательных бляшек в языке интактных крыс (n = 5)

Отдел языка	Типы ветвления осевого цилиндра, %					Количество веточек в бляшке	Количество ядер в бляшке	Площадь бляшки, мкм^2
	дихотомический		рассыпной	магистральный	переходный			
	простой	сложный						
Кончик	64,61	2,12	16,63	6,51	10,14	4,73	8,89	659,6
Тело	49,72	12,34	15,66	12,28	10,01	3,52	6,46	540,2
Корень	75,46	8,22	16,32	0,00	0,00	2,12	4,17	381,5

Таблица 2

Гистометрическая характеристика нервно-мышечных синапсов быстрых гликолитических мышечных волокон языка
в разные сроки экспериментальной дегидратации организма крыс (x ± SE, n = 5)

Структурные элементы и их параметры	Контроль	Длительность эксперимента			
		3 суток	6 суток	9 суток	14 суток
Периметр терминалей, мкм	7,23 ± 0,81	4,02 ± 0,34*	4,26 ± 0,32	3,66 ± 0,24	3,22 ± 0,26*
Длина синаптического контакта, мкм	2,88 ± 0,22	1,42 ± 0,24	0,83 ± 0,007	0,62 ± 0,002*	0,55 ± 0,003*
Количество складок постсинаптической мембраны	10,64 ± 1,26	6,11 ± 1,23	3,87 ± 0,9*	1,51 ± 0,23**	1,11 ± 0,01*
Расстояние между складками, мкм	0,21 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,92 ± 0,01*	0,98 ± 0,01**
Длина отдельной складки, мкм	2,87 ± 0,15	2,22 ± 0,12	1,61 ± 0,09**	1,25 ± 0,03	1,12 ± 0,02*
Ширина активной зоны, мкм	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01**
Длина активной зоны, мкм	0,85 ± 0,03	0,57 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,21 ± 0,01***
Количество везикул на весь срез через активную зону	165,4 ± 17,5	101,3 ± 12,4*	71,2 ± 16,8**	320,4 ± 52,2	120,0 ± 30,2*
Количество везикул в области активной зоны	10,69 ± 0,47	6,24 ± 0,32	4,25 ± 0,27	2,83 ± 0,21*	2,11 ± 0,14**

Примечание: * – P < 0,05; ** – P < 0,01 по сравнению с предыдущим этапом эксперимента.

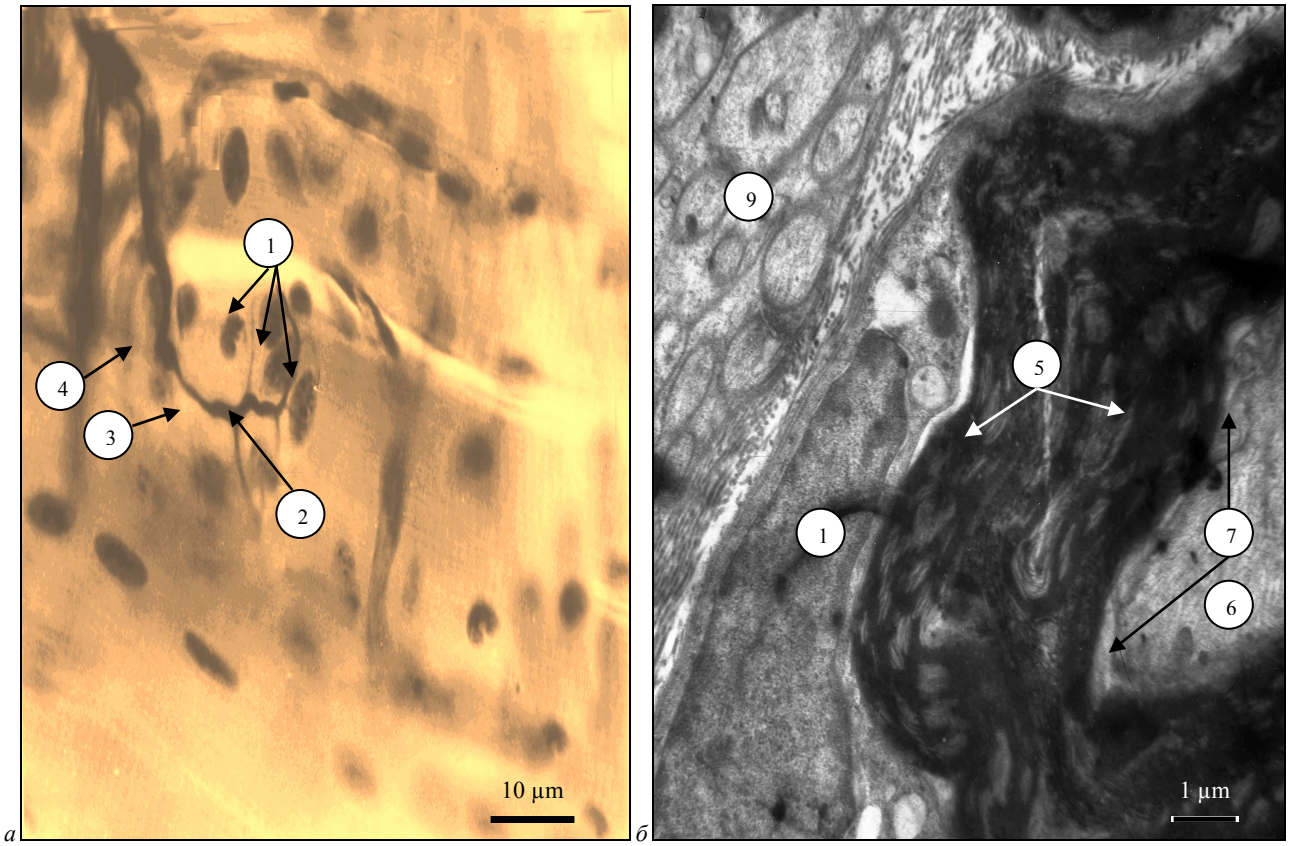


Рис. 2. Гистоструктурная (*а*) и ультраструктурная (*б*) организация периферического нервного аппарата собственных мышц языка через 3 суток после начала моделирования дегидратации: импрегнация по Бильшовському – Грос: *1* – нейролеммоциты; *2* – терминальные ветвления; *3* – сужение претерминалей; *4* – варикозное расширение претерминалей; *5* – миелиновая оболочка; *6* – аксон; *7* – периаксональное пространство; *8* – гемокапилляр; 9 – безмиелиновое нервное волокно

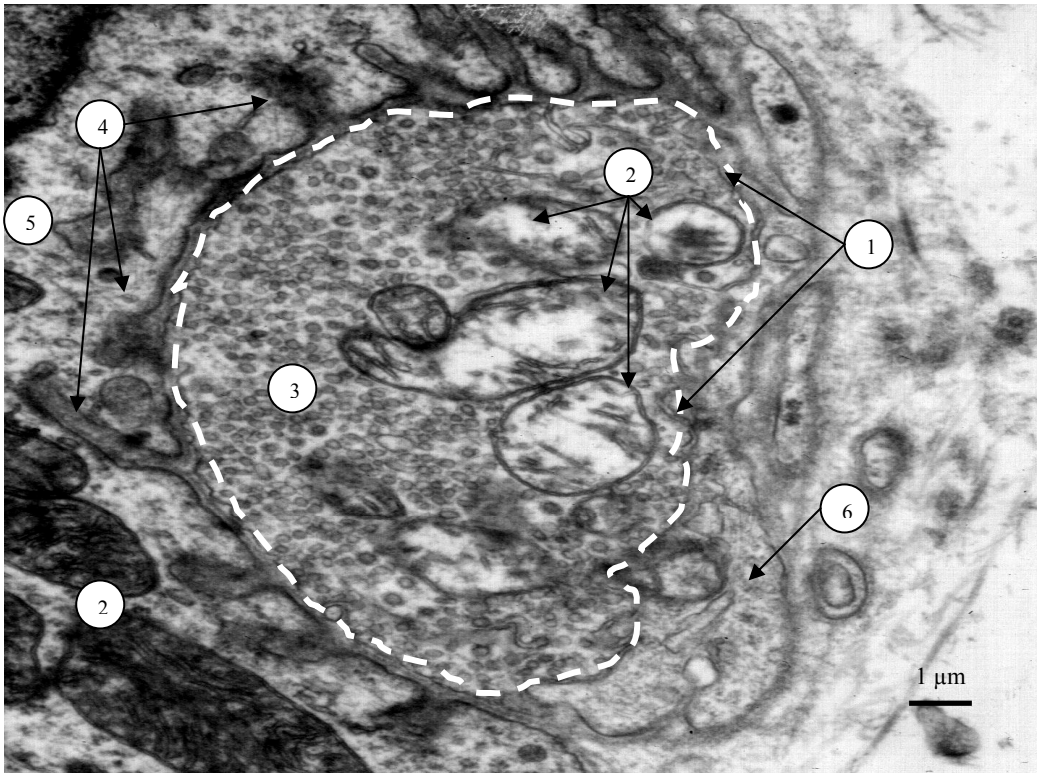


Рис. 3. Ультраструктура аксо-мышечного синапса через 6 суток после начала моделирования дегидратации: *1* – пресинаптический полюс АМС (контуры обведены пунктирной линией), *2* – митохондрии, *3* – синаптические везикулы, *4* – постсинаптические складки, *5* – мышечное волокно, 6 – нейролеммоцит

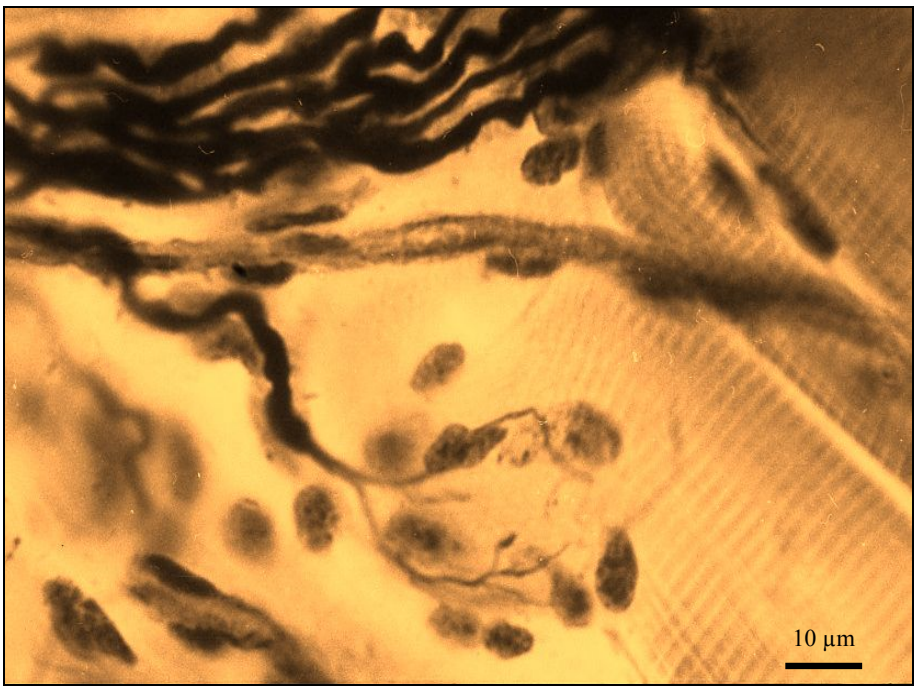


Рис. 4. Нарушение правильного контура миелиновой оболочки в области претерминалей двигательного нервного волокна через 9 суток после начала моделирования дегидратации: импрегнация по Бильшовскому – Грос

При этом незначительное количество пиноцитозных пузырьков, которые находятся в цитоплазме, проникают туда вследствие деструкции постсинаптической мембраны. Гистометрический анализ и исследования ультраструктуры нервно-мышечных синапсов быстрых окислительно-гликолитических и медленных окислительных мышечных волокон показал, что у них тоже появляется тенденция к уменьшению количества пиноцитозных пузырьков, длины синаптического контакта, количества синаптических складок, ширины и длины активных зон пресинаптической мембраны. На данном этапе эксперимента наблюдается формирование так называемых атрофических синапсов, для которых характерным признаком является полное отсутствие складок в постсинаптической мембране.

Особенность строения нервно-мышечных синапсов большинства мышечных волокон языка заключается в том, что пресинаптический полюс образован отдельными терминалями. Последние содержат относительно малое количество синаптических пузырьков, отсутствуют четко сформированные активные зоны. При этом терминали образуют расширенные аксон-нейролеммоцитные и аксон-аксонные щелевидные контакты.

Ограничение питьевого режима в течение 12 суток ведет к массивному разрушению нервно-мышечных окончаний, гомогенизации миелиновых оболочек и атрофии терминальных разветвлений аксонов (рис. 5).

Аксоплазма имеет повышенную электронно-оптическую плотность, в ней отсутствуют нейрофиламенты и другие специфические включения. В нервно-мышечных синапсах терминальные ветвления разрушаются, в результате чего пресинаптический полюс нервно-мышечных контактов прекращает свое существование. В этих участках наблюдаются остатки аксоплазмы. В связи с тотальной деструкцией ультраструктур аксо-мышечных синапсов на данном этапе эксперимента гистометрические исследования провести не удалось. Что касается синапсов атрофичных мышечных волокон, то для их терминалей характерно периферическое расположение синаптических пузырьков с одновременным образованием обширных пустот в центральной части нервных терминалей. Синаптические везикулы через поврежденные участки пресинаптической мембраны попадают в субсинаптическую зону, которая, как и на предыдущем этапе исследования, имеет примитивную архитектуру.

Обсуждение

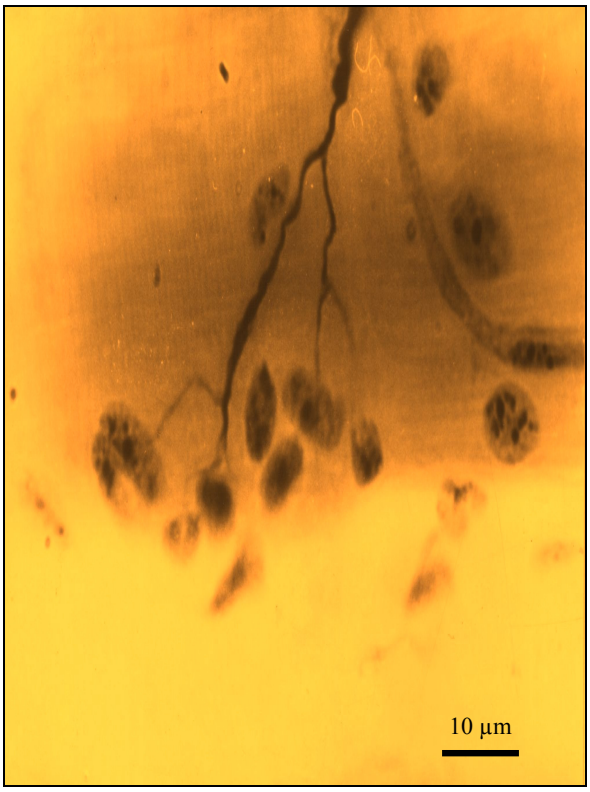
Данные об эмбриональном и постэмбриональном развитии двигательных нервных окончаний в организме животных и человека (Bayline et al., 2001) свидетельствуют о том, что наиболее примитивным типом ветвления осевого цилиндра является простой дихотомический, а более дифференцированными – рассыпной и магистральный тип ветвления нервных терминалей.

Полученные нами данные свидетельствуют о разнице в строении двигательных окончаний в разных отделах языка у одного и того же животного. При этом большинство двигательных окончаний имеет простой дихотомический тип ветвления (76,0%), а магистральный и переходный совсем отсутствуют. По имеющимся данным литературы, форма двигательных окончаний в мышцах языка у большинства млекопитающих довольно однообразна (Mu and Sanders, 2010). Например, Knittel and Kent (2005), исследовавшие двигательные окончания языка у представителей класса рыб, также отмечает удивительное сходство в их строении.

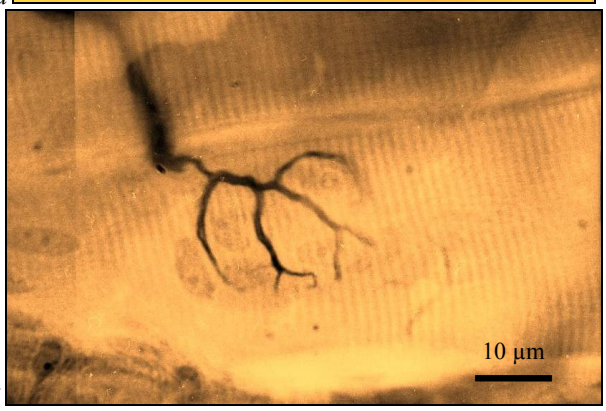
Однако авторы многочисленных работ, посвященных изучению двигательных нервных окончаний в скелетных мышцах животных, ограничиваются, как правило, лишь общим описанием двигательных окончаний и не анализируют их подробности (Simmons, 2017). Лишь сравнительно недавно Guttridge (2012) обратил внимание на изменение количества специфических ядер двигательного окончания при различных условиях деятельности мышц.

В работах Zhang et al. (2001) и Zciena et al. (2009) описываются уже не только изменение количества ядер, но и числа терминальных веточек, а также отмечаются вариации размеров двигательных окончаний и характера ветвления осевого цилиндра в мышцах, различающихся анатомическими, физиологическими, топографическими или биомеханическими условиями функционирования.

Основываясь на работах Bayline et al. (2001) и Zciena (2013), мы считаем, что для выявления разницы в строении двигательных бляшек у ряда животных необходимо тщательное исследование отдельных структур элементов, составляющих бляшку, ее размеров, характера ветвления осевого цилиндра. Это тем более необходимо, что и по результатам наших наблюдений, резких видовых различий в строении двигательных окончаний не обнаруживается. Мы считаем, что цифровые данные, полученные в результате такого исследования, могут, по-видимому, характеризовать степень дифференцирования двигательного окончания.



а



б

Рис. 5. Структура терминальных разветвлений нервно-мышечного окончания в контрольной группе животных (*а*) и их дегенеративный распад на 14-е сутки после начала моделирования дегидратации (*б*): импрегнация по Бильшовскому – Грос

Из работ Gaffield et al. (2011) и Simmons (2017) известно, что в нервно-мышечном синапсе происходит изменение обмена веществ при передаче возбуждении с нерва на мышцу. Активность мионеврального синапса зависит как от количества терминальных веточек и ядер бляшек, так и от ее размеров. Об этом свидетельствуют работы Knittel and Kent (2005), показавших, что характерной особенностью двигательных окончаний является высокая концентрация и активность локализованных в ней энзимов по сравнению с нервными и мышечными волокнами. При этом Mu et al. (2013) подчеркивают, что ферменты, необходимые для специфической деятельности нервных элементов, распределяются преимущественно в производных шванновской глии. В результате ветвления осевого цилиндра значительно увеличивается поверхность нервных волокон, контактирующих с протоплазмой шванновского симпласта.

Данные вышуказанных авторов подтверждаются также экспериментами других исследователей (Johnson and Connor, 2011), которые отмечают, что в зависимости от режима мышечной деятельности происходит увеличение или уменьшение количества терминальных веточек, ядер и площади двигательного окончания.

Сравнивая данные научной литературы (Motoyama et al., 2009; Suzuki et al., 2012; Dana and McCaughey, 2015) и результаты собственного исследования, мы пришли к выводу, что, по сравнению с мышами, двигательные бляшки языка крысы имеют довольно большие размеры (соответственно 212,3 ± 4,8 и 540,1 ± 9,1 мкм^2), содержат большее количество ядер (соответственно 4,9 ± 0,05 и 6,3 ± 0,07) и дифференцированные типы ветвления осевого цилиндра (рассыпной и магистральный).

По мнению Bayline et al. (2001), Gaffield et al. (2011) и Zghikh et al. (2014), это разнообразие вариаций в строении двигательных окончаний в языке млекопитающих связано с тем, что отдельные отряды и виды этого класса в процессе дивергентной эволюции приспособились к определенным условиям существования. В связи с этим различной оказывается и функция языка. Работами многих авторов (Suzuki et al., 2012; Simmons, 2016) на разнообразном фактическом материале показано, что изменение функции органа влечет за собой и изменение его структуры. На основании этого можно предположить, что структура двигательных окончаний в языке также связана с особенностью его функции. Однако необходимо подчеркнуть, что учесть особенности функции языка значительно труднее, чем скелетных мышц, тем более что в научной литературе такие данные отсутствуют.

Чтобы иметь возможность хотя бы в общих чертах судить о функции языка у животных, мы учитывали не только характер его движения во время питания, но и наличие ряда дополнительных действий. Анализируя данные, касающиеся строения двигательных окончаний языка крысы, прежде всего укажем на ясно выраженные существенные топографические различия: двигательные окончания кончика языка являются более дифференцированнными, то есть в них имеется значительно больше терминальных веточек и ядер в бляшках, чем в корне. Площадь двигательного окончания также значительно больше в теле языка. Кроме того, большинство двигательных окончаний тела языка обладают наиболее дифференцированными типами ветвления осевого цилиндра, в то время как в корне большинство бляшек – простого дихотомического типа.

Из данных научной литературы известно, что характер питания животных существенно отличается. Ряд авторов (Amir and Grinfeld, 2011; Simmons, 2017) указывают, что чем сложнее механизм захватывания пищи, тем более быстрые движения языка требуются и тем более сложный тип ветвления нервно-мышечных окончаний.

В строении двигательных окончаний языка исследованных представителей парнокопытных также наблюдаются различия: количество ядер и средняя площадь бляшки оказались больше у свиньи (Liu, 2009), чем у овцы (Choy, 1986). По-видимому, это можно связать с тем, что язык свиньи играет роль хватательного органа во время приема корма, тогда как у овцы функцию захватывания пищи выполняют губы.

В соответствии с этими данными интересны результаты исследования Pfeiffer et al. (2000) и Zciena et al. (2009), которые нашли, что ядро подъязычного нерва и мышцы языка более развиты у коровы и свиньи, чем у лошади, губы которой выполняют функцию захватывания корма, как и у овцы.

Сравнивая представителей разных отрядов, например, грызунов и хищных, можно отметить, что двигательные окончания в языке хищных более дифференцированны. Это, по-видимому, можно связать с разнообразным характером деятельности мышц языка. Помимо обычной функции, характерной для всех животных, язык хищников выполняет ряд дополнительных действий. Например, язык кошки, благодаря ороговеванию нитевидных сосочков, помогает животному сдирать мясо с костей и удерживать добычу в ротовой полости. Язык собаки является отчасти органом терморегуляции.

Что касается двигательных окончаний языка человека, то многие исследователи предполагали, что двигательные окончания в языке человека в связи с участием его в акте членораздельной речи будут более дифференцированными, чем у других исследованных животных (Motoyama et al., 2009; Johnstone et al., 2010).

В действительности оказалось, что наибольшей степени дифференцированности двигательные окончания достигают у ежа, совершающего чрезвычайно быстрые движения языком. Возникает предположение, что увеличение количества веточек, ядер и площади двигательного окончания связано, очевидно, в первую очередь с быстротой и интенсивностью, а не с тонкостью и разнообразием движений. Эти последние зависят, вероятно, от деятельности высшего отдела центральной нервной системы – коры головного мозга.

Следует подчеркнуть, что предположение о значении быстроты и интенсивности в сокращении мышц для формирования двигательных окончаний требует еще дальнейшего подтверждения.

Таким образом, обнаружено постепенное усложнение строения двигательных окончаний языка в норме, что зависит от их топографии. По нашему мнению, такая сложность и разнообразие нервно-мышечного аппарата языка у крыс должны отразиться на его реакции на самые разнообразные факторы как в норме, так и при патологии. Об этом свидетельствуют полученные нами данные экспериментального исследования, которые показали, что реакция нервно-мышечных окончаний на дегидратацию проявляется на всех уровнях их организации и имеет четко выраженную динамику. Сравнение ультраструктуры конечных нейролеммоцитов контрольных и подопытных животных показало ряд характерных изменений, которые свидетельствуют о развитии стресс-реакции в этих клетках в ответ на дегидратацию. Сравнительный анализ наших данных и данных научной литературы показал, что компенсаторно-приспособительные реакции нейролеммоцитов при дегидратации проявляются гипотрофией таких морфологических структур, которые обеспечивают достаточный уровень синтетических процессов в норме (Slater, 2015).

Обнаруженные нами электронномикроскопически признаки деструкции миелиновых волокон в виде расширения периаксонального пространства и высокая степень агрегации филаментозно-тубулярных структур в аксоплазме позволяют говорить о нарушении аксонного транспорта (Kuznetsov and Kuznetsov, 2014). Агрегация микротрубочек и нейрофиламентов может проходить в условиях повышенной кислотности аксоплазмы. Такое «закисление», очевидно, является результатом искаженной функции нейролеммоцитов, которые находятся в неадекватных условиях и выделяют в окружающую среду кислый белок (Gaffield et al., 2011). При этом в цитоплазме нейролеммоцитов и в аксоплазме нервных терминалей значительно увеличивается количество вакуолей и везикул разного диаметра, что свидетельствует о критическом уровне захвата жидкости из межклеточного пространства. При этом миелиновая оболочка имеет множественные участки расслоения ламелл миелина. Такая деградация миелиновой оболочки является показателем глубокого нарушения обмена фосфолипидов (Nawaz et al., 2013).

Уменьшение количества митохондрий, среди которых преобладают органеллы с матриксом низкой электронно-оптической плотности и редуцированными кристами следует трактовать как признак нарушения окислительного метаболизма при длительной дегидратации (Bunn et al., 2014). Поскольку в этом процессе митохондрии принимают непосредственное участие, можно предположить, что атрофия мышц языка обусловлена нарушением активного транспорта нейромедиатора в результате дефицитного энергообеспечения аксо-мышечной передачи нервного импульса. При этом морфологическим субстратом нарушения окислительного фосфориллирования является фрагментация и редукция крист, которая проявляется снижением активности сукцинатдегидрогеназы. Набухание митохондрий в отдельных участках аксо-мышечного синапса, очевидно, является результатом компенсаторно-приспособительной реакции, направленной на усиление их функциональной активности (Pathi et al., 2012). Подтверждение этого положения можно найти в более ранней работе Holstege and Kuypers (1987), где авторадиографическим методом выявлено рост синтеза ДНК в набухших митохондриях.

Если учесть, что число везикул нейромедиатора и количество митохондрий в пресинаптической области аксона зависит, с одной стороны, от синтетической активности нейрона (Mu, 2013), а с другой – от аксонного транспорта (Kuznetsov and Kuznetsov, 2014), выявленное нами существенное уменьшение периметра терминалей и длины синаптического контакта может выступать в роли третьего и не менее важного фактора, влияющего на снижение интенсивности процессов передачи нервного возбуждения в условиях дегидратации.

Вышеописанные изменения характерны для всех типов мышечных волокон языка, однако наибольшую устойчивость к патогенетическому воздействию дегидратации проявляют нервные окончания в медленных оксидативных мышечных волокнах, самую низкую – в быстрых гликолитических, а в быстрых окислительно-гликолитических мышечных волокнах занимают промежуточное положение.

Продление срока полного ограничения питьевой воды до 9 суток приводит к дегенеративному распаду отдельных эфферентных волокон и терминальных разветвлений двигательного аксона, что вызывает денервацию мышечных волокон. При этом их целостность некоторое время может поддерживаться мембранными рецепторами инсулина, количество которых возрастает при дегидратации и денервации мышечного волокна (Johansson and Arnqvist, 2006). Отмеченное нами уменьшение количества нейролеммоцитов и аргирофилия их ядер в области нервно-мышечного контакта не является специфическим явлением, поскольку похожие изменения наблюдали (Gaffield et al., 2011; Simmons, 2016) при нарушениях другого генеза.

Следует отметить, что прогрессирующее уменьшение площади нервно-мышечного контакта в комплексе с увеличением количества синаптических пузырьков в нервно-мышечных синапсах быстрых гликолитических терминалей двигательных аксонов свидетельствует о хроническом нарушении механизма экзоцитоза ацетилхолина через пресинаптическую мембрану. Аналогичное явление наблюдается при развитии миастенического синдрома (Tankisi et al., 2013).

Гистометрический анализ и исследования ультраструктуры нервно-мышечных синапсов быстрых окислительно-гликолитических и медленных оксидативных мышечных волокон показал, что у них тоже появляется тенденция к уменьшению количества пиноцитозных пузырьков, синаптических складок, ширины и длины активных зон пресинаптической мембраны, а также к уменьшению длины синаптического контакта в целом.

На данном этапе эксперимента мы наблюдали формирование так называемых атрофических синапсов, для которых характерным признаком является полное отсутствие складок в постсинаптической мембране. Уменьшение складчатости мембраны ведет к сужению ее площади, а значит, к снижению количества холинорецепторов, исчезновению дополнительной площади для инактивации медиатора с помощью ацетилхолинэстеразы и уменьшению количества Na-K-АТФ-азы, которая обеспечивает местную реполяризацию постсинаптической мембраны (Fritz and Müller, 2007). Пресинаптическая мембрана в этой ситуации обеспечивает экзоцитоз ацетилхолина как в активных, так и в неактивных зонах. Подобное явление описано в работе Rothman (2013) при действии токсинов, которые блокируют экзоцитоз медиатора.

Особенность строения нервно-мышечных синапсов большинства мышечных волокон заключается в том, что пресинаптический полюс образован отдельными терминалями. Последние содержат относительно малое количество синаптических пузырьков, отсутствуют четко сформированные активные зоны. При этом терминали образуют расширенные аксон-нейролеммоцитные и аксон-аксонные щелевидные контакты. Учитывая динамику образования атрофических синапсов и вышеприведенные данные, можно сделать вывод о широком участии нейролеммоцитов в процессе дегидратации мышечных волокон. Мы предполагаем, что после разрушения аксонных терминалей нейролеммоциты тормозят синтез и структурирование в матриксе синаптической щели вещества или веществ, которые определяют запуск механизмов роста аксона, а затем и его торможения при контакте с базальной пластинкой бывшего синапса. Таким фактором может быть снижение

концентрации вещества Р, фактора роста аксонов и других биологически активных веществ (Moore and Goldberg, 2011). Однако образование эффективных синапсов и длительное поддержание их нормальной структуры в условиях дегидратации невозможно, поскольку требует воздействия прогностических факторов роста – миотрофинов. В условиях подавления физиологического обмена межклеточной жидкости в мышечных волокнах при ограничении поступления питьевой воды аксоны, хотя и реиннервируют «старую» базальную пластинку, пробыв на ней некоторое время, исчезают из зоны бывшего синапса.

Ограничение питьевого режима в течение 12 суток ведет к массивному разрушению нервно-мышечных окончаний, гомогенизации миелиновых оболочек, атрофии терминальных разветвлений аксонов. Аксоплазма электронноплотная, в ней отсутствуют нейрофиламенты и другие специфические включения. Такие дегенеративные изменения свидетельствуют о существенном нарушении в системе аксонного транспорта. Нейротрофическое влияние мотонейрона на мышечные волокна в значительной степени зависит от системы аксонного транспорта. На это указывает ряд исследований при его фармакологической блокаде (García et al., 2013). Поэтому деструктуризация аксоплазмы при дегидратации следует расценивать как фактор, который ослабляет нейротрофический контроль на мембрану мышечного волокна. Для реализации нейротрофического контроля большое значение имеет секреция ацетилхолина (Bayline et al., 2001; Suzuki et al., 2012), который является обязательным фактором для выделения из терминальной аксоплазмы специфических трофогенов (Moore and Goldberg, 2011).

В нервно-мышечных синапсах терминальные ветвления разрушаются, в результате чего пресинаптический полюс нервно-мышечных контактов прекращает свое существование. В этих участках наблюдаются остатки аксоплазмы. Постоянным признаком при всех формах и степенях нейро- и миопатии является недостаточность активной передачи импульса в зоне пресинаптической мембраны (Mu, 2013). Результаты, полученные нами, показывают, что при дегидратации к имеющимся деструктивным изменениям претерминальных волокон и аксонных терминалей присоединяется недостаточность передачи импульсов, которая обусловлена глубокими дегенеративными изменениями в постсинаптических мембранах, которые усиливают влияние других неблагоприятных факторов на состояние поперечнополосатых мышц языка. В связи с тотальной деструкцией ультраструктур аксомышечных синапсов на данном этапе эксперимента гистометрические исследования провести не удалось.

Выводы

В языке крысы наблюдаются следующие типы ветвления осевого цилиндра двигательного окончания: дихотомический (простой и сложный), рассыпной, магистральный и переходный. Степень развития двигательных нервно-мышечных синапсов языка (количество терминальных веточек и ядер, а также площадь бляшки) различна в разных отделах языка в связи с тем, что в процессе дивергентной эволюции отдельные части языка млекопитающих приспособились к различным условиям захвата и пережевывания пищи. Увеличение количества терминальных веточек, ядер и площади двигательного окончания связано в первую очередь с быстротой, а не с тонкостью и разнообразием движений иннервируемого органа.

Патоморфологические изменения при дегидратации организма отражают тесное взаимодействие нервно-мышечных окончаний при метаболической, реактивной и дистрофической перестройке мышечных волокон при общей дегидратации организма. Неодинаковая степень их выраженности связана с существованием в составе мышц языка различных мышечных волокон, причем преобладают мышечные волокна промежуточного типа, которые наиболее чувствительны к резкому ограничению питьевого режима.

В мышечных волокнах языка вместе с измененными митохондриями и миофибриллами находятся поврежденные органеллы в аксо-мышечных синапсах с признаками как реактивных, так и деструктивных процессов, что указывает на тесную морфофункциональную взаимосвязь между этими структурами.

References

Amir, O., & Grinfeld, D. (2011). Articulation rate in childhood and adolescence: Hebrew speakers. Language and Speech, 54(2), 225–240.

Bayline, R. J., Duch, C. C., & Levine, R. B. (2001). Nerve-muscle interactions regulate motor terminal growth and myoblast distribution during muscle development. Developmental Biology, 231, 348–363.

Bunn, D., Jimoh, F., Wilsher, S., & Hooper, L. (2014). Effectiveness of external factors to reduce the risk of dehydration in older people living in residential care: A systematic review. BMC Health Services Research, 14(Suppl 2), P11.

Choy, V. J. (1986). Isolation and properties of sheep neurohypophysial nerve terminals. Neuropeptides, 7(4), 337–349.

Dana, R. M., & McCaughey, S. A. (2015). Gustatory responses of the mouse chorda tympani nerve vary based on region of tongue stimulation. Chemical Senses, 40(5), 335–344.

Davidova, L. M., Tkach, G. F., Sikora, V. Z., Kiptenko, L. I., & Maksimova, O. S. (2016). Dinamika strukturnoji organizaciji jazyka shhuriv za umov vplivu zagal'nogo znevodnennja organizmu [The dynamics of the structural organization of tongue of rats under the influence of general dehydration]. Aktual'ni Problemy suchasnoji Medicyny, 16(4), 8–12 (in Ukranian).

Fritz, M., & Müller, V. (2007). An intermediate step in the evolution of ATPases – F1F0-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesisthe. FEBS Journal, 274(13), 3421–3428.

Gaffield, M. A., Romberg, C. F., & Betz, W. J. (2011). Live imaging of bulk endocytosis in frog motor nerve terminals using FM dyes. Journal of Neurophysiology, 106(2), 599–607.

García, M. R., Pearlmutter, B. A., Wellstead, P. E., & Middleton, R. H. (2013). A slow axon antidromic blockade hypothesis for tremor reduction via deep brain stimulation. PLoS ONE, 8(9), 734–756.

Guttridge, D. C. (2012). Skeletal muscle regeneration. In: Hill, J. (ed.). Muscle. Fundamental Biology and Mechanisms of Disease. Elsevier, 2, 921–933.

Holstege, J. C., & Kuypers, H. G. J. M. (1987). Brainstem projections to lumbar motoneurons in rat – I. An ultrastructural study using autoradiography and the combination of autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. Neuroscience, 21(2), 345–367.

Hooper, L., & Bunn, K. (2014). Predictors of dehydration in older people living in UK residential care. European Geriatric Medicine, 5, 202–203.

Hooper, L., Bunn, D., Jimoh, F. O., & Fairweather-Tait, S. J. (2014). Water-loss dehydration and aging. Mechanisms of Ageing and Development, 136, 50–58.

Hooper, L., Bunn, K., Prado, M., & Siervo, M. (2014). Assessment of dehydration in older people: Agreement of measured serum osmolality with calculated serum osmolarity equations. European Geriatric Medicine, 5, 80.

Hua, T. E., Yang, T. L., Yang, W. C., Liu, K. J., & Tang, S. C. (2013). 3-D neurohistology of transparent tongue in health and injury with optical clearing. Frontiers Neuroanatomy, 7, 36–42.

Johansson, G. S., & Arnqvist, H. J. (2006). Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells. AJP: Endocrinology and Metabolism, 291(5), 1124–1130.

Johnstone, A. F. M., Viele, K., & Cooper, R. L. (2010). Structure/function assessment of synapses at motor nerve terminals. Synapse, 65(4), 287–299.

Knittel, L. M., & Kent, K. S. (2005). Remodeling of an identified motoneuron during metamorphosis: Hormonal influences on the growth of dendrites and axon terminals in fish. Journal of Neurobiology, 63(2), 106–125.

Kuznetsov, I. A., & Kuznetsov, A. V. (2014). What tau distribution maximizes fast axonal transport toward the axonal synapse? Mathematical Biosciences, 253, 19–24.

Liu, Z.-J., Shcherbatyy, V., Kayalioglu, M., & Seifi, A. (2009). Internal kinematics of the tongue in relation to muscle activity and jaw movement in the pig. Journal of Oral Rehabilitation, 36(9), 660–674.

Moore, D. L., & Goldberg, J. L. (2011). Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. Developmental Neurobiology, 71(12), 1186–1211.

Mosendz, T. M., & Mickan, B. M. (2012). Struktura skeletnogo m'jaza pri termorobochij degidrataciji organizmu [The structure of skeletal muscle during termal dehydration]. Morfologija, 94(1), 150–153 (in Ukranian).

Motoyama, A. A., Watanabe, I. S., Iyomasa, M. M., Silva, M. C. P., Sosthines, M. C. K., Lopes, M. G. O., Guimarães, J. P., & Kfoury, J. R. (2009). Ultrastructure of motor nerve terminals in the anterior third of wistar rat tongue. Microscopy Research and Technique, 72(6), 464–470.

Mu, L., & Sanders, I. (2010). Human tongue neuroanatomy: Nerve supply and motor endplates. Clinical Anatomy, 23(7), 777–791.

Mu, L., Sobotka, S., Chen, J., Su, H., Sanders, I., Adler, C. H., Shill, H. A., Caviness, J. N., Samanta, J. E., & Beach, T. G. (2013). α-Synuclein pathology and

axonal degeneration of the peripheral motor nerves innervating tongue muscles in Parkinson Disease. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 72(2), 119–129.
Nawaz, S., Schweitzer, J., Jahn, O., & Werner, H. B. (2013). Molecular evolution of myelin basic protein, an abundant structural myelin component. Glia, 61(8), 1364–1377.
Pathi, B., Kinsey, S. T., Howdeshell, M. E., Priester, C., McNeill, R. S., & Locke, B. R. (2012). The formation and functional consequences of heterogeneous mitochondrial distributions in skeletal muscle. Journal of Experimental Biology. 215(11), 1871–1883.
Pfeiffer, C. J., Levin, M., & Lopes, M. A. F. (2000). Ultrastructure of the horse tongue: Further observations on the lingual integumentary architecture. Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C, 29(1), 37–44.
Robin, M., Malbon, A., Ricci, E., McGowan, C., & Malalana, F. (2013). Reduced tongue tone associated with degeneration of the hypoglossal nerve nucleus in a horse with equine motor neuron disease. Equine Veterinary Education, 28(8), 434–438.
Rothman, J. (2013). Control of membrane fusion in exocytosis. Biophysical Journal, 104(2), 11a.
Simmons, Z. (2016). Changes in muscle and Nerve. Muscle and Nerve, 55(1), 1–2.
Simmons, Z. (2017). The scope of muscle and nerve. Muscle and Nerve, 55(5), 615–616.
Slater, C. R. (2015). The functional organization of motor nerve terminals. Progress in Neurobiology, 134, 55–103.
Slaughter, K., Li, H., & Sokoloff, A. J. (2006). Neuromuscular organization of the superior longitudinalis muscle in the human tongue 1. Motor endplate morphology and muscle fiber architecture. Cells Tissues Organs, 181(1), 51–64.
Suzuki, E., Aoyama, K., Fukui, T., Nakamura, Y., & Yamane, A. (2012). The function of platelet-derived growth factor in the differentiation of mouse tongue striated muscle. Orthodontics and Craniofacial Research, 15(1), 39–51.
Tankisi, H., Otto, M., Pugdahl, K., & Fuglsang-Frederiksen, A. (2013). Spontaneous electromyographic activity of the tongue in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle and Nerve, 48(2), 296–298.
Watanabe, I., Guimarães, J. P., Boleta Almeida, S. A. Y., Righeti, M. M., Santos, T. C., Miglino, M. A., & Kfoury, J. R. (2009). Nerve endings of filliform, fungiform and vallate papillae of dorsal tongue mucosa of White-lipped peccary (*Tayassu pecari*): Neurohistological observations. Pesquisa Veterinária Brasileira, 29(4), 281–285.
Ye, W., Abu, A. F., & Liu, Z. J. (2010). Assessment of cell proliferation and muscular structure following surgical tongue volume reduction in pigs (guineia pigs). Cell Proliferation, 43(6), 562–572.
Zciena, A. P., Bolina, C. S., Almeida, S. R. Y., Rici, R. E. G., Oliveira, M. F., Silva, M. C. P., Miglino, M. A., & Watanabe, I. S. (2013). Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* Linnaeus 1766). Journal of Anatomy, 223,(2), 152–158.
Zghikh, L. N., Vangysel, E., Nonclercq, D., Legrand, A., Blairon, B., Berri, C., Bordeau, T., Rémy, C., Burtéa, C., Montuelle, S. J., & Bels, V. (2014). Morphology and fibre-type distribution in the tongue of the *Pogona vitticeps* lizard (Iguania, Agamidae). Journal of Anatomy, 225(4), 377–389.
Zhang, L. F., Moritani, M., Honma, S., Yoshida, A., & Shigenaga, Y. (2001). Quantitative ultrastructure of slowly adapting lingual afferent terminals in the principal and oral nuclei in the cat. Synapse, 41(2), 96–111.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 343–348
doi: 10.15421/021753

Grouping and clustering of maize Lancaster germplasm inbreds according to the results of SNP-analysis

K. V. Derkach*, T. M. Satarova**, V. V. Borysova*, V. Y. Cherchel*, B. V. Dzyubeckiy*

**Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Dnipro, Ukraine*
***Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine*

Article info

Received 19.06.2017
Received in revised form 28.07.2017
Accepted 03.08.2017

Institute of Grain Crops of NAAS of Ukraine, V. Vernadsky Str., 14, Dnipro, 49067, Ukraine.

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine. Tel.: +38-056-236-26-18. E-mail: satarova2008@ukr.net, kvderkach@gmail.com

Derkach, K. V., Satarova, T. M., Borysova, V. V., Cherchel, V. Y., & Dzyubeckiy, B. V. (2017). Grouping and clustering of maize Lancaster germplasm inbreds according to the results of SNP-analysis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 343–348. doi: 10.15421/021753

The objective of this article is the grouping and clustering of maize inbred lines based on the results of SNP-genotyping for the verification of a separate cluster of Lancaster germplasm inbred lines. As material for the study, we used 91 maize (*Zea mays* L.) inbred lines, including 31 Lancaster germplasm lines and 60 inbred lines of other germplasms (23 Iodent inbreds, 15 Reid inbreds, 7 Lacon inbreds, 12 Mix inbreds and 3 exotic inbreds). The majority of the given inbred lines are included in the Dnipro breeding programme. The SNP-genotyping of these inbred lines was conducted using BDI-III panel of 384 SNP-markers developed by BioDiagnostics, Inc. (USA) on the base of Illumina VeraCode Bead Plate. The SNP-markers of this panel are biallelic and are located on all 10 maize chromosomes. Their range of conductivity was >0.6. The SNP-analysis was made in completely automated regime on Illumina BeadStation equipment at BioDiagnostics, Inc. (USA). A principal component analysis was applied to group a general set of 91 inbreds according to allelic states of SNP-markers and to identify a cluster of Lancaster inbreds. The clustering and determining hierarchy in 31 Lancaster germplasm inbreds used quantitative cluster analysis. The share of monomorphic markers in the studied set of 91 inbred lines equaled 0.7%, and the share of dimorphic markers equaled 99.3%. Minor allele frequency (MAF) > 0.2 was observed for 80.6% of dimorphic markers, the average index of shift of gene diversity equaled 0.2984, PIC on average reached 0.3144. The index of gene diversity of markers varied from 0.1701 to 0.1901, pairwise genetic distances between inbred lines ranged from 0.0316–0.8000, the frequencies of major alleles of SNP-markers were within 0.5085–0.9821, and the frequencies of minor alleles were within 0.0179–0.4915. The average homozygosity of inbred lines was 98.8%. The principal component analysis of SNP-distances confirmed the isolation of the Lancaster group within the general set of analyzed inbred lines. Two-dimensional component analysis showed that the first principal component (PCA1) accounted for 36.0% of total variation and divided the investigated set of 91 inbred lines into two fractions, while all the inbred lines which are considered Lancaster based on pedigree information were included in one of the fractions. The second principal component (PCA2), which accounted for 12.1% of total variation, separated most of the Lancaster germplasm inbred lines from the others in this fraction, although the overlapping of the locations of Lancaster and non-Lancaster inbred lines was observed. Qualitative cluster analysis of 31 Lancaster germplasm inbred lines allowed to identify two clusters: the first one includes 23 inbred lines of Ukrainian selection and the well known Mo17 inbred line (77.4% of total number of analysed lines) inbred line, and the second cluster included 6 inbred lines of Ukrainian selection and the well known Oh43 inbred line (22.6% of total number of analysed lines) inbred line. The isolation of two clusters within Lancaster germplasm indicates the genetic diversity in this plasm. The evaluation of genome similarities through allelic states of SNP-markers can successfully be used for classification and systematization of the gene pool of maize genetic resources.

Keywords: *Zea mays*; markers of single nucleotide polymorphism of DNA; principal component analysis; cluster analysis

Групування та кластеризація ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу

К. В. Деркач*, Т. М. Сатарова**, В. В. Борисова*, В. Ю. Черчель*, Б. В. Дзюбецький*

**Інститут зернових культур НААН України, Дніпро, Україна*
***Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна*

Охарактеризовано репрезентативність маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК панелі BDI-III з 384 SNP-маркерів для 91 лінії кукурудзи Дніпровської селекційної програми різних зародкових плазм. Проведено групування досліджуваного масиву ліній за алельним станом SNP-маркерів та ідентифікацію кластера плазми Ланкастер серед загальної добірки ліній шляхом проведення двовимірного

принципового компонентного аналізу. За результатами якісного кластерного аналізу методом повного зв'язку відмічено генетичне різноманіття всередині плазми Ланкастер за варіюванням алельного стану SNP-маркерів. Серед проаналізованих ліній зародкової плазми Ланкастер виділено два підкластери. Перший підкластер об'єднує 23 лінії української селекції та широковідому лінію Mo17 (77,4%), другий – 6 ліній української селекції та широковідому лінію Oh43 (22,6%).

Ключові слова: *Zea mays*; маркери однонуклеотидного поліморфізму ДНК; принциповий компонентний аналіз; кластерний аналіз

Вступ

Внутрішньовидова систематизація генетичних ресурсів культурних рослин – актуальна проблема, особливо для монотипних родів, таких як кукурудза (*Zea mays* L.). За рахунок багаторічної селекції усередині одного виду існують сотні, тисячі і навіть мільйони локальних популяцій, ліній, гібридів, сортів. Упорядкування цієї маси представників того чи іншого виду культурних рослин залежно від їх генетичної спорідненості та геномна характеристика – необхідні завдання молекулярної генетики та біотехнології.

Сучасна селекція кукурудзи будується на основі гетерозисних моделей і полягає у використанні лінійного матеріалу різних типів зародкової плазми. Типи зародкової плазми – окремі групи, які об'єднують значну кількість споріднених генотипів кукурудзи, тобто тих, які мають спільне походження, як правило, походять від одного вихідного сорту. Для України селекційно найперспективніша група ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. Вирощуються також лінії зародкових плазм Айодент, Лакон, Рейд. Лінії плазми Ланкастер відрізняються високою комбінаційною здатністю, інтенсивним стартовим ростом, середньою стійкістю до хвороб і, головне, значною посухо- та жаростійкістю, що актуально в умовах глобального потепління (Dzjubec'kij et al., 2012; Derkach et al., 2016).

Сучасні генотипи зародкової плазми Ланкастер походять від вільнозапиленого сорту Lancaster Sure Crop, який створила родина Hershey з округу Ланкастер, штат Пенсильванія (США). Родина Hershey у 1860–1910 рр. працювала з місцевим напівкременистим сортом, який характеризувався малими тонкими качанами лавандового (бузкового) кольору. Спочатку відбирали за середньою довжиною качана, добре дозрілим насінням, неураженістю пліснявою. Постійно відбирали качани з кременистими зернами, хоча схрещування проводили з пізніми зубоподібними сортами. Пізніше під час відбору почали звертати увагу на міцніші корені та більші качани. Відібраний із цього типу зародкової плазми сорт кукурудзи названо Sure Crop через його ранньостиглість і посухостійкість, що забезпечувало сталий впевнений врожай. Окремо селекцією вільнозапиленого сорту Lancaster займалася родина Richey біля Ла Саля, штат Іллінойс, із 1888 по 1920 рр., створивши сорт Richey Lancaster. Насіння сорту Lancaster Sure Crop потрапило до них через мігрантів із Міннесоти, які привезли його з Пенсильванії. Селекцію вели на більшу довжину качана, більшу масу насіння, вищу врожайність та кращу схожість насіння. Сучасні лінії плазми Ланкастер переважно походять від двох ліній першого циклу самозапилення сорту Ланкастер – Oh40B (від сорту Richey Lancaster) та C103 (від сорту Lancaster Sure Crop), хоча практичного значення набули лінії другого циклу самозапилення Mo17 (від лінії C103) та Oh43 (від лінії Oh40B) (Bennetzen and Hake, 2009).

Історично склалося, що приналежність ліній кукурудзи до певного типу зародкової плазми, тобто внутрішньовидова класифікація, яка покликана бути філогенетичною, ґрунтується на даних педігрі (родоводів), тобто взаємовідносини ліній оцінюються залежно від їх походження. Така класифікація недосконала, бо родоводи мають такі недоліки як суб'єктивність, пропуски в записах, неможливість відновлення тих їх частин, які належать до XIX – першої половини XX сторіччя, міксування неспоріднених генотипів у генотипі нащадка. Внутрішньовидова класифікація кукурудзи, основана на оцінюванні, наприклад, комбінаційної здатності (поділ зразків не на зародкові плазми, а на гетерозисні групи), також не досконала, оскільки прояв ознаки комбінаційної здатності залежить не тільки від генотипу, а і від факторів довкілля. Поділ генофонду культурної рослини по групах адаптації до мінливих умов довкілля зустрічається з тим, що генотипи однієї групи адаптації не обов'язково гомологічні за походженням (Dzjubec'kij et al., 2012). Разом із цим, використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів, зокрема, маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК (single nucleotide polymorphism), тобто SNP-маркерів, розглядається як потенційно ефективний інструмент внутрішньовидової класифікації та систематизації генофонду культурних рослин, що враховують спорідненість і варіювання на рівні геномів, на відміну від методів, які базуються на порівнянні за фенотипічними ознаками (Elshire et al., 2013; Wu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Mikić et al., 2017).

У зв'язку із цим, мета нашого дослідження – групування та кластеризація ліній кукурудзи за результатами SNP-генотипування для верифікації окремого кластера ліній зародкової плазми Ланкастер.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом дослідження виступали 91 лінія кукурудзи (*Zea mays* L.), зокрема, 31 лінія зародкової плазми Ланкастер і 60 ліній інших зародкових плазм (23 лінії плазми Айодент, 15 ліній плазми Рейд, 7 ліній плазми Лакон, 12 ліній плазми Мікс та 3 лінії екзотичної плазми). Переважна більшість ліній входить до Дніпровської селекційної програми.

SNP-генотипування цих ліній проводили за панеллю BDI-III з 384 SNP-маркерів, розробленою фірмою BioDiagnostics, Inc. (США) на основі Illumina VeraCode Bead Plate. SNP-маркери панелі BDI-III біалельні, розташовані на всіх 10 хромосомах кукурудзи, мають ранг конструктивності > 0,6 (Venkatramana et al., 2012). SNP-аналіз виконано у повністю автоматизованому режимі на обладнанні Illumina BeadStation на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (США).

Оцінювання репрезентативності SNP-маркерів для набору з 91 лінії кукурудзи проводили за Lu et al. (2009) за такими показниками: частота пропущених даних, частота мономорфних та диморфних маркерів, частота мажорних та мінорних алелів, показник зсуву генного різноманіття маркера, показник генного різноманіття лінії, індекс інформативності, гомозиготність і гетерозиготність зразків.

Частоту пропущених даних за маркером *i* (%, missing data points) розраховували як процентне відношення кількості зразків, за якими не вдалося визначити алельний стан маркера *i*, до загальної кількості зразків, для яких проводили визначення алельного стану маркера *i*. Частоту мономорфних маркерів у даному наборі зразків (%) розраховували як процентне відношення кількості біалельних маркерів, які в даному наборі зразків виявили мономорфний стан, до загальної кількості біалельних маркерів, за якими проаналізовано дану сукупність зразків. Частоту диморфних маркерів у даному наборі зразків (%) розраховували як відношення кількості біалельних маркерів, які в даному наборі селекційних зразків виявили диморфний стан, до загальної кількості біалельних маркерів, за якими проаналізовано набір зразків. Частоту мажорного алеля за маркером *i* в даному наборі зразків розраховували як відношення кількості зразків, в яких виявлено мажорний алельний стан за маркером *i*, до загальної кількості зразків, проаналізованих за маркером *i*. Даний показник визначається в частках одиниці і завжди більший за 0,5. Частоту мінорного алеля за маркером *i* в даному наборі зразків (minor allele frequency, MAF) розраховували як відношення кількості зразків, у яких виявлено мінорний алельний стан за маркером *i*, до загальної кількості зразків,

проаналізованих за маркером *i*. Даний показник визначається в частках одиниці і завжди менший за 0,5.

Показник зсуву генного різноманіття для маркера *i* у даному наборі зразків розраховували за формулою:

$$1 - [(p_i^+)^2 + (p_i^-)^2],$$

де p_i^+ та p_i^- – частоти альтернативного стану маркера *i* для набору зразків, проаналізованих за даним маркером. Показник визначали в частках одиниці (в межах 0,0–0,5).

Показник генного різноманіття зразка *k* (gene diversity) визначали за формулою:

$$(n_A \bullet n_A - 1 + n_T \bullet n_T - 1 + n_Г \bullet n_Г - 1 + n_Ц \bullet n_Ц - 1)/2N \bullet (N - 1),$$

де n_A, n_T, $n_Г$ і $n_Ц$ – кількість маркерів, які в маркерному сайті містять, відповідно, аденін, тимін, гуанін та цитозин, N – загальна кількість маркерів, за якими досліджено зразок *k*. Показник розраховували в частках одиниці. Його значення можуть коливатися від 0 до 0,5 і збільшуються у разі посилення генного різноманіття лінії.

Індекс інформативності маркера *i* (polymorphism information content value, PIC) розраховували за формулою:

$$1 - [(p_i^+)^2 + (p_i^-)^2] - 1 \bullet 2 \bullet (p_i^+)^2 \bullet (p_i^-)^2,$$

де p_i^+ та p_i^- – частоти альтернативного стану маркера *i* для зразків, проаналізованих за даним маркером. PIC визначається в частках одиниці і змінюється від 0 до 0,375.

Гомозиготність зразка *k* (%) розраховували як процентне відношення кількості маркерів, що виявили гомозиготний алельний стан у зразка *k*, до загальної кількості маркерів, за якими проаналізовано зразок *k*. Гетерозиготність зразка *k* (%) розраховували як процентне відношення кількості маркерів, що виявили гетерозиготний алельний стан у зразка *k*, до загальної кількості маркерів, за якими проаналізовано зразок.

Завдання групування досліджуваного масиву ліній за алельним станом SNP-маркерів та ідентифікації кластера ліній плазми Ланкастер серед загальної сукупності ліній виконували шляхом проведення принципового компонентного аналізу. Цей аналіз (PCA, метод головних компонент) дозволяє провести зменшення кількості об'єктів аналізу за рахунок нових основних змінних величин, досягти скорочення розмірності опису, здійснити візуалізацію даних та виділити значиму інформацію. Основи принципового компонентного аналізу розроблено в працях Abdi and Williams (2010).

Для встановлення ієрархії ліній у проаналізованому масиві проведено якісний кластерний аналіз 31 лінії кукурудзи плазми Ланкастер. Ми застосували один з ієрархічних агломеративних методів кластерного аналізу – метод повного зв'язку (complete-linkage clustering, далекі сусіди) (Brereton, 2003; Sivolap et al., 2011).

Дані в таблиці наведено у вигляді X ± m, де X – середнє значення показника, m – довірчий інтервал (P = 0,05).

Результати

Аналіз алельного стану SNP-маркерів у наборі з 91 лінії кукурудзи дозволив визначити тип нуклеотиду в маркерних сайтах у 97,8% ліній. Частка мономорфних маркерів у досліджуваному наборі ліній склала 0,7%, диморфних – 99,3%. Частотою мінорного алеля (MAF) > 0,2 характеризувалися 80,6% диморфних маркерів. Середній показник зсуву генного різноманіття маркера *i* дорівнював 0,2984, а PIC використаних маркерів у даному наборі ліній у середньому сягав 0,3144 за потенційно можливого діапазону значень 0–0,3750. Наведені показники свідчать про виконання вимог, які висуваються до інформативних SNP-маркерів, і правомочність використання інформації, отриманої під час SNP-аналізу.

Основні характеристики набору з 91 лінії кукурудзи, визначені за результатами SNP-генотипування за панеллю BDI-III, такі: середня гомозиготність досліджених ліній − 98,8%, частоти мажорних алелів SNP-маркерів коливалися в межах 0,5085–0,9821, а мінорних алелів – 0,0179–0,4915. Показник генного різноманіття ліній перебував у межах 0,1701–0,1901 (за потенційно можливого розмаху від 0 до 0,5, показник збільшується у разі посилення генного різноманіття лінії). Значення PIC використаних маркерів варіювало в максимально можливих межах. Попарні генетичні дистанції між дослідженими лініями перебували в діапазоні 0,0316–0,8000.

Результати принципового компонентного аналізу генетичних SNP-дистанцій між усіма лініями проаналізованого набору наведено на рисунку 1. Двовимірний компонентний аналіз показав, що перший принциповий компонент (PCA1) пояснює 36,0% загального варіювання та поділяє досліджуваний масив з 91 лінії на дві фракції: А і Б. Уздовж осі OX фракція А візуалізується в інтервалі –1,0 – –0,2, а фракція Б – в інтервалі –0,2 – +0,8. При цьому всі лінії, які за педігрі вважаються Ланкастер (білі кружечки на рис. 1), потрапляють у фракцію Б, розташовану на верхньому (правому) кінці осі OX.

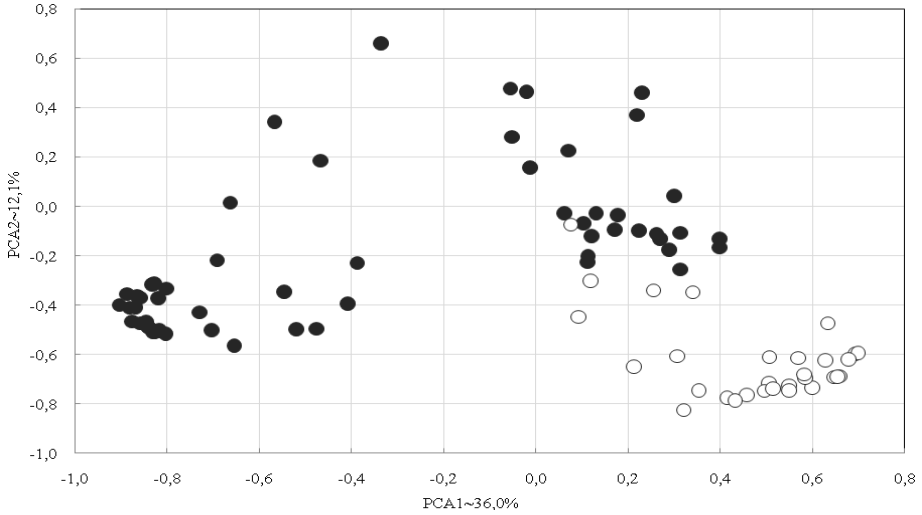


Рис. 1. Двовимірна діаграма принципового компонентного аналізу (PCA) даних SNP-генотипування 91 лінії кукурудзи: окремі лінії представлені кружками; білим кольором вказано лінії, які за педігрі належать до плазми Ланкастер (L), а чорним – лінії решти зародкових плазм (NL); масив досліджуваних ліній за першим принциповим компонентом PCA1 розпадається на дві фракції (А та Б)

Другий принциповий компонент (PCA2), який пояснює 12,1% загального варіювання, відокремлює більшість ліній Ланкастер (нижній кінець осі OY) від решти ліній фракції Б, хоча має місце деяке перекриття зон розташування L- та NL-ліній. Таким чином, принциповий компонентний аналіз попарних SNP-дистанцій підкреслює відокремленість групи ліній Ланкастер у загальному масиві проаналізованих ліній. Для з'ясування генетичних взаємовідносин ми провели кластеризацію

ліній плазми Ланкастер за розміром генетичних SNP-дистанцій. За Sivolap et al. (2011), «кластер» – група об'єктів, які мають спільні властивості, а характеристики «кластера» – внутрішня однорідність та зовнішня ізольованість. Кластерна модель ієрархізації об'єктів передбачає, що об'єкти з подібними властивостями належать до одного кластера. Найчастіше вона має вигляд дендрограми. На рисунку 2 показано дендрограму генетичних взаємовідносин ліній кукурудзи плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу, побудовану методом повного зв'язку.

На дендрограмі (рис. 2) виділяються два кластери, перший з яких об'єднує 23 лінії української селекції плазми Ланкастер та відому лінію Mo17 (77,4% загальної кількості проаналізованих ліній), а другий – 6 ліній української селекції плазми Ланкастер та відому лінію Oh43 (22,6%). Виділення двох кластерів вказує на різноманіття генетичного матеріалу усередині даної плазми. Дві з трьох фенотипічно подібних ліній ДК267, ДК212 та ДК6080, відібрані з вихідної популяції за участю лінії Oh43, під час кластеризації за SNP-даними увійшли до кластера, спільного з Oh43 (ДК267, ДК212), а лінія ДК6080 потрапила до кластера з Mo17. Цей цікавий факт може свідчити про те, що серед предків вихідних генотипів лінії ДК6080 окрім Oh43 могла бути присутньою також лінія Mo17, і комплекс саме її алельних варіантів маркерів перейшов у спадковість до ДК6080. Лінії ДК633266 та ДК298, у родоводі яких присутні лінії Oh43 та Mo17, входять до одного кластера з лінією Mo17, тобто саме від цієї лінії вони отримали більшу частку специфічних алельних варіантів маркерів, ніж від лінії Oh43.

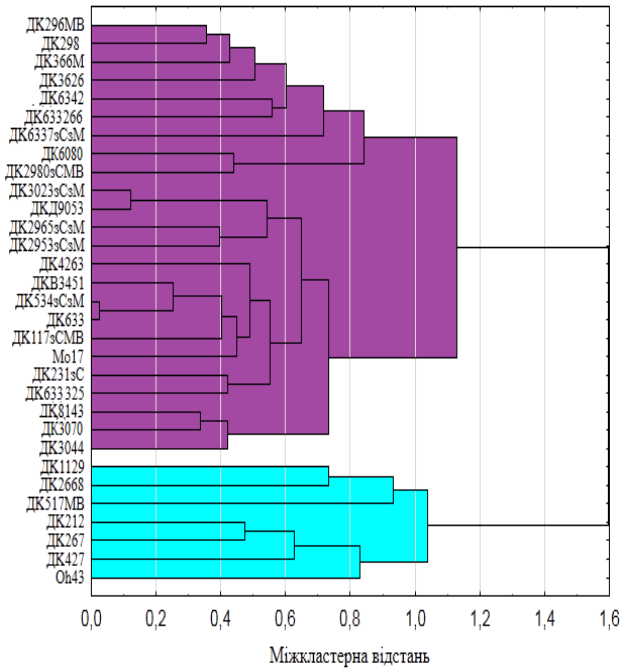


Рис. 2. Дендрограма генетичних взаємовідносин ліній кукурудзи плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу, побудована методом повного зв'язку

У таблиці наведено оцінки варіювання основних показників, що характеризують однонуклеотидний поліморфізм ліній плазми Ланкастер порівняно з аналогічною інформацією для групи неланкастерівських ліній.

Загалом частоти мажорних алелів SNP-маркерів коливалися для L-ліній в межах 0,5238–0,9688, а для NL-ліній – у ширших межах 0,5085–0,9821 (табл.). Середня частота мажорного алеля в групі L-ліній достовірно перевищувала аналогічний показник у NL-ліній і була ближчою до медіани потенційно можливого інтервалу значень частот мажорних алелів (0,7500), тоді як у NL-ліній цей показник зсунутий у бік менших частот. За коефіцієнтом варіації цієї ознаки достовірних відмінностей між двома групами ліній не зафіксовано.

Показник генного різноманіття у ліній плазми Ланкастер коливався в межах 0,1701–0,1873, а у NL-ліній – у межах 0,1725–0,1901 (за потенційно можливого розмаху від 0 до 0,5, показник збільшується за посилення генного різноманіття лінії). Тобто цей показник в групах L- та NL-ліній коливався в близькому діапазоні, відповідно 0,0172 та 0,0176, але його значення в групі L-ліній достовірно менші (в середньому на рівні 0,1774), порівняно з групою NL-ліній (в середньому 0,1808). Ті самі закономірності простежено відносно середнього значення показника зсуву генного різноманіття. Коефіцієнти варіації двох груп для показника генного різноманіття були низькими та достовірно не відрізнялися. Для показника зсуву генного різноманіття коефіцієнт варіації групи L-ліній суттєво (в 1,72 раза) перевищував аналогічний показник групи NL-ліній.

Таблиця
Варіювання основних показників
однонуклеотидного поліморфізму ДНК у ліній кукурудзи

Характеристика		Група ліній	
		L	NL
Кількість досліджених ліній, шт.		32	59
Частота мажорного алеля, частка одиниці	$Lim_{potential}$	0,5000–1,000	
	Lim	0,5238–0,9688	0,5085–0,9821
	X ± m	0,7678 ± 0,0159	0,6977 ± 0,0143
	V, %	17,0 ± 4,3	16,8 ± 3,1
Показник генного різноманіття ліній, частка одиниці	$Lim_{potential}$	0–0,5000	
	Lim	0,1701–0,1873	0,1725–0,1901
	X ± m	0,1774 ± 0,0015	0,1808 ± 0,0009
	V, %	2,4 ± 0,6	2,1 ± 0,4
Показник зсуву генного різноманіття, частка одиниці	$Lim_{potential}$	0–0,5000	
	Lim	0–0,5000	0–0,5000
	X ± m	0,3045 ± 0,0180	0,3866 ± 0,0133
	V, %	51,0 ± 12,8	29,6 ± 5,5
PIC, частка одиниці	$Lim_{potential}$	0–0,3750	
	Lim	0–0,3750	0–0,3750
	X ± m	0,2462 ± 0,0132	0,3053 ± 0,0091
	V, %	46,4 ± 11,6	25,6 ± 4,7
Попарні генетичні дистанції, частка одиниці	$Lim_{potential}$	0–1,0000	
	Lim	0,0035–0,5333	0,0316–0,8000
	X ± m	0,3377 ± 0,0099	0,4229 ± 0,0061
	V, %	33,5 ± 8,4	30,5 ± 5,6

Значення PIC використаних маркерів в обох групах ліній варіювало в максимально можливих межах. Вищі значення PIC виявлено у більш поліморфній групі NL-ліній. Коефіцієнт варіації ознаки у групі L-ліній також суттєво (в 1,81 раза), перевищив цей показник для NL-ліній.

У групі ліній неланкастерівських плазм діапазон генетичних дистанцій був більшим (0,7684), ніж у L-ліній (0,5298), ліміти ширші (0,0316–0,8000 проти 0,0035–0,5333), а середнє значення достовірно вищим (0,4229 ± 0,0061 проти 0,3377 ± 0,0099). Максимальна генетична дистанція у групі NL-ліній зафіксована між лініями B73 та ДКД2725СВзМ, а у групі L-ліній – між Oh43 та ДК8143. Коефіцієнти варіації даної ознаки у двох груп достовірно не розрізнялися. Генетична дистанція між двома групами, L-ліній та NL-ліній, склала 0,4742.

Порівняння варіювання за основними показниками однонуклеотидного поліморфізму ДНК ліній кукурудзи очікувано свідчить про більше генетичне різноманіття групи ліній, де зібрані представники декількох неланкастерівських плазм, але виявляє також певний рівень різноманіття групи ліній Ланкастер.

Оскільки сучасні лінії української селекції створені на базі популяцій різної складності із залученням у тому числі компонентів, які не належать до груп Mo17 та Oh43, оцінювання їх подібності між собою за SNP-маркерами дозволить обрати доцільну стратегію для вибору альтернативних генотипів із метою їх використання у синтезі високогетерозисних гібридів.

Таким чином, оцінювання подібності геномів за визначеними, константними сайтами чи локусами може слугувати інформативним джерелом для класифікації та систематизації генофонду зразків культурних рослин.

Обговорення

У праці Semagn et al. (2012) з 450 інбредних ліній, досліджених за 1065 SNP-маркерами, і праці Wen et al. (2012), які досліджували 350 генотипів кукурудзи раси Tuxpeño, а також значну кількість ліній із різноманітних селекційних програм США за 1536 SNP-маркерами, частота пропущених даних склала 10%. Xu et al. (2017) за спеціально підібраною панеллю з 55 000 SNP-маркерів проаналізували 593 лінії кукурудзи помірного та тропічного поясів і повідомляють про частоту пропущених даних на рівні 0,3–5,2% (у середньому 1,83%). Romay et al. (2013) показали, що кількість пропущених даних можна зменшити під час повторного сиквенування, а також висловлюють припущення про залежність кількості пропущених даних від генотипу лінії, що сиквенується. Так, генотипи, близькі до референсного геному, яким є геном лінії B73, дають найменшу кількість пропущених даних (до 20%), інші – до 30%, а лінія SA24 після 25-разового генотипування мала лише 16% пропущених даних. У нашому дослідженні частотою пропущених даних >20% характеризувалися лише шість маркерів. Вони виключені з аналізу та подальших розрахунків, але інформацію про їх алельний стан використано для ліній, де тип нуклеотиду було встановлено.

Середня гетерозиготність проаналізованих зразків склала 1,2%, у середньому 0,0–0,4 гетерозиготних SNP-сайтів на одну лінію, що свідчить про високу (на рівні 98,8%) гомозиготність досліджених ліній. У нашому дослідженні гетерозиготні SNP-локуси виключали з аналізів і розрахунків. Wen et al. (2012) показали, що гетерозиготність за SNP-маркерами коливається від 1% у ліній CIMMYT до 36% у місцевих американських популяцій.

У праці Semagn et al. (2012) за даними SNP-генотипування спорідненість на рівні 5–50% мали 79% ліній, а 94% попарних генетичних дистанцій вкладалися в діапазон 0,3–0,4, оскільки мали вузьку генетичну базу з CIMMYT-програм для Східної та Південної Африки. Більшість ліній автори вважають унікальними для цієї селекційної програми. Xu et al. (2017) показав, що у кукурудзи помірного та тропічного поясів спорідненість 59% досліджених ліній перебувала на рівні 0–0,5%, а 25% ліній – на рівні 5–20%, тобто даний набір складений зі значно віддалених між собою в генетичному відношенні, різноманітних і навіть унікальних зразків. У нашому наборі досліджених ліній, переважна більшість яких входить до Дніпровської селекційної програми, визначена за результатами SNP-генотипування спорідненість ліній у діапазоні 0–5% не зареєстрована, а найбільша кількість пар ліній (65,2%) має значення спорідненості в інтервалі 40–60%.

Показник генного різноманіття ліній Дніпровської селекційної програми перебував у діапазоні 0,1701–0,1901. Це значно менше, ніж для популяцій CIMMYT (0,2669) і ліній із програми US-GEM для розширення зародкової плазми США (0,3891), які вміщують значні колекції, у тому числі тропічних, азійських, південноамериканських генотипів (Wen et al., 2012). Низькі значення показника генного різноманіття ліній та його вузький діапазон ми пов'язуємо зі специфічним набором ліній, що аналізували (ліній Дніпровської селекційної програми), генезис яких проходив у специфічних і суворих відносно посухи та спеки умовах степової зони України.

Таким чином, загальні характеристики генотипування, проведеного нами за панеллю з 384 SNP-маркерів для 91 лінії кукурудзи, більшість яких створена за Дніпровською селекційною програмою, відповідають установленим вимогам і перебувають на рівні, отриманому іншими авторами під час генотипування шляхом часткового сиквенування геномів ліній кукурудзи різного походження за SNP-панелями.

Wu et al. (2016), вивчивши 544 лінії за 362008 SNP-маркерами за допомогою принципового компонентного аналізу, встановили, що перші дві принципові компоненти пояснюють 32,8% (19,1% та 13,7%) загального варіювання для всього масиву ліній кукурудзи, 31,0% (17,6% та 13,4%) – для групи низинних тропічних ліній, 30,1% (18,1% та 12,0%) для субтропічної групи ліній середньої висоти та 30,8% (18,2% та 12,6%) – для тропічної гірської групи ліній. У нашому дослідженні перша та друга принципові компоненти пояснюють разом 48,1% загального варіювання, що на 15,3% вище, ніж у праці (Wu et al., 2016). Semang et al. (2012) визначили 237 алелів за 236 SNP-маркерами, які найкраще відділяли три групи ліній між собою. Перша та друга принципові компоненти під час аналізу за цими алелями пояснювали 99,8% (93,6% та 6,2%) загального варіювання масиву з 450 ліній кукурудзи. Під час дослідження розподілу 770 помірних і тропічних / субтропічних ліній за 1034 SNP-маркерами встановлено, що перша та друга принципові компоненти пояснюють лише 6,1% та 2,8% загального варіювання (Lu, 2009). Метод принципового компонентного аналізу дозволив ефективно розділити 346 досліджених ліній на чотири підгрупи: дві гетерозисні групи (Iowa Stiff Stalk Synthetic та Non-Stiff Stalk), група тропічної / субтропічної кукурудзи та змішана група (Li, 2017).

Mikić et al. (2017), проаналізувавши 96 ліній кукурудзи помірного поясу Південно-Східної Європи за 5 SSR-маркерами, виділили 6 кластерів, серед яких кластери, що містили лінії BSSS, Ланкастер і Айодент. Автори довели значне різноманіття ліній плазми Ланкастер і перспективність її використання в селекційному процесі, а також для асоціативного картування цільових ознак. Smith et al. (2015) на основі генотипування 380 ліній Техаської селекційної програми за 766 SNP-маркерами здійснили їх поділ на групи, які відповідали групам за педігрі BSSS, NSS, Айодент та тропічній групі. Разом із цим, Semagn et al. (2012) не підтверджують зв'язок між результатами генотипування за 1065 SNP-маркерами 450 ліній кукурудзи та поділ на гетерозисні групи за комбінаційною здатністю, оціненою як у діалельних, так і в тестерних схрещуваннях. Автори пояснюють це впливом генотипу батьківських компонентів, а також тестера на фенотипічний прояв комбінаційної здатності і її не збіжність з результатами геномного аналізу. Під час аналізу генетичної структури 367 ліній кукурудзи, поширених у Китаї (Wu, 2014), за 56110 SNP-маркерами виділено дві великі групи: до першої з них увійшли лінії місцевої зародкової плазми, до другої – інтродукованої плазми, а також п'ять підгруп, що відповідали різним гетерозисним групам (Reid Yellow Dent, Lancaster Sure Crop, P-группа, Tang Sipingtou та Tem-tropical група, всередині яких також спостерігали генетичну гетерогенність, причому найменша гетерогенність відзначена всередині P-групи, а найбільша – всередині Tem-tropical групи). Генетична різнорідність відмічена також серед 59 ліній INERA, проаналізованих за 1057 SNP-маркерами (Dao, 2014), і серед 156 ліній Північно-Каролінського Державного університету (Nelson, 2015), і у 284 ліній селекції Університету Міннесоти (Schaefer, 2013).

Висновки

Загальні характеристики генотипування, проведеного за панеллю з 384 маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК для 91 лінії кукурудзи Дніпровської селекційної програми, відповідають установленим вимогам і перебувають на рівні, отриманому іншими авторами у процесі SNP-аналізу ліній кукурудзи різного походження. Результати принципового компонентного аналізу підтверджують наявність серед проаналізованого масиву окремої групи ліній, які за педігрі належать до зародкової плазми Ланкастер. Результати якісного кластерного аналізу методом повного зв'язку свідчать про варіювання всередині плазми Ланкастер, де виділено лінії, близькі як до Mo17, так і до Oh43.

References

Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews, Computational Statistics.

Bennetzen, J. L., & Hake, E. S. A. (2009). Handbook of maize. Genetic and genomics. New York. Springer Science.

Brereton, R. G. (2003). Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. Wiley, Chichester.

Dao, A., Sanou, J., Mitchell, S. E., Gracen, V., & Danquah, E. Y. (2014). Genetic diversity among INERA maize inbred lines with single nucleotide polymorphism (SNP) markers and their relationship with CIMMYT, IITA, and temperate lines. BMC Genetics, 15, 127–140.

Derkach, K. V., Abraimova, O. E., & Satarova, T. M. (2016). Reguljacija morfogenezu *in vitro* u linij kukurudzi grupi Lankaster [Regulation of *in vitro* morphogenesis in maize inbreds of the Lancaster group]. Visnyk of Dnipropetrovsk Universitet. Biology, Ecology, 24(2), 253–257 (in Ukrainian).

Dzjubec'kij, B. V., Bodenko, N. A., Fed'ko, M. M., & Gusak, J. V. (2012). Stvorennja seredn'opiznih gibridiv kukurudzi na bazi plazmi Lankaster (C_{103}) [Creation of medium-late hybrids of corn based on Lancaster germplasm (C_{103})]. Bjuleten' Institutu Sil's'kogo Gospodarstva Stepovoji Zony NAAN Ukrayiny, 3, 8–11 (in Ukrainian).

Elshire, R. J., Acharya, C. B., Mitchell, S. E., Flint-Garcia, S. A., McMullen, M. D., Holland, J. B., Buckler, E. S., & Gardner, C. A. (2013). Comprehensive genotyping of the USA national maize inbreds seed bank. Genome Biology, 14(6), R55.

Li, X., Jian, Y., Xie, C., Wu, J., Xu, Y., & Zou, C. (2017). Fast diffusion of domesticated maize to temperate zones. Scientific Reports, 7, 2077–2089.

Lu, Y., Yan, J., Guimarães, C. T., Taba, S., Hao, Z., Gao, S., Chen, S., Li, J., Zhang, S., Vivek, B. S., Magorokosho, C., Mugo, S., Makumbi, D., Parentoni, S. N., Shah, T., Rong, T., Crouch, J. H., & Xu, Y. (2009). Molecular characterization of global maize breeding germplasm based in genome-wide single nucleotide polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 120(1), 93–115.

Mikić, S., Kondić-špika, A., Brbaklić, L., Stanisavljević, D., Ćeran, M., Trkulja, D., & Mitrović, B. (2017). Molecular and phenotypic characterisation of diverse temperate maize inbred lines in Southeast Europe. Zemdirbyste-Agriculture, 104(1), 31–40.

Nelson, P. T., Krakowsky, M. D., Coles, N. D., Holland, J. B., Bubeck, D. M., Smith, J. S. C., & Goodman, M. M. (2016). Genetic characterization of the North Carolina State University Maize Lines. Crop Science, 56, 259–275.

Romay, M. C., Millard, M. J., Glaubitz, J. C., Peiffer, J. A., Swarts, K. L., Casstevens, T. M., Elshire, R. J., Acharya, C. B., Mitchell, S. E., Flint-Garcia, S. A., McMullen, M. D., Holland, J. B., Buckler, E. S., & Gardner, C. A. (2013). Comprehensive genotyping of the USA national maize inbreds seed bank. Genome Biology, 14(6), R55.

Schaefer, C. M., & Bernardo, R. (2013). Population structure and single nucleotide polymorphism diversity of historical Minnesota maize inbreds. Crop Science, 53(4), 1529–1536.

Semagn, K., Magorokosho, C., Vivek, B. S., Makumbi, D., Beyene, Y., Mugo, S., Prasanna, B. M., & Warburton, M. L. (2012). Molecular characterization of diverse CIMMYT maize inbred lines from eastern and southern Africa using single nucleotide polymorphic markers. BMC Genomics, 13, 113–124.

Sivolap, J. M., Kozhuhova, N. J., & Kalendar', R. N. (2011). Variabel'nost' i specifichnost' genomov sel'skohozjajstvennyh rastenij [Variability and specificity of genomes of agricultural plants]. Astroprint, Odessa (in Russian).

Smith, S. D., Murray, S. C., & Heffner, E. (2015). Molecular analysis of genetic diversity in a Texas maize (*Zea mays* L.) breeding program. Maydica, 60, 1–8.

Venkatramana, P., Carlson, C., Blackstad, M., Bialozynski, R., Schultz, Q., & Kaufman, B. (2010). Development and characterization of single nucleotide polymorphism (SNP) panel for marker assisted backcrossing in corn. Seed Technology, 32(2), 153–154.

Wen, W., Franco J., Chavez-Tovar, V. H., Yan, J., & Taba, S. (2012). Genetic characterization of a core set of a tropical maize race Tuxpeño for further use in maize improvement. PLoS One, 7(3), e32626.

Wu, X., Li, Y., Shi, Y., Song, Y., Wang, T., Huang, Y., & Li, Y. (2014). Fine genetic characterization of elite maize germplasm using high-throughput SNP genotyping. Theoretical and Applied Genetics, 127, 621–631.

Wu, Y., San Vicente, F., Huang, K., Dhliwayo, T., Costich, D. E., Semagn, K., & Babu, R. (2016). Molecular characterization of CIMMYT maize inbred lines with genotyping-by-sequencing SNPs. Theoretical and Applied Genetics, 129, 753–765.

Xu, C., Ren, Y., Jian, Y., Guo, Z., Zhang, Y., Xie, C., Fu, J., Wang, H., Wang, G., Xu, Y., Li, P., & Zou, C. (2017). Development of a maize 55 K SNP array with improved genome coverage for molecular breeding. Molecular Breeding, 37(3), 20–34.

Zhang, X., Zhang, H., Li, L., Lan, H., Ren, Z., Liu, D., Wu, L., Liu, H., Jaqueth, J., Li, B., Pan, G., & Gao, S. (2016). Characterizing the population structure and genetic diversity of maize breeding germplasm in Southwest China using genome-wide SNP markers. BMC Genomics, 17(1), 697–704.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 349–355
doi: 10.15421/021754

Biomorphology and rhythm of seasonal development of the relic species *Lobelia dortmanna* in oligotrophic lakes of Tver region

A. G. Lapirov*, E. A. Belyakov*, **, O. A. Lebedeva*

**I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia*
***Cherepovets State University, Cherepovets, Russia*

Article info

Received 18.06.2017
Received in revised form 14.07.2017
Accepted 20.07.2017

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Nekouz District, Yaroslavl Region, 152742, Russia.
Tel.: +48-547-240-42.
E-mail: lapir@ibiw.yaroslavl.ru

Cherepovets State University, Lunacharsky Ave., 5, Cherepovets, 162600, Russia

Lapirov, A. G., Belyakov, E. A., & Lebedeva, O. A. (2017). Biomorphology and rhythm of seasonal development of the relic species Lobelia dortmanna in oligotrophic lakes of Tver region. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 349–355. doi: 10.15421/021754

This article covers the morphology of the vegetative and generative sphere of a rare relic species, *Lobelia dortmanna* L. (Lobelioideae). This is the first time that using the modular approach a study has analysed the shoot system of this species and described the structures of all three categories: elementary (EM), universal (UM) and basic (OM). This paper describes the life form and analyses the rhythm of seasonal development of the species in the lakes of Tver oblast, and provides data on the seed productivity. As a life form, *L. dortmanna* is a herbaceous polycarpic, unclearly polycentric shallow-rooted plant with a fibrous root system and non-specialized morphological disintegration. The sympodially growing shoot-system of the plant is formed by two types of different-aged anisotropic replacement shoots: dicyclic vegetative-generative semirosette and annual vegetative rosette shoots. The indicator of actual seed productivity equals on average up to 1621 ± 451 seeds per single vegetative-generative shoot. The module structure of *L. dortmanna* is presented by 10 variants of elementary modules. The main modules are formed on the basis of a monocarpic dicyclic anisotropic monopodial shoot with the following morpho-functional zones distinguished: 1) the lower zone of inhibition; 2) the recovery zone; 3) the upper zone of inhibition 4) the latent generative zone; 5) the main inflorescence. The functional role of the first three morpho-functional zones of a monocarpic shoot is performed by a minimum number of variants of elementary modules. In the rhythm of seasonal development, the authors distinguished 7 consecutive stages: 1) the period of relative rest; 2) vegetative phase; 3) the phase of budding; 4) flowering; 5) fruiting; 6) secondary activities. By the character of rhythm of seasonal development, *L. dortmanna* belongs to the group of evergreen plants with a long growing season and middle-late summer flowering.

Keywords: morphology; vegetative and generative sphere; universal and basic modules; rhythm of development

Биоморфология и ритм сезонного развития реликтового вида *Lobelia dortmanna* в олиготрофных озерах Тверской области

А. Г. Лапиров*, Е. А. Беляков*, **, О. А. Лебедева*

**Институт биологии внутренних вод имени И. Д. Папанина РАН, Борок, Россия*
***Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия*

Рассмотрены морфология вегетативной и генеративной сферы редкого реликтового вида – лобелии Дортманна, *Lobelia dortmanna* L. (Lobelioideae). Впервые с помощью модульного подхода проанализирована побеговая система этого вида, определены структуры всех трех категорий модулей: элементарного (ЭМ), универсального (УМ) и основного (ОМ). Описана жизненная форма и рассмотрен ритм сезонного развития этого вида на озерах Тверской области, приведены данные по семенной продуктивности. По жизненной форме *L. dortmanna* является травянистым поликарпиком, неявнополицентрическим короткокорневищным малолетником вегетативного происхождения с кистекорневой системой и ранней неспециализированной морфологической дезинтеграцией. Нарастающая симподиально побеговая система растения образована двумя типами разновозрастных анизотропных побегов замещения: дициклическими вегетативно-генеративными полурозеточными и однолетними вегетативными розеточными. Величина фактической семенной продуктивности *L. dortmanna* в озерах Тверской области, в среднем, достигает 1621 ± 451 семя на один вегетативно-генеративный побег. Модульная структура *L. dortmanna* представлена 10 вариантами элементарных модулей. Основные модули формируются на основе монокарпического дициклического анизотропного моноподиального побега, в рамках которого выделен ряд морфофункциональных зон: 1) нижняя зона торможения; 2) зона возобновления; 3) верхняя зона торможения 4) скрытогенеративная зона; 5) главное соцветие. При этом функциональная роль трех первых морфофункциональных зон монокарпического побега обеспечивается малым числом вариантов элементарных модулей. При описании ритма сезонного развития

авторами выделено несколько последовательных этапов: 1) период относительного покоя; 2) вегетативная фаза; 3) фаза бутонизации; 4) цветения; 5) плодоношения; 6) вторичной деятельности. По характеру ритма сезонного развития *L. dortmanna* относится к группе длительновегетирующих летнезимнезеленых растений со средне- и позднелетним периодом цветения.

Ключевые слова: морфология вегетативной и генеративной сферы; универсальный и основной модули; ритм развития

Введение

Lobelia dortmanna L., лобелия Дортманна – индикатор олиготрофных озерных экосистем, редкий и исчезающий вид, доминирующий в растительности бедных питательными веществами озер Европы и Северной Америки (Szmeja, 1987; Sand-Jensen et al., 2005; Møller and Sand-Jensen, 2011). В России это растение спорадически встречается в северных областях Европейской части; в Средней России отмечено лишь в некоторых озерах Тверской области (Gubanov et al., 2004), где считалось единственным представителем атлантических видов (Nevskiy, 1956). Этот вид относится к группе так называемых «изоэтидов» – специфических погруженных растений с низкими трофическими требованиями (Lamentowicz and Milecka, 2004; Sand-Jensen et al., 2005; Pulido et al., 2012). Морфологические характеристики этих растений сопряжены с ростом в бедных углеродом олиготрофных озерах и характеризуются розеткой коротких листьев (<10 см), плотной, хорошо развитой корневой системой, обширными воздушными внутренними лакунами в листьях и корнях и хлоропластами вблизи лакун (Raven et al., 1988 – цит. по Pedersen and Sand-Jensen, 1992).

Несмотря на то, что лобелия Дортманна давно представляет интерес для ботаников (Szmeja, 1987), ее морфологические особенности и ритм сезонного развития изучены недостаточно полно. Имеющиеся морфологические работы, в основном зарубежных исследователей, относятся к середине XIX века, началу и 40–50-м годам XX века (Buchenau, 1866; Tswett, 1907; Aberg, 1943 – все цит. по: Szmeja, 1987; Sylven, 1903; Ydrac, 1905 – все, цит. по: Woodhead, 1951; Armand, 1912; Glück, 1924; Philipson, 1948). Краткие сведения по этому вопросу приводятся в немногочисленных отечественных работах (Philippov et al., 2016; Markov, 2017). Работ по ритму сезонного развития лобелии также крайне мало. Подробные сведения по ритму сезонного развития в одном из олиготрофных озер на севере Польши (Lake Wielkie Oczko), включающему 8 фенологических фаз, представлены польским исследователем Szmeja (1987). До настоящего времени это единственная известная нам работа подобного плана. Остальные, в лучшем случае, описывают лишь особенности цветения и плодоношения (Woodhead, 1951; Farmer and Spence, 1987).

В связи с вышеизложенным, цель данной работы – охарактеризовать биоморфологию и ритм сезонного развития *L. dortmanna* в олиготрофных озерах Тверской области.

Материал и методы исследований

В основу работы положены материалы оригинальных исследований *L. dortmanna*, проведенных в 2014–2016 гг. на водоемах Тверской области: Вышневолоцкий р-н – озера Бельское (близ д. Белое – 57°43′41″ N, 34°14′07″ E) и Ящино (близ д. Ящины – 57°41′11″ N, 34°39′11″ E); Осташковский р-н – озера Сиг (окрестности деревень Куряево – 57°01′28,4″ N, 33°06′36″ E, Буковичи – 57°03′15″ N, 33°11′02″ E и Краклово – 57°01′28″ N, 33°06′38″ E) и Сабро (близ д. Звягино – 57°09′56″ N, 32°54′19″ E и пос. Дубье – 57°08′31″ N, 32°53′06″ E).

На исследованных озерах *L. dortmanna* растет на глубинах 0,2–1,2 м и более на песчаном или песчаном с наилком грунтах в виде отдельных экземпляров, небольших групп растений или обширных пятен (шириной более 50 и длиной более 200 м, оз. Бельское) с высоким проективным покрытием (до 100%). Группировки данного вида сосредоточены, в основном, в тростниковых зарослях, либо на защищенных (реже не защищенных) от волнового действия открытых пространствах. Для исследования биоморфологии лобелии Дортманна использовали преимущественно живой, фиксированный, а также гербарный материал фондов IBIW, MHA и MW. Всего проанализировано 90–100 побегов, находящихся в разных онтогенетических состояниях. В качестве основных подходов при проведении исследования выбраны классические методы: сравнительно-морфологический и ритмологический, применяемые при изучении водных и прибрежно-водных растений (Savinykh and Cheryomushkina, 2015).

Для выявления сезонных морфологических изменений раз в месяц на протяжении всего вегетационного сезона 2014–2016 гг. проводили натурные исследования и сборы в двух озерах морено-аккумулятивного происхождения – Бельское и Сиг (Тверская обл.). Собранные образцы очищали от грунта, укладывали в полиэтиленовые пакеты и доставляли в лабораторию, где проводили биометрический анализ. В вегетативной сфере отмечали длину и число междоузлий побегов, порядок их ветвления, емкости терминальных и боковых почек; определяли число листьев, их длину и ширину, подсчитывали число корней и измеряли их максимальную длину. При исследовании генеративной сферы у растений измеряли длину цветоноса и его метамеров, определяли фактическую семенную продуктивность (ФСП), включающую общее число семян на побеге (Vaynagiy, 1974). Учет числа генеративных побегов и количества семян на них в зависимости от глубины произрастания растений проводили с помощью рамки площадью 0,25 м^2. Повторность для каждой из глубин – 3–5-кратная.

Жизненная форма *L. dortmanna* описана в соответствии с алгоритмом, показанным в работе Savinykh and Cheryomushkina (2015), феноритмотип – согласно классификации фенологических типов растений (Borisova, 1972). При характеристике растительных группировок с участием *L. dortmanna* авторы отмечали тип водного объекта, экологические особенности местообитания (характер грунта, глубину воды), составляли список таксонов, входящих в состав биоценоза. В тексте работы и в таблицах данные представлены в виде x ± SD.

Результаты

Морфология вегетативной сферы

Симподиальная побеговая система взрослой генеративной особи лобелии Дортманна образована розеточными участками нескольких порядков ветвления (рис 1*а*, *б*), которые постепенно погружаются в грунт благодаря наличию придаточных корней. Она представлена двумя типами разновозрастных анизотропных побегов: дициклическими вегетативно-генеративными полурозеточными и однолетними вегетативными розеточными.

Розеточные побеги конические длиной 1,8 ± 0,9 и диаметром 0,4 ± 0,1 см. На всем протяжении они несут однотипные листья: сидячие линейные цельнокрайние с тупым кончиком, S-образно-изогнутые, длиной до 4,5 ± 0,6 см и шириной – 0,3–0,4 см, сплюснутые до 0,15–0,20 см, темно-зеленого цвета, блестящие, зимующие. Листья хрупкие, с двумя полостями внутри. Листорасположение спиральное в четыре ряда. Число листьев на побегах варьирует в зависимости от онтогенетического состояния растения. Например, на розеточном участке генеративного побега формируется в среднем 21,5 ± 3,5 (в отдельных случаях до 30) листьев, в то время как у вегетативных побегов – до 28,4 ± 6,1. Кроме типичных, описанных выше, листьев у этого растения имеются листья верховой формации – брактеи. Последние цельные, плоские, со шпателевидной в очертании листовой пластинкой (длиной до 0,25 и шириной – до 0,18 см) и городчатым краем.

В пазухах большинства листьев боковые почки не образуются. Формирование латеральных почек (в пазухах одного –

трех последних (самых верхних) листьев розеточного участка побега) у генеративных особей происходит в период завершения закладки терминального цветоноса, либо на начальных этапах его развития. Эти почки трогаются в рост без периода покоя, образуя побеги следующего порядка ветвления (рис 1*а*, *б*). К осени, с отмиранием терминального соцветия, розеточный участок вегетативно-генеративного побега оставляет за собой функции запасания питательных веществ. В течение следующего вегетационного сезона побеги, начавшие свое развитие в прошлом году, повторяют жизненный цикл материнского побега. Материнский участок розеточного побега *n*-го порядка постепенно отмирает к началу – концу третьего года жизни.

Рис. 1. *L. dortmanna*: *а*, *б* – структура побеговой системы; *в* – утолщения на корнях: *1* – розеточный участок побега *n*-го порядка (материнский) с отмершими листьями; *2* – розеточный участок вегетативно-генеративного побега *n* + 1-го порядка ветвления (листья удалены); *3* – вегетативный розеточный участок побега *n* + 2-го порядка ветвления (нынешнего года) с открытой верхушечной почкой и листьями; *4* – соцветие, реализованное в нынешнем году

Корневая система у *L. dortmanna* кистевидная, представлена многочисленными (до 65,7 ± 33,4 у вегетативных и 112,6 ± 33,2 (иногда до 150–200) у вегетативно-генеративных) стеблеродными придаточными корнями, обычно неветвящимися, реже ветвящимися до *n* + 1-го порядка. Живые корни белого цвета, 8,6 ± 2,0 см длиной, по мере отмирания они обесцвечиваются. Интересно наличие на концах некоторых корней специфических утолщений (рис. 1*в*). Активное развитие придаточных корней в базальной части розеточного побега наблюдается в течение всего вегетационного сезона, в осенне-зимний период их развитие замедляется.

Морфология генеративной сферы

Соцветие *L. dortmanna* представлено простой брактеозной кистью. Средняя длина цветоносной оси достигает 59,2 ± 11,0 см, диаметр – 0,2–0,3 см. В отдельных случаях цветоносная ось может достигать 117 см (Glück, 1924). Длина метамеров оси изменяется по одновершинной кривой. На цветоносной оси (снизу вверх) располагаются сначала листья срединной формации (нередко их нижняя часть прирастает к цветоносной оси), затем братеи. При этом в нижней части соцветия (в пазухе первого – второго листа срединной формации) пазушные структуры (вегетативные почки) имеются либо отсутствуют. Выше по цветоносной оси, в пазухах третьего – четвертого (реже еще и второго) срединных листьев, а также идущих за ними двух нижних брактей, обнаружены зачаточные соцветия, которые, как правило, в рост не трогаются. Еще выше располагается участок цветоносной оси, на котором из пазух брактей выходят расположенные на цветоножках (длиной от 0,5 до 1,0 см) одиночные поникающие цветки.

Цветки обоеполые зигоморфные пятичленные с двойным околоцветником, самоопыляющиеся, венчик голубой либо бледно-фиолетовый. У лобелии нередко можно наблюдать наличие клейстогамных цветков (в нижней части соцветия, которая может быть погружена в воду). Последние выглядят также как обычные цветки и могут формировать плоды с хорошо развитыми семенами. Аналогичное явление наблюдал и Glück (1924) в природных и культуральных условиях.

Плоды *L. dortmanna* представляют собой овальные тонкоребристые коробочки с двумя створками (Gubanov et al., 2004; Lebedeva and Belyakov, 2016). Формирование и созревание семян происходит не одновременно. Первыми созревают плоды, располагающиеся (нередко под водой) в нижней части соцветия. Коробочка имеет эллиптическую форму (1,5 ± 1,1 см длиной и 0,4 см диаметром), резко сужающуюся в верхней части в столбик (до 0,4 см длиной). Содержимое плода разделено на два гнезда. Число созревших коробочек с семенами на один монокарпический побег достигает 3–6 штук. Часть цветков не успевает сформировать плоды.

Семена правильной эллиптической формы (длиной 0,4–0,6 и шириной 0,3–0,4 мм) с блестящей темно- либо светло-коричневой семенной оболочкой (Lebedeva and Belyakov, 2016) с характерной бугристой скульптурой; с прямым зародышем и разви-

тым эндоспермом. Характерной особенностью семян является полное отсутствие у них плавучести, что препятствует их распространению даже на небольшие расстояния в водоеме. У растений с исследуемых озер среднее число семян, приходящихся на коробочку, достигает 319 ± 55, а среднее число семян в одном гнезде – 160 ± 29. Для семян лобелии характерна неоднородность, связанная с различиями в степени их развития как в каждом из гнезд коробочки, так и коробочке в целом. В коробочке число нормально развитых семян (в морфологическом и физиологическом смысле) в среднем достигает 306 ± 58, недоразвитых – 18 ± 11, а в каждом из гнезд коробочки – 147 ± 35 и 10 ± 6, соответственно.

Величина ФСП *L. dortmanna* в озерных экосистемах Тверской области доходит, в среднем, до 1621 ± 451 семя на один вегетативно-генеративный побег и зависит от числа коробочек на побеге. В популяции лобелии на оз. Бельское ФСП достигает 1726 ± 527 (для растений с 3–6 коробочками), в то время как на оз. Сиг – 1428 ± 395 (для растений с 3–5 коробочками).

В зависимости от глубины произрастания лобелии изменяется число генеративных побегов, а, следом, и число продуцируемых семян (табл. 1). Оптимальной для произрастания растений является глубина 50–70 см, на которой число продуцируемых семян достигает максимальных величин на исследуемую площадь (в нашем случае – 0,25 м^2).

Таблица 1
Изменения числа продуцируемых семян *Lobelia dortmanna* на единицу площади с возрастанием глубины

Название озера	Глубина, см	Число генеративных побегов, шт./0,25 м^2	Число продуцируемых семян, шт./0,25 м^2
Оз. Бельское	20	24,0 ± 13,3	41 424 ± 22 956
	50–60	26,6 ± 10,6	45 912 ± 18 296
	70	57,5 ± 0,5	99 245 ± 863
	90–100	24,6 ± 3,0	42 460 ± 5 178
Оз. Сиг	60	9,7 ± 5,2	13 858 ± 7 429
	65–70	13,3 ± 3,0	19 002 ± 4 286
	75–80	5,6 ± 1,5	8 001 ± 2 143

Модульная структура

В строении побегового тела *L. dortmanna* выделено 10 вариантов элементарных модулей (ЭМ; категории модулей по Savinykh (2007, 2008)):

1) укороченное междоузлие, узел с листом срединной формации и стеблеродными придаточными корнями либо без них;

2) укороченное междоузлие, узел с листом срединной формации, пазушной почкой и стеблеродными придаточными корнями либо без них;

3) укороченное междоузлие, узел с листом срединной формации, вегетативным побегом и стеблеродными придаточными корнями либо без них;

4) удлиненное междоузлие, узел с листом срединной формации;

5) удлиненное междоузлие, узел с листом срединной формации и пазушной почкой;

6) удлиненное междоузлие, узел с листом срединной формации и нереализованной боковой генеративной осью второго порядка (паракладием);

7) удлиненное междоузлие, узел с брактеей и нереализованной боковой генеративной осью второго порядка (паракладием);

8) удлиненное междоузлие, узел с брактеей и плодом;

9) удлиненное междоузлие, узел с брактеей и цветком;

10) удлиненное междоузлие, узел с брактеей и бутоном.

Полученные данные свидетельствуют об ограниченности и постоянстве числа ЭМ как в структуре розеточной (вегетативной), так и генеративной сфер растения.

Универсальный модуль (УМ) представлен монокарпическим дициклическим анизотропно нарастающим моноподиальным побегом, несущим терминальное соцветие (рис. 2).

В его строении выделяем следующие морфофункциональные зоны. Нижняя зона торможения (НЗТ) представлена базальной частью розеточного участка дициклического монокарпического побега. В пазухах листьев НЗТ боковые почки, как правило, отсутствуют. Основная функция НЗТ – ассимилирующая запас питательных веществ. Зона возобновления (ЗВ) располагается в верхней трети розеточного участка побега. Здесь закладывается 1–2 пазушные почки, на базе которых формируются новые розеточные побеги. Верхняя зона торможения (ВЗТ) включает в себя 2–3 коротких метамера розеточного участка побега и до 1–2 длинных метамера с нормальными листьями, в пазухах которых пазушные структуры либо имеются, но в рост не трогаются, либо вообще отсутствуют. Скрытогенеративная зона (СГЗ) представлена 4–5 (6) длинными метамерами, в пазухах листьев (брактей) которых располагаются не реализующиеся в нормальных условиях боковые генеративные оси второго порядка (паракладии). СГЗ принимает участие при выносе соцветия над поверхностью воды, утрачивая при этом функцию семенной продуктивности. Главное соцветие (ГС) представлено открытой кистью, в составе которой можно единовременно наблюдать коробочки со зрелыми семенами, цветки и бутоны. Основная функция этой зоны – генеративная.

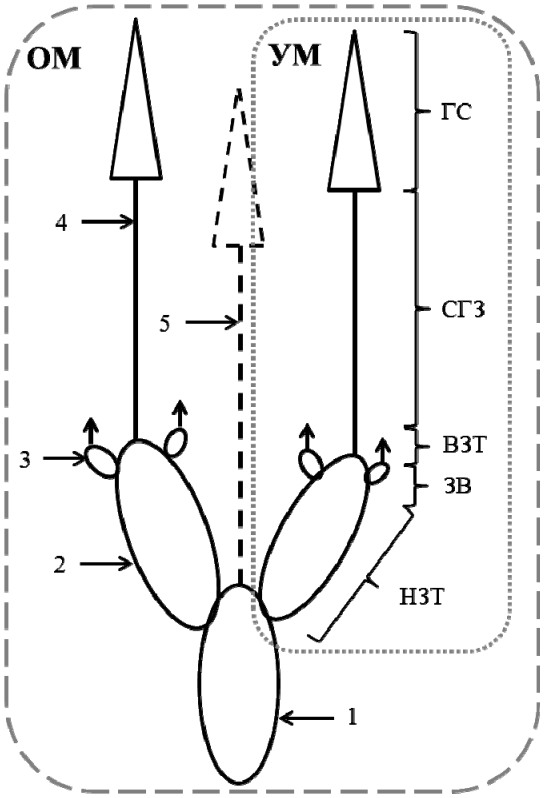


Рис. 2. Морфофункциональные зоны дициклического анизотропно и моноподиально нарастающего вегетативно-генеративного побега *L. dortmanna*: ОМ – основной модуль, УМ – универсальный модуль, НЗТ – нижняя зона торможения, ЗВ – зона возобновления, ВЗТ – верхняя зона торможения, СГЗ – скрытогенеративная зона, ГС – главное соцветие; все структуры, обозначенные цифрами 1–4, как на рис. 1, 5 – соцветие, отмершее в конце прошлого вегетационного сезона

Основной модуль (ОМ) *L. dortmanna* образован нарастающей симподиально системой побегов замещения, формирующейся на основе одного монокарпического полурозеточного побега. Модель побегообразования – симподиальная полурозеточная.

Одним из важных слагаемых, необходимых при решении вопросов использования естественного генофонда для интродукции, а также охраны популяций данного вида в природе, является изучение сезонного развития растения на конкретной территории. Ритм сезонного развития лобелии разбит на ряд последовательных этапов.

Период относительного покоя протекает в течение осени – зимы прошлого года до конца апреля нынешнего. Симподиальная побеговая система образована прошлогодним материнским розеточным участком побега (как правило, несущим листья), с отмершим терминальным цветоносом и одним – двумя молодыми боковыми вегетативными розеточными побегами. Основания розеточной части боковых побегов, как правило, погружены в грунт. Рост боковых побегов у *L. dortmanna* в течение зимнего периода продолжается, сопровождаясь при этом замедленным развертыванием молодых светло-зеленых листьев и образованием стеблеродных придаточных корней.

Вегетативная фаза. Начало вегетации *L. dortmanna* наблюдается на исследованных водоемах с конца апреля после полного таяния льда. В этот период начинается активное развитие верхушечных почек прошлогодних вегетативных дочерних розеточных побегов. При этом материнский прошлогодний монокарпический побег *n*-го порядка (с отмершим терминальным соцветием) еще несет на себе часть живых прошлогодних ассимилирующих листьев.

Фаза бутонизации. С начала мая у дочерних розеточных побегов *L. dortmanna* наблюдается закладка терминального соцветия. При этом уже в начале первой – второй декады мая, когда температура придонного слоя воды (глубина 30–50 см) возрастает с 7–9 до 19 °C, происходит закладка терминальных соцветий (практически у 50% монокарпических побегов). Такое явление характерно для многих водных и прибрежно-водных растений (Lebedeva and Lapirov, 2009). У отдельных дочерних розеточных побегов переход к фазе бутонизации может наблюдаться в июне – середине июля. При этом закладка генеративных органов в верхушечной почке и их дальнейшее развитие происходит без периода покоя, что можно характеризовать как вариант силлепсиса. В этот период листья на прошлогоднем участке материнского монокарпического побега *n*-го порядка обычно отмирают. У боковых побегов (с тронувшимися в рост терминальными цветоносами) в пазухах одного – двух последних листьев, расположенных в верхней части розеточного побега, отмечено наличие пазушных почек с 3 ± 1 листовыми зачатками. Они развиваются силлептически и обеспечивают дальнейшее ветвление побега до *n* + 2 порядка. Если в течение вегетационного периода в терминальной почке вегетативного розеточного побега генеративные органы не закладываются, побег продолжает нарастать моноподиально и ортотропно.

Фаза цветения. Началу цветения лобелии предшествует быстрый рост метамеров соцветия в длину, вследствие чего генеративные части появляются над поверхностью воды. Появление цветоносов над поверхностью воды у лобелии наблюдается обычно к началу первой декады июня, когда температура воды достигает 20–21 °C. Цветение продолжается в среднем около 40–47 суток. Вместе с цветением наблюдается активное развитие боковых побегов.

Фаза плодоношения. Созревание первых коробочек с семенами у лобелии наблюдается в конце первой декады июля. Начало фазы плодоношения совпадает с пиком цветения. К концу второй – третьей декады августа верхушки цветоносов засыхают, коробочки с семенами разрушаются. Морфологические особенности побегов в осенний период представлены в таблице 2.

Таблица 2

Морфометрические характеристики материнского и дочерних розеточных побегов *L. dortmanna*

Тип побега	Число листьев в розетке	Число корней	Розеточная часть побега		Емкость верхушечной почки
			длина	диаметр	
конец второй декады августа					
Материнский побег *n*-го порядка с отмирающим соцветием	17,5 ± 3,3	95,0 ± 8,0	2,2 ± 0,3	0,6 ± 0,1	–
Дочерние боковые побеги *n* + 1-го порядка	3,0 ± 1,0	единичны	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	7,2 ± 0,7
первая декада сентября					
Материнский побег *n*-го порядка с отмирающим соцветием	21,5 ± 3,5	139,5 ± 44,0	2,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1	–
Дочерние боковые побеги *n* + 1-го порядка	6,3 ± 1,7	11,7 ± 2,9	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	6,1 ± 0,9

Примечание: «–» – верхушечная почка отсутствует.

Окончание вегетации. Темпы развития дочерних побегов замедляются при наступлении третьей декады августа, что приводит к снижению емкости их терминальных почек. Волновое воздействие приводит к обламыванию либо полеганию цветоносов и дальнейшему их отмиранию и разложению. Отмечаются процессы отмирания розеточного участка прошлогоднего вегетативно-генеративного побега. Последнее нередко сопровождается неспециализированой морфологической дезинтеграцией, приводящей к полному обособлению дочерних генеративных побегов. Этот процесс может наступать и в более ранние сроки.

Фаза вторичной деятельности. В течение осенне-зимнего периода побег продолжает выполнять функцию ассимиляции и запасания питательных веществ. Наряду с этим, хотя и в замедленном темпе, продолжается формирование стеблеродных придаточных корней и развертывание листьев дочерних боковых побегов.

Таким образом, по характеру ритма сезонного развития (Borisova, 1965) *L. dortmanna* можно отнести к группе длительновегетирующих летнезимнезеленых растений со средне- и позднелетним периодом цветения.

Обсуждение

Жизненную форму лобелии Дортманна в «Биологической флоре Британских островов» Woodhead (1951, p. 485) описывает достаточно просто: «розеткообразующий многолетник, обычно погруженный в вегетативном состоянии». Ранее Glück (1924) выделял две «формы»: f. *ramosa* Murbeck – большое погруженное пышное растение с ветвящимся стеблем и f. *terrestris* Glück – наземное, сильно редуцированное и маленькое растение. Редкая форма *paniculata* Prahl – с соцветием, ветвящимся в его нижней части, отмечена немецким ученым Hegi (по: Woodhead, 1951). Несмотря на это, Pedersen and Sand-Jensen (1992) показали, что погруженная и наземная формы сохраняют одинаковый тип морфологии, скорости роста и физиологии. В настоящей работе рассматривается погруженная (наиболее распространенная) форма лобелии.

Philippov et al. (2016, p. 86) характеризуют основную жизненную форму *L. dortmanna* как «внутриводно-столонное кистекорневое многолетнее поликарпическое травянистое растение с чередованием двух фенобиоморф: длительной вегетативно неподвижной моноцентрической кистекорневой и кратковременной вегетативно подвижной явнополицентрической внутриводно-столонной». Отметим, что на многочисленном тщательно просмотренном живом и гербарном материале нами не обнаружено наличие ««шагающих» удлиненных вегетативных моноциклических эфемерных побегов, нарастающих в толще воды (внутриводных столонов)» (Philippov et al., 2016, p. 86).

На основании собственных материалов по морфологии и модульной структуре, с использованием алгоритма, применяемого в современных биоморфологических исследованиях (Savinykh and Cheryomushkina, 2015), мы характеризуем жизненную форму *L. dortmanna* как травянистый поликарпик, неявнополицентрический короткокорневищный малолетник вегетативного происхождения с кистекорневой системой и ранней неспециализированной морфологической дезинтеграцией.

У зеленых ассимилирующих листьев лобелии, как отмечают Pedersen and Sand-Jensen (1992), практически отсутствуют устьица (кроме незначительного количества на адаксиальной стороне, близкой к основанию листа), в отличие от брактей, имеющих многочисленные устьица. Несмотря на это, брактеи играют незначительную роль в короткой части жизненного цикла (Pedersen and Sand-Jensen, 1992). Наши наблюдения не подтверждают точку зрения Moeller (1978), что в течение осени и зимы лобелия Дортманна не продуцирует новые листья. В этой связи справедливо мнение Hutchinson (1975), который считает, что образование и развитие листьев в зимний период идет медленнее, чем в другие сезоны. Исследователь объясняет это тем, что существование многих водных растений в умеренном климатическом поясе затруднено из-за чрезмерно низких зимних температур и уменьшения интенсивности света из-за льда и снежного покрова. Таким образом, наличие зимнезелености у *L. dortmanna* является, по-видимому, следствием реализации наследственно обусловленных ритмов жизнедеятельности, сохранившихся «как реликтовый признак принадлежности предковых видов к флорам сезонных климатов прошлого» (Mihalin et al., 2010, p. 119).

Как показано нами, формирование побегов $n + 1$ порядка ветвления (боковые розеточные побеги) происходит в конце периода закладки терминального соцветия или на начальных этапах его развития. Например, на оз. Бельское в начале второй декады мая 2016 года обнаружены растения, имеющие зачаточное соцветие (длиной 0,5–0,9 см) и несущие 1–3 боковые почки (длиной до 0,9 мм с 2–4 листовыми зачатками) в пазухах верхних ассимилирующих листьев. В дальнейшем из этих почек формируются боковые побеги, представляющие собой вегетативные диаспоры. Аналогичные структуры описаны у лобелии Szmeja (1987). Однако их развитие, по его мнению, происходит в постгенеративную фазу и сопровождается увяданием цветоноса и всех листьев. По-видимому, сроки формирования боковых побегов напрямую зависят от географических различий в расположении озер.

Обнаруженные у лобелии с Тверских озер специфические утолщения корней (чаще в апикальной части, реже по всей поверхности) связаны с наличием везикулярно-арбускулярной микоризы (vesicular-arbuscular – VA), впервые описанной в конце 1970-х годов у изоэтидов в датских олиготрофных озерах (Søndergaard and Laegaard, 1977). По материалам, полученным из южных озер Швеции, суммарная длина корней лобелии, колонизированная грибами, колеблется от 34% до 85%, при этом арбускулярная колонизация – 28–83%, везикулярная – 6–65% (Nielsen et al., 2004). Подобный симбиоз чрезвычайно важен для изоэтидов, и, в частности, для лобелии, поскольку позволяет ей существовать при низком трофическом уровне озерных седиментов.

Рассматривая генеративную сферу растения, заметим, что формирование побегов из вегетативных почек в нижней части соцветия (в пазухе первого – второго листа срединной формации) мы не наблюдали, хотя, это, по-видимому, возможно. Так, Makavičiūtė and Sinkevičienė (2011) у лобелии Дортманна (озеро Салинис, Литва) обнаружили молодое вегетативное растение в нижней части соцветия (на расстоянии 25 мм от основания цветоносной оси). Подобное явление, по мнению этих авторов, связано со специфическими условиями окружающей среды (затенение и погружение растений в осадочные слои, а также природное и антропогенное эвтрофирование).

В отличие от семян лобелии из Шотландских озер, большинство из которых оказалось нежизнеспособными (Farmer and Spence, 1987), в популяциях, изученных нами, число подобных составляло около 10%. Сравнивая популяции лобелии в озерных экосистемах Тверской области и в Белорусских озерах (озеро Бредно (Marozau, 2013)), отметим, что число зрелых полноценных семян в плоде у первых значительно выше, чем у вторых (306,4 ± 57,6 и 155,4 ± 4,9, соответственно).

Как и в случае с калипсо и дремликом (Chuprakova and Savinykh, 2012), у лобелии Дортманна функциональная роль основных зон побегового комплекса обеспечивается минимальным числом (от 1 до 3) вариантов ЭМ. При этом самой простой структурой обладают НЗТ, ЗВ и ВЗТ, включающие в себя не более одного – двух вариантов ЭМ. Отсутствие спящих почек в пазухах листьев является главным фактором, исключающим как структурную, так и онтогенетическую поливариантность развития этого растения. Последнее обусловлено жесткой адаптацией растения к условиям внешней среды, что говорит о его уязвимости.

В целом, ритм сезонного развития лобелии в Тверских озерах сходен с таковым в одном из олиготрофных озер Польши (Szmeja, 1987). Однако в исследованных нами популяциях наблюдается сдвиг ряда фенологических фаз растений на более ранние сроки. Например, закладка цветоносов у лобелии в озерах Тверской области происходит в начале мая, а в польских популяциях этого растения – в конце мая. При этом пик цветения и фаза плодоношения наступают в близкие сроки. Это подтверждает ранее высказанную точку зрения (Voroshilov, 1960) о том, что в отношении признака ритма развития между близкими (одинаковыми) видами наблюдаются как черты сходства, так и черты различия.

Выводы

Согласно результатам исследования, по жизненной форме *L. dortmanna* – травянистый поликарпик, неявнополицентрический короткокорневищный малолетник вегетативного происхождения с кистекорневой системой и ранней неспециализированной морфологической дезинтеграцией. Нарастающая симподиально побеговая система растения представлена двумя типами разновозрастных анизотропных побегов замещения: дициклическими вегетативно-генеративными полурозеточными и однолетними вегетативными розеточными.

Наличие специфических утолщений, как в средней, так и в апикальной частях корней лобелии Дортманна, связано с формированием здесь везикулярно-арбускулярной микоризы, позволяющей растению существовать в водоемах с низким трофическим уровнем. Величина ФСП *L. dortmanna* в озерных экосистемах Тверской области в среднем достигает 1621 ± 451 семян на один вегетативно-генеративный побег. Оптимальной глубиной для произрастания этого растения является 50–70 см; на этой глубине число генеративных побегов, а, соответственно, и число продуцируемых семян на площади 0,25 м^2 достигает максимальных величин. Модульная структура лобелии представлена 10 вариантами ЭМ. ОМ формируется на основе монокарпического дициклического анизотропного моноподиального побега, несущего терминальное соцветие. Функциональная роль основных зон монокарпического побега обеспечивается минимальным числом вариантов ЭМ. По характеру ритма сезонного развития *L. dortmanna* относится к группе длительновегетирующих летнезимнезеленых растений со средне- и позднелетним периодом цветения.

Полевые работы выполнены при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», подпрограмма «Биоразнообразие: состояние и динамика».

References

Armand, M. L. (1912). Recherches morphologiques sur le *Lobelia dortmanna* L. Revue Generale de Botanique, 24(288), 465–478.

Borisova, I. V. (1965). Ritmy sezonnogo razvitiya stepnyh rasteniy i zonalnyh tipov stepnoy rastitelnosti Centralnogo Kazahstana [Seasonal development rhythms of steppe plants and zonal types of steppe vegetation of Central Kasakhstan]. Acta Instituti Botanici Nomine V. L. Komarovii Academiae Scientiarum URSS. Series III (Geobotanica), 17, 64–99.

Chuprakova, E. I., & Savinykh, N. P. (2012). Struktura osobey *Calypso bulbosa* (L.) Oakes i *Epipactis palustris* (L.) Crantz s pozicii modulnoy

organizacii [Structure of individuals of *Calypso bulbosa* (L.) Oakes and *Epipactis palustris* (L.) Crantz from position of modular organization]. Yaroslavl Pedagogical Bulieten, 3(4), 97–102 (in Russian).

Farmer, A. M., & Spence, D. H. N. (1987). Flowering, germination and zonation of the submerged aquatic plant *Lobelia dortmanna* L. Journal of Ecology, 75(4), 1065–1076.

Glück, H. (1924). Biologische und morphologische Untersuchungen über Wasser- und Sumpfgewächse. IV. Untergetauchte und Schwimmblattflora. Verlag von Gustav Fischer, Jena (in Germany).

Gubanov, I. A., Kiselyova, K. V., Novikov, V. S., Tihomirov, V. N. (2004). Illyustrirovannyy opredelitel rasteniy Sredney Rossii. Tom 3. Pokrytosemennye (Dvudol'nye: Razdel'nolepestnye) [Illustrated key to plants of Central Russia. Vol. 3. Angiosperms (Bipartite: Polypetalae)]. KMK, Moscow (in Russian).

Hutchinson, G. E. (1975). A treatise on limnology. Vol. 3. Limnological botany. Wiley and Sons, New York.

Lamentowicz, M., & Milecka, K. (2004). *Lobelia dortmanna* L. seeds in lake sediments from the Tuchola Forest (Pomerania, Northern Poland). Acta Palaeobotanica, 44(2), 281–285.

Lebedeva, O. A., & Belyakov, E. A. (2016). Osobennosti prorastaniya semyan *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) v usloviyah ehksperimenta [Features of seed germination of *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) under experimental conditions]. Rastitelnye Resursy, 52(3), 375–380 (in Russian).

Lebedeva, O. A., & Lapirov, A. G. (2009). The rhythm of the seasonal development and morphological polyvariation *Batrachium circinatum* (Sibth.) Spach at the Rybinsk reservoir. Inland Water Biology, 2(3), 223–227.

Makavičiūtė, J., & Sinkevičienė, Z. (2011). Unusual vegetative propagation of water *Lobelia* (*Lobelia dortmanna*) in Lake Salinis (Lithuania). Botanica Lithuanica, 17(4), 185–187.

Markov, M. V. (2017). K izucheniyu polushnikovyh oligotrofnyh ozer Tverskoy oblasti: Fotosinteziruyushchaya biota kak indikator ih troficheskogo statusa [Research on the Isoetid oligotrophic Lakes in Tver region: Photosynthetic biota as their trophic state indicator]. Russian Journal of Ecosystem Ecology, 2(1), 1–19 (in Russian).

Marozau, I. M. (2013). Sravnitelnoe izuchenie i ehkologo-biologicheskie osobennosti *Lobelii dortmanna* pri reintrodukcii [The comparative and ecological-biological features of *Lobelia dortmanna* with reintroduction]. Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of Belarus. Biological Series, 4, 30–34 (in Belarus).

Mihalin, M. V., Popkov, B. V., & Priluckiy, A. N. (2010). Sezonnyy ritm rasteniy i perspektivy ego transformacii [Seasonal rhythm of plants and prospects for its transformation]. Byulleten Botanicheskogo Sada – Instituta DVO RAN, 5, 117–132 (in Russian).

Moeller, R. E. (1978). Seasonal changes in biomass, tissue chemistry and net production of the evergreen hydrophyte *Lobelia dortmanna*. Canadian Journal of Botany, 56(12), 1425–1433.

Møller, C. L., & Sand-Jensen, K. (2011). High sensitivity of *Lobelia dortmanna* to sediment oxygen depletion following organic enrichment. New Phytologist, 190(2), 320–331.

Nevskiy, M. L. (1956). O nekotorom svoeobrazii flory i rastitel'nosti Vyshnevolockogo rayona Kalininskoy oblasti [About some peculiarityes of flora and vegetation of Vyshnevolotsky district of the Kalinin region]. Uchenye Zapiski Kalininskogo Gosudarstvennogo Pedagogicheskogo Instituta imeni M. I. Kalinina, 20, 5–46 (in Russian).

Nielsen, K. B., Kjøller, R., Olsson, P. A., Schweiger, P. F., Andersen, F. Ø., & Rosendahl, S. (2004). Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. Mycological Research, 108(6), 616–625.

Pedersen, O. & Sand-Jensen, K. (1992). Adaptations of submerged *Lobelia dortmanna* to aerial life form: Morphology, carbon sources and oxygen dynamics. Oikos, 65(1), 89–96.

Philippov, D. A., Bobroff, Y. A., Czhobadze, A. B., & Levashov, A. N. (2016). *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) v Vologodskoy oblasti [*Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) in the Vologda region]. Vestnik Sankt-Peterburgskogo Universiteta. Seriya 3. Biologiya, 1, 84–99.

Philipson, W. R. (1948). Studies in the development of the inflorescence: V. The raceme of *Lobelia dortmanna* L., and other Campanulaceous inflorescences. Annals of Botany, 12(46), 147–156.

Pulido, C., Keijsers, D. J. H., Lucassen, E. C. H. E. T., Pedersen, O., & Roelofs, J. G. M. (2012). Elevated alkalinity and sulfate adversely affect the aquatic macrophyte *Lobelia dortmanna*. Aquatic Ecology, 46(3), 283–295.

Sand-Jensen, K., Borum, J., & Binzer, T. (2005). Oxygen stress and reduced growth of *Lobelia dortmanna* in sandy lake sediments subject to organic enrichment. Freshwater Biology, 50(6), 1034–1048.

Savinykh, N. P. (2007). Modul'naya organizaciya rasteniy [Modular organization of plants]. In: Ontogeneticheskiy atlas rasteniy [Ontogenetic atlas of plants]. Izdatelstvo Mariyskogo Gosudarstvennogo Universiteta, Yoshkar-Ola, 15–34 (in Russian).

Savinykh, N. P. (2008). Primenenie koncepcii modul'noy organizacii k opisaniyu struktury rasteniya [Application of modular concept to description of plant structure]. In: Sovremennye podhody k opisaniyu struktury rasteniy [Contemporary approach to description of plant structure]. LLC "Loban", Kirov, 47–69 (in Russian).

Savinykh, N. P., & Cheryomushkina, V. A. (2015). Biomorphology: Current status and prospects. Contemporary Problems of Ecology, 8(5), 541–549.

Søndergaard, M., & Laegaard, S. (1977). Vesicular – arbuscular mycorrhiza in some aquatic vascular plants. Nature, 268, 232–233.

Szmeja, J. (1987). The seasonal development of *Lobelia dortmanna* L. and annual balance of its population size in an oligotrophic lake. Aquatic Botany, 28(1), 15–24.

Vaynagiy, I. V. (1974). O metodike izucheniya semennoy produktivnosti rasteniy [Concerning the methodology for the studying of plants' seed productivity]. Botanicheskiy Zhurnal, 59(6), 826–831 (in Russian).

Voroshilov, V. N. (1960). Ritm razvitiya u rasteniy [The rhythm of plants development]. Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscow (in Russian).

Woodhead, N. (1951). Biological flora of the British Isles: *Lobelia dortmanna* L. Journal of Ecology, 39(2), 458–464.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 356–362
doi: 10.15421/021755

Bile lipids in rats under chronic social stress

A. M. Liashevych, I. I. Tubaltseva, Y. M. Reshetnik, O. V. Bondarenko, S. P. Veselsky, M. Y. Makarchuk

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 02.07.2017
Received in revised form 11.08.2017
Accepted 13.08.2017

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Glushkova Str., 2, Kyiv, 03022, Ukraine.
Tel.: +38-063-050-22-30.
E-mail: lam88leona2@gmail.com

Liashevych, A. M., Tubaltseva, I. I., Reshetnik, Y. M., Bondarenko, O. V., Veselsky, S. P., & Makarchuk, M. Y. (2017). Bile lipids in rats under chronic social stress. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 356–362. doi: 10.15421/021755

Our experiments studied changes in lipid compound of bile of non-purebred male rats under the condition of social stress while the preparation "Korvitin" was used against the stress. Using the method of thin-layer chromatography, we determined the concentrations of phospholipids, cholesterol and its esters, free fatty acids and triglycerides in the animals' bile, which was obtained through vivesection a day and a month after the rats were first subjected to chronic social stress (model of social defeat), and also in the bile of the animals which were treated intragastrically with "Korvitin" against the stress (1 mg/kg, 7 days). In the bile of the male rats which experienced chronic social stress the concentration of free cholesterol decreased and the content of its esters increased both immediately after the initiation of stress and after a month of exposure to stress. The concentration of free fatty acids in the bile decreased after modeling chronic social stress, but increased in liver secretion, taken a month after the animals had first experienced stress. In the bile of male rats immediately after the procedure of exposing the animals to stress, the content of phospholipids decreased. Using "Korvitin" during the modeling of social stress caused decrease in the content of phospholipids in the rats' bile and caused significant increase in the concentration of free fatty acids, triglycerides and cholesterol esters in the liver secretion. The study found significant changes in the concentration of lipids in the bile and in their distribution in the organism of male rats under the conditions of experimentally induced chronic stress. The effect of stress on the bile of rats requires further study for determining its pathogenic role.

Keywords: liver; bile cholesterol; bile phospholipids; bile fat acids; bile triglycerides; Korvitin; social defeat

Ліпіди жовчі самців щурів в умовах хронічного соціального стресу

А. М. Ляшевич, І. І. Тубальцева, Є. М. Решетник, С. П. Весельський, О. В. Бондаренко, М. Ю. Макарчук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

В експериментах на безпородних самцях щурів досліджено зміни ліпідного складу жовчі за хронічного соціального стресу та застосування корвітину за цих умов. Методом тонкошарової хроматографії визначено концентрації фосфоліпідів, холестролу та його етерів, вільних жирних кислот і тригліцеридів у жовчі, зібраній у гострих дослідах через добу та через місяць після того, як щурі зазнали хронічного соціального стресу (у моделі соціальної поразки), а також у тварин, які у процесі стресування отримували інтрагастрально корвітин (1 мг/кг, 7 діб). У жовчі самців щурів, які зазнали експериментального хронічного соціального стресу, знижувалася концентрація вільного холестеролу та збільшувався вміст його етерів як одразу після завершення стресування, так і через місяць після нього. Концентрація вільних жирних кислот у жовчі знижувалася після завершення моделювання хронічного соціального стресу, але зростала у печінковому секреті, зібраному через місяць по тому як тварини зазнали стресового впливу. У жовчі самців щурів одразу після завершення процедури стресування знижувався вміст фосфоліпідів. Застосування корвітину під час моделювання соціального стресу у щурів запобігало зниженню вмісту фосфоліпідів у жовчі та викликало істотне збільшення концентрації вільних жирних кислот, тригліцеридів і етерів холестеролу у печінковому секреті. Виявлені суттєві зміни концентрації ліпідів у жовчі, а отже, і їх розподілу в організмі самців щурів в умовах експериментального хронічного стресу потребують подальшого вивчення для з'ясування їх патогенетичної ролі.

Ключові слова: печінка; холестерол жовчі; фосфоліпіди жовчі; жирні кислоти жовчі; тригліцериди жовчі; корвітин; модель соціальної поразки

Вступ

Жовч як унікальна біологічна рідина містить різні складові та виконує численні важливі функції в організмі (Boyer, 2013). Жовчоутворення відіграє ключову роль у метаболізмі холестеролу, виступаючи основним шляхом його екскреції як у вигляді синтезованих із нього в гепатоцитах жовчних кислот, так і його вільної та етерифікованої форм. І хоча холестероловий гомеостаз не обмежується синтезом холестеролу в гепатоцитах та його виведенням у складі жовчі, порушення його надходження до жовчі спричинює серйозні розлади жовчосекреторної функції та патологічні стани гепато-біліарної системи (Hşmioğullari et al., 2007; Wang et al., 2009; Tyazhka et al., 2015). До основних ліпідних складових жовчі крім холестеролу та жовчних кислот належать фосфоліпіди (переважно діацилфосфатидилхолін). Завдяки детергентним властивостям жовчні кислоти забезпечують надходження ліпідів (перш за все фосфатидилхоліну) з каналікулярного домену плазматичної мем-

брани гепатоцитів до жовчі (Boyer, 2013; Eckstein et al., 2015; Linton, 2015). У свою чергу, фосфоліпіди жовчі виконують захисну функцію, зменшуючи детергентні ефекти холатів (Nicolaou et al., 2015). За фізіологічного стану в жовчі людини та інших ссавців жовчні кислоти та фосфоліпіди утворюють із холестеролом комплекси – міцели. У випадку порушення співвідношення концентрацій цих компонентів у жовчі створюються умови для випадання холестеролу в осад та його кристалізації (Hşmioğullari et al., 2007; Wang et al., 2009), проявляються токсичні ефекти жовчних кислот тощо (Linton, 2015; Nicolaou et al., 2015).

Надходження ліпідів до жовчі та підтримання певного їх співвідношення у печінковому секреті – важливий фізіологічний процес, що значною мірою відображає перебіг ліпідного обміну у клітинах печінки та в організмі в цілому (Tyazhka et al., 2015). Зміни обміну ліпідів і пов'язані з ними патології характерні для різних форм стресу, вони виявляються у тварин різних видів і людини (Zahayko et al., 2008; Chuang et al., 2010; Han et al., 2016). Відомі прямі ефекти гострого теплового стресу на ліполіз та ліпогенез в адипоцитах (Faylon et al., 2015). Соціальний стрес спричиняє ожиріння та супутні захворювання (Scott et al., 2012). Хронічний стрес викликає жирове переродження печінки з одночасною втратою вісцерального жиру (Liu et al., 2014). Відмічаються як швидкі (оксидативний стрес, запалення), так і тривалі (метаболічні розлади, активація окремих ланок метаболічних перетворень ксенобіотиків та ліпідів, внутрішньопечінкове накопичення тригліцеридів, лімфоцитарна інфільтрація, асцит тощо) порушення структури та функціонування печінки, викликані посттравматичним стресовим розладом, що зумовлює виникнення дисліпідемії та метаболічного синдрому (Gautam et al., 2015).

Серед сучасних медико-біологічних досліджень ліпідного обміну, гіпо- та гіперхолестеринемії та пов'язаних із ними метаболічного синдрому, атеросклерозу, ішемічної хвороби серця чільне місце посідає вивчення відповідних лікувальних засобів (Dlyaboha, 2012; Liashevych et al., 2017). Зокрема, біофлавоноїди змінюють ліпідний склад крові та жовчі, впливають на жовчосекреторну функцію печінки лабораторних тварин (Liashevych et al., 2016; Vovkun et al., 2016). Критична роль стресіндукованих порушень метаболізму ліпідів у розвитку багатьох патологічних станів, невиправдано мала кількість сучасних досліджень жовчосекреторної функції печінки в умовах соціального стресу та актуальність пошуку ефективних препаратів для корекції патологічно зміненого ліпідного обміну зумовили мету цієї статті – виявити вплив хронічного соціального стресу на ліпідний склад жовчі самців щурів одразу по завершенні процедури стресування, у віддаленому періоді часу (через місяць) та під час застосування корвітину у стресованих тварин.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження провели на 48 білих безпородних щурах у віварії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Всі експерименти проводили відповідно до існуючих міжнародних і національних вимог і норм гуманного поводження з експериментальними тваринами. Тварин утримували у пластикових клітках із ґратчастим залізним верхом індивідуально (експериментальні тварини) або гаремом (один самець разом із 2–4 самицями). Режим освітлення у віварії – природний. Упродовж усього експерименту підтримували належний температурний режим. Тварини отримували стандартний раціон (комбікорм для лабораторних щурів Вітамекс, Україна), мали вільний доступ до води та їжі. Після одержання тварин їх індивідуально помічали шляхом нанесення перманентним маркером номера на хвіст. Від першого до останнього дня дослідження контролювали масу тіла експериментальних тварин.

Двадцять один щур масою 0,20 ± 0,03 кг використаний як інтрудер для створення хронічного соціального стресу – модель соціальної поразки. Інші 21 щур масою 0,35–0,40 кг, кожного яких утримували разом із 2–4 самицями, слугували як доместики в цій моделі стресу. Щури-інтрудери (n = 21) зазнавали впливу хронічного соціального стресу в моделі соціальної поразки упродовж 14 діб. П'ятеро з них із сьомої по чотирнадцяту добу процедури стресування отримували інтрагастрально корвітин у дозі 1 мг/кг маси тіла тварини. Тварини контрольної групи масою 0,20 ± 0,03 кг (n = 6) також отримували стандартний раціон і мали вільний доступ до води, але не зазнавали впливу хронічного соціального стресу в моделі соціальної поразки.

Використана у нашому дослідженні модель соціального стресу (модель соціальної поразки) забезпечила набуття інтрудерами субординантного статусу та мала достатню тривалість для формування у них відповідного поведінкового стереотипу. Модифікована модель хронічного соціального стресу розроблена для мишей, у ній стрес спричиняв повторний досвід соціальних поразок у щоденних міжсамцевих конфронтаціях (Kudryavtseva, 1991; Horid'ko et al., 2017). Процедура соціального стресу починалася з тижневої ізоляції щурів-інтрудерів для усунення їх попереднього соціального досвіду. Надалі щурів-інтрудерів протягом усього часу досліду утримували індивідуально (в окремих клітках). За три доби до початку стресу тестували щурів-доместиків на наявність агоністичної поведінки шляхом підсаджування до них у клітки індиферентних щурів, які не входили до складу експериментальної групи. Доместиків, які не демонстрували агресивної поведінки, виключали з експерименту.

Стрес створювали щоденними агоністичними взаємодіями між тваринами. За 10 хв до початку агоністичних взаємодій із кліток щурів-доместиків відсаджували самок. Кожного дня упродовж 14 діб у затемненій кімнаті, у другій половині доби у клітку до доместика підсаджували інтрудера на 10 хв для агоністичних взаємодій. Після цього на 20 хв у клітці встановлювали прозору перфоровану перегородку, що давала можливість візуального, нюхового та слухового, але не фізичного контакту між щуром-інтрудером і щуром-доместиком. Активність доместиків та кількість їх атак підраховували. Одночасно відслідковували поведінку інтрудерів під час перебування в одній клітці з доместиком.

Для дослідження тривалості можливих ефектів хронічного соціального стресу на ліпідний склад жовчі тварин ділили на дві групи: у першій (n = 10) забирання жовчі проводили через добу після завершення процедури стресування (група I), а у другій (n = 6) – через місяць після неї (група II). Самці щурів групи II упродовж місяця після моделювання в них хронічного соціального стресу перебували у приміщенні віварію в одній окремій клітці, отримували стандартний раціон і мали вільний доступ до води та їжі. Тварини, які інтрагастрально отримували упродовж другого тижня стресування корвітин у дозі 1 мг/кг маси тіла, складали експериментальну групу III (n = 5). Зразки жовчі відбирали в групі III у той же час, що й у групі I.

Жовчосекреторну функцію щурів-інтрудерів досліджували *in vivo* в гострих експериментах, використовуючи для наркотизації тіопентал натрію в дозі 60 мг/кг маси тіла тварини. Перед оперативним втручанням, необхідним для отримання печінкового секрету, тварин піддавали харчовій депривації упродовж однієї доби, але при цьому вони мали вільний доступ до води. Після лапаротомії канюлювали жовчну протоку, і через 30 хв стабілізації стану тварини здійснювали протягом наступних 3 годин гострого досліду забирання 18 10-хвилинних проб жовчі. Кожні три 10-хвилинні порції жовчі збирали до одного епендорфа, надалі методом тонкошарової хроматографії, модифікованим у нашій лабораторії, визначали вміст жовчних кислот, фосфоліпідів, холестеролу та його етерів, вільних жирних кислот і тригліцеридів у всіх півгодинних зразках печінкового секрету (Vesel's'kyy et al., 2001).

За концентраціями окремих фракцій ліпідів (холестерол, етери холестеролу) та сумарних жовчних кислот розраховували холато-холестероловий коефіцієнт (коефіцієнт літогенності

жовчі), коефіцієнт етерифікації холестеролу (співвідношення вільного холестеролу до його етерів) та співвідношення фосфоліпідів до загального холестеролу жовчі (Hanytkevych et al., 1985). Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA) з урахуванням t-критерію Стьюдента за нормального розподілу даних і непараметричного критерію Мана – Уїтні – за ненормального розподілу. Нормальність розподілу оцінювали за допомогою тесту Шапіро – Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності за P < 0,05 (Filimonova et al., 2004, 2005).

Результати

Функції жовчі як травного секрету виконуються нею лише за умови необхідної концентрації в ній відповідних органічних компонетів, перш за все, жовчних кислот і ліпідів, та за підтримання належного співвідношення цих речовин у печінковому секреті. За хронічного соціального стресу у печінці самців щурів відбуваються метаболічні процеси, які викликають зміни ліпідного складу жовчі. Проведене одразу по завершенні процедури хронічного соціального стресу (моделі соціальної поразки) дослідження жовчі самців щурів групи I виявило зниження концентрацій вільного холестеролу, вільних жирних кислот і, в останній пробі печінкового секрету, – фосфоліпідів жовчі (табл. 1, 2). Концентрація фосфоліпідів у шостій пробі жовчі щурів групи I зменшувалася на 11,7% (P < 0,01) порівняно з контролем (табл. 1).

Через місяць після стресування у щурів не спостерігали суттєвих змін вмісту фосфоліпідів у жовчі порівняно з контролем. Під час застосування корвітину упродовж останнього з двох тижнів процедури стресування вміст фосфоліпідів у жовчі самців щурів групи III статистично значимо не відрізнявся від контролю (табл. 1).

Таблиця 1
Концентрація ліпідів у жовчі щурів самців під час хронічного соціального стресу та застосування корвітину (1 мг/кг) (M ± SD, мг%, n = 21)

Проби жовчі	Серія	Фракції ліпідів жовчі		
		фосфоліпіди	вільні жирні кислоти	тригліцериди
1	контроль	69,74 ± 6,66	12,14 ± 2,15	2,33 ± 0,93
	група I	71,21 ± 7,51	10,01 ± 2,24	2,05 ± 0,26
	група II	69,68 ± 7,70	21,03 ± 2,52***	2,90 ± 0,55
	група III	67,96	19,82***	2,26
2	контроль	68,73 ± 6,05	12,59 ± 2,51	2,30 ± 0,61
	група I	72,01 ± 7,63	9,81 ± 1,77*	2,04 ± 0,31
	група II	70,85 ± 6,82	20,65 ± 2,99***	2,65 ± 0,46
	група III	70,24	19,28**	2,60
3	контроль	67,19 ± 4,15	12,57 ± 2,02	2,29 ± 0,83
	група I	68,97 ± 7,02	11,20 ± 2,03	2,15 ± 0,29
	група II	68,17 ± 5,11	20,68 ± 2,35***	2,72 ± 0,40
	група III	70,80	18,78**	2,52
4	контроль	66,31 ± 3,76	12,37 ± 1,64	2,19 ± 0,68
	група I	66,38 ± 6,33	10,46 ± 1,67*	2,03 ± 0,30
	група II	65,72 ± 5,16	19,72 ± 2,21***	2,52 ± 0,51
	група III	70,98	18,62**	2,66
5	контроль	64,10 ± 4,44	12,74 ± 1,52	1,96 ± 0,69
	група I	60,42 ± 6,49	9,39 ± 2,22**	1,85 ± 0,24
	група II	62,97 ± 5,61	18,48 ± 1,92***	2,42 ± 0,35
	група III	66,78	20,98**	2,78*
6	контроль	62,67 ± 4,01	12,97 ± 1,59	1,96 ± 0,63
	група I	55,35 ± 4,83**	8,24 ± 1,13***	1,73 ± 0,24
	група II	60,53 ± 4,49	17,88 ± 1,71***	2,38 ± 0,41
	група III	63,38	21,50***	2,96*

Примітки: * – P < 0,05, ** – P < 0,01, *** – P < 0,001 статистично значимі відмінності порівняно з контролем.

Максимальне зниження концентрації вільних жирних кислот на 36,5% (P < 0,001) виявлене у шостій пробі жовчі щурів групи I (табл. 1). І навпаки, через місяць після завершення процедури хронічного соціального стресу у самців щурів концентрація вільних жирних кислот у жовчі зросла. Так, у шостій пробі вміст вільних жирних кислот збільшився на 37,9% (P < 0,001) порівняно з контролем. При цьому як у жовчі, зібраній у тварин одразу після моделювання хронічного соціального стресу, так і у зразках, взятих через місяць після нього, концентрація тригліцеридів не змінювалася порівняно з контролем. Натомість у тварин, які зазнали соціальної поразки та отримували корвітин, концентрація вільних жирних кислот і тригліцеридів зросла порівняно з контролем (табл. 1). Наприкінці гострого досліду (шоста проба) у групі III вміст вільних жирних кислот у жовчі вищий від контролю на 65,8% (P < 0,001), а тригліцеридів – на 51,0% (P < 0,001).

Таблиця 2
Концентрація холестеролу та його етерів у жовчі щурів самців під час хронічного соціального стресу та застосування корвітину (1 мг/кг) (M ± SD, мг%, n = 21)

Проби жовчі	Серія	Вільний та етерифікований холестерол жовчі	
		холестерол	етери холестеролу
1	контроль	28,60 ± 3,87	2,64 ± 0,49
	група I	21,24 ± 3,15**	3,18 ± 0,68
	група II	23,27 ± 3,63*	2,73 ± 0,67
	група III	20,90**	3,34*
2	контроль	28,83 ± 3,82	2,51 ± 0,45
	група I	20,97 ± 1,65**	2,88 ± 0,58
	група II	24,13 ± 2,59*	2,95 ± 0,62
	група III	21,94**	3,60**
3	контроль	27,11 ± 3,21	2,53 ± 0,46
	група I	21,23 ± 3,44**	2,95 ± 0,48
	група II	23,35 ± 1,40*	3,03 ± 0,50
	група III	22,10**	3,88**
4	контроль	26,06 ± 4,86	2,39 ± 0,48
	група I	19,10 ± 2,10**	3,00 ± 0,43*
	група II	22,10 ± 1,09	2,83 ± 0,51
	група III	22,58	3,78***
5	контроль	24,54 ± 4,84	2,39 ± 0,55
	група I	16,96 ± 1,27**	2,79 ± 0,47
	група II	20,53 ± 1,67	2,65 ± 0,47
	група III	20,96	3,54**
6	контроль	24,16 ± 4,76	2,50 ± 0,60
	група I	16,79 ± 1,94**	2,60 ± 0,48
	група II	20,45 ± 1,07	2,62 ± 0,57
	група III	19,58	3,64**

Примітки: див. табл. 1.

За хронічного соціального стресу у гепатоцитах самців щурів переважно пригнічуються процеси, які забезпечують надходження у первинні жовчні канальці стероїдних ліпідних компонентів жовчі. Спостерігали більше зниження концентрації холестеролу в усіх зразках жовчі тварин групи I (одразу після моделювання соціального стресу). Концентрація холестеролу у першій пробі жовчі групи I менша на 25,7% (P < 0,01) від контролю, а в останній, шостій пробі – на 41,3% (P < 0,01; табл. 2).

У самців щурів групи II вміст вільного холестеролу в жовчі у першій – третій пробах менший за контроль на 18,7% (P < 0,05), 16,3% (P < 0,05), 13,9% (P < 0,05), відповідно, але далі (у четвертій, п'ятій та шостій пробах) його концентрація статистично значимо не відрізняється від показників контрольної групи (табл. 2). Під час уведення стресованим тваринам корвітину подібним чином пригнічується надходження вільного холестеролу у жовчні канальці. У групі III концентрація холестеролу у першому зразку жовчі менша за контроль на 26,9% (P < 0,01), у другому – на 23,9% (P < 0,01), а у третьому – на 18,5% (P < 0,01). Слід відмітити підвищену порівняно з контролем концентрацію етерів холестеролу у жовчі щурів групи III (табл. 2). У першій півгодинній пробі жовчі групи III вміст етерів холестеролу зростав порівняно з контролем на 26,5% (P < 0,05), а в останній, шостій, – на 45,6% (P < 0,01).

Таким чином, жовч стресованих щурів групи I мала такі відмінності за вмістом ліпідів порівняно з контролем: у першій пробі в цій групі частка вільних жирних кислот складає лише

9%, а холестеролу – 20%, тоді як фосфоліпідів – 66%, а етерів холестеролу – 3% (рис. 1).

Через місяць після проведення процедури стресування (група II) у жовчі виявляється протилежний порівняно з групою I феномен: у першому зразку жовчі частка вільних жирних кислот серед ліпідів досягає 18%, а фосфоліпідів дещо зменшується (58%). При цьому холестеролу, як і у групі I, лишається 20% (рис. 1). Склад першої проби жовчі, отриманої у групі III, показує, що уведення корвітину під час моделювання соціальної поразки у самців-інтрудерів викликало збільшення частки вільних жирних кислот до 17% і етерів холестеролу до 3% з одночасним зменшенням частки вільного холестролу до 18% та підтриманням вмісту фосфоліпідів на тому ж рівні, що й у контролі (рис. 1).

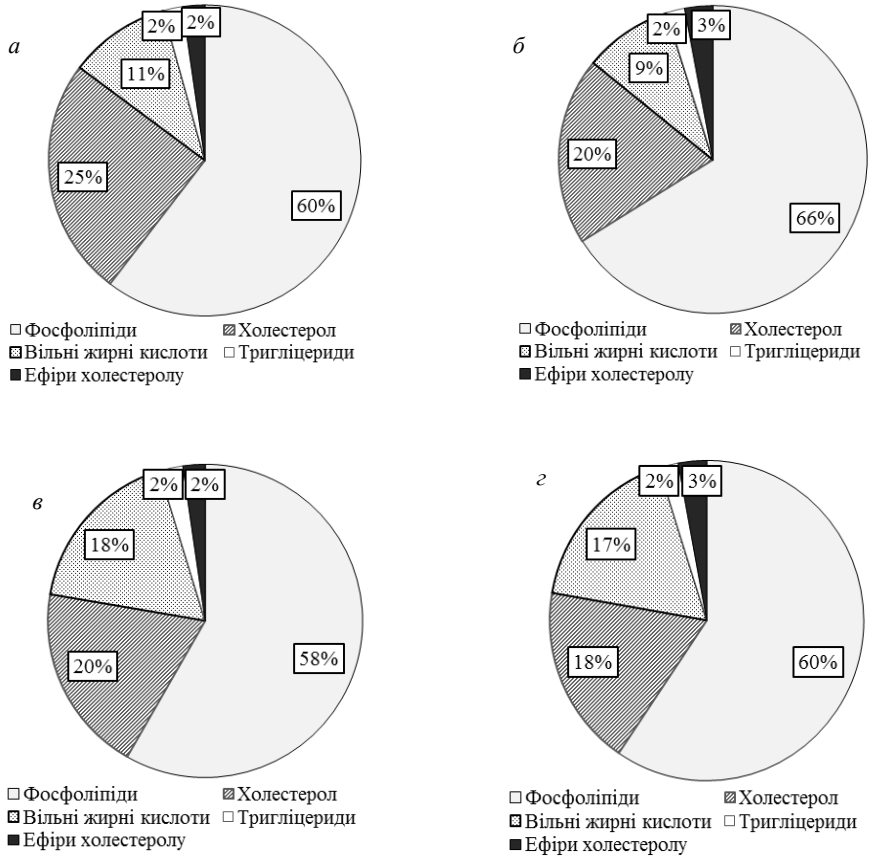


Рис. 1. Співвідношення ліпідів у першій пробі жовчі самців щурів під час хронічного соціального стресу та застосування корвітину: вказано відсоткову частку кожної ліпідної фракції в контролі (*а*), групах I (*б*), II (*в*) та III (*г*); n = 21

Значною мірою вплив соціального стресу на ліпідний склад жовчі виявляється у різній динаміці підтримання співвідношення різних ліпідів у печінковому секреті впродовж гострого досліду. Хоча концентрація фосфоліпідів у шостій пробі жовчі групи I була меншою за контроль (табл. 1), частка цього ліпідного компонента склала 65% загального вмісту ліпідів у печінковому секреті, а частка вільних жирних кислот лишилася низькою (10%). Як у контролі, так і у групі I у шостій пробі частка холестеролу серед усіх інших ліпідних фракцій ставала меншою порівняно з першою півгодинною пробою жовчі. Відсоток тригліцеридів серед усіх ліпідів жовчі лишався незмінним упродовж усього гострого досліду як у контролі, так і у групі I – 2% і 3% відповідно (рис. 2).

У групі II частки фосфоліпідів, холестеролу та тригліцеридів серед усіх визначених фракцій ліпідів у шостому зразку жовчі лишилися тикими, як і у першій пробі, частка вільних жирних кислот дещо зменшилася (17%), а частка етерів холестеролу збільшилася до 3% (рис. 2). У щурів-інтрудерів, які отримували корвітин, у шостій пробі жовчі зменшилася лише частка фосфоліпідів: 57%, порівняно з 60% у першій пробі. При цьому у шостій пробі жовчі групи III збільшилися до 19% і 3% частки вільних жирних кислот і тригліцеридів, відповідно. Відсоток холестеролу та його етерів серед усіх визначених ліпідів жовчі у шостій пробі групи III лишався таким самим, як і у першій пробі (рис. 2).

Фізико-хімічні властивості жовчі, зокрема, її колоїдна стабільність та літогенність можуть бути успішно оцінені за відповідними співвідношеннями різних ліпідних компонентів. У самців щурів групи I холато-холестероловий коефіцієнт жовчі першої та другої проб вищий від контролю на 27% та 25% ($P < 0,05$) відповідно. Також холато-холестероловий коефіцієнт жовчі у першій та другій пробах збільшувався порівняно з контролем на 33% ($P < 0,05$) та 32% ($P < 0,05$) у щурів самців за хронічного соціального стресу та застосування корвітину (група III). Натомість у групі II в четвертому, п'ятому та шостому зразках жовчі холато-холестероловий коефіцієнт був меншим від контролю на 21%, 20% ($P < 0,05$) та 28% ($P < 0,05$; табл. 3). Отже, за розрахунками холато-холестеролового співвідношення бачимо, що літогенні властивості жовчі (зростання ймовірності утворення холестеролових жовчних каменів) виявляються через місяць по тому як тварини зазнали соціального стресу.

Коефіцієнт етерифікації жовчі щурів у групі I менший за контроль у всіх шести пробах, відповідно на 40% ($P < 0,01$), 38% ($P < 0,05$), 36% ($P < 0,01$), 44% ($P < 0,001$), 44% ($P < 0,01$) та 31%. У групі II коефіцієнт етерифікації жовчі самців щурів за хронічного соціального стресу також менший за контроль протягом усього гострого досліду (шість проб) на 26%, 31% ($P < 0,05$), 34% ($P < 0,01$), 32% ($P < 0,05$), 31% ($P < 0,05$), 20%. У тварин, які інтрагастрально отримували впродовж другого тижня стресування корвітин (група III), коефіцієнт етерифікації був меншим від контролю у шести зразках жовчі на 42% ($P < 0,05$), 47% ($P < 0,01$), 52% ($P < 0,01$), 42% ($P < 0,01$), 46% ($P < 0,01$) та 45% ($P < 0,01$; табл. 3). Оскільки коефіцієнт етерифікації розраховується як співвідношення вільного холестеролу до етерифікованого, зменшення його значення вказує на посилення процесів етерифікації холестеролу у клітинах печінки як в

умовах стресу, так і за застосування корвітину. Співвідношення фосфоліпідів і холестеролу жовчі щурів самців у групі I у всіх шести пробах було більше контролю на 33% (P < 0,01), 36% (P < 0,01), 29% (P < 0,05), 36% (P < 0,01), 37% (P < 0,05), 30% (P < 0,05). У самців щурів групи II співвідношення фосфоліпідів і холестеролу було у першій і другій пробах жовчі статистично значимо більше контролю на 21% (P < 0,05) і 19% (P < 0,05) відповідно (табл. 3). У групі III співвідношення фосфоліпідів і холестеролу жовчі щурів у першому зразку більше контролю на 26% (P < 0,01), у другому – на 25% (P < 0,01), третьому – на 20% (P < 0,05; табл. 3). Виявлене збільшення описаного співвідношення пов'язане не з посиленим надходженням фосфоліпідів до жовчних канальців, а зі зменшенням вмісту холестеролу в жовчі стресованих самців щурів.

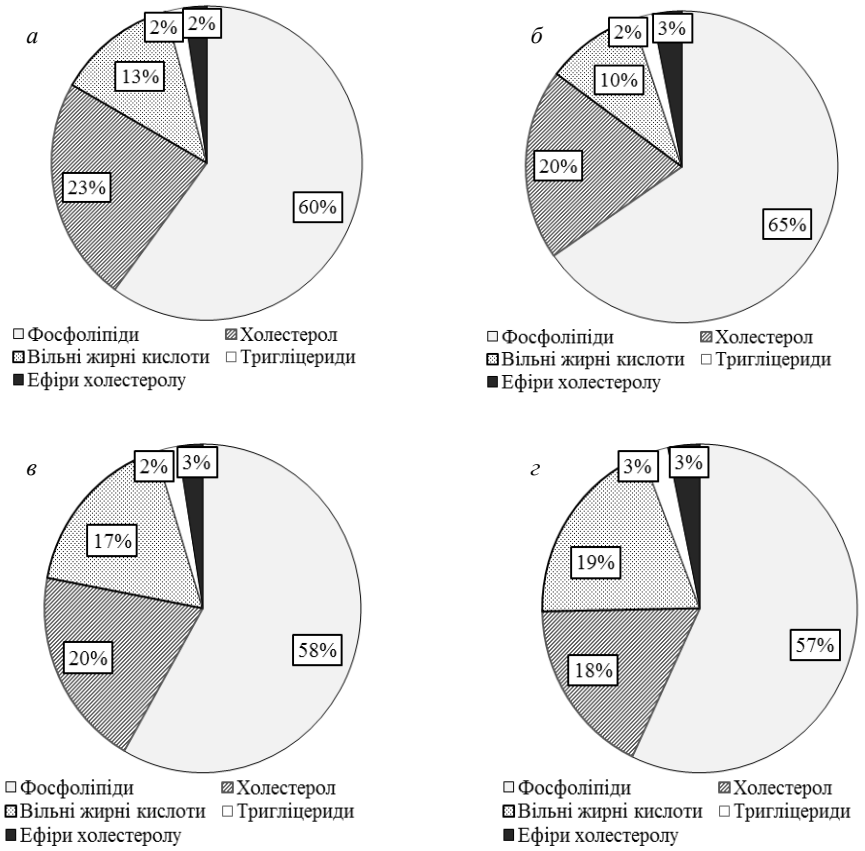


Рис. 2. Співвідношення ліпідів у шостій пробі жовчі щурів самців під час хронічного соціального стресу та застосування корвітину: вказано відсоткову частку кожної ліпідної фракції в контролі (*а*), групах I (*б*), II (*в*) та III (*г*); n = 21

Обговорення

У тварин, які тільки-но зазнали процедури стресування, печінка не здатна забезпечувати вміст фосфоліпідів у жовчі на достатньому рівні впродовж усього експерименту та наприкінці гострого досліду концентрація цих складових печінкового секрету знижується. З огляду на значення фосфоліпідів жовчі як її ліпідних компонентів, що захищають клітини стінок первинних жовчних протоків та всього біліарного дерева від детергентних впливів холатів (Nicolaou et al., 2015) та стабілізують колоїдну систему жовчі, утримуючи (разом із жовчними кислотами) холестерол у складі міцел і таким чином запобігаючи його випаданню в осад (Wang et al., 2009, Boyer, 2013; Linton, 2015), зменшення концентрації фосфоліпідів у печінковому секреті можна вважати ще одним патологічним наслідком соціального стресу. Але слід зауважити, що фосфоліпіди потрапляють до жовчі внаслідок детергентного впливу холатів на каналікулярні ділянки плазматичних мембран гепатоцитів (Boyer, 2013). Надмірне зростання їх концентрації можливе лише за збільшення вмісту в жовчних канальцях аномальних жовчних кислот. У такому випадку виникатимуть розлади функціонування та структури мембран клітин печінки через порушення їх нормального складу. Оскільки співвідношення фосфоліпідів до холестеролу та холато-холестероловий коефіцієнт жовчі стресованих тварин збільшувалися, в умовах створеної нами моделі хронічного соціального стресу не зростав ризик холелітіазу. Однак через місяць після процедури стресування співвідношення фосфоліпідів до холестеролу залишається вищим контролю, але холато-холестероловий коефіцієнт жовчі знижується, а отже, погіршуються солюбілізаційні властивості печінкового секрету.

Синтез і етерифікація холестеролу пригнічується за різних уражень печінки, зокрема, холестазу. Найбільше зростання холато-холестеролового коефіцієнта саме у групі III підтверджує припущення про можливі антихолелітичні властивості корвітину. Посилення етерифікації холестеролу, яке спостерігається в цих умовах, сприяє його утриманню у жовчних міцелах. Разом із тим, слід зазначити, що зміни коефіцієнта етерифікації у групах I і II вказують на посилене утворення етерів холестеролу в умовах соціального стресу та через місяць після стресування. Збільшення в крові рівня етерів холестеролу з насиченими та мононенасиченими жирними кислотами спричинює погіршення його трансмембранного транспорту до клітин і посиленої кристалізації, а відтак, його накопичення у судинному руслі з наступним відкладенням на стінках судин (Dlyaboha, 2012). Для з'ясування патогенетичної ролі виявленого нами посилення етерифікації холестеролу в умовах хронічного соціального стресу потрібні подальші дослідження, зокрема, жирнокислотного складу етерів холестеролу.

Зменшення концентрації вільних жирних кислот у жовчі стресованих щурів, яке спостерігалося одразу після завершення процедури стресування, може вказувати на інтенсифікацію використання цих речовин у реакціях енергетичного обміну в організмі тварин. Ймовірно, що істотне збільшення вмісту

вільних жирних кислот у щурів групи II може бути пов'язане з посиленням їх виходу з відповідних депо, що не супроводжувалося належною утилізацією в тканинах організму. Такі розлади можуть бути наслідком хронічного психосоціального стресу, оскільки його характерна риса – ліпідна дисрегуляція (Gautam et al., 2015). Виявлені особливості ліпідного обміну та жовчоутворення за соціального стресу, як і викликане корвітином збільшення концентрації вільних жирних кислот і тригліцеридів у жовчі щурів групи III, потребують ретельного подальшого вивчення. Дослідження жовчі тварин в умовах експериментального соціального стресу дозволить не тільки розширити існуючі уявлення про порушення ліпідного обміну в стресових ситуаціях, а й відкрити нові аспекти участі гепатобіліарної системи у патогенезі стрес-індукованих захворювань. Хронічний соціальний стрес викликає певні зміни співвідношення ліпідів у жовчі, що слід враховувати для корекції стрес-індукованих патологій. Зважаючи на отримані нами результати, необхідно проводити подальші дослідження для пошуку ефективних гепатотропних препаратів для надання комплексної допомоги в умовах хронічного соціального стресу.

Таблиця 3

Холато-холестероловий коефіцієнт, коефіцієнт етерифікації та співвідношення фосфоліпідів і холестеролу жовчі щурів самців за хронічного соціального стресу та застосування корвітину (1 мг/кг, Me [Q_{25}; Q_{75}], мг%, n = 21)

Проби жовчі	Серія	Холато-холестероловий коефіцієнт	Коефіцієнт етерифікації	Співвідношення фосфоліпідів до холестеролу
1	контроль	15,06 [14,36; 15,78]	11,03 [9,10; 13,13]	2,16 [2,02; 2,56]
	група I	19,05 [16,75; 19,47]	6,58 [6,35; 7,01]**	2,87 [2,76; 3,05]**
	група II	17,57 [15,38; 18,54]	8,21 [7,64; 9,95]	2,62 [2,55; 2,87]*
	група III	19,98 [18,51; 20,35]*	6,45 [5,69; 7,07]*	2,73 [2,71; 2,78]**
2	контроль	14,49 [14,18; 15,62]	11,60 [9,96; 14,05]	2,18 [2,04; 2,50]
	група I	18,12 [17,13; 19,05]*	7,24 [6,58; 7,90]*	2,97 [2,83; 3,23]**
	група II	14,90 [13,78; 16,79]	7,98 [7,39; 9,91]*	2,59 [2,53; 2,70]*
	група III	19,16 [18,03; 19,73]*	6,19 [5,62; 6,75]**	2,72 [2,69; 2,77]**
3	контроль	14,96 [14,00; 16,94]	11,34 [9,69; 12,89]	2,24 [2,06; 2,57]
	група I	15,78 [14,73; 18,52]	7,24 [7,06; 7,62]**	2,88 [2,66; 3,08]*
	група II	13,34 [13,01; 13,49]*	7,51 [7,21; 8,72]**	2,61 [2,45; 2,67]
	група III	18,98 [18,49; 19,22]*	5,49 [5,24; 6,88]**	2,68 [2,67; 2,79]*
4	контроль	15,21 [13,82; 17,55]	11,24 [9,64; 13,65]	2,21 [2,14; 2,79]
	група I	15,05 [11,82; 13,01]*	6,35 [6,15; 6,61]***	3,01 [2,86; 3,13]**
	група II	12,05 [13,50; 16,60]	7,61 [7,09; 8,71]*	2,61 [2,58; 2,72]
	група III	17,65 [15,62; 18,56]	6,58 [4,94; 6,60]**	2,77 [2,68; 2,77]
5	контроль	14,97 [13,74; 18,27]	10,70 [7,94; 12,22]	2,25 [2,17; 2,79]
	група I	15,61 [13,79; 17,46]	5,97 [5,73; 6,70]**	3,09 [3,05; 3,05]*
	група II	11,91 [11,18; 12,66]*	7,42 [7,00; 9,32]*	2,72 [2,59; 2,87]
	група III	16,81 [15,80; 17,20]	5,82 [5,24; 6,88]**	2,72 [2,16; 2,64]
6	контроль	14,53 [13,24; 17,02]	9,41 [8,24; 12,96]	2,24 [2,15; 2,64]
	група I	15,25 [14,26; 16,40]	6,52 [5,54; 7,09]**	2,90 [2,64; 3,07]*
	група II	10,44 [9,67; 10,90]*	7,55 [6,81; 9,09]	2,58 [2,56; 2,69]
	група III	14,98 [14,84; 15,35]	5,19 [4,82; 6,22]**	2,76 [2,69; 2,77]

Примітки: див. табл. 1.

Висновок

У самців щурів, які зазнали експериментального хронічного соціального стресу, порушувалися процеси обміну холестеролу в печінці, що викликало зниження концентрації вільного холестеролу в жовчі та посилення його етерифікації в клітинах печінки, як одразу після завершення стресування, так і через місяць після нього. Крім того, одразу після стресування самців щурів у їх жовчі зменшувався вміст фосфоліпідів. Застосування корвітину одночасно з моделюванням соціального стресу викликало зменшення вмісту вільного холестеролу та збільшення кількості його етерів у жовчі самців щурів із підтриманням концентрації фосфоліпідів на контрольному рівні. Посилене використання жирних кислот у метаболічних реакціях в організмі стресованих тварин викликало зниження їх концентрації у жовчі одразу після моделювання хронічного соціального стресу. Але через місяць по тому як тварини зазнали експериментального хронічного стресу концентрація вільних жирних кислот у печінковому секреті зростала. У жовчі щурів, які зазнавали соціальної поразки та отримували корвітин, концентрація вільних жирних кислот і тригліцеридів збільшувалася. Виявлені зміни концентрації ліпідів у жовчі вказують на суттєві зміни їх розподілу в організмі самців щурів за умов експериментального хронічного соціального стресу та застосування у процесі стресування корвітину. Значна тривалість і специфічна динаміка в часі змін ліпідного складу жовчі за хронічного соціального стресу потребують подальшого вивчення для з'ясування їх патогенетичної ролі та пошуку ефективних засобів корекції.

References

Boyer, J. L. (2013). Bile formation and secretion. Comprehensive Physiology, 3(3), 1035–1078.

Chuang, J. C., Cui, H., Mason, B. L., Mahgoub, M. L., Bookout, A. L., Yu, H. G., Perello, M., Elmquist, J. K., Repa, J. J., Zigman, J. M., & Lutter, M. (2010). Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. Journal of Lipid Research, 51(6), 1344–1353.

Dlyaboha, Y. Z. (2012). Korektsiya zhyrnokyslotnoho skladu eteryfikovanoho kholesterolu v orhanizmi ta rist shchuriv za eksperymental'noyi hiperkholesterynemiyi [Correction of fatty acid composition of esterified cholesterol in the body and growth of rats in experimental hypercholesterolemia]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 3(1), 29–37 (in Ukranian).

Eckstein, J., Berndt, N., & Holzhütter, H.-G. (2015). Computer simulations suggest a key role of membranous nanodomains in biliary lipid secretion. PLOS Computational Biology, 11(2), e1004033.

Faylon, M. P., Baumgard, L. H., Rhoads, R. P., & Spurlock, D. M. (2015). Effects of acute heat stress on lipid metabolism of bovine primary adipocytes. Journal of Dairy Science, 98(12), 8732–8740.

Filimonova, N. B., & Fil', I. O. (2005). Statystychnyy analiz danykh vidpovidno do zasad naukovo obgruntovanoyi medytsyny. Porivnyannya hrup za kil'kisnymy pokaznykamy [Statistical analysis of data according to the principles of science-based medicine. Comparison of groups in quantitative terms]. Medytsyna Zaliznychnoho Transportu Ukrayiny, 4, 86–93 (in Ukranian).

Filimonova, N. B., Fil', I. O., & Mykhaylova, T. S. (2004). Statystychnyy analiz danykh vidpovidno do zasad naukovo obgruntovanoyi medytsyny. Pervynnyy analiz kil'kisnykh danykh, podannya rezul'tativ eksperymentu [Statistical analysis of data according to the principles of science-based medicine. Initial analysis of quantitative data, presentation of experimental results]. Medytsyna Zaliznychnoho Transportu Ukrayiny, 4, 30–38 (in Ukranian).

Ganitkevich, J. V., & Karbach, J. I. (1985). Issledovanie zhelchi. Biohimicheskie i biofizicheskie metody [Investigation of bile. Biochemical and biophysical methods]. Higher School, Kyiv (in Russian).

Gautam, A., D'Arpa, P., Donohue, D. E., Muhie, S., Chakraborty, N., Luke, B. T., Grapov, D., Carroll, E. E., Meyerhoff, J. L., Hammamieh, R., & Jett, M. (2015). Acute and chronic plasma metabolomic and liver transcriptomic stress effects in a mouse model with features of post-traumatic stress disorder. Public Library of Science, 10(1), e0117092.

Han, J., & Kaufman, R. J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. Journal of Lipid Research, 57(8), 1329–1338.

Horid'ko, T. M., Kosiakova, H. V., Berdyshev, A. G., Meged, O. F., Gudz, E. A., Onopchenko, O. V., Asmolkova, V. S., Lozova, V. M., Tukalenko, E. V., Bondarenko, O. V., Tubalzeva, I. I., Kovalenko, O. A., Makarchuk, M. Y., & Hula, N. M. (2017). Antistress effects of N-stearoylethanolamine in rats with chronic social stress. Ukrainian Biochemical Journal, 89(4), 68–76.

Hşmioğullari, A. A., Bozdayi, A. M., & Rahman, K. (2007). Biliary lipid secretion. Turkish Journal of Gastroenterology, 18(2), 65–70.

Kudryavtseva, N. N. (1991). A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice. Aggressive Behavior, 17(5), 285–291.

Liashevych, A. M., Reshetnik, Y. M., Syechyna, I. M., Vesel's'kyy, S. P., & Harnyk, K. V. (2016). Vplyv korvitynu na biotransformatsiyu zhovchnykh kyslot u pechintsi shchuriv z eksperymental'noyu hiperkholesterynemiyeyu [Effect of corvitin on biotransformation of bile acids in the liver of rats with experimental hypercholesterolemia]. Phytotherapy, 4, 12–16 (in Ukranian).

Linton, K. J. (2015). Lipid flopping in the liver. Biochemical Society Transactions, 43(5), 1003–1010.

Liu, Y. Z., Chen, J.-K., Zhang, Y., Wang, X., Qu, S., & Jiang, C.-L. (2014). Chronic stress induces steatohepatitis while decreases visceral fat mass in mice. BioMed Central Gastroenterology, 14, 106.

Nicolaou, M., Andress, E. J., Zolnerciks, J. K., Dixon, P. H., Williamson, C., & Linton, K. J. (2012). Canalicular ABC transporters and liver disease. Journal of Pathology, 226(2), 300–315.

Scott, K. A., Melhorn, S. J., & Sakai, R. R. (2012). Effects of chronic social stress on obesity. Current Obesity Reports, 1(1), 16–25.

Tyazhka, O. V., Smishchuk, V. V., & Bryuzhina, T. S. (2015). Znachennya biokhimichnoho doslidzhennya zhovchi yak indykatora porushen' metabolizmu zhyrnykh kyslot, fosfolipidiv ta kholesterynu v ditey z kholelitiazom [The value of biochemical research bile as an indicator of metabolic disorders of fatty acids, phospholipids and cholesterol in children with cholelithiasis]. Perynatolohiya i Pediatriya, 61, 63–67 (in Ukranian).

Vesel's'kyy, S. P., Lyashchenko, P. S., Kostenko, S. I., Horenko, Z. A., & Kurovs'ka, L. F. (2001). Sposib pidhotovky prob bioridyn dlya vyznachennya vmistu rechovyn lipidnoyi pryrody [Method of preparation of samples of bioridines to determine the content of substances of lipid nature]. Pat. 99031324 (in Ukranian).

Vovkun, T. V., Yanchuk, P. I., Shtanova, L. Y., Vesel's'kyy, S. P., & Shalamay, A. S. (2016). Zovnishn'osekretorna funktsiya pechinky shchuriv pry diyi korvitynu [Exocrine function of the liver in rats with exposure to corvitin]. Fiziologichnyi Zhurnal, 62(3), 30–38 (in Ukranian).

Wang, D. Q., Cohen, D. E., & Carey, M. C. (2009). Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. Journal of Lipid Research, 50, S406–411.

Wirtz, P. H., Ehlert, U., Bärtschi, C., Redwine, L. S., & Känel, R. (2009). Changes in plasma lipids with psychosocial stress are related to hypertension status and the norepinephrine stress response. Metabolism: Clinical and Experimental, 58(1), 30–37.

Zahayko, A. L., Voronina, L. M., Kaliman, P. A., & Strel'chenko, K. V. (2008). Vplyv khronichnoho sotsial'noho stresu na metabolizm lipidiv u zolotystykh syriys'kykh khom'yachkiv [Influence of chronic social stress on lipid metabolism in golden hamsters Syria]. Ukrainian Biochemical Journal, 80(4), 120–128 (in Ukranian).

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 363–368
doi: 10.15421/021756

Morphological and biochemical mechanisms of changes in buccal epithelocytes and erythrocytes in children suffering psycho-emotional stress

R. Z. Gan*, S. L. Popel'**

**Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine*
***Precarpathian National University named after V. Stefanik, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

Article info

Received 04.07.2017
Received in revised form 29.07.2017
Accepted 04.08.2017

Ivano-Frankivsk National Medical University, Galitcka Str., 2, Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine.

Precarpathian National University named after V. Stefanik, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine. Tel.: +38-097-87-41-446. E-mail: popelsergij@gmailcom

Gan, R. Z., & Popel', S. L. (2017). Morphological and biochemical mechanisms of changes in buccal epithelocytes and erythrocytes in children suffering psycho-emotional stress. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 363–368. doi: 10.15421/021756

The article provides experimental data on the impact of psychoemotional stress on cytological, morphometric, immunological and biochemical indicators in 7–11 year old children. We examined 100 children of primary school age, who were divided into the main group (50 children who had been resettled from the war zone in Eastern Ukraine) and the control group (50 children, who live in Ivano-Frankivs'k). We used morphological (light-optical and electromicroscopic) and morphometric analysis of buccal epithelium and peripheral blood erythrocytes, biochemical methods for identifying the products of peroxidation of lipids, ceruloplasmin and ferritin according to widely used methods. Morphological methods revealed that under psychoemotional stress, the size of the nuclei and buccal epithelial cells significantly decreases, and their nucleo-cytoplasmic ratio changes towards increase in the share of cytoplasm, and the indicators of coefficient of buccal epithelial cell shape indicate significant deformation of those cells. Similar changes were observed in the erythrocytes of peripheral blood. In the blood, we observed an increase in the CD_{95}^{+} concentration of lymphocytes. Clearly manifested changes in morphological and morphometric indicators of buccal epithelium and erythrocytes when there is an increase in the CD_{95}^{+} level of lymphocytes indicate the development of a systematic apoptosis reaction of the studied cells in the condition of psychoemotional stress. Also we observed clearly manifested changes in the coefficient of erythrocytes' shape, their size and perimeter, increase in the number of reversibly and irreversibly changed cells, which with increase in free radical oxidation, indicates disorders in the organism's antioxidant protection system in general and requires a pathogenically grounded programme of treating complications related to psychoemotional stress among 7–11 year old children who were resettled fom the combat zone in Eastern Ukraine.

Keywords: lipid peroxidation; antioxidant protection; buccal epitheliocytes; erythrocytes; apoptosis

Морфологічні та біохімічні механізми змін букальних епітеліоцитів та еритроцитів у дітей за психоемоційного стресу

Р. З. Ган*, С. Л. Попель**

**Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна*
***Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна*

Наведено експериментальні дані про вплив психоемоційного стресу на цитологічні, морфометричні, імунологічні та біохімічні показники у дітей 7–11 років. Обстежено 100 дітей молодшого шкільного віку, яких поділили на основну групу (50 дітей, переселених із зони бойових дій) і контрольну групу (50 дітей, які постійно проживають у м. Івано-Франківськ). Виконано морфологічні (світлооптичне та електронномікроскопічне) та морфометричне дослідження букального епітелію та еритроцитів периферійної крові, біохімічне виявлення продуктів перекисного окиснення ліпідів, церулоплазміну та феритину за загальноприйнятими методами. Морфологічними методами дослідження встановлено, що за психоемоційного стресу площа ядер і цитоплазми букальних епітеліоцитів значно зменшується, а їх ядерно-цитоплазматичне співвідношення змінюється на користь частки цитоплазми, при цьому показники коефіцієнта форми букальних епітеліоцитів вказують на значну деформованість цих клітин. Подібні зміни відбуваються в еритроцитах периферійної крові. У крові спостерігається збільшення концентрації CD_{95}^{+} лімфоцитів. Виражені зміни морфологічних і морфометричних показників букального епітелію та еритроцитів за збільшення рівня CD_{95}^{+} лімфоцитів вказують на розвиток системної реакції апоптозу вивчених клітин за психоемоційного стресу. При цьому спостерігаються виражені зміни коефіцієнта форми еритроцитів, їх площі та периметра, підвищується кількість зворотно- та незворотно змінених клітин, що на тлі посилення вільнорадикального окиснення свідчить про порушення антиоксидантної системи захисту організму в цілому та потребує патогенетично обгрунтованої програми лікування ускладнень, пов'язаних із психоемоційним стресом у дітей 7–11 років, які були вимушено переселені із зони ведення бойових дій на Сході України.

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів; антиоксидантний захист; букальні епітеліоцити; еритроцити; апоптоз

Вступ

За психоемоційного стресу в різних тканинах виявляються глибокі біохімічні порушення та зменшення кількості дезінтоксикантів, що зумовлює активацію процесів цитолізу (Gloire et al., 2008; Ahmad et al., 2011). Внутрішньотканинна гіпоксія супроводжує психоемоційні реакції різної етіології та часто проявляється на слизових оболонках. Особливо чутливі до гіпоксії поверхневі епітеліоцити. Аналізуючи стан епітеліоцитів, дослідники цитологічного матеріалу часто обмежують їх вивчення за рахунок оцінювання некрозозапальної активності за системою Metavir і встановлення індексу гістологічної активності запального процесу за Knodell (Godin et al., 2009). Зовсім незначна кількість праць стосується отримання даних, які базуються на доказових морфометричних методах, що дозволяє дати об'єктивну оцінку стану букальних епітеліоцитів у різноманітній патологічній і, що важливіше, на нашу думку, передпатологічній ситуації. Зокрема, останніми роками окремі автори провели подібні спроби під час визначення площі ядер епітеліоцитів і подали об'єктивну оцінку цього показника за різних станів організму (Moscicka-Studzinska et al., 2009; Nikolovski et al., 2017).

На думку Sundaramoorthy et al. (2016) і Zotti et al. (2016), наявність різних передпатологічних і патологічних процесів, у тому числі цитолітичних, безпосередньо відображається на структурі мембрани еритроцитів. За психоемоційного стресу відбувається каскад функціональних змін, які відображаються на різному рівні організації живої матерії. Водночас за таких умов багато авторів виявили активацію процесів перекисного окиснення ліпідів і зниження функцій системи антиоксидантного захисту (Swanepoel et al., 2011; Das et al., 2012). Окремі автори вказують на перебільшення удвічі – утричі вмісту малонового діальдегіду за такого стану. У свою чергу, Gloire et al. (2008) і Choi (2016) вказують, що гіпоксія – один з основних факторів запуску процесів апоптозу. Однак ці дані потребують уточнення, що визначило актуальність нашого дослідження.

Мета цього дослідження – охарактеризувати морфологічні та морфометричні зміни букальних епітеліоцитів та еритроцитів на тлі визначення рівня CD_{95}^{+} лімфоцитів і процесів перекисного окиснення ліпідів за психоемоційного стресу в дітей 7–11 років.

Матеріал і методи досліджень

Обстежено 50 дітей віком 7–11 років, переселених на Прикарпаття із зони бойових дій на Сході України. В усіх дітей під час клініко-психологічного обстеження спостерігали ознаки психоемоційного стресу. Ці діти віднесені до основної групи обстеження. Контрольну групу складають 50 практично здорових дітей цього віку, які проживають постійно в м. Івано-Франківськ і яким проводили обстеження в межах профілактичного огляду в організованих дитячих колективах.

Цитологічний аналіз букальних епітеліоцитів у кількості 500 одноядерних клітин проводили на мікроскопі Leica CME за допомогою аналізатора зображень (відеокамера Sony ExwaveHad SSC-DC58AP). Морфометричне дослідження проводили з використанням бази програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool® (Mishra et al., 2017). Для цього готували цитологічні препарати-відбитки щічної поверхні слизової оболонки порожнини рота та забарвлювали їх за Романовським – Гімза за рекомендаціями Tredoux et al. (2015) і Klegarth (2017). Визначали такі морфометричні показники епітеліоцитів як площа профілю цілої клітини та її ядра, співвідношення між площею профілю епітеліоцита та профілем її ядра, коефіцієнт форми епітеліоцита та його ядра (Moscicka-Studzinska et al., 2009).

Морфофункціональний стан не менше ніж 300 еритроцитів у дітей оцінювали на мазках, забарвлених за Романовським – Гімза. Аналіз проводили за такими морфометричними показниками: площа, периметр профілю, коефіцієнт форми.

Різні види деформації еритроцитів виявляли за допомогою сканувального електронного мікроскопа JEOL-25M-T220A (Японія). Препарати крові для сканувальної електронної мікроскопії готували загальноприйнятим методом.

Стан процесів перекисного окиснення ліпідів оцінювали за кількістю малонового діальдегіду, активність каталази, трансферин і церулоплазмін визначали з урахуванням рекомендацій Godin (2009).

У дітей у тесті імунофлуоресценції визначали фенотип лімфоцитів периферійної крові за ідентифікацією диференційованих антигенів із застосуванням моноклональних антитіл, які належать до кластера диференціації CD_{95}^{+} (Fas/CD_{95}) – апоптозу лімфоцитів (Debatin et al., 2009; Choi, 2016).

Для оцінювання ступеня вірогідності результатів дослідження проводили варіаційний аналіз отриманих результатів. Усі кількісні показники наведені у вигляді M ± m, де M – середнє арифметичне, m – похибка середнього арифметичного. Вірогідність різниці визначали після перевірки на нормальність розподілу за t-критерієм Стьюдента. Кореляційний аналіз проводили за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона.

Результати

На цитологічних препаратах виявили деструктивні зміни епітеліоцитів (рис. 1). У багатьох епітеліоцитах виявлено процеси, які свідчать про гідропічну дистрофію. В окремих мікропрепаратах зустрічається незначна кількість епітеліоцитів, в ядрах яких виявляються глибки конденсованого хроматину з маргінальним розташуванням. При цьому повністю збережена цілісність ядерної оболонки. Цитоплазма в таких епітеліоцитах ущільнена. У деяких епітеліоцитах визначаються великі ацидофільні гранули.

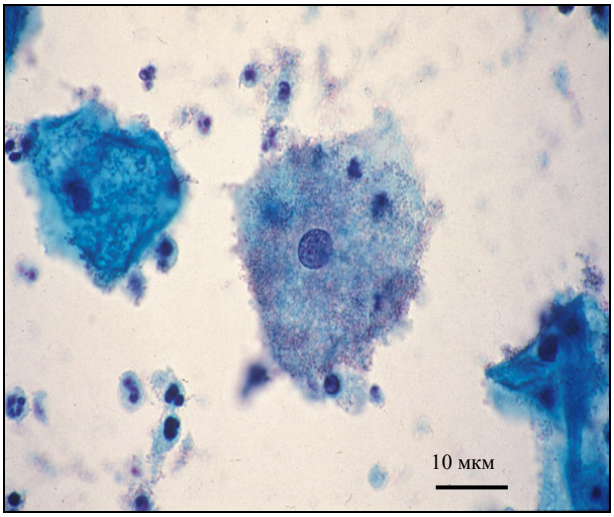


Рис. 1. Цитологічна картина букального епітелію у дітей основної групи з вираженими ознаками психоемоційного стресу

Під час морфометричного дослідження виявлено зменшення середньої площі профілю цитоплазми епітеліоцитів та їх ядер на 17,5% (відповідно з 1,49 ± 0,03 мкм^2 у контрольній групі дітей до 1,23 ± 0,01 мкм^2 в основній групі ($P < 0,05$). Це – причина збільшення співвідношення між площею цитоплазми букальних епітеліоцитів та їх ядер, що досягає в основній групі дітей 0,19 ± 0,003 ($P < 0,05$). Збільшення коефіцієнта форми епітеліоцитів та їх ядер відповідно до 1,25 ± 0,07 ($P < 0,05$) і 1,18 ± 0,06 ($P < 0,05$) свідчить про те, що їх контури стають менш округлими та більш нерівномірними. Наведені середні показники оцінюють стан букальних епітеліоцитів загалом. Розглядаючи зокрема представництво букальних епітеліоцитів із різним метричним розподілом їх площі, ми зауважили, що найбільша кількість із них (77,9%) має площу 80–160 мкм^2, тоді як у дітей контрольної групи вона становить 100–250 мкм^2

(85,6%) (рис. 2). Приблизно такі ж співвідношення встановлені під час визначення площі ядра (рис. 3). 85,4% ядер мають площу 15–30 мкм^2 (у дітей контрольної групи – 78,5% клітин мають ядра площею 20–50 мкм^2). Під час психоемоційного стресу гістограма розподілу співвідношення площі ядра до площі клітини дещо зміщується вправо. При цьому величина піків зменшується, але з'являється більше клітин із високими значеннями цього показника (рис. 4). Коливання досягають 0,05–0,30 (77,8%), тоді як у дітей контрольної групи вони становлять 0,10–0,30 (66,6%). Контури епітеліоцитів змінюються в напрямку збільшення кількості деформованих клітин, про що свідчить метричний перерозподіл клітин: різко зменшується кількість клітин із найнижчими значеннями коефіцієнта форми, на третину збільшується відсоток клітин величиною 1,20–1,39, учетверо – клітин зі значенням коефіцієнта форми 1,40–1,59 і з'являється популяція клітин із вищими значеннями коефіцієнта форми (рис. 5). При цьому певна кількість клітин деформована та має коефіцієнт форми 1,70–2,39 (7,4%). Таких клітин у дітей контрольної групи не виявлено, а під час психоемоційного стресу показник їх коефіцієнта форми перебільшує 1,80.

Форма ядра також виявляє значну деформацію (рис. 6), що характеризується збільшенням коефіцієнта форми з 1,30 до 1,59 (у дітей контрольної групи – не більше 1,29).

У дітей основної групи під час психоемоційного стресу площа еритроцитів зменшується до 40,1 ± 0,43 мкм^2 (у контрольній групі вона становить – 47,4 ± 0,26 мкм^2, $P < 0,05$). При цьому в основній групі дітей прослідковується морфометричний перерозподіл еритроцитів, оскільки переважають клітини загальною площею 35,2–55,3 мкм^2.

Периметр еритроцитів зменшується до 24,2 ± 0,16 мкм і 89,4% усіх еритроцитів мають периметр 21,8–25,2 мкм, тоді як у дітей контрольної групи цей показник становить 22,6–30,9 мкм.

Серед еритроцитів найбільші відхилення спостерігаються за показником коефіцієнта їх форми: у середньому він значно знижується до 1,04 ± 0,002 (у контрольній групі його значення становлять 1,10 ± 0,003, $P < 0,05$).

При цьому пік гістограми розподілу еритроцитів за показником форми у дітей під час психоемоційного стресу перебуває в межах 1,10–1,15 (58,1% усіх еритроцитів, тоді як у контрольній групі такі еритроцити виявляються тільки в 9,6%).

До того ж у 91,4% дітей контрольної групи достатньо багато еритроцитів мають цей показник у діапазоні 0,95–1,05 ($P < 0,05$), а під час психоемоційного стресу (89,3% дітей основної групи) – лише 0,91 ($P < 0,05$).

Водночас, під час визначення стану процесів ПОЛ та АОСЗ установлено, що у цих самих дітей за психоемоційного стресу вміст малонового діальдегіду підвищується до 6,36 ± 0,02 нмоль/л (у контрольній групі цей показник становить тільки 3,86 ± 0,02 нмоль/л), тобто за психоемоційного стресу його рівень збільшується в 1,64 раза ($P < 0,05$). При цьому концентрація каталази у дітей за психоемоційного стресу також підвищується до 75,4 ± 3,3 мг H_2O_2/л (у контрольній групі цей показник становить тільки 66,1 ± 2,5 мг H_2O_2/л, $P < 0,05$). У дітей основної групи під час психоемоційного стресу значно зменшується вміст церулоплазміну та трансферину (відповідно до 10,11 ± 0,17 і 0,19 ± 0,003 ммоль/л; у дітей контрольної групи ці показники становлять, відповідно, 28,95 ± 0,81 та 0,26 ± 0,002 ммоль/л, $P < 0,05$). На такому фоні біохімічних показників у дітей основної групи відбувається деформація еритроцитів і зменшення їх площі та периметра (рис. 7).

За психоемоційного стресу у дітей основної групи рівень CD_{95}^+ лімфоцитів різко збільшувався до 7,1 ± 0,33 ($P < 0,05$), тоді як у контрольній групі він становить лише 2,17 ± 0,23 (табл.).

Дані про співвідношення антиоксидантної системи до рівня CD_{95}^+ лімфоцитів у дітей основної групи (рис. 8) вказують на існування прямого кореляційного зв'язку між концентрацією малонового діальдегіду ($r = 0,78$) та каталази ($r = 0,75$) та середнього оберненого кореляційного зв'язку між цими показниками та вмістом церулоплазміну ($r = –0,45$) та трансферину ($r = –0,45$).

Обговорення

У процесі морфологічного дослідження виявлено порушення форми клітин букального епітелію та їх ядер, що характерно для першої стадії апоптозу (Nikolovski et al., 2017). Із даних літератури (Mishra et al., 2017) відомо, що зміна форми клітини та її ядра, а також наявність ацидофільних гранул свідчать про апоптоз, тому що за некрозу у клітинних мембранах (зокрема, ядра та клітинній оболонці) відбувається деструктивні зміни іншого характеру.

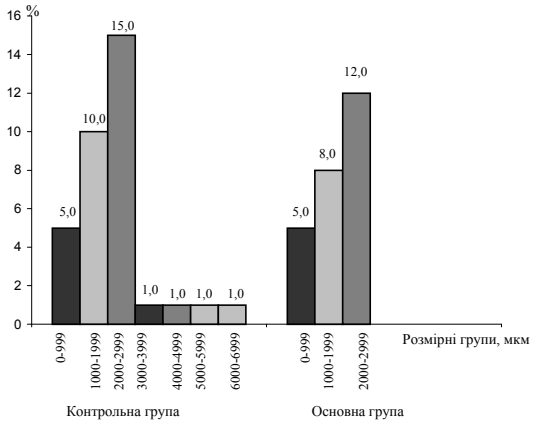


Рис. 2. Гістограма розподілу площі десквамованих букальних епітеліоцитів (мкм^2) у дітей контрольної (n = 50) та основної груп (n = 50)

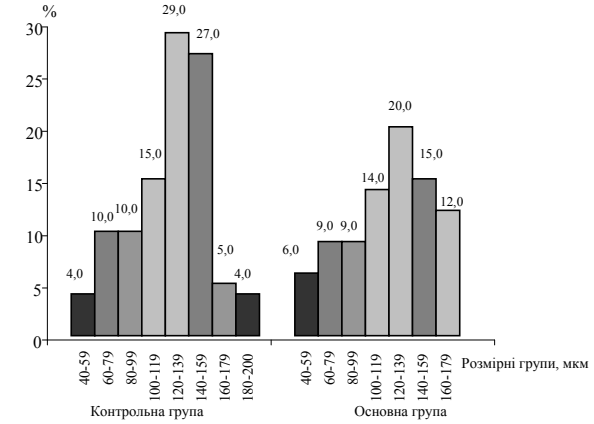


Рис. 3. Гістограма розподілу величини площі ядра десквамованих букальних епітеліоцитів (мкм^2) у дітей контрольної (n = 50) та основної груп (n = 50)

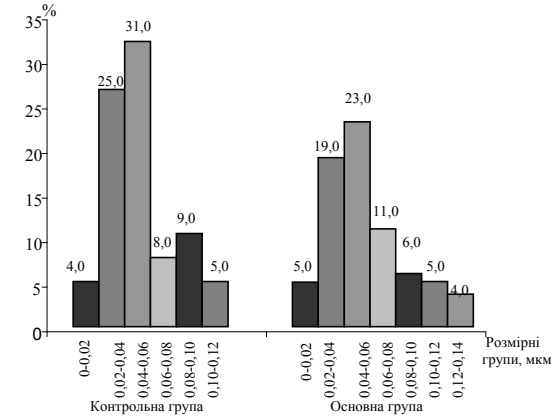


Рис. 4. Гістограма розподілу співвідношення площі ядра та цитоплазми десквамованих букальних епітеліоцитів (мкм^2) у дітей контрольної (n = 50) та основної груп (n = 50)

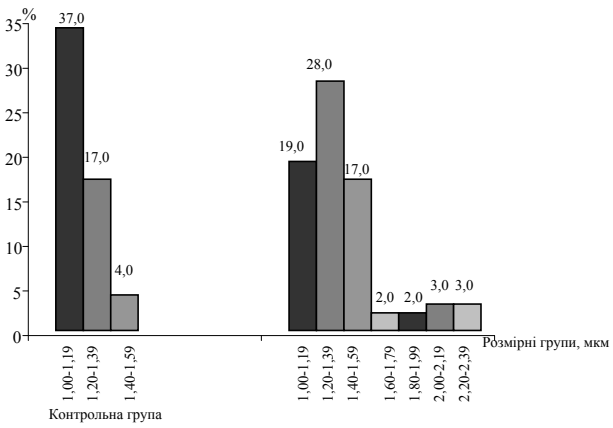


Рис. 5. Гістограма розподілу коефіцієнта форми десквамованих букальних епітеліоцитів (мкм^2) у дітей контрольної (n = 50) та основної групи (n = 50)

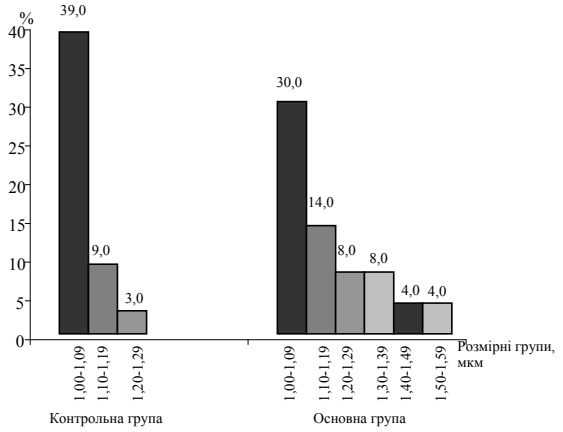
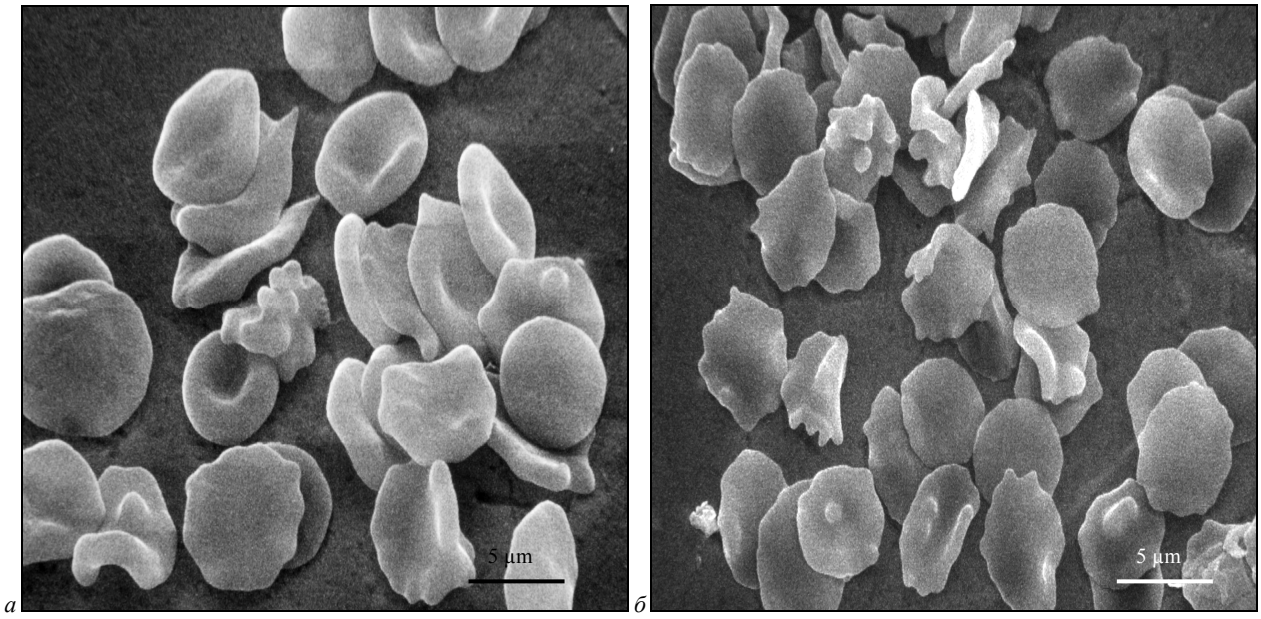


Рис. 6. Гістограма розподілу коефіцієнта форми ядра десквамованих букальних епітеліоцитів (мкм^2) у дітей контрольної (n = 50) та основної групи (n = 50)



а *б*

Рис. 7. Зміна форми (*а*) та розмірів (*б*) еритроцитів у дітей за психоемоційного стресу: сканувальна електронна мікроскопія

Таблиця

Вміст ферментів антиоксидантної системи, продуктів перекисного окиснення ліпідів та рівень CD_{95}^+ лімфоцитів в еритроцитах дітей контрольної та основної груп (M ± m, n = 50)

Група	Показники				
	малоновий діальдегід, нмоль/л	каталаза, мг H_2O_2/л	церулоплазмін, ммоль/л	трансферин, ммоль/л	CD_{95}^+ лімфоцитів, ум. од.
Контрольна група	3,86 ± 0,02	66,12 ± 2,48	28,95 ± 0,81	0,26 ± 0,002	2,17 ± 0,23
Основна група	6,36 ± 0,02*	75,44 ± 3,32*	10,11 ± 0,17*	0,19 ± 0,003*	7,10 ± 0,33*

Примітка: * – P < 0,05 відносно контрольної групи.

Так само, як й інші автори, ми вважаємо, що під час проведення морфометричного дослідження епітеліоцитів нівелюється вплив суб'єктивних факторів на оцінювання морфологічних змін (Tredoux et al., 2015; Zotti et al., 2016).

Динаміка морфометричних змін площі букальних епітеліоцитів та їх ядер у наших дослідженнях збігається з результатами інших авторів (Moscicka-Studzinska et al., 2009), які визначали морфологічну характеристику організму тварин за психоемоційного стресу за даними змінами в епітеліальних клітинах інших органів.

Виявлені нами зміни основних двох показників (малонового діальдегіду та каталази) свідчать про посилення процесів перекисного окиснення ліпідів з утворенням підвищеної кількості вільних радикалів. На фоні змін церулоплазміну та трансферази ці зрушення вказують на погіршення стану АОСЗ у дітей за психоемоційного стресу.

На думку Ahmad et al. (2011) і Ellis et al. (2012), збільшення вмісту феритину та заліза на фоні зменшення кількості трансферину у крові відповідає за активність деструктивного процесу за психоемоційного стресу у клітинах усього організму. Це, за даними інших авторів (Bergamini et al., 2004; Karle, 2009; Bianchini et al., 2013), стає можливим за умов здатності цих компонентів до індукції процесів перекисного окиснення ліпідів і ослаблення антиоксидантної системи захисту організму. У сукупності ці фактори створюють на клітинні мембрани системний вплив, що спричиняє втрату їх стійкості до дії вільних радикалів і унеможливлює опір іншим компонентам окисного стресу за таких умов.

Зважаючи, що еритроцити у сканувальному електронному мікроскопі мають вигляд дискоцита з невеликими відхиленнями від округлої форми, що відображено у показнику коефіцієнта їх форми, результати, які ми отримали, свідчать про значні зміни форми еритроцитів за психоемоційного стресу. На думку багатьох авторів (Godin et al., 2009; Reinhart et al., 2009; Ellis et al., 2012), це пов'язано саме з підвищенням процесів перекисного окиснення ліпідів на фоні зниження системи антиоксидантного захисту організму.

Тобто посилення вільнорадикальних реакцій та ослаблення антиоксидантного захисту та змін у букальних епітеліоцитах і еритроцитах периферичної крові пов'язані між собою. Раніше це було показано під час вивчення Морфофункціональних еритроцитів людини та тварин за моделювання різних патологічних станів (Sprague et al., 2010; Ahmad et al., 2011; Swanepoel et al., 2011; Das et al., 2012).

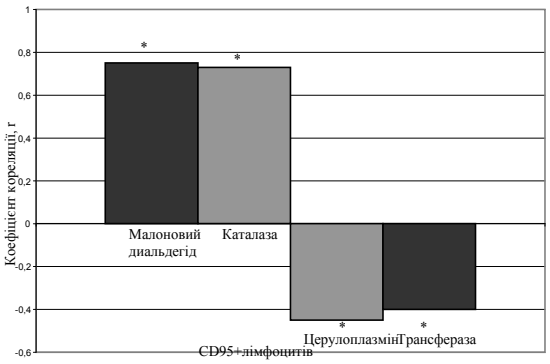


Рис. 8. Кореляційна залежність між показниками антиоксидантної системи та концентрацією продуктів перекисного окиснення ліпідів в основній групі дітей (n = 50) за психоемоційного стресу: * – вірогідність коефіцієнта кореляції P < 0,05

Останніми роками велика увага приділяється апоптозу клітин імунної системи під час психоемоційного стресу (Zhang et al., 2008; Zotti et al., 2016).

Нині апоптоз розглядається як результат дії внутрішньоклітинної генетичної програми незалежно від причини (нормальної або патологічної), що викликала її виникнення. Під час апоптозу ядро та цитоплазма піддаються пікнозу, а клітинна оболонка «герметизується» з експозицією на зовнішній поверхні ліпідного чинника, що викликає швидкий фагоцитоз макрофагами без розвитку запальної реакції. Ці дані підтверджуються нашими морфометричними знахідками як у букальних епітеліоцитах, так і в еритроцитах периферійної крові.

Ми також підтверджуємо, що апоптоз принципово відрізняється від некрозу, під час якого відбувається набухання та розрив клітин із неминучим розвитком запалення. За таких умов макрофаги не продукують прозапальні цитокіни під час фагоцитозу апоптотичних тілець, проте збільшують продукцію антизапальних цитокінів. Найважливіша ознака апоптозу – інтернуклеосомальний розпад ядерної ДНК, що дає можливість виявляти апоптичні клітини *in situ* за допомогою реакції TUNEL. У розвитку апоптозу ключове значення мають каспази, до субстратів яких відносять життєво важливі білки ядра. Тому виявлені нами морфологчні зміни в ядрі букальних епітеліоцитів можуть опосередковано служити доказом апоптичного сценарію за психоемоційного стресу.

Важливу роль у розвитку апоптозу виконує пошкодження мітохондрій із виходом із них у цитоплазму потужного активатора каспаз – цитохрому С. Це явище пов'язане зі зміною експресії генів родини Bcl-2, що перебувають під контролем гена p53, активність якого визначає вступ клітини на шлях апоптозу (Sagan et al., 2010). Завершення багатьох імунологічних процесів апоптозом зумовлене взаємодією рецептора Fas (CD95/APO-1) і його ліганда FasL, широко розповсюджених у клітинах імунної системи. Цей механізм самостійно або разом із перфорин-гранзимовим компонентом – головні шляхи цитотоксичного кілінгу, що здійснюється Т- і NK-клітинами. Елімінація цих клітин, що вже виконали свою функцію, також відбувається за допомогою FAS-опосередкованого апоптозу (Choi, 2016). Клональна делеція незрілих Т-клітин у вилочковій залозі відбувається без участі Fas/FasL системи. Апоптоз здійснюється під час таких імунологічних реакцій як делеція В-лімфоцитів у гермінтативних центрах за активації антигеном і захист імунопривілейованих органів. За адекватної регуляції апоптозу він підтримує клітинну рівновагу в імунній системі. Ослаблення або посилення темпів апоптозу індукує патологію імунної системи (Gloire et al., 2008).

Наші дані вказують на те, що за психоемоційного стресу у дітей основної групи різко збільшується рівень CD_{95}^{+} лімфоцитів, що свідчить про Fas-залежний апоптоз. Механізми, які зумовлюють гіперекспресію Fas і підвищення рівня апоптозу, пов'язані з розвитком внутрішньоклітинного оксидативного стресу та індукцією монооксигенування у клітинах (Shelton et al., 2013; Sundaramoorthy et al., 2016). За даними цих авторів, за цих умов у різних клітин організму розвиваються морфологічні та морфометричні зміни, подібні до виявлених нами, перебудова структури букальних епітеліоцитів і еритроцитів у дітей основної групи під час психоемоційного стресу.

У зв'язку з викладеним вище ми обрали саме цей віковий контингент дітей, у яких ще досить добре працюють ці механізми у вилочковій залозі, а виявлений нами підвищений рівень CD_{95}^{+} лімфоцитів під час психоемоційного стресу вимагає подальшого дослідження.

Дані, отримані після проведеного кореляційного аналізу між показниками антиоксидантної системи, рівнем продуктів перекисного окиснення ліпідів і рівнем CD_{95}^{+} лімфоцитів, певною мірою узгоджуються з результатами досліджень, отриманими іншими авторами відносно того, що люди з вираженими наслідками психоемоційцної травми мають значно вищий рівень продуктів модифікованого окиснення білків та ліпідів, за вираженого пониження таких антиоксидантних ферментів як супероксиддисмутаза та каталаза, у разі зменшення вмісту відновленого глутатіону на фоні зниження активності глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази (Baskevich, 2017).

Висновки

За психоемоційного стресу виявляються морфологічні зміни букальних епітеліоцитів, які підтвержуються морфометричними показниками і свідчать про зменшення площі робочої поверхні клітин, індукцію апоптозу, що пов'язано з активацією процесів перекисного окиснення ліпідів та пригніченням функціональної здатності антиоксидантної системи захисту організму дітей 7–11 років. Морфометричні зміни еитроцитів периферичної крові, які проявляються зменшенням площі, периметра та різного виду деформаціями, відповідають морфологічним змінам букальних епітеліоцитів, що у поєднанні з різким збільшенням рівня CD_{95}^{+} лімфоцитів свідчить про системний характер змін в організмі дітей під час психоеміційного стресу.

Установлені зміни морфологічного та морфометричного стану букальних епітеліоцитів і еритроцитів свідчать, що в комплексних дослідженнях ці клітини можуть застосовуватись як модельні об'єкти під час установлення системних реакцій організму на вплив різних патологічних факторів.

Запропоновані підходи із застосуванням морфометричних методів у дослідженні букальних епітеліоцитів та еритроцитів із визначенням стану процесів перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи захисту – об'єктивне та суттєве доповнення для виявлення ознак психоемоційного стресу та призначення патогенетично обґрунтованої програми медичної реабілітації.

References

Ahmad, M. K., Amani, S., & Mahmood, R. (2011). Potassium bromate causes cell lysis and induces oxidative stress in humanerythrocytes. Environmental Toxicology, 29(2), 138–145.

Baskevich, O. V. (2017). Condition of erythrocyte membranes in people with mental and behavioural disorders caused by alcohol consumption. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 111–117.

Bergamini, C., Stefania Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. Current Pharmaceutical Design, 10(14), 1611–1626.

Bianchini, K., & Wright, P. A. (2013). Hypoxia delays hematopoaesis: Retention of embryonic hemoglobin and erythrocytes in larval rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during chronic hypoxia exposure. Journal of Experimental Biology, 216(23), 4415–4425.

Choi, J. W. (2016). Fas (CD95/APO-1) associations between soluble APO-1 (Fas/CD95) concentrations and hematopoaetic activity in healthy women. Acta Haematologica, 116(2), 137–140.

Das, D. K., Chakraborty, C. B., Mitra, A. K., Maiti, G. H., & Ray, A. K. (2012). Quantitative microscopy approach for shape-based erythrocytes characterization in anaemia. Journal of Microscopy, 249(2), 136–149.

Debatin, K.-M. (2009). Sensitivity and resistance – apoptosis in the APO-1 (Fas/CD95) system. Oncology Research and Treatment, 19(1), 3–5.

Ellis, C. G., Milkovich, S., & Goldman, D. (2012). What is the efficiency of ATP signaling from erythrocytes – regulate distribution of O_2 supply within the microvasculature? Microcirculation, 19(5), 440–450.

Gloire, G., Charlier, E., & Piette, J. (2008). Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. Biochemical Pharmacology, 76(11), 1451–1458.

Godin, D. V., Gray, G. R., & Frohlich, J. (2009). Study of erythrocytes in a hereditary hemolytic syndrome (HHS): Comparison with erythrocytes in lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. Scandinavian Journal of Haematology, 24(2), 122–130.

Karle, H. (2009). Destruction of erythrocytes during experimental fever. Acta Medica Scandinavica, 186, 349–359.

Klegarth, A. R. (2017). Buccal swabs. The International Encyclopedia of Primatology, 1–1.

Mishra, R., Dhar, S. S., Mishra, H., & Asthana, A. K. (2017). Carcinoma buccal mucosa with multiple cutaneous metastases. Annals of International Medical and Dental Research, 3(2), 1–9.

Mortensen, E. (2009). Studies on the osmotic fragility of normal human erythrocytes. Acta Medica Scandinavica, 174(3), 289–297.

Mortensen, E. (2009). Studies on the osmotic fragility of normal human erythrocytes. Acta Medica Scandinavica, 173(6), 693–697.

Moscicka-Studzinska, A., Kijeńska, E., & Ciach, T. (2009). Electroosmotic flow as a result of buccal iontophoresis – Buccal mucosa properties. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 72(3), 595–599.

Nikolovski, D., Dugalic, S., & Pantic, I. (2017). Iron oxide nanoparticles decrease nuclear fractal dimension of buccal epithelial cells in a time-dependent manner. Journal of Microscopy, 1(1), 1–8.

Reinhart, W. H., Zehnder, L., & Schulzki, T. (2009). Stored erythrocytes have less capacity than normal erythrocytes – support primary haemostasis. Thrombosis and Haemostasis, 101(4), 720–723.

Sagan, D., Jermnim, N., & Tangvarasittichai, O. (2010). CD_{95} is not functional in human erythrocytes. International Journal of Laboratory Hematology, 32(6), 244–247.

Shelton, R. L., Mattison, S. P., & Applegate, B. E. (2013). Volumetric imaging of erythrocytes using label-free multiphoton photoacoustic microscopy. Journal of Biophotonics, 7(10), 834–840.

Sprague, R. S., Bowles, E. A., Achilleus, D. M., & Ellsworth, L. (2010). Erythrocytes as controllers of perfusion distribution in the microvasculature of skeletal muscle. Acta Physiologica, 202(3), 285–292.

Sundaramoorthy, R., Velusamy, Y., Balaji, A. P. B., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2016). Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometricform on human erythrocytes and lymphocytes *in vitro*. Chemico-Biological Interactions, 257, 119–124.

Swanepoel, A. C., & Pretorius, E. (2011). Scanning electron microscopy analysis of erythrocytes in thromboembolic ischemic stroke. International Journal of Laboratory Hematology, 34(2), 185–191.

Tredoux, S., Mfolozi, S., & Shires, K. (2015). Efficiency of buccal DNA sampling device in the mortuary. Journal of Forensic Investigation, 3(2), 6.

Zhang, S., Witasp, E., Lauwen, M., & Fadeel, B. (2008). Brief cross-linking of Fas/APO-1 (CD_{95}) triggers engulfment of pre-apoptotic target cells. FEBS Letters, 582, 3501–3508.

Zotti, F. D., Lobysheva, I., & Balligand, J.-L. (2016). Nitric oxide and hemoglobin form a paramagnetic compound quantifiable by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy in venous erythrocytes that reflects vascular NO bioavailability *in vivo*. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 8(3), 217.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 369–376
doi: 10.15421/021757

The influence of a selenium-chromium-lipid complex obtained from *Chlorella vulgaris* on the energy metabolism in rats with experimental diabetes

O. Y. Lukashiv, V. V. Grubinko

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 12.06.2017
Received in revised form 28.07.2017
Accepted 29.07.2017

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, M. Kryvonos Str., 2, Ternopil, 46027, Ukraine. Tel.: +38-097-225-34-66. E-mail: lukashiv5@gmail.com

Lukashiv, O. Y., & Grubinko, V. V. (2017). The influence of a selenium-chromium-lipid complex obtained from Chlorella vulgaris on the energy metabolism in rats with experimental diabetes. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 369–376. doi: 10.15421/021757

One of the leading roles in treating diabetes mellitus belongs to chrome ions therapy (III), especially in the complex with selenium (IV). Currently selenium is obtained from unicellular algae, which contain biologically active substances and which are capable of accumulating exogenous microelements. By incubating unicellular algae *Chlorella vulgaris* Biej. in the conditions of aquaculture with sodium selenite (IV) and chromium (III) chloride, we obtained a biologically active lipid substance which contains selenium and chromium. The substance was tested for the impact on energy metabolism of animals exposed to experimentally induced diabetes mellitus. The diabetes was caused by modeling obesity of the animals with further injection of streptozotocin in the amount of 65 mg/kg and nicotinamide at the dose of 230 mg/kg. The rats were intragastrically injected with 1 ml of 1% starch solution which contained a selenium-chrome-lipid complex extracted from the *Chlorella* containing 0.6 µg of selenium, 1.05 µg of chrome and 0.5 mg of lipids for prophylactic, therapeutic and prophylactic-therapeutic purposes; the other group of rats for therapeutic purposes was injected with starch solution with the same composition of microelements in inorganic form – sodium selenite (IV) and chromium chloride (III). This paper presents the results of our study of the impact of organic and inorganic compounds of chrome and selenium on the energetic metabolism of rats exposed to experimental diabetes mellitus. The analysis determined that in the rats' organism, the selenium-chrome-lipid complex from the *Chlorella* improved the indicators of the energetic metabolism – in the group of rats which received it for therapeutic purposes, we observed an up to 7.5 fold increase in the activity of succinate dehydrogenase compared to the rats which did not receive therapeutic treatment. The increase in the activity of succinate dehydrogenase corresponded to the increase in the activity of cytochrome *c* oxidase to 17.2% – in the group of rats injected with the substance for therapeutic purposes. Also, the selenium-chrome-lipid complex activated NADPH-glutamatedehydrogenase in groups of rats which received it for prophylactic and therapeutic-prophylactic purposes. A decrease in NADPH-GDH was observed in all groups of rats which were injected with the *Chlorella* complex, and its activation was observed only in the group of rats injected with inorganic forms of selenium and chrome. In rats injected with the *Chlorella* complex, we observed change in the ratio of NAD and NADPH-GDH towards increase. This indicates the intensification of the energy metabolism in the animals' liver by using aminoacids as energetic substances. In the conditions of injecting inorganic forms of selenium and chrome, the ratio of NAD/NADPH decreased. Therefore, the results allow us to consider the algal complex obtained from *Chlorella* to be effective for regulating the energetic metabolism of subjects suffering from diabetis mellitus compared to the use of inorganic forms of chrome and selenium.

Keywords: microalgae; metabolism; micronutrients; streptozotocin; nicotinamide

Вплив селенхромліпідної субстанції із *Chlorella vulgaris* на енергетичний метаболізм у щурів за експериментального цукрового діабету

О. Я. Лукашів, В. В. Грубінко

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна

Унаслідок інкубації одноклітинної водорості *Chlorella vulgaris* Biej. в умовах аквакультури з натрій селенітом і хром (III) хлоридом отримано та виділено стабільну селенхромліпідну субстанцію, вивчено її вплив на щурів з експериментальним цукровим діабетом II типу на тлі ожиріння. Діабет викликали в два етапи: спочатку моделювали аліментарне ожиріння за допомогою висококалорійної дієти та натрію глутамату упродовж чотирьох тижнів, наступним етапом відтворено модель цукрового діабету шляхом внутрішньоочеревинного уведення стрептозотоцину (65 мг/кг) із попереднім уведенням нікотинаміду (230 мг/кг). Щурам з експериментальним діабетом уводили

внутрішньошлунково очищену селенхромліпідну субстанцію із хлорели, що містила 0,6 мкг селену, 1,05 мкг хрому та 0,5 мг ліпідів, у складі 1% водно-крохмальної суспензії в кількості 1 мл із профілактичною, лікувальною та лікувально-профілактичною метою. Іншій групі щурів із лікувальною метою вводили внутрішньошлунково неорганічні форми хрому (III) та селену (IV) у вигляді хром хлориду та натрій селеніту в ідентичній кількості. Наведено результати дослідження впливу органічних (селенхромліпідного комплексу) та неорганічних сполук хрому та селену на енергетичний метаболізм щурів за експериментального цукрового діабету. Під час вживання селенхромліпідного комплексу із хлорели в організмі щурів більшою мірою поліпшувалися показники енергетичного обміну, зокрема активність цитохромоксидази, сукцинатдегідрогенази та глутаматдегідрогенази. Результати дозволяють вважати отриманий водоростевий комплекс із хлорели ефективнішим порівняно з неорганічними формами хрому та селену.

Ключові слова: мікроводорості; обмін речовин; мікроелементи; стрептозотоцин; нікотинамід

Вступ

Пропоноване дослідження – маловивчене в науковій літературі, а тому стаття претендує на оригінальність. Упродовж останніх років не опубліковано жодної ґрунтовної праці, що стосується цієї проблематики. Вітчизняні та зарубіжні вчені здебільшого аналізували вплив неорганічного хрому (Cr^{3+}) на обмінні процеси за цукрового діабету, а також вивчали перспективи використання мікроводорості *Chlorella vulgaris* Biej. у щурів з експериментальним діабетом.

Епідемічний характер поширення захворюваності на цукровий діабет II типу (ЦД 2), що супроводжується ожирінням, – важлива проблема медицини. Близько 80% хворих на ЦД 2 мають надмірну масу тіла (Aguirre et al., 2011), до того ж у людей із помірним ступенем ожиріння частота діабету зростає учетверо, а з різко вираженим – у 30 разів. Дослідження останніх років вказують на значне поширення ожиріння, яке виступає основним фактором ризику не тільки цукрового діабету II типу, а й атеросклерозу, серцево-судинних захворювань і деяких інших патологій (Vlasenko et al., 2011; Laakso and Kuusisto, 2014; Reaven, 2011). Ожиріння визнане Всесвітньою організацією охорони здоров'я як нова неінфекційна епідемія XXI століття. У зв'язку з низьким рівнем фізичної активності, збільшенням у раціоні висококалорійних продуктів, а також неконтрольованим вживанням харчових добавок, наприклад, глутамату натрію, понад половину дорослого населення України має надмірну масу тіла. Останніми роками відмічають постійне збільшення кількості осіб із надлишковою масою тіла та цукровим діабетом II типу, особливо серед працездатного населення, тому ЦД 2 та ожиріння – актуальні проблеми медицини (Vlasenko et al., 2011; Kharroubi and Darwish, 2015). До того ж, діабет і ожиріння супроводжуються розвитком складних супутніх захворювань і ранньою інвалідністю, а також високою смертністю (Islam and Loots, 2009).

Сучасні погляди на етіологію, механізм розвитку та лікування цукрового діабету II типу в основному сконцентровані на дослідженні ролі інсулінорезистентності та порушення функції β-клітин підшлункової залози. Однак недостатня увага приділяється іншим аспектам патогенезу, зокрема особливостям енергетичного обміну, що зумовлюють весь спектр клінічних проявів цього захворювання.

Ефективність функціонування енергетичних систем в організмі – один із критеріїв успішності лікування ЦД (Stancic et al., 2017). Вивчення енергетичного забезпечення може як послужити основою для визначення його ролі в патогенезі ЦД 2, так і бути підставою для розроблення нових методів лікування та профілактики цього захворювання за допомогою корекції виявлених порушень (Tatsumi et al., 1998; Inzucchi et al., 2012). За діабету на тлі активації оксидативного стресу в організмі відбуваються значні зміни молекулярної структури мембран мітохондрій, що зумовлює порушення функціонування ферментних комплексів дихального ланцюга (Mokryy et al., 2016) і, як наслідок, біоенергетичних процесів у клітинах, оскільки вуглеводи не можуть використовуватися для енергетичних потреб печінкою, скелетними м'язами, серцем, нирками (Zanozyna et al., 2010; Stancic et al., 2017).

Незважаючи на досить широкий арсенал сучасних антидіабетичних засобів, проблема реальної компенсації цукрового діабету залишається невирішеною, що обґрунтовує пошук і створення нових ефективних і, водночас, малотоксичних антидіабетичних засобів. Один із найперспективніших способів профілактики порушень обміну речовин – використання біологічно активних добавок (БАД), в яких мінеральні речовини природного походження перебувають у зв'язаній формі у природному комплексі з білками, вуглеводами та ліпідами. Значний інтерес становлять комплекси селену та і біологічно активних металів (Lukashiv et al., 2016).

Селен і хром (III) – важливі мікроелементи для обміну речовин (Vincent, 2012a, 2012b, 2013), бо беруть участь у клітинному захисті від вільнорадикальних реакцій і тому корисні для запобігання значної кількості хвороб і їх лікування (Vincent, 2012b; Selenium, 2003). Хром (III) бере участь у поліпшенні метаболізму в живих організмах, адже він регулює вуглеводний, протеїновий та ліпідний обміни (Brownley et al., 2015; Ganguly, 2016). Численні дослідження (Jain and Kannan, 2001; Cefalu and Hu, 2004; Cheng et al., 2004; Jainet al., 2007; Huaet al., 2012) показали, що хром корисний для лікування інсулінорезистентності та цукрового діабету у людей. У разі недостатнього надходження Cr (III) в організмі виникають метаболічні порушення, симптоми яких схожі на ті, що виникають за діабету та серцево-судинних захворюваннях (Cefalu and Hu, 2004). Cr (III) відіграє важливу роль у підтриманні нормального рівня глюкози в крові (Sundaram et al., 2012), зниженні рівня холестеролу та триацилгліцеролів у плазмі, пригніченні секреції запальних цитокінів, а в комплексі із селеном – інгібує розвиток оксидативного стресу (Jain et al., 2007; Ganguly et al., 2017). Хром підтримує нормальну функцію інсуліну, сприяє транспорту глюкози з крові в клітини печінки, м'язів і жирової тканини.

Щодо хром- і селенумісних препаратів, споживання селенумісних продуктів не може повністю задовольнити потреби людини в селені, як і в багатьох інших мікроелементах, особливо в їх комплексі. Багато сучасних добавок, однак, є синтетичними аналогами вітамінів і мінеральних речовин, вони не зв'язані у біологічні комплекси та можуть мати іншу структуру, ніж натуральні нутрієнти, а також вони часто низькоефективні та можуть виявляти побічні ефекти.

Останнім часом як джерело селену та інших мікроелементів використовують одноклітинні фотосинтезувальні водорості (Zolotor'ova et al., 2008) як джерело біологічно-активних речовин, утворених за рахунок внутрішньоклітинного біосинтезу, що можуть поглинати та накопичувати екзогенні мікроелементи, включаючи їх до складу, насамперед, пігментів, білків та ліпідів (Minyuk, 2000). Досить добре зарекомендували себе, наприклад, препарати з хлорели, не тільки як джерела біологічно доступного хлорофілу, низки вітамінів, амінокислот, а й жирних кислот, що мають антитоксичний (Kim et al., 2009; Lee and Kim, 2009) чи антисклеротичний ефекти (Lee et al., 2008). У попередніх дослідженнях установлено оптимальні умови накопичення селену та мікроелементів клітинами хлорели в аквакультурі (Vinjarska et al., 2014).

Біохімічно виправдане отримання ліпід-селенових субстанцій із хлорели протягом 7 діб вирощування водорості у середовищі з 10,0 мг Se^{4+}/дм^3, а оптимальне для досліджень і перспектив виділення хром-ліпідної субстанції із хлорели використання концентрації хрому 5,0 мг/дм^3 (Vinjarska et al., 2014). У здорових щурів селенхромліпідна субстанція збільшувала сукцинатдегідрогеназну та цитохромоксидазну активності, глутаматдегідрогеназний шлях утворення глутамату, що

сприяло утворенню та активному функціонуванню компонентів антиоксидантної системи (Lukashiv et al., 2016).

Виходячи із цього, мета нашого дослідження – оцінити стан енергетичних процесів у щурів із цукровим діабетом за впливу селенхромліпідного комплексу із *Ch. vulgaris*, а також порівняти вплив неорганічних і органічних сполук хрому та селену на енергетичний метаболізм у щурів за цієї патології.

Матеріал і методи досліджень

Біологічно активну субстанцію отримали шляхом культивування мікропопуляціїї альгологічно чистої культури *Chlorella vulgaris* Beij. CCAP-211/11в в умовах накопичення у середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера та Горхема № 11 за температури +22…+25 ºС та освітлення 2 500 лк 16/8 год (Topachevskyy, 1975). До культури водоростей додавали водний розчин Na_2SeO_3 у розрахунку на Se^{4+} – 10,0 мг/дм^3, та водний розчин $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ з умістом Cr^{3+} – 5,0 мг/дм^3. Біомасу живих клітин відбирали на сьому добу культивування. Контроль – культура, яку вирощували у середовищі без селеніту та іонів хрому.

Ліпіди з включеними в них атомами селену та хрому у процесі метаболізму *in vivo* з біомаси водоростей екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю у відношенні 2 : 1 методом Фолча (Hokin and Hexum, 1992): до однієї масової частки вологої біомаси додавали 20 масових часток екстрагувальної суміші та залишали на 12 год., а неліпідні домішки з екстракту видаляли відмиванням 1% розчином KCl. Загальну кількість ліпідів визначали ваговим методом після відгонки екстрагувальної суміші (Keyts, 1975). Вміст селену в ліпідному екстракті після його озолення нітратною кислотою (HNO_3) в герметичних бюксах за 120 ºС упродовж двох годин визначали спектрофотометрично з о´-фенілендіаміном за довжини хвилі 335 нм (Dedkov and Musatov, 2002), а хрому – після озолення ліпідного екстракту сумішшю нітратної (HNO_3) та сульфатної (H_2SO_4) кислот у герметичних бюксах визначали спектрофотометрично за допомою хромазуролу S за довжини хвилі 556 нм (Yatskiv et al., 2009).

Постановка експерименту. Об'єкт досліджень – білі безпородні щури-самці (125 тварин) початковою масою 160–180 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001), а також керувалися положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Тварин утримували у звичайних умовах віварію. Щури адаптовані 10 діб у дослідній кімнаті, поважені та поділені на сім груп:

I – контрольна група – здорові щури (К);

II–VII – тварини з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД):

II – тварини з ЕЦД, виведені з експерименту на 21-шу добу (ЦД 1);

III – тварини з ЕЦД, виведені з експерименту на 35-шу добу (ЦД 2);

IV – тварини з ЕЦД + профілактичне уведення селенхромліпідного комплексу (ЦД + П);

V – тварини з ЕЦД + уведення селенхромліпідного комплексу з лікувальною метою (ЦД + Л 1);

VI – тварини з ЕЦД + лікувально-профілактичне уведення селенхромліпідного комплексу (ЦД + П + Л 1);

VII – тварини з ЕЦД + уведення хром хлориду $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ та натрій селеніту Na_2SeO_3 з лікувальною метою (ЦД + Л 2).

Така кількість експериментальних груп щурів доцільна, оскільки дає змогу не лише дослідити лікувальні властивості селенхромліпідного комплексу із *Ch. vulgaris* за цукрового діабету II типу, а й вивчити його профілактичну дію при факторах ризику діабету, порівняти лікувальний вплив препарату із хлорели з дією неорганічних сполук Cr^{3+} і Se^{4+} за цього захворювання.

Нині відомо понад десять експериментальних моделей цукрового діабету, які застосовуються в науково-медичній практиці. Найпопулярнішим методом моделювання ЦД в експериментальних тварин шляхом уведення їм певних хімічних речовин визнано використання стрептозотоцину (СТЗ) (Grytsiuk et al., 2014). Під час вибору експериментальної моделі стрептозотоцинового цукрового діабету брали за взірець рекомендації Spasov et al. (2011) та низки інших дослідників (Islam and Wilson, 2012), які показали, що у разі превентивного введення нікотинаміду (НА) підвищується стійкість β-клітин острівців Лангерганса до пошкоджувальної дії стрептозотоцину. Ця модель дає змогу змоделювати стан, максимально близький до цукрового діабету II типу, що проявляється розвитком гіперглікемії, глюкозурії без явищ ацидозу.

Виходячи з аналізу літературних джерел (Nolan and Færch, 2012), ми вирішили змоделювати цукровий діабет у два етапи, тобто змоделювати діабет на тлі ожиріння в експериментальних тварин. Перший крок – моделювання аліментарного ожиріння, а наступний – відтворення стрептозотоцин-нікотинамід-індукованої моделі ЦД 2.

Ожиріння моделювали шляхом 4-тижневого призначення висококалорійної дієти, до складу якої входили стандартна їжа (47%), солодке концентроване молоко (44%), кукурудзяна олія (8%), рослинний крохмаль (1%) з додаванням глутамату натрію у співвідношенні 0,6 : 100,0 (дієта #C 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ) (Marushchak and Krynyts'ka, 2012). Ця модель дозволяє викликати аліментарне ожиріння, при цьому зменшується ризик загибелі тварин під час експерименту (He et al., 2008; Luz et al., 2010). Тварини контрольної групи упродовж усього періоду експерименту отримували стандартну їжу та мали вільний доступ до води. Процес відтворення аліментарного ожиріння контролювали шляхом зважування тварин, вимірювання назально-анальної довжини та розрахунку індексу маси тіла (ІМТ) – ділення маси тіла в грамах на довжину в сантиметрах у квадраті (Jeyakumar et al., 2006). Безпосередньо за передніми кінцівками тварини вимірювали окружність грудної клітки (ОГ), перед задніми кінцівками визначали окружність живота (ОЖ). Вимірювання проводили сантиметровою стрічкою з точністю до 1 мм.

Другий етап – одноразове уведення діабетогенного препарату стрептозотоцину фірми «Sigma» (США) внутрішньоочеревинно після попереднього 24-годинного їх голодування за вільного доступу до питної води з розрахунку 65 мг/кг (приготовленого на цитратному буфері) із попереднім (за 15 хв) інтраперитонеальним уведенням нікотинаміду у дозі 230 мг/кг на фізрозчині. Контрольним щурам уводили тільки цитратний буфер.

Тваринам IV групи, починаючи з першого дня введення цитотоксину щодня упродовж 21 доби внутрішньошлунково вводили 1 мл 1% водного крохмального розчину, який містив у собі виділений із хлорели та очищений відмиванням хлороформ-метаноловою сумішшю (2 : 1) та 1% розчином калію хлориду ліпідний екстракт, що містив 0,6 мкг селену, 1,05 мкг хрому у 0,5 мг ліпідів, що співвідноситься із щоденними фізіологічними нормами споживання цих мікроелементів (Forceville et al., 1998; Iskra and Vlizlo, 2013).

Тваринам V групи введення селенхромліпідного комплексу починали з 21-ї доби з моменту введення цитотоксину протягом 14 діб.

Щурам VI групи суспензію призначали з першого дня введення СТЗ упродовж 35 діб.

Тваринам VII групи з 21-ї по 35-ту добу вводили крохмальний розчин натрій селеніту та хром хлориду, який у перерахунку на іони Se^{4+} і Cr^{3+} містив ідентичну добову дозу цих мікроелементів.

Для чистоти експерименту тваринам I та II груп упродовж 21 доби вводили *per os* фізіологічний розчин, тваринам III групи – впродовж 35 діб. Евтаназію щурів I, II та IVгруп здійснювали на 21-шу добу експерименту під тіопенталовим наркозом, евтаназію III, V, VI та VII груп виконували аналогічно на 35-ту добу.

Для досліджень брали печінку та сироватку крові тварин. Печінку (500 мг) використовували для отримання гомогенату

методом диференційної гомогенізації, яку проводили після попередньої перфузії з 5,0 мл фізіологічного розчину. Кров забирали із серця тварин, центрифугували за 3 000 об./хв протягом 30 хв для отримання сироватки.

Розвиток цукрового діабету II типу контролювали за вмістом глюкози у крові (ммоль/л), яку визначали глюкометром «Accu-Chek Active» фірми «Roche Diagnostics GmbH» (Німеччина), рівнем фруктозаміну (Johnson et al., 1982) у сироватці крові, наявністю глюкози («Глюкотест», %) та кетонових тіл у сечі («Ацетонтест», ммоль/л), які визначали за допомогою індикаторних смужок «ПВП «Норма».

Глюкозотолерантний тест проводили на 14-ту добу розвитку ЦД. Кров для досліджень відбирали із хвостової вени щурів.

У печінці визначали активність ензимів енергетичного метаболізму: сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) – за окисненням сукцинату до фумарату фериціанідом калію, що реєстрували спектрофотометрично за довжини хвилі 420 нм (Prohorova, 1982); цитохромоксидази (ЦО, КФ 1.9.3.1) – за конденсацією α-нафтолу та *n*-фенілендіамінгідрохлориду з утворенням фенолу (540 нм) (Straus, 1954); глутаматдегідрогенази (ГДГ, КФ 1.4.1.2) – за швидкістю окиснення НАДН або НАДФН, яке фіксували за 340 нм (Sof'in et al., 1984).

Кількість білків визначали за Lowry et al. (1951).

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики на основі 8–13 повторів. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного пакета Statistica 6.0 (StatSoft, США). Обчислювали середнє арифметичне (M) та стандартну похибку середнього арифметичного (m). Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента після підтвердження нормальності розподілу вибірки. Вірогідною вважали різницю між вибірками за $P < 0,05$.

Результати

Хроматографічний та мас-спектрометричний аналіз селенумісних ліпідів *Ch. vulgaris* (Perales et al., 2006), вирощених за високих концентрацій Se (IV), показав, що селен присутній у всіх фракціях ліпідів, механізм включення елемента до їх складу поки що не зрозумілий. Однак включені в ліпіди селен і метали зв'язуються з ними міцно, оскільки в результаті процедури виділення в їх складі виявляється значна кількість цих мікроелементів. Можливо, це – результат їх включення до складу молекул ліпідів за місцем подвійного зв'язку у ненасичених жирних кислотах або за рахунок міжмолекулярної взаємодії координаційно (Selenium, 2003), що тим самим дозволяє вважати ці комплекси фізіологічно адекватними та збалансованими.

У попередніх експериментах (Lukashiv et al., 2016a, 2016b), які здійснювались на здорових щурах-самцях із масою тіла 160–180 г після введення крохмального розчину селенхромліпідного комплексу, 1 мл якого містив 1,85 мкг селену, 1,1 мкг хрому, 0,5 мг ліпідів один раз на добу упродовж 14 діб, в організмі щурів не виявлено інтоксикації, бо вміст середньомолекулярних пептидів (МСМ) знижувався: $МСМ_1$ – в 1,6 раза, $МСМ_2$ – в 1,4 раза. У печінці та сироватці крові тварин знижувалися вміст малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів, а також підвищувався енергетичний статус (збільшувалася активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази), активувався глутаматдегідрогеназний шлях утворення глутамату, зросла активність каталази та вміст відновленого глутатіону.

Протягом періоду моделювання аліментарного ожиріння відмічалося збільшення маси тіла тварин. Зокрема, аналіз основних анатомо-фізіологічних показників на 28-шу добу експерименту вказує на достовірне підвищення маси тіла щурів дослідної групи на 46,6% та індексу маси тіла – на 33,3%, поряд зі зростанням окружностей живота та грудної клітки, порівняно з контрольною групою (табл.). Таким чином, достовірне зростання біометричних показників щурів дослідної групи свідчить про розвиток ожиріння. Визначення вмісту глюкози та фруктозаміну в крові, а також проведення глюкозотолерантного тесту – одні з визначальних маркерів цукрового діабету. Проведені нами дослідження показали, що на третю добу у тварин з експериментальним цукровим діабетом рівень глікемії зріс у 3,8 раза порівняно з контрольними тваринами (15,9 ± 0,33 ммоль/л). Із 14-ї доби рівень глюкози у крові знизився до 8,9 ± 0,23 ммоль/л і до кінця спостереження майже не змінювався. Також у тварин із діабетом на 21-шу добу індукції ЦД спостерігали істотне підвищення концентрації фруктозаміну у сироватці крові (в 1,9 раза, група ЦД1), що свідчить про активацію процесів неензимного глікозилювання, а також про посилення метаболізації глюкози гексозаміновим шляхом (тобто з утворенням фруктози) в інсулінонечутливих тканинах (Reznikov, 2003).

Таблиця

Біометричні параметри тварин (M ± m)

Показники	Групи щурів	
	контроль, n = 16	ожиріння n = 109
Маса тіла, г	192,1 ± 1,3	281,7 ± 2,0*
Довжина тіла, см	20,02 ± 0,96	20,98 ± 0,44
Індекс маси тіла, г/см^2	0,48 ± 0,02	0,64 ± 0,01*
Окружність грудної клітки, см	11,18 ± 0,53	15,21 ± 0,51
Окружність живота, см	12,76 ± 0,41	18,3 ± 0,55
Окружність живота / окружність грудної клітки	1,14 ± 0,04	1,20 ± 0,03

Примітка: * – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами за $P < 0,05$.

У здорових тварин рівень глюкози у сечі складав 0%, після введення цитотоксину на 3–7-му добу зріс до 0,5%, далі показник становив 0,1%. Із 7-ї доби після введення СТЗ кетонових тіл у сечі не знайдено. Отримані результати вказують на відсутність кетоацидозу, характерного для цукрового діабету I типу.

Проведений глюкозотолерантний тест показав, що у тварин з експериментальним ЦД рівень глікемії через дві години з моменту введення глюкози становив 13,4 ± 0,52 ммоль/л, у тварин контрольної групи – 5,6 ± 0,62 ммоль/л. Результати свідчать про порушення толерантності до глюкози у щурів з ЕЦД.

Основні біохімічні процеси, що мають відношення до енергетичного обміну та відбуваються в мітохондріях, – цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса), β-окиснення жирних кислот, карнітиновий цикл, транспорт електронів у дихальний ланцюг і окисне фосфорилювання. Кожен з них може бути причиною мітохондріальної дисфункції (Morino et al., 2006; Grattagliano et al., 2012). Враховуючи велику кількість ензимів, що беруть участь у генеруванні енергії в клітині, у нашому дослідженні визначено активність ключового ензиму циклу трикарбонових кислот (сукцинатдегідрогенази) та електронотранспортного ланцюга (цитохромоксидази), а також глутаматдегідрогеназну активність, яка пов'язує енергетичні та біосинтетичні процеси в клітині.

Адекватне відображення вираженості дисметаболічних процесів і стану енергетичного обміну – активність сукцинатдегідрогенази (СДГ). СДГ належить до сукцинатоксидазної системи ферментів, об'єднаних у ланцюг у мітохондріях. СДГ – перший ензим цієї системи, цитохромоксидаза – останній. Їх активність відображає енергетичний потенціал клітини, функціональний стан і кількість активних мітохондрій. Деякі автори (Readon et al., 1992) зазначають, що ЦД має перше місце серед ендокринопатій, виявлених за мітохондріальної патології. Здійснюючи окиснення в організмі, СДГ бере участь у знешкодженні токсинів і недоокиснених продуктів, що з'являються у хворих на ЦД. Активність цього ензиму – показник окисного метаболізму у клітинах діабетиків (Ferreica et al., 2003).

У тварин на 21-шу добу розвитку ЦД активності ЦО та СДГ у печінці знизилися відповідно на 20,0% і 10,5%, порівняно з контрольною групою (рис. 1). При ЦД 2 з ожирінням внутрішньоклітинний рівень НАДФН, як правило, підвищуються, що викликає збільшення продукції супероксид-радикалів, посилення оксидативного стресу та появу деструктивних процесів у ткани-

нах (Gupte et al., 2009). У наших дослідженнях у щурів із діабетом активність НАДФН-ГДГ (рис. 2) зросла учетверо порівняно з контролем, НАДН-ГДГ знизилася лише на 2,3%, а співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ зменшилося в 4,1 раза.

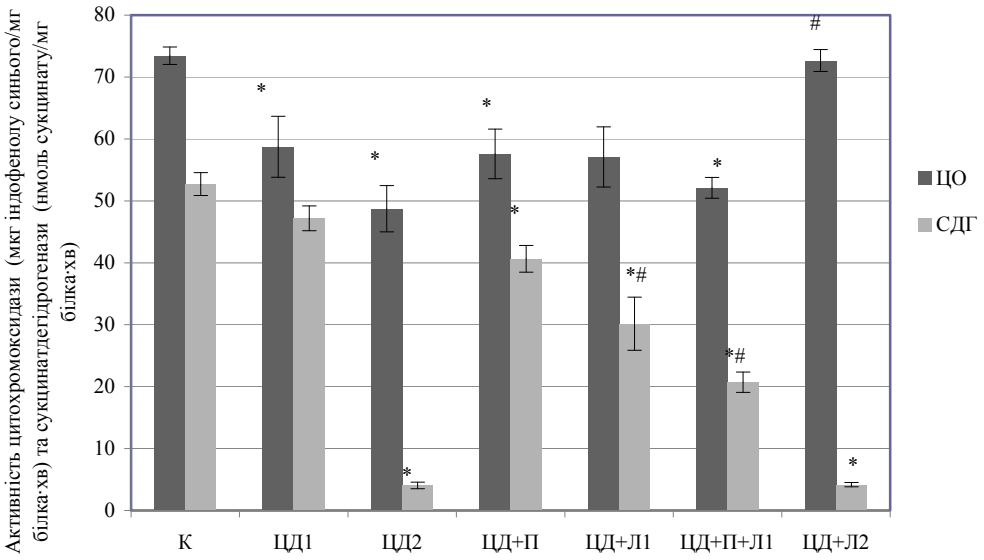


Рис. 1. Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази у печінці щурів після застосування селенхромліпідного комплексу та введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+} (M ± m; n = 8–13): різниця показників достовірна (P < 0,05) відносно * – контрольної групи (К), # – відносно групи ЦД 2

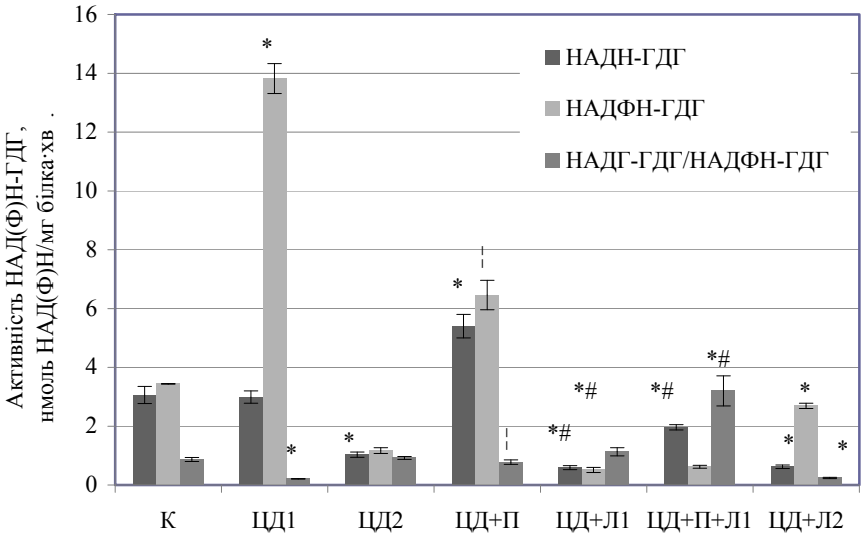


Рис. 2. Активність НАДН- та НАДФН-глутаматдегідрогеназ і їх співвідношення у печінці щурів після застосування селенхромліпідного комплексу та введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+} (M ± m; n = 8–13): різниця показників достовірна (P < 0,05) відносно: * – контрольної групи (К), ¦ – відносно групи ЦД1, # – відносно групи ЦД 2

Виявлені зміни відповідають клінічній картині, що супроводжує розвиток діабету та узгоджується з метаболічними порушеннями у хворих на інсуліннезалежний ЦД. За введення селенхромліпідного комплексу відмічається підвищення активності СДГ (рис. 1), зокрема, у групі ЦД + Л 1 її активність збільшилася у 7,5 раза порівняно з групою ЦД 2, у групі ЦД + Л 2 збільшення відбулося лише на 3%, а у групі ЦД + П + Л 1 – у 5,2 раза.

Підвищення сукцинатдегідрогеназної активності узгоджується з підвищенням активності цитохромоксидази: у групі ЦД + Л 1 відмічається поліпшення активності ЦО на 17,2%, у групі ЦД + Л 2 – на 49,1% та на 7,0% у групі ЦД + П + Л 1 (рис. 1). Активність СДГ і ЦО у щурів, яким уводили селенхромліпідний комплекс із профілактичною метою, незначно знизилася.

НАДН-глутаматдегідрогеназна активність за дії селенхромліпідного комплексу із хлорели достовірно зросла на 80,6% у групі ЦД + П порівняно з групою ЦД 1, у групі ЦД + Л 1 та ЦД + Л 2 (за введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+}) активність НАДН-ГДГ знизилася на 43,0% і 39,8%, відповідно, а у групі ЦД + П + Л 1 зросла на 90,3% щодо показника тварин групи ЦД2 (рис. 2).

Активність НАДФН-ГДГ за введення щурам селенхромліпідного комплексу із хлорели також суттєво зменшувалася у групі ЦД + П (в 2,1 раза відносно групи ЦД 1), а за споживання щурами селенхромліпідного комплексу груп ЦД + Л 1 та ЦД + П + Л 1 достовірно знизилася в 2,3 та 1,9 раза, лише за введення неорганічних форм Cr^{3+} та Se^{4+} показник зріс в 1,9 раза щодо показника у тварин групи ЦД 2 (рис. 2).

В експерименті спостерігали зростання показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ (рис. 2) в усіх групах тварин, яким уводили селенхромліпідний комплекс, більшою мірою у групі ЦД + П – в 3,7 раза (щодо групи ЦД1) та у групі ЦД + П + Л 1 – в 3,5 раза відносно групи ЦД2. Зростання співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ свідчить про активізацію каталітичної ланки нітрогенового метаболізму в організмі тварин. Суттєве зниження показника співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ відмічалося у групі щурів, яким уводили неорганічні форми Cr^{3+} та Se^{4+} відносно групи ЦД 2, а у групі ЦД + Л 1 показник зріс в 1,2 раза.

Отримані результати свідчать про активізацію енергетичного метаболізму за введення селенхромліпідних комплексів із хлорели на фоні ЦД 2 як на рівні циклу Кребса, так в термінальній фазі дихального ланцюга, а також про використання амінокислот як енергетичного субстрату.

Обговорення

Експериментально відтворений цукровий діабет II типу відзначається порушенням метаболізму в організмі щурів, що підтверджується результатами комплексних біохімічних досліджень. Глибокі розлади енергетичного обміну виникають за діабету, коли значно зменшується вироблення макроергічних сполук у зв'язку з порушенням дихального ланцюга, зумовленим обмеженням потужності циклу Кребса (Ferreica et al., 2003).

Адекватне відображення вираженості дисметаболічних процесів і стану енергетичного обміну – зменшення активності цитохромоксидази, сукцинатдегідрогенази, НАДН-глутаматдегідрогенази, активізація діяльності НАДФН–ГДГ, а також зниження співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФ-ГДГ.

Спрямованість глутаматдегідрогеназної реакції, напрям якої визначається наявністю коферменту (НАД-залежна – пряма, НАДФ-залежна – зворотна), зумовлює напрям метаболізму (Metzler, 2003; Dudina, 2005). У прямій реакції відбувається дезамінування глутамату з утворенням 2-оксоглутарату з подальшим його використанням у циклі Кребса або інших метаболічних системах, виконуючи енергетичну функцію. У зворотній реакції фермент спрямовує метаболізм у бік біосинтезу амінокислот (синтетазний шлях). Закономірності активності глутаматдегідрогенази з $НАД^+$ та $НАДФ^+$ свідчать про переважання утворення глутамату над його дезамінуванням, тобто активізацію зв'язування аміаку як один із дієвих детоксикаційних механізмів, який розвивається під час використання амінокислот як енергетичних субстратів у стресових і патологічних станах (Grubinko and Arsan, 1998).

Результати досліджень співвідносяться з даними окремих авторів (Shibata et al., 2003; Jeong et al., 2009) про те, що хлорела може бути корисною для профілактики діабету та розвитку діабетичних ускладнень, а також володіє гіпоглікемічним ефектом. Завдяки властивостям *Ch. vulgaris* акумулювати із середовища культивування іони неметалів і металів, а також накопичувати екзогенні мікроелементи, включаючи їх у значній кількості до складу ліпідів, антидіабетична дія хлорели посилюється. Пероральне введення в організм лабораторних щурів з експериментальним діабетом селенхромліпідного комплексу з *Ch. vulgaris* покращило енергетичний статус щурів.

З огляду на дані, відображені в рисунках 1 та 2, можна узгодити їх із твердженнями, наведеними Cefalu et al. (2004) про те, що відповідь організму на дію Cr^{3+} та Se^{4+} залежить від форми його введення. Добавки хрому використовують у вигляді неорганічних (в основному це хлорид хрому) та органічних (нікотинат хрому, піколінат хрому, цитрат хрому, ацетат хрому) сполук, а також у вигляді хромумісних дріжджів. На думку деяких дослідників, неорганічні сполуки хрому мають нижчий рівень засвоєння цього елемента в організмі порівняно з органічними сполуками, не зв'язані у біологічні комплекси та можуть мати іншу структуру, ніж натуральні нутрієнти; вони часто проявляють низьку ефективність і можуть виявляти побічні ефекти. Згідно з даними Vincent (2012), біозасвоєння хрому з неорганічних сполук невисоке (до 1%), однак воно зростає до 25% за надходження хрому у вигляді органічних сполук (піколінати, нікотинати, цитрати). Таким чином, результати досліджень дозволяють зробити обґрунтований висновок про те, що використання селенхромліпідного комплексу, виділеного із хлорели, дає набагато більший терапевтичний ефект при змодельованому ЦД, і є ефективнішим, порівняно з неорганічними сполуками, засвоєння яких в організмі набагато нижче.

Висновки

Дослідження дозволило вперше ґрунтовно вивчити вплив ліпідів *Ch. vulgaris* за спільної дії Cr^{3+} та Se^{4+} на енергетичний метаболізм щурів за змодельованого ЦД 2. Селенхромліпідний комплекс проявляє вплив на обмінні процеси в організмі тварин за експериментального цукрового діабету.

Отримані результати – зростання рівня фруктозаміну, глікемії, глюкозурії, відсутність кетонурії, а також оцінка динаміки глікемії під час проведення орального тесту толерантності до глюкози у щурів, за якого рівень глікемії через 2 години від моменту введення глюкози залишався вищим за 13 ммоль/л, свідчили про розвиток ЦД 2 у щурів.

Із *Ch. vulgaris* в умовах аквакультури виділено стабільний селенхромліпідний комплекс, за введення якого щурам з експериментальним цукровим діабетом у дозі з 0,6 мкг селену, 1,05 мкг хрому в 0,5 мг ліпідів на 1 мл 1% водно-крохмальної суспензії у печінці відбувалося підвищення активностей сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази. Виняток становлять лише ті групи тварин, яким уводили селенхромліпідний комплекс із профілактичною метою, у них активність досліджених ензимів незначно знизилася.

Селенхромліпідний комплекс активував НАДН-глутаматдегідрогеназу у групах щурів, яким його вводили з профілактичною та лікувально-профілактичною метою. Відбулося зниження НАДФН-ГДГ у всіх групах щурів, яким уводили комплекс із *Ch. vulgaris*, його активацію відмічали лише у групі щурів, яким уводили неорганічні форми селену та хрому. За введення селенхромліпідного комплексу з мікроводорості відбулася зміна співвідношення активності $НАД^+$ та $НАДФ^+$-ГДГ у бік зростання (до 3,7 раза у групі ЦД + П), що свідчить про прискорення у печінці експериментальних тварин енергетичного метаболізму з використанням як енергетичних субстратів амінокислот. За введення неорганічних форм селену та хрому співвідношення НАДН/НАДФН знижується.

Результати показали позитивний вплив селенхромліпідного комплексу з *Ch. vulgaris* на енергетичний обмін щурів з експериментальним ЦД 2 над неорганічними формами хрому та селену. Це дозволяє вважати даний комплекс із хлорели перспективним регулятором енергетичного метаболізму за цукрового діабету.

References

Aguirre, L., Arias, N., Macarulla, T., Gracia, A., & Portillo, M. (2011). Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. The Open Nutraceuticals Journal, 4, 189–198.

Brownley, K. A., Boettiger, C. A., Young, L. A., & Cefalu, W. T. (2015). Dietary chromium supplementation for targeted treatment of diabetes patients with comorbid depression and binge eating. Medical Hypotheses, 85(1), 45–48.

Cefalu, W. T, & Hu, F. B. (2004). Role of chromium in human health and in diabetes. Diabetes Care, 27(11), 2741–2751.

Cheng, H. H., Lai, M. H., Hou, W. C., & Huang, C. L. (2004) Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(5), 1385–1389.

Dedkov, Y. M., & Musatov, A. V. (2002). Selen: Byolohycheskaya rol', khymycheskye svoystva y metody opredelenyya [Selenium: Biological role, chemical properties and methods of determination]. Chemistry, 1688, 19–23 (in Russian).

Dudina, Y. V. (2005). Effect of kainate-induced experimental epilepsy on NADPH-diaphorase and calcium-binding proteins in rat hippocampal neurons. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 139(3), 309–312.

Ferreica, F. M., Palmeira, C. M, Seica, R., Moreno, A. J., & Santos, M. S. (2003). Diabetes and mitochondrial bioenergetics: Alterations with age. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17(4), 214–222.

Forceville, X., Vitoux, D., Gauzit, R., Combes, A., Lahilaire, P., & Chappuis, P. (1998). Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis and outcome incritically ill patients. Critical Care Medicine, 26(9), 1536–1544.

Ganguly, R., Sahu, S., Ohanyan, V., Haney, R., Chavez, R., Shah, S., Yalamanchili, S., & Raman, P. (2017). Oral chromium picolinate impedes hyperglycemia-induced atherosclerosis and inhibits proatherogenic protein TSP-1 expression in STZ-induced type 1 diabetic ApoE-/- mice. Scientific Reports, 7, 45279.

Ganguly, R., Wen, A. M., Myer, A. B., Czech, T., Sahu, S., Steinmetz, N. F., & Raman, P. (2016). Anti-atherogenic effect of trivalent chromium-loaded CPMV nanoparticles in human aortic smooth muscle cells under hyperglycemic conditions *in vitro*. Nanoscale, 8(12), 6542–6554.

Grattagliano, I., de Bari, O., Bernardo, T. C., Oliveira, P. J., Wang, D. Q., & Portincasa, P. K. (2012). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease – from origin to propagation. Clinical Biochemistry, 45, 610–618.

Grubinko, V. V., & Arsan, V. O. (1998). Rol' hlutamat – hlutaminovoho peretvorennya v rehulyatsiyi homeostazu v mozku tvaryn za stres-diyi faktoriv zovnishn'oho seredovyshcha [The role of glutamate-glutamine in the regulation of homeostasis in the brain of animals subject to stress-action from environmental factors]. Ecological Physiology, 1, 13–18 (in Ukrainian).

Grytsiuk, M. I., Boychuk, T. N., & Petryshyn, A. I. (2014). Porivnyal'na kharakterystyka eksperymental'nykh modeley diabetu [Comparative characteristic of experimental models of diabetes]. World of Medicine and Biology, 44, 199–203 (in Ukrainian).

Gupte, R. S., Floyd, B. C., Kozicky, M., George, S., Ungvari, Z. I., Neito, V., Wolin, M. S., & Gupte, S. A. (2009). Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. Free Radical Biology and Medicine, 47(3), 219–228.

He, K., Zhao, L., Daviglus, M. L., Dyer, A. R., Van Horn, L., Garside, D., Zhu, L., Guo, D., Wu, Y., Zhou, B., & Stamler, J. (2008). Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: The INTERMAP study. Obesity, 16(8), 1875–1880.

Hokin, L. E., & Hexum, T. D. (1992). Studies on the characterization of the sodium – potassium transport adenosinetriphosphatase on the role of phospholipids in the enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics, 151(2), 58–61.

Hua, Y., Clark, S., Ren, J., & Sreejayan, N. (2012). Molecular mechanisms of chromium in all eviating insulin resistance. Journal of Nutritional Biochemistry, 23(4), 313–319.

Inzucchi, S., Bergenstal, R. M., & Buse, J. B. (2012). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A patient-centered approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care, 35, 1–16.

Iskra, R. Y., & Vlizlo, V. V. (2013). Osoblyvosti funktsionuvannya systemy antyoksydantnoho zakhystu v erytroyidnykh klitynakh i tkanynakh svyney za diyi khromu khlorydu [Peculiarities of functioning of the system of antioxidant protection in erythroid cells and tissues of pigs under the action of chromium chloride]. Ukrainian Biochemical Journal, 85(3), 96–102 (in Ukrainian).

Islam, M. S., & Wilson, R. D. (2012). Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. Methods in Molecular Biology, 933, 161–174.

Islam, S., & Loots, D. T. (2009). Experimental rodentmodels of type 2 diabetes: A rewiev. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 31(4), 249–261.

Jain, S. K., & Kannan, K. (2001). Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-a secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 289, 687–691.

Jain, S. K., Rains, J. L., & Croad, J. L. (2007). High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. Antioxidants and Redox Signaling, 9, 1581–1590.

Jeong, H., Kwon, H., Kim, M. (2009). Hypoglycemic effect of *Chlorella vulgaris* intake in type 2 diabetic Goto Kakizaki and normal Wistar rats. Nutrition Research and Practice, 3(1), 23–30.

Jeyakumar, S. M., Vajreswari, A., & Giridharan, N. V. (2006). Chronic dietary vitamin A supplementation regulates obesity in an obese mutant WNIN/Ob rat model. Obesity, 14, 52–59.

Johnson, R. N., Metcalf, P. A., & Baker, J. R. (1982). Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clinica Chimica Acta, 127(1), 87–95.

Keyts, M. (1975). Tekhnika lipidolohii. Vydelenie, analiz i identifikatsiya lipidov [Technique of lipidology. Isolation, analysis, identification of lipids]. Mir, Moscow (in Russian).

Kharroubi, A. T, & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World Journal of Diabetes, 6(6), 850–867.

Kim, Y. J., Kwon, S., & Kim, M. K. (2009). Effect of *Chlorella vulgaris* intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. Nutrition Research and Practice, 3(2), 89–94.

Laakso, M., & Kuusisto, J. (2014). Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. Nature Reviews Endocrinology, 10(5), 293–302.

Lee, H. S., Park, H. J., & Kim, M. K. (2008). Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. Nutrition Research and Practice, 2(4), 204–210.

Lee, H. S., & Kim, M. K. (2009). Effect of *Chlorella vulgaris* on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet. Journal of Medicinal Food, 12(5), 1029–1037.

Lowry, O. H., Rosenbroug, N. I., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, 193(1), 265–275.

Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., & Grubinko, V. V. (2016). Vplyv na metabolichni protsesy v orhanizmi selenovmisnykh biodobavok ta perspektyvy yikh vykorystannya [Effect on metabolic processes in the organism of selenium-containing bio-supplements and prospects for their use]. Bulletin of Biology and Medicine, 130, 30–34 (in Ukrainian).

Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., Vasilenko, O. V., & Grubinko, V. V. (2016). The effect of selenium-chrome-lipid substance from *Chlorella vulgaris* Biej. on energy metabolism in rats. World Science, 7(11), 17–21.

Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., Vinyars'ka, H. B., & Grubinko, V. V. (2016). Vplyv selen-khrom-lipidnoyi substantsiyi iz *Chlorella vulgaris* Biej. na oksydatyvnyy status shchuriv [Effect of selenium-chromium-lipid substance on *Chlorella vulgaris* Biej. the oxidative status of rats]. Medical and Clinical Chemistry, 18(2), 28–33 (in Ukrainian).

Luz, J., Pasin, V. P., Silva, D. J. M., Zemdegs, J. C., Amaral, L. S., & Affonso-Silva, S. M. (2010). Effect of food restriction on energy expenditure of monosodium glutamate-induced obese rats. Nutrition and Metabolism, 56(1), 31–35.

Marushchak, M. I., & Krynyts'ka, I. Y. (2012). Sposib modelyuvannya alimentarnoho ozhyrinnya [A way to model alimentary obesity]. Patent of Ukraine No 68839, MPK G09B 23/28 (2006.01), A61K 31/195 (2006.01), application number u201112114 (in Ukrainian).

Metzler, D. E. (2004). Biochemistry: The chemical reactions of living cells. 2nd ed. Academic Press, New York – London.

Minyuk, G. S., & Drobetskaya, I. V. (2000). Vliyaniye selena na zhiznedeyatel'-nost' morskikh i presnovodnykh mikrovodorosley [Effect of selenium on the activity of marine and freshwater microalgae]. Ecology of the Sea, 54, 26–37 (in Russian).

Mokryy, V. Y., Ziablitsev, S. V., & Kryshtal', M. V. (2016). Osoblyvosti formuvannya okysnoho stresu u patsiyentiv z tsukrovym diabetom 2 typu v zalezhnosti vid tryvalosti zakhvoryuvannya i stati [Features of the formation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes, depending on the duration of the disease and sex]. International Endocrinology Journal of the Year, 77, 67–71 (in Ukrainian).

Morino, K., Petersen, K., Shulman, F., & Morino, G. I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. Diabetes, 55(2), 9–15.

Nolan, J. J., & Færch, K. (2012). Estimating insulin sensitivity and beta-cell function: Perspectives from the modern pandemics of obesity and type 2 diabetes. Diabetologia, 55(11), 2863–2867.

Perales, H. V., Pena-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere, 64, 1–10.

Prokhorova, M. I., ed. (1982). Metody biokhimichnykh doslidzhen' (lipidnyy ta enerhetychnyy metabolizm) [Methods of biochemical studies (lipid and energy metabolism)]. Leningrad University Press, Leningrad (in Russian).

Reardon, W., Ross, R. J., Sweeney, M. G., Luxon, L. M., Pembrey, M. E., Harding, A. E., & Trembath, R. C. (1992). Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. Lancet, 8832, 1376–1379.

Reaven, G. M. (2011). Relationships among insulin resistance, type 2 diabetes, essential hypertension, and cardiovascular disease: Similarities and differences. Journal of Clinical Hypertension (Greenwich), 13(4), 238–243.

Reznikov, O. G. (2003). Zagal'ni etytchni pryncypy eksperymentivna tvarynach [General ethical principles of experiments on animals]. The first national congress on bioethics. Endocrinology, 8(1), 142–145.

Shibata, S., Natori, Y., Nishihara, T., Tomisaka, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Nguyen, V. (2003). Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 49(5), 334–339.

Sof'yn, A. V., Shatylov, V. R., & Kretovych, V. L. (1984). Hlutamatdehydrohenazy odnokletochnoy zelenoy vodorosly. Kynetycheskye svoystva [Glutamate dehydrogenase of unicellular green algae. Kinetic properties]. Biochemistry, 49(2), 334–345 (in Russian).

Spasov, A. A., Voronkova, M. P., Snyhur, H. L., Cheplyaeva, N. Y., & Chepurnova, M. V. (2011). Eksperymental'naya model' sakharnoho dyabeta typa 2 [Experimental model of type 2 diabetes]. Biomedicine, 3, 12–18 (in Russian).

Stancic, A., Filipovic, M., Ivanovic-Burmazovic, I., Masovic, S., Jankovic, A., Otasevic, V., Korac, A., Buzadzic, B., & Korac, B. (2017). Early energy metabolism-related molecular events in skeletal muscle of diabetic rats: The effects of l-arginine and SOD mimic. Chemico-Biological Interactions, 272, 188–196.

Straus, W. (1954). Colorimetric microdetermination of cytochromeoxidase. Journal of Biological Chemistry, 207(2), 733–743.

Sundaram, B., Singhal, K., & Sandhir, R. (2012). Ameliorating effect of chromium administration on hepatic glucose metabolism in streptozotocin-induced experimental diabetes. Biofactors, 38, 59–68.

Tatsumi, T., Matoba, S., Kobara, M, Keira, N., Kawahara, A., Tsuruyama, K., Tanaka, T., & Katamura, M. (1998). Energy metabolism after ischemic preconditioning in streptozotocin-induced diabetic rat hearts. Journal of the American College of Cardiology, 31(3), 707–715.

Vincent, J. B. (2012). Is chromium effective as a nutraceutical. The bioinorganic chemistry of chromium, 55–79.

Vincent, J. B. (2012). Is chromium essential the evidence. The bioinorganic chemistry of chromium, 7–30.

Vincent, J. B. (2012). Is chromium (III) effective as a therapeutic agent. The bioinorganic chemistry of chromium, 81–123.

Vincent, J. B. (2013). Chromium: Isitessential, pharmacologically relevant, ortoxic? Metal Ions Life Sciences, 13, 171–198.

Vlasenko, M., Semenyuk, I., & Slobodyanyuk, G. (2011). Diabet i ozhyrinnya – epidemiya XXI stolittya: Suchasnyy pidkhid do problemy [Diabetes and obesity – The epidemic of the XXI century: A modern approach to problems]. Ukrainian Therapeutic Journal, 2, 50–55 (in Ukrainian).

Yatskiv, O. S., & Patsay, Y. O. (2009). Spektrofotometrychne vyznachennya Cr (III) z dopomoyu khromazurolu S v prysutnosti Cr (VI) [Spectrophotometric determination Cr (III) with chromazoorol S in the presence of Cr (VI)]. Methods and Objects of Chemical Analysis, 4(1), 43–47 (in Ukrainian).

Zanozyna, O. V., Borovkov, N. N., & Shcherbatyuk, T. H. (2010). Svobodnora-dykal'noe okyslenye pry sakharnom dyabete 2-ho typa: Ystochnyky obrazo-vanyya, sostavlyayushchye, patohenetycheskye mekhanyzmy toksychnosty [Free radical oxidation in type 2 diabetes, sources of formation, constitutive, pathogenetic mechanisms of toxicity]. Modern Technology in Medicine, 3, 104–112 (in Russian).

Zolotor'ova, O. K., Shnyukova, E. I., Sivash, O. O., & Mikhaylenko, N. F. (2008). Perspektivi vikoristannya mikrovodorostey u biotekhnologiyi [Prospects for the use of microalgae in biotechnology]. Al'terpres, Kyiv (in Ukrainian).

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 377–383
doi: 10.15421/021758

Possibility of identifying plant components of the diet of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) by visual evaluation

D. Y. Reshetniak, O. Y. Pakhomov, V. V. Brygadyrenko

Oles' Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 02.07.2017
Received in revised form 09.08.2017
Accepted 15.08.2017

Oles' Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, 49010, Dnipro, Ukraine.
Tel. +38-050-939-07-88.
E-mail: brigad@ua.fm

Reshetniak, D. Y., Pakhomov, O. Y., & Brygadyrenko, V. V. (2017). Possibility of identifying plant components of the diet of Harpalus rufipes (Coleoptera, Carabidae) by visual evaluation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 377–383. doi: 10.15421/021758

Harpalus rufipes (De Geer, 1774) is a trans-palearctic, polyzonal, habitat generalist species, which is usually the most numerous ground beetle species in agricultural ecosystems and forest plantations. In laboratory conditions, 50 *H. rufipes* imagoes were placed in separate containers, each individual being fed over several days with seeds of a single species of plant, the total number of plant species being ten. Then the content of the beetles' intestine were analyzed using Lugol's iodine stain for visualizing starch granules. Native agents of ground seeds of plants and also of seeds treated by a fermentative agent from a mammalian pancreas were used for control. Granules of starch from seeds of *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L. and *Secale cereale* L. were only insignificantly broken down by enzymes in the intestines of *H. rufipes*. The starch granules of *Avena sativa* L., *Panicum miliaceum* L., *Sorghum drummondii* (Steud.) Millsp. and Chase, *Fagopyrum esculentum* Moench and *Sinapis arvensis* L. were also insignificantly affected in the beetles' intestine compared to the agent affected by enzymes of vertebrate animals. Starch granules of *Beta vulgaris* L. seeds affected by the enzymes became deformed and fragmented. Sometimes only their fragments remained. Seeds with a high content of fats such as seeds of *Juglans regia* L. were digested poorly in the intestine of *H. rufipes* (drops of fat could be seen surrounding certain food particles, which obstructed their digestion). The results of microscopic study of the intestinal content of mixed phytophage ground beetles of agricultural environments will help in identifying mechanisms of regulation of trophic chains by polyphage species, and will help advance the study of gregarine infection rates among ground beetles.

Keywords: intestinal content; ground beetles; digestion; starch; mixed phytophages

Introduction

Identifying the dietary components of mixed phytophage ground beetles is an interesting and promising area of ecological research. Ground beetles which feed on plant seeds can consume both cultivated species of plants, therefore causing damage to agriculture, and weed seeds, which is beneficial to agriculture (Honek et al., 2003; Fawki and Toft, 2005; Klimeš and Saska, 2010). Studying the diet of different species of ground beetles which feed on plants in the conditions of natural ecosystem and agricultural landscapes is interesting both from a theoretical (evaluating the structure of trophic chains, identifying the mechanisms of regulation of phytocoenosis structures, etc.), and from a practical perspective (identifying mechanisms of limiting the population of the most harmful species of weed, qualitative evaluation and quantification of seed stock of weeds in agrocoenoses, etc.).

One such mixed phytophage-species is *Harpalus rufipes* (De Geer, 1774), a trans-palearctic polyzonal species inhabiting fields, typically the most numerous species of among the ground beetle in agricultural ecosystems (Kryzhanovskij et al., 1995; Hurka, 1996; Freude et al., 2004; Kataev and Liang, 2015). The biology of *H. rufipes* in natural conditions has been studied in some detail (Lindroth, 1986; Midtgaard, 1999; Porhajašova et al., 2009; Harrison and Gallandt, 2012). *H. rufipes* consumes agricultural pests, and also causes damage to cereal cultures. *H. rufipes* is usually found in cultivated lands, pastures, in gardens, in polluted areas, in ruderal communities (Lindroth, 1986; Davies, 1953). In most habitats, *H. rufipes* lives together with 3–7 species of the *Harpalus* genus, generally being numerically dominant and attaining the maximum size among the entire group of ground beetles with a mixed (vegetative and animal) diet (Thomas et al., 2001). The life-cycle of *H. rufipes* varies (Matalin, 2007): in the north of its range, a generation develops over two years, in the south part – during one year. Imagoes are seen from late March – April to late September – November. Oviposition takes place from early Mach to July. In the two year development cycle, larvae and imagoes hibernate (Lindroth, 1986).

In spring and in early summer, *H. rufipes* migrates over quite large distances, moving 10–15 m a day. H. rufipes can make significant migrations by land and by air, with clusters of dozens and hundreds of individuals per square meter in areas with optimum hygrothermal regimes and concentrations of trophic objects (vegetative and animal). In the areas, where individuals concentrate, they can significantly affect plantings of agricultural crops (Lindroth, 1986; Currie et al., 1996). Studying the trophic chains between this species and seeds of different plant species is valuable agriculturally and scientifically for developing the methods of general calculation of the population of any species in an agrocenosis. Selectively consuming seeds, the beetle can cause a much stronger effect upon the structure of a phytocoenosis than it would by consuming the vegetative parts of plants (Honek et al., 2003; Saska et al., 2010). On the other hand, it is possible that individual preferences exist among different individuals within populations (Korolev and Brygadyrenko, 2014), therefore the availability of certain types of food is interesting for

studying intra-populational trophic and morphological polymerphism of a *H. rufipes* population (Brygadyrenko and Reshetniak, 2014a).

In the conditions of steppe zones, beetles are common in forest plantations and natural forests of different types Brygadyrenko (2014, 2015). Consuming seeds of different plant species and invertebrates of different species (Monzo et al., 2011; Reshetniak and Brygadyrenko, 2013), they are able to survive through unfavorable periods of droughts, when they concentrate on the edges of grain crop fields and limit the seed yield both for cultivated cereals and weeds in the fields (Faly and Brygadyrenko, 2014; Faly et al., 2017). The factors which cause the imagoes of this species to migrate (including mass migrations) have been insufficiently studied (Midtgaard, 1999), but certainly apart from beetles' activity related to mating and oviposition in the most favorable conditions, the main factor is searching for a sufficient amount of seeds of optimum quality and of optimum species composition, including in agrocoenoses (Zhang et al., 1997; Hartke et al., 1998; Porhajašova et al., 2009; Bohan et al., 2011; Harrison and Gallandt, 2012). Clusters of *H. rufipes* imagoes attract a great number of predators (Thiele, 1977; Churchfield et al., 1991), which drives the movement of energy in ecosystems further up the trophic chains.

Field studies have indicated a high extent of infection of *H. rufipes* with several species of gregarines (Brygadyrenko and Reshetniak, 2016). The influence of the dietary components of different beetle individuals upon these species of protozoan parasites remains unstudied. It is another interesting and important practical research area where microscopic identification of the beetles' diet components has a significant value. Experiments on seed consumption by *H. rufipes* have been conducted for a large spectrum of agricultural crops (Hartke et al., 1998; Shearin et al., 2008; Brygadyrenko and Reshetniak, 2014b). The seeds of plants are the main source of energy for *H. rufipes*, which the beetle specifically searches for. For example, *H. rufipes* selectively eats out the seeds of strawberries (Briggs, 1965). The species provides great interest for studying the process of breakdown of starch in the intestines of polyphage insects.

Therefore, the objective of this paper is to evaluate the possibility of determining the content of the diet of *H. rufipes* using the visual characteristics of their intestinal content in laboratory conditions.

Materials and methods

H. rufipes individuals were collected using pitfall traps in August 2015 in corn fields around Dnipro (central part of Ukraine). The beetles were collected from a population with a low level of gregarine infection, and indeed not a single gregarine specimen was found during the course of the experiment. 50 *H. rufipes* individuals were used in the research. The beetles were put in separate containers (to prevent cannibalism) with no food, but with access to fresh water and were kept for two days for cleansing their intestines from undigested food remains. Then each *H. rufipes* imago was kept separately in a rectangular container (8 × 12 cm and 8 cm height) with one type of food for 5 days. Overall, the *H. rufipes* imagoes were fed with fruits and seeds of 10 species of food plants (5 beetles for each food plant species). Each beetle was offered one food type in excess quantity (Table 1).

Table 1
Brief characteristics of food substrates of *H. rufipes* beetles in the laboratory experiment

Family	Species	English name	Part of plant	Processing method
Poaceae	*Avena sativa* L.	Oat	fruits	solid
	Secale cereale L.	Rye		
	Hordeum vulgare L.	Barley		
	Sorghum drummondii (Steud.) Millsp. and Chase	Sudan grass		
	Panicum miliaceum L.	Proso millet		cleaned from shell
	Triticum aestivum L.	Bread wheat		solid
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum* Moench	Buckwheat		cleaned from shell
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris* L.	Sea beet		solid
Juglandaceae	*Juglans regia* L.	Persian walnut		cleaned from shell
Brassicaceae	*Sinapis arvensis* L.	Field mustard	seeds	solid

The numbered containers were arranged randomly on the laboratory table, which was not exposed to direct sunlight. The temperature in the laboratory fluctuated from +22 °C in the night to +28 °C in the day, relative air humidity was 38–54%. The entire laboratory part of the study was completed in 5 days, from 08–13.08.2015 (in the period of maximum mobility of the beetles common in Ukraine's steppe zone).

The intestines of the beetles were removed and placed on microscopic glass in physiological solution. Then 5–6 transversal incisions by scalpel were made, extruding the content of the middle section of intestine. The elements of digested food were stained using Lugol's iodine for detailed visualization of starch granules.

For comparison of the intestinal content with standard samples, the samples of all the fruits and seeds used in the experiment were ground in a porcelain mortar, then placed on the microscopic glass in the physiological solution heated to 36 °C with fermentative preparation from the human pancreas. The preparation was also stained using Lugol's solution. The control samples of raw fruits and seeds were also ground in a porcelain mortar, and then put on a microscopic glass in physiological solution and stained in a similar way.

The studied material was photographed using a digital camera with 5 megapixel resolution. The observations were made using a microscope with ×5, ×10 magnification and ×40 planochromatic microscope objectives.

Results

No differences were found among the five specimens in each group which consumed a particular plant species, the content of their intestine being monotypic. However, significant differences were found in intestinal content of the beetles which were fed with different types of food (Fig. 1–4). Starch grains in the content of the middle section of the beetles' intestine and in the preparation treated with human digestive enzymes did not significantly differ in form or in size.

Starch granules in wheat seeds are oval, 2–5 µm in diameter (Fig. 1*a–c*). By contrast, starch granules of rye are on average larger (3–7 µm), most often round (Fig. 1*d–f*). Starch granules of barley are smaller, most often round rather than oval (Fig. 1*g–i*). Fermentative preparation breaks down granules of these cereals more intensively than the enzymes of *H. rufipes* intestines.

Starch granules of oats (Fig. 2*a–c*) are much smaller than the granules of the above-mentioned cereals (0.7–1.8 µm). Starch granules of millet (Fig. 2*d–f*) are larger (1.5–2.8 µm). Starch granules of sorghum (Fig. 2*g–i*) are the same size as starch granules of wheat – 2.0–4.5 µm. In the beetles' intestines they were not affected compared with the preparation affected the enzymes of vertebrate animals.

The starch granules of buckwheat (rhombic, 2.5–4.0 µm length, Fig. 3*a–c*) and mustard (irregular shape, 1.5–5.0 µm, Fig. 3*d–f*) remained unaffected in the intestines of *H. rufipes*. Starch granules in the seeds of beet (rhombic, 2.5–4.0 µm length, Fig. 3*g–i*) affected by enzymes of *H. rufipes* intestines became deformed and fragmented, often only small particles of them were left.

Seeds with high fat content (for example Persian walnut) were digested poorly in the intestines (Fig. 4) of *H. rufipes* beetles. Drops of fat (more than 10–15 µm in length) were visible around separate particles, which impeded their digestion.

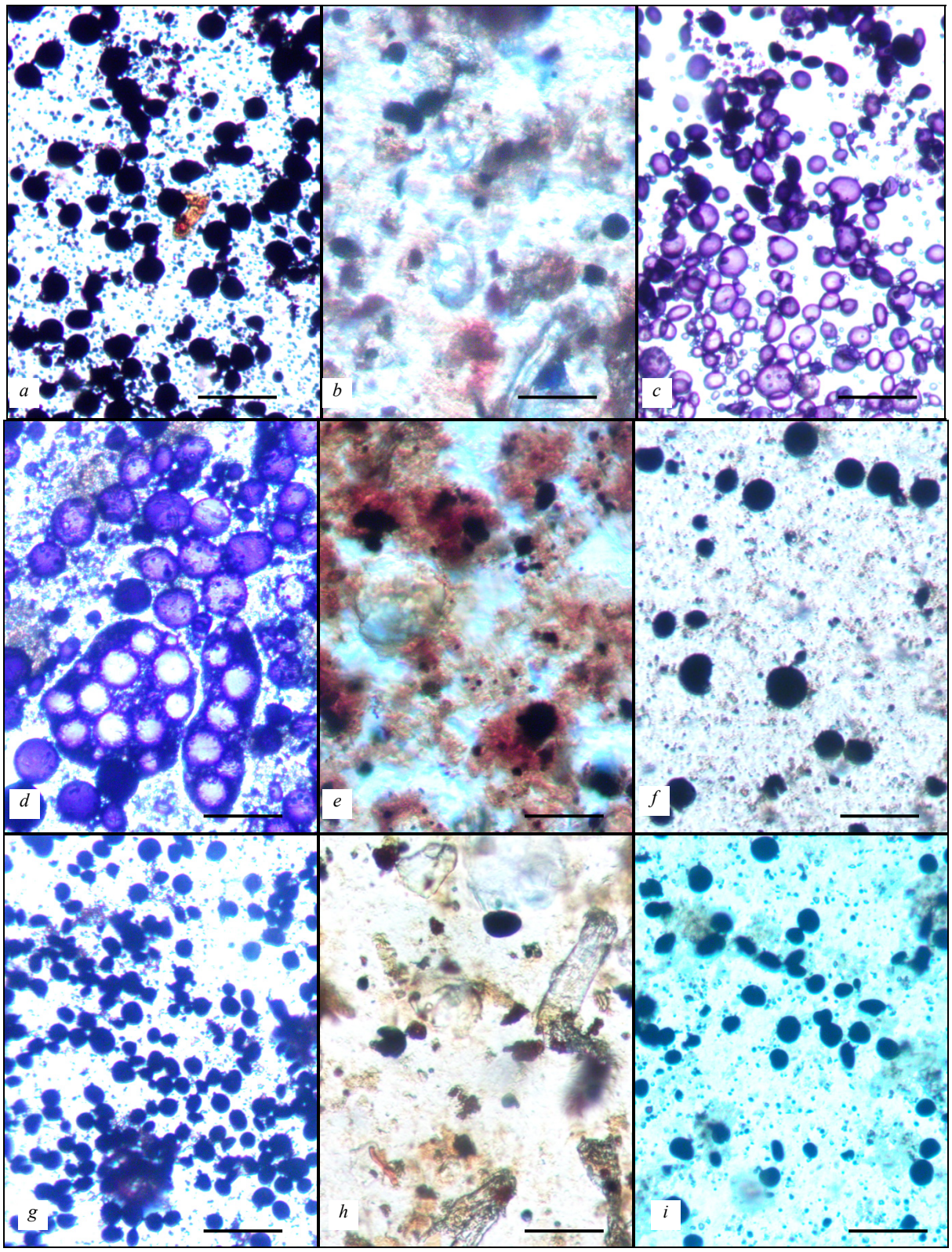


Fig. 1. Influence of fermentative preparation from the human pancreas and intestinal enzymes of *H. rufipes* upon the seeds of wheat (*a–c*), rye (*d–f*) and barley (*g–i*): *a*, *d*, *g* – ground seeds, *b*, *e*, *h* – ground seeds processed using fermentative preparation, *c*, *f*, *i* – seeds taken out of the middle section of intestines of *H. rufipes*; staining on all preparations was done with Lugol's solution; bar – 10 µm

Discussion

In our previous research we analysed the digestion of different plant foods by *H. rufipes* (Brygadyrenko and Reshetniak, 2014b) and found that fat – rich foods were consumed less and caused a decrease in the beetles' body mass. By using food mixtures containning several species of plant foods we found the optimum combination for food consumption and increase in the beetles' body mass – for the most efficient digestion of food. The current research is a continuation of our previous series of experiments on finding optimal conditions for keeping beetles in a laboratory, including the provision of artificial types of diet (Reshetniak and Brygadyrenko, 2013). In the photographs of the intestinal content of the beetles which are fed on the seeds of Persian walnut (Fig. 4) fat drops around food particles could be clearly distinguished, which impeded the beetles' normal digestive process.

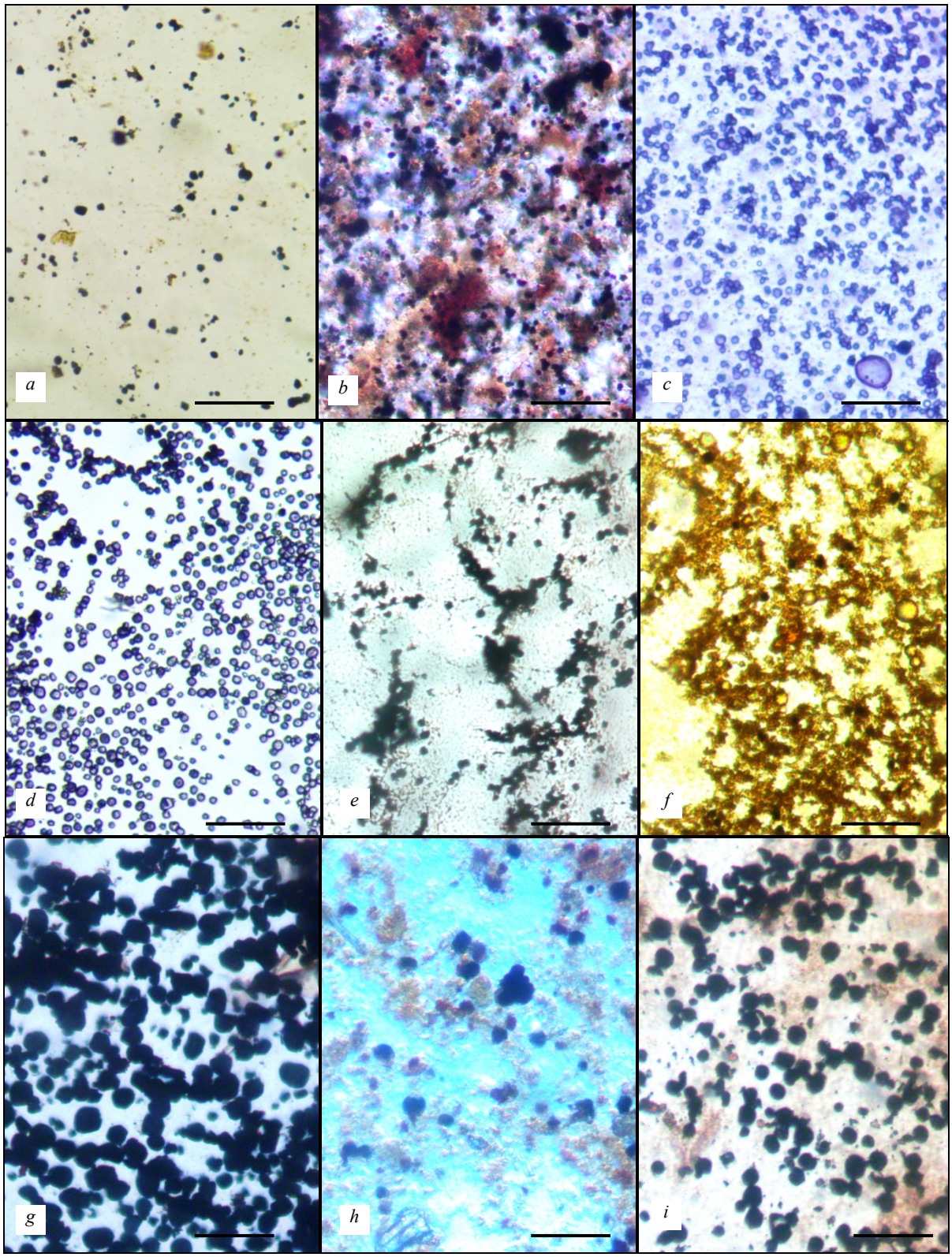


Fig. 2. Influence of fermentative preparation from the human pancreas and intestinal enzymes of *H. rufipes* upon the seeds of oat (*a–c*), millet (*d–f*) and sorghum (*g–i*): *a*, *d*, *g* – ground seeds, *b*, *e*, *h* – ground seeds processed using fermentative preparation, *c*, *f*, *i* – seeds taken out of the middle section of intestines of *H. rufipes*; staining on all preparations was done with Lugol's solution; bar – 10 µm

The second aspect of this research was the influence of the structure of the content of the central section of the intestine of *H. rufipes* on morphological variability of the single cell parasites which we often find in the course of our research (Reshetniak, 2015). We have found that gregarines change their morphology in different beetles (Brygadyrenko and Reshetniak, 2016). The morphology of gregarines is the main indicator in identifying their taxonomic position. However, we have found no research in the literature on the influence of the content of partially digested food on the morphological characteristics of gregarines, parasites of insects. Even though no gregarines were found in the intestines of the beetles collected, this article is the first attempt at visual assessment of the environment for gregarines in a laboratory experiment with the hosts feeding on a single type of food. *H. rufipes* is not a pure phytophage;

apart from plants, the beetles consume dozens of species of invertebrates, which impedes morphological study of the beetles' intestinal content.

Changes in the structure of starch grains occur in the rear part of the central section of the intestine of *H. rufipes*. Therefore, we found no morphometric changes in the form of starch grains.

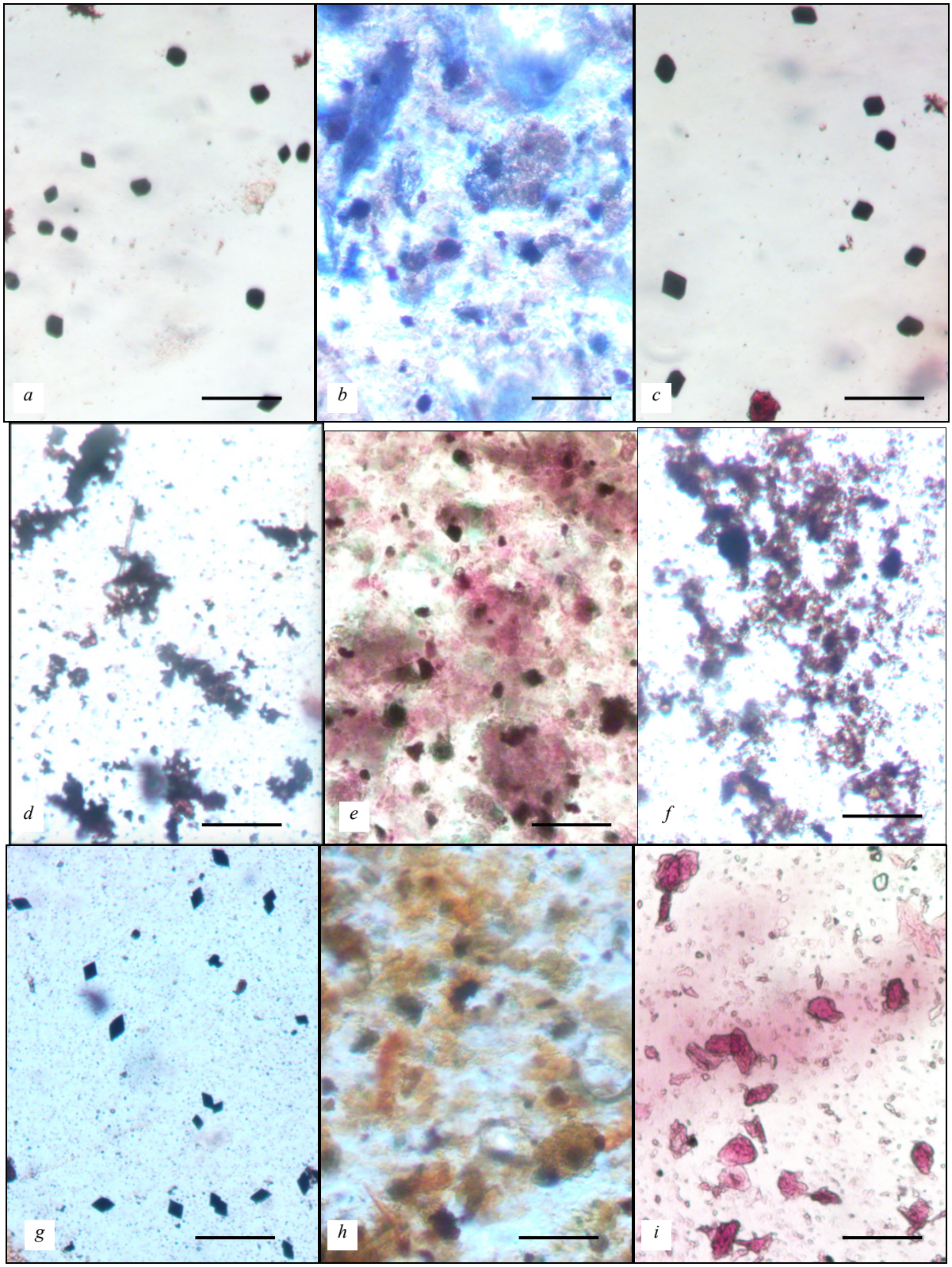


Fig. 3. Influence of fermentative preparation from the human pancreas and intestinal enzymes of *H. rufipes* upon the seeds of buckwheat (*a–c*), mustard (*d–f*) and beet (*g–i*): *a*, *d*, *g* – ground seeds, *b*, *e*, *h* – ground seeds processed using fermentative preparation, *c*, *f*, *i* – seeds taken out of middle section of the intestines of *H. rufipes*; staining on all preparations was done with Lugol's solution; bar – 10 µm

Identifying plant species whose traces were found on the stone tools of cavemen is only possible using the methods of identifying the peculiarities of morphometric and optical properties of starch granules. Starch is the main component of any plant seed – it can make up 70% of their dry weight (Arraiz et al., 2016). The starch from seeds of *Avena sativa* was resistant to the effect of different HCl concentrations at temperatures of 25 °C and 50 °C (Bet et al., 2016). Cleaned seeds of buckwheat also are a rich source of starch for *H. rufipes*

beetles (Dziadek et al., 2016). The results we obtained indicate that using microscopic analysis of beetles' intestinal content allows the qualitative composition of their diet to be identified, which enables the most significant components to be determined and the variation of the diet for different *H. rufipes* individuals to be assessed (Brygadyrenko and Reshetniak, 2014b).

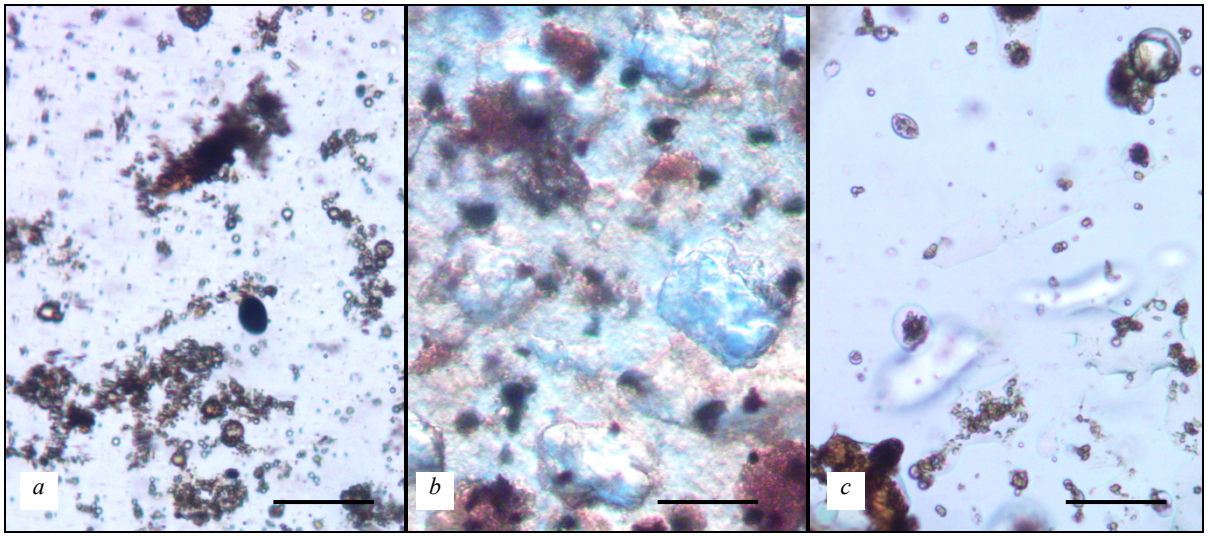


Fig. 4. Influence of fermentative preparation from the human pancreas and intestinal enzymes of *H. rufipes* upon the seeds of Persian walnut: *a* – ground seeds, *b* – ground seeds processed using fermentative preparation, *c* – seeds taken out of the middle section of intestines; staining on all preparations was done with Lugol's solution; bar – 10 µm

Conclusion

Usage of visual analysis of beetles' intestinal content is a possible additional method of analysis, which is promising for employment together with PCR-methods. Studying the trophic chains of *H. rufipes* and other species of ground beetles in particular agrocoenoses and natural ecosystems enables interesting mechanisms of regulation of trophic chains by polyphage-species to be determined. This research method will be a significant addition to parasitological methods of studying ground beetles' intestinal content when investigating their infection with gregarines, nematodes and other parasitic species.

References

Arráiz, H., Barbarin, N., Pasturel, M., Beaufort, L., Domínguez-Rodrigo, M., & Barboni, D. (2016). Starch granules identification and automatic classification based on an extended set of morphometric and optical measurements. Journal of Archaeological Science: Reports, 7, 169–179.

Bet, C. D., do Prado Cordoba, L., Ribeiro, L. S., & Schnitzler, E. (2016). Common vetch (*Vicia sativa*) as a new starch source: Its thermal, rheological and structural properties after acid hydrolysis. Food Biophysics, 11(3), 275–282.

Bohan, D. A., Boursault, A., Brooks, D. R., & Petit, S. (2011). National-scale regulation of the weed seedbank by carabid predators. Journal of Applied Ecology, 48(4), 888–898.

Briggs, J. B. (1965). Biology of some ground beetles (Col., Carabidae) injurious to strawberries. Bulletin of Entomological Research, 56(1), 79–93.

Brygadyrenko, V. V. (2015). Community structure of litter invertebrates of forest belt ecosystems in the Ukrainian steppe zone. International Journal of Environmental Research, 9(4), 1183–1192.

Brygadyrenko, V. V. (2016). The influence of moisture conditions on the structure of litter invertebrate communities in shelterbelt and plantation forests in Southern Ukraine. Journal of Bio-Science, 22, 77–88.

Brygadyrenko, V. V., & Reshetniak, D. Y. (2014a). Morphological variability among populations of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae): What is more important – the mean values or statistical pecularities of distribution in the population? Folia Oecologica, 41(2), 109–133.

Brygadyrenko, V. V., & Reshetniak, D. Y. (2014b). Trophic preferences of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) with regard to seeds of agricultural crops in conditions of laboratory experiment. Baltic Journal of Coleopterology, 14(2), 179–190.

Brygadyrenko, V. V., & Reshetniak, D. Y. (2016). Morphometric variability of *Clitellocephalus ophoni* (Eugregarinida, Gregarinidae) in the intestines of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae). Archives of Biological Sciences, 68(3), 587–601.

Churchfield, S., Hollier, J., & Brown, V. K. (1991). The effects of small mammal predators on grassland invertebrates, investigated by field exclosure experiment. Oikos, 60(3), 283–290.

Currie, C. R., Spence, J. R., & Niemela, J. (1996). Competition, cannibalism and intraguild predation among ground beetles (Coleoptera: Carabidae): A laboratory study. Coleopterists Bulletin, 50(2), 135–148.

Davies, M. I. (1953). The contents of the crops of some British carabid beetles. Entomologist's Monthly Magazine, 89, 18–23.

Dziadek, K., Kopeć, A., Pastucha, E., Piątkowska, E., Leszczyńska, T., Pisulewska, E., Witkowicz, R., & Francik, R. (2016). Basic chemical composition and bioactive compounds content in selected cultivars of buckwheat whole seeds, dehulled seeds and hulls. Journal of Cereal Science, 69, 1–8.

Faly, L. I., & Brygadyrenko, V. V. (2014). Patterns in the horizontal structure of litter invertebrate communities in windbreak plantations in the steppe zone of the Ukraine. Journal of Plant Protection Research, 54(4), 414–420.

Faly, L. I., Kolombar, T. M., Prokopenko, E. V., Pakhomov, O. Y., & Brygadyrenko, V. V. (2017). Structure of litter macrofauna communities in poplar plantations in an urban ecosystem in Ukraine. Biosystems Diversity, 25(1), 29–38.

Fawki, S., & Toft, S. (2005). Food preferences and the value of animal food for the carabid beetle *Amara similata* (Gyll.) (Col., Carabidae). Journal of Applied Entomology, 129, 551–556.

Freude, H., Harde, K.-W., & Lohse, G. A. (2004). Die Kafer Mitteleuropas. Band 2. Adephaga. 1. Carabidae (Laufkafer). Elsevier Gmbh, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Harrison, S., & Gallandt, E. R. (2012). Behavioural studies of *Harpalus rufipes* De Geer: An important weed seed predator in Northeastern US agroecosystems. International Journal of Ecology, 2012, 1–6.

Hartke, A., Drummond, F. A., & Liebman, M. (1998). Seed feeding, seed caching, and burrowing behaviors of *Harpalus rufipes* De Geer larvae (Coleoptera: Carabidae) in the Maine potato agroecosystem. Biological Control, 13(2), 91–100.

Honek, A., Martinkova, Z., & Jarosik, V. (2003). Ground beetles (Carabidae) as seed predators. European Journal of Entomology, 100(4), 531–544.

Hurka, K. (1996). Carabidae of the Czech and Slovak Republics. Kabourek, Zlin.

Kataev, B. M., & Liang, H. (2015). Taxonomic review of Chinese species of ground beetles of the subgenus *Pseudoophonus* (genus *Harpalus*) (Coleoptera: Carabidae). Zootaxa, 3920(1), 1–39.

Klimeš, P., & Saska, P. (2009). Larval and adult seed consumption affected by the degree of food specialization in *Amara* (Coleoptera: Carabidae). Journal of Applied Entomology, 134(8), 659–666.

Korolev, O. V., & Brygadyrenko, V. V. (2014). Influence of individual variation in the trophic spectra of *Pterostichus melanarius* (Coleoptera, Carabidae) on the adaptation possibilities of its population. Folia Oecologica, 41(1), 34–43.

Kryzhanovskij, O. L., Belousov, I. A., Kabak, I. I., Kataev, B. M., Makarov, K. V., & Shilenkov, V. G. (1995). A checklist of the ground-beetles of Russia and adjacent lands (Insecta, Coleoptera, Carabidae). Sofia-Moscow, Pensoft Publishers.

Lindroth, C. H. (1986). The Carabidae (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomologica Scandinavica, 15(2), 233–497.

Matalin, A. V. (2007). Typology of life cycles of ground beetles (Coleoptera, Carabidae) in Western Palaearctic. Entomological Review, 87(8), 947–972.

Midtgaard, F. (1999). Is dispersal density-dependent in carabid beetles? A field experiment with *Harpalus rufipes* (Degeer) and *Pterostichus niger* (Schaller) (Col., Carabidae). Journal of Applied Entomology, 123(1), 9–12.

Monzó, C., Sabater-Muñoz, B., Urbaneja, A., & Castañera, P. (2011). The ground beetle *Pseudophonus rufipes* revealed as predator of *Ceratitis capitata* in citrus orchards. Biological Control, 56(1), 17–21.

Porhajašova, J., Petřvalsky, V., Macak, M., & Urminska, J. (2009). Occurrence of species family Carabidae (Coleoptera) indepence on the input of organic matter into soil. Journal of Central European Agriculture, 9(3), 557–565.

Reshetniak, D. Y., & Brygadyrenko, V. V. (2013). Optimizacija raciona *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) v uslovijakh laboratornogo soderzhanija [Optimizing of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) diet under laboratory conditions]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 21(1), 38–42 (in Russian).

Reshetnyak, D. Y. (2015). Sezonnaja dinamika zarazhennosti *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) gregarinami v agrojekosisteme [Seasonal dynamic of the occurrence of the gregarines infection of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) in agroecosystem]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 23(2), 149–153 (in Russian).

Saska, P., Martinkova, Z., & Honek, A. (2010). Temperature and rate of seed consumption by ground beetles (Carabidae). Biological Control, 52(2), 91–95.

Shearin, A. F., Reberg-Horton, C. S., & Gallandt, E. R. (2008). Cover crop effects on the activity-density of the weed seed predator *Harpalus rufipes* (Coleoptera: Carabidae). Weed Science, 56(3), 442–450.

Thiele, H.-U. (1977). Carabid beetles in their environments. Springer-Verlag, Berlin.

Thomas, C. F. G., Parkinson, L., Griffiths, G. J. K., Garcia, A. F., & Marshall, E. J. P. (2001). Aggregation and temporal stability of carabid beetle distributions in field and hedgerow habitats. Journal of Applied Ecology, 38(1), 100–116.

Zhang, J., Drummond, F. A., Liebman, M., & Hartke, A. (1997). Phenology and dispersal of *Harpalus rufipes* De Geer (Coleoptera: Carabidae) in agroecosystems in Maine. Journal of Agricultural and Urban Entomology, 14(2), 171–186.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 384–388
doi: 10.15421/021759

Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine

M. D. Kukhtyn*, Y. V. Horyuk**, V. V. Horyuk**, T. Y. Yaroshenko***, O. I. Vichko*, O. S. Pokotylo*

**Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine*
***State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Ukraine*
****I. Y. Horbachevsky Ternopil State Medical Universi, Ternopil, Ukraine*

Article info

Received 07.07.2017
Received in revised form 12.08.2017
Accepted 15.08.2017

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ruska Str., 56, Ternopil, 46001, Ukraine. Tel.: +38-097-239-20-57. E-mail: kuchtynnic@gmail.com

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Schevchenko Str., 13, Kamianets-Podilskyi, 32300, Ukraine. Tel.: +38-097-661-79-64. E-mail: goruky@ukr.net

I. Horbachevsky Ternopyl State Medical University, Majdan Voli, 1, Ternopil, 46001, Ukraine. Tel.: +38-097-854-87-81. E-mail: yaroshenkotya@tdmu.edu.ua

Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. (2017). Biotype characterization of Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 384–388. doi: 10.15421/021759

Prevention of foodborne diseases is a priority for the world health system. In the process of manufacturing milk and dairy products, the most important factor compromising their safety is seeding with a conditionally pathogenic and pathogenic microflora. *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria* and other microorganisms that reproduce in dairy products without changing their organoleptic properties are a particular danger. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic, conditionally pathogenic microorganism that often contaminates raw milk and dairy products. The aim of the research presented in this article was to determine the dissemination of *S. aureus* in milk and milk products of household production in the western regions of Ukraine, to identify the biotypes of *S. aureus*, production of enterotoxins and the presence of methicillin-resistant strains. *S. aureus* was isolated on BD Baird-Parker Agar. The biotypes of *S. aureus* were determined according to Meer. The determination of MRSA was carried out on the chromogenic Agar chromID MRSA ("Biomerioux", Russia). The mecA gene was determined using the LightCycler MRSA Advanced Test with LightCycler 2.0 primer (Roche Molecular Biochemicals, Germany). To determine staphylococcal enterotoxins, the test system RIDASCREENSET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) was used. We isolated saprophyte staphylococci from milk of raw and dairy products in western regions of Ukraine in 82.7–97.4% of samples. *S. aureus* is much more rarely isolated from these dairy products, so it was isolated from sour cream at 62.8 ± 0.9%, from milk at 35.5 ± 1.3% and cottage cheese at 23.0 ± 1.6%. Of the most well known biotypes of *S. aureus* present in milk of raw and dairy products of domestic production, two ecological types were distinguished: human and cattle. In this case *S. aureus* var. *hominis* was isolated more often than in *S. aureus* var. *bovis*. This gives grounds to believe that the main source of contamination with milk staphylococci of raw and dairy products of domestic production is people. Enterotoxin type A, which causes foodborne toxemia, was produced by *S. aureus* in 40.0 ± 0.5% of cases. Consequently, home-produced dairy products can spread staphylococcal toxicity caused by *S. aureus* var. *hominis*. It was found that 17.8 ± 0.6% of *S. aureus* var. *hominis* were resistant to methicillin, which is 1.8 times greater than that of *S. aureus* var. *bovis*. This gives grounds to consider that there is a risk of MRSA infection to consumers of home-produced dairy products. All methicillin-resistant staphylococci studied produced enterotoxins.

Keywords: staphylococci; biotypes; MRSA; enterotoxins

Биотиповые характеристики золотистых стафилококков, выделенных из молока и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины

Н. Д. Кухтын*, Ю. В. Горюк**, В. В. Горюк**, Т. Я. Ярошенко***, О. И. Вичко*, О. С. Покотило*

**Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя, Тернополь, Украина*
***Подольский государственный аграрно-технический университет, Каменец-Подольский, Украина*
****Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского, Тернополь, Украина*

Молочные продукты домашнего производства, которые реализуются на рынках в западных регионах Украины, не исследуются по микробиологическим показателям в полном объеме. Поэтому периодически эта продукция становится причиной возникновения у людей различных пищевых отравлений. Чаще всего при употреблении молочных продуктов домашнего производства, которые реализуются без соблюдения санитарно-гигиенических требований, возникают стафилококковые токсикозы. Среди значительного количества видов

стафилококков энтеротоксины продуцирует в основном золотистый стафилококк. В статье приведены данные об обсемененности молока и молочных продуктов домашнего производства стафилококками, их биологическое происхождение, продукция энтеротоксинов, наличие метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA). Определено наличие золотистых стафилококков в молоке сыром в 35,5% случаев, в сметане и твороге – в 23,0–62,8% случаев. Биотипирование *S. aureus* показало, что из молока сырого человеческий эковар выделен в 56,5% случаев, из молочных продуктов (сметаны и творога) – 67,2–90,6%, а из рук продавцов – в 93,2%. Данные исследования указывают, что главный источник обсеменения молока и молочных продуктов золотистым стафилококком – люди, которые производят и реализуют продукцию. В значительно большем количестве определено наличие метициллин-резистентных культур у золотистого стафилококка человеческого биотипа по сравнению с биотипом крупного рогатого скота. 17,8% культур *S. aureus* var. *hominis* были устойчивы к метициллину, что в 1,8 раза больше по сравнению с культурами *S. aureus* var. *bovis*. Это дает возможность предполагать инфицирование потребителей молочных продуктов домашнего производства MRSA. Энтеротоксин типа А, который вызывает стафилококковый токсикоз у людей, продуцирует только золотистый стафилококк человеческого биотипа.

Ключевые слова: стафилококки; биотипы; MRSA; энтеротоксины

Введение

Профилактика заболеваний пищевого происхождения относится к приоритетным задачам системы здравоохранения во всем мире (Cremonesi et al., 2007; Wang et al., 2009; Ateba et al., 2010; Thaker et al., 2013; Basanisi et al., 2017). В процессе изготовления молока и молочных продуктов главным фактором опасности является обсеменение патогенной и условно-патогенной микрофлорой (Doulgeraki et al., 2017; Mehli et al., 2017). Особую опасность представляют сальмонеллы, кишечные палочки, листерии и другие микроорганизмы, которые размножаются в молочных продуктах, не меняя их органолептических свойств (Lowy, 1998). Золотистый стафилококк является оппортунистическим условно-патогенным микроорганизмом, который часто обсеменяет сырое молоко и молочные продукты (Jaber et al., 2015; Carfora et al., 2015; Basanisi et al., 2017).

Среди большого количества видов стафилококков в основном *S. aureus* продуцирует энтеротоксины типа А, вызывающие пищевой токсикоз (Cremonesi et al., 2007; Thaker et al., 2013; Habib et al., 2015; Al-Ashmawy et al., 2016; Macori et al., 2016). В то же время, энтеротоксигенные штаммы *S. aureus*, изолированные от людей, по некоторым свойствам отличаются от штаммов *S. aureus*, выделенных от животных. Поэтому определяют несколько эковаров (биотипов) *S. aureus* в зависимости от биологического происхождения: *S. aureus* var. *hominis*, *S. aureus* var. *avium*, *S. aureus* var. *canis*, *S. aureus* var. *bovis* (Fournier et al., 2008; Jaber, 2011; Bardiau et al., 2013). В Украине научных работ, посвященных изучению биотипов золотистого стафилококка, выделенных из молока и молочных продуктов, практически нет. Ученые ограничиваются констатацией факта наличия этих бактерий в молочных продуктах без определения источника заражения, что не дает возможности предпринимать целенаправленные профилактические меры.

Также актуальным остается изучение распространенности метициллин-резистентного стафилококка (MRSA) в молоке и молочных продуктах (Kwon et al., 2005; Crago et al., 2012; Wang et al., 2014; Doulgeraki et al., 2017; Hamid et al., 2017; Macori et al., 2017). Низкий уровень его выделения из продуктов питания в Украине не отражает реальной ситуации. Внимание уделяется информации о чувствительности культур к антибиотикам с целью проведения лечебно-профилактических мероприятий, в то же время, распространение энтеротоксигенных штаммов не исследуется.

Таким образом, цель работы – определить источник контаминации молока и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины золотистым стафилококком, его способности продуцировать энтеротоксины, исследовать его метициллин-резистентные штаммы, что даст возможность разработать новые подходы к оценке микробиологической безопасности этих продуктов за счет усовершенствования нормативно-методической базы контроля.

Материал и методы исследований

Исследована 71 проба молока сырого, 212 проб сметаны, 65 проб творога домашнего производства, которые реализовались на продовольственных рынках западных регионов Украины (Тернопольская, Хмельницкая, Львовская, Черновицкая области) и 57 смывов с рук продавцов этих продуктов. Выделено и идентифицировано 247 культур *S. aureus*.

Изоляция и идентификация золотистого стафилококка. Микробиологическую обработку образцов для выделения *S. aureus* проводили с использованием BD Baird-Parker Agar по стандартной методике. Десятикратные разведения проб продуктов высевали на чашки для первичной изоляции. Инкубировали в аэробных условиях в течение 42–48 ч при температуре 36 ± 1 °C и делали подсчет через 18–24 и 42–48 часов.

Морфологические характеристики. Микроскопический препарат изготавливали с изолированной культуры на чистом предметном стекле и окрашивали по Граму. Окрашенный мазок исследовали под микроскопом: наблюдали грамположительные сферические клетки, похожие на гроздь винограда, расположенные в нескольких плоскостях.

Биохимическое исследование. Для подтверждения наличия *S. aureus* использовали тесты на каталазу, коагулазу, оксидазу, на ферментацию D-маннитола, продукцию ДНКазы, ацетоина (Maurin, 2004).

Определение биотипа. У культур, принадлежащих к *S. aureus*, биотип определяли используя схему: определение цвета пигмента, наличие бета-гемолиза, активность коагулазы в бычьей плазме, рост на среде с кристаллическим фиолетовым (Mayer, 1999).

Определение метициллин-резистентных стафилококков (MRSA). Для определения MRSA использовали хромогенную среду Агар chromID MRSA («Biomerioux», Россия). Определение гена mecA проводили с использованием тестовой системы LightCycler MRSA Advanced Test с помощью праймеров LightCycler 2.0 («Roche Molecular Biochemicals», Германия).

Обнаружение стафилококковых энтеротоксинов (SE). Для выявления энтеротоксинов штаммы культивировали в 10 см^3 питательного бульона («Merck», Германия) в течение суток в аэробных условиях при 37 ºС. Супернатанты бактериальной культуры собирали центрифугированием при 4 000 об./мин. в течение 10 мин. Для определения энтеротоксинов стафилококка SEA, SEB, SEC, SED и SEE использовали тест-систему Ridascreen®Set A, B, C, D, E («R-Biopharm AG», Германия). Анализ проводили согласно с методическими указаниями 4.2. 2429 – 08 «Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах». Средний нижний предел обнаружения анализа составлял 0,1 мг/см^3. Все эксперименты выполнялись в трехкратном повторении.

Результаты

Исследовано молоко сырое и молочные продукты домашнего производства, реализуемые на рынках западных регионов Украины, на обсемененность представителями рода *Staphylococcus* и его коагулазоположительным видом – *S. aureus* (табл. 1). Бактерии рода *Staphylococcus* по частоте выделения можно отнести к специфической микрофлоре молока сырого и молочных продуктов домашнего производства, так как они выделялись в 82,7–97,4% случаев. В то же время *S. aureus* в этих продуктах обнаруживался значительно реже. Чаще всего его выделяли из сметаны: 62,8% случаев, что в 1,8 раза ($P < 0,05$) больше по сравнению с пробами молока сырого и в 2,7 раза больше ($P < 0,05$) по сравнению с творогом.

В молоке сыром и молочных продуктах домашнего производства (табл. 2) циркулируют два биотипа золотистого стафилококка: *S. aureus* var. *bovis* (биотип крупного рогатого скота) и *S. aureus* var. *hominis* (человеческий биотип). Однако доля их выделения из данных продуктов разная. Из молока сырого выделяли 43,5% культур золотистого стафилококка, которые отнесены к биотипу крупного рогатого скота, а 56,5% – к человеческому эковару. Из сметаны выделялось 67,2% культур *S. aureus* var. *hominis*, что в 2,0 раза (P < 0,05) больше, по сравнению со *S. aureus* var. *bovis*. С творога, в основном, выделялись бактерии *S. aureus* var. *hominis*. Их количество было в 1,6 раза (P < 0,05) больше, чем в молоке. Количество бактерий *S. aureus* var. *bovis* в твороге было меньше в 4,6 раза (P < 0,05) по сравнению с молоком. Доминирование человеческого эковара в твороге связано с обсеменением его после изготовления (при упаковке и реализации). Специфика изготовления творога в домашних условиях заключается в длительной термической обработке сквашенного молока, при которой погибает практически вся вегетативная микрофлора, в том числе и золотистый стафилококк. На руках продавцов преобладал человеческий биотип, который выделялся в 93,2 ± 1,4% случаев, это указывает на то, что люди – главный источник обсеменения молочных продуктов золотистыми стафилококками.

Таблица 1
Обсемененность стафилококками молока и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины (%, n = 348)

Объект исследований	Частота выделения стафилококков	
	Staphylococcus spp.	*S. aureus*
Молоко сырое, n = 71	97,4	35,5
Сметана, n = 212	98,7	62,8*
Творог, n = 65	82,7	23,0

Примечание: *Staphylococcus spp*. – все виды рода *Staphylococcus*; * – P < 0,05 по сравнению с пробами молока сырого и творога.

Таблица 2
Биотипы *S. aureus*, выделенные из молока и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины (%, n = 247)

Объект исследований	Исследовано культур, n	Биотипы *Staphylococcus aureus*	
		S. aureus var. *hominis*	*S. aureus* var. *bovis*
Молоко сырое	51	56,5	43,5
Сметана	97	67,2*	32,8
Творог	43	90,6#	9,4
Смывы с рук продавцов	56	93,2	6,8Δ

Примечание: *S. aureus* var. *hominis* – человеческий биотип (эковар); *S. aureus* var. *bovis* – биотип (эковар) крупного рогатого скота; * – P < 0,05 по сравнению с *S. aureus* var. *bovis*; # – P < 0,05 по сравнению с молоком; Δ – P < 0,05 по сравнению с молоком.

Таким образом, полученные данные биологического типирования золотистого стафилококка, который выделяли из молока сырого и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины, указывают на наличие постоянного источника обсеменения молочных продуктов бактериями *S. aureus* var. *hominis* от производителей и продавцов этих продуктов. Это требует постоянного микробиологического обследования производителей и продавцов для выявления их носительства и лечения с целью профилактики пищевых токсикозов стафилококковой этиологии.

Определение штаммов стафилококков, устойчивых к метициллину (табл. 3), показало, что оба биотипа резистентны к антибиотикам бета-лактамной группы: 17,8% культур *S. aureus* var. *hominis* устойчивы к метициллину, что в 1,8 раза (P < 0,05) больше по сравнению с культурами *S. aureus* var. *bovis*. Это дает основание полагать о возможности инфицирования потребителей молочных продуктов домашнего производства MRSA.

Стафилококки продуцируют шесть антигенных вариантов энтеротоксина: A, B, C, D, E и F. В основном пищевой токсикоз вызывает энтеротоксин типа A, реже – D (Normanno et al., 2007). Нами определены продукция энтеротоксинов и их типы у бактерий *S. aureus* var. *bovis* и *S. aureus* var. *hominis* (табл. 4).

Таблица 3
Частота выделения метициллин-резистентных штаммов золотистого стафилококка из молока и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины (%, n = 247)

Биотипы *Staphylococcus aureus*	Исследовано культур		Количество *MRSA*	
	n	%	n	%
S. aureus var. hominis	185	100	33	17,8*
S. aureus var. bovis	62	100	6	9,6

Примечание: MRSA – метициллин-резистентный золотистый стафилококк; * – P < 0,05 по сравнению с *S. aureus* var. *bovis*.

Таблица 4
Типы энтеротоксинов, которые продуцировали золотистые стафилококки, выделенные из молока и молочных продуктов в западных регионах Украины (%, n = 247)

Типы энтеротоксинов	*S. aureus var. hominis*		*S. aureus var. bovis*	
	иследовано культур, %	в том числе *MRSA*, %	иследовано культур, %	в том числе *MRSA*, %
энтеротоксинов не продуцируют	42,7	0	51,2	0
SEA	40,0	85,1	0	0
SEB	0	0	0	0
SEC	12,4*	4,3	9,7	33,3
SED	4,9*	11,1	12,9	12,5
SEC/D	0	0	24,2	60,0

Примечание: SEA – энтеротоксины типа A, SEB – энтеротоксины типа B, SEC – энтеротоксины типа C, SED – энтеротоксины типа D, SEC/D – смешанные энтеротоксины типа C и D; * – P < 0,05 по сравнению с *S. aureus* var. *bovis*.

Количество штаммов *S. aureus* var. *hominis* и *S. aureus* var. *bovis*, которые вообще не продуцировали энтеротоксинов, составляла соответственно 42,7% и 51,6%. Способность продуцировать энтеротоксин типа A обнаружили только в 40,0% бактерий *S. aureus* var. *hominis*. Количество бактерий *S. aureus* var. *hominis*, которые продуцировали энтеротоксин типа C, составляло 12,4%, что в 1,3 раза (P < 0,05) больше по сравнению со *S. aureus* var. *bovis*. Энтеротоксин типа D бактерии *S. aureus* var. *hominis* продуцировали в 2,6 раза (P < 0,05) меньше, чем бактерии *S. aureus* var. *bovis*. Смешанные типы энтеротоксинов C/D продуцировали только бактерии *S. aureus* var. *bovis* в 24,2% случаев. Все выделенные MRSA – энтеротоксигенные. Таким образом, энтеротоксин типа A, который в основном вызывает пищевое отравление, продуцирует в молоке и молочных продуктах золотистый стафилококк человеческого происхождения.

Обсуждение

Почти 100% наличие бактерий рода *Staphylococcus* в пробах молочных продуктов домашнего производства можно объяснить тем, что эти молочные продукты изготавливаются из сырого термически не обработанного молока коров с нарушением санитарно-гигиенических норм и правил. Стафилококки составляют так называемую резидентную (полезную) микрофлору кожи вымени коров и почти всегда их можно выделить из сырого молока (Febler et al., 2010; Anderson et al., 2012; Mahmmod et al., 2017, Kukhtyn et al., 2017). Поэтому сапрофитные стафилококки часто выделяются из необработанных молочных продуктов домашнего производства. Золотистые стафилококки, по данным исследований, значительно реже выделяются с поверхности кожи сосков и молочной железы у здоровых коров. Около 20% клинически здоровых коров являются их носителями на поверхности кожи сосков и до 5% – в молочной железе. Однако их

количество существенно возрастает в сыром молоке при мастите, наличии ран, царапин и эрозий кожи сосков (Graber et al., 2009; Anderson et al., 2012; Carfora et al., 2015). Таким образом, некоторая обсемененность молочных продуктов домашнего производства сапрофитными коагулазоотрицательными стафилококками – это закономерность, которую нельзя избежать, так как они присутствуют на коже сосков коров и в молоке сыром. В то же время выделение золотистого стафилококка, в частности, биотипа крупного рогатого скота, будет свидетельствовать о наличии заболеваний кожи вымени или молочной железы коров.

Из наиболее известных биотипов золотистого стафилококка (*S. aureus* var. *hominis*, *S. aureus* var *bovis*, *S. aureus* var. *avium*, *S. aureus* var. *canis*) (Fournier et al., 2008; Jaber, 2011; Bardiau et al., 2013), с молока сырого и молочных продуктов домашнего производства выделяли два эковара: человеческий и крупного рогатого скота. При этом *S. aureus* var. *hominis* выделяли чаще по сравнению со *S. aureus* var *bovis*. Это дает основание считать, что главным источником обсеменения стафилококками молока сырого и молочных продуктов домашнего производства являются люди, которые не соблюдают надлежащей гигиены и санитарии во время производственных процессов: доения коров, первичной обработки молока, изготовления и реализации молочных продуктов. Такая значительная обсемененность коагулазоположительными стафилококками не может остаться без внимания из-за возможности их размножаться и продуцировать энтеротоксины, которые способны вызывать пищевые отравления. Считается, что молочные продукты контаминированны преимущественно стафилококками биотипа крупного рогатого скота (Normanno et al., 2007; Jaber et al., 2015; Bharathy et al., 2015), в то же время большинство случаев стафилококковых пищевых токсикозов вызывают энтеротоксины типа A и D, которые продуцируют стафилококки человеческого биотипа (Davis et al., 2004; Argudin et al., 2010; Doulgeraki et al., 2017).

Считается, что мультирезистентный золотистый стафилокок является одним из наиболее распространенных возбудителей нозокоминальных инфекций в Европе и мире (Paterson et al., 2014; Sergelidis and Angelidis, 2015; Basanisi et al., 2017). В настоящее время в Украине нет научных результатов исследований о распространенности этого возбудителя в молочных продуктах домашнего производства. Проведенные нами исследования показали, что оба биотипа *S. aureus* var. *hominis* и *S. aureus* var. *bovis* были резистентными к антибиотикам бета-лактамной группы. В 17,9% случаев MRSA имел человеческое происхождение, что в 1,8 раза больше по сравнению с биотипом крупного рогатого скота. Это дает основание полагать о возможности инфицирования потребителей молочных продуктов домашнего производства MRSA, поскольку все исследованные культуры MRSA продуцировали энтеротоксины.

Проведенные исследования показали, что энтеротоксин типа A продуцировал только *S. aureus* var. *hominis*. Среди всех энтеротоксинов тип A выделялся в 40,1% случаев. Культуры стафилококков биотипа крупного рогатого скота продуцировали, в основном, токсины типов C, D и C/D, что, скорее всего, свидетельствует о проявлениях клинических и субклинических форм маститов у коров (Febler et al., 2010; Habib et al., 2015). Следовательно, молочные продукты домашнего производства могут быть причиной возникновения стафилококкового токсикоза, который вызывает *S. aureus* var. *hominis*.

Полученные новые данные об источниках обсеменения молока и молочных продуктов домашнего производства энтеротоксигенными штаммами золотистого стафилококка человеческого биотипа указывают на необходимость комплексного подхода к разработке микробиологических критериев безопасности. Информация о возможных источниках обсеменения необработанных молочных продуктов домашнего производства золотистым стафилококком и их контроль являются залогом эффективной профилактики пищевых токсикозов стафилококковой этиологии.

Выводы

Из молока и молочных продуктов домашнего производства в западных регионах Украины выделяются два биотипа золотистого стафилококка: *S. aureus* var. *hominis* и *S. aureus* var. *bovis*. Золотистый стафилококк человеческого биотипа содержится в этих продуктах в значительно большем количестве и попадает в них с рук производителей и продавцов при несоблюдении правил гигиены. 17,8% культур *S. aureus* var. *hominis* устойчивы к метициллину, что в 1,8 раза ($P < 0,05$) больше по сравнению с культурами *S. aureus* var. *bovis*. Энтеротоксин типа A, который вызывает стафилококковый токсикоз, продуцируют только культуры *S. aureus* var. *hominis*. Учитывая установленные новые источники обсеменения золотистым стафилококком молочных продуктов домашнего производства и с целью профилактики пищевых токсикозов стафилококковой этиологии, необходимо усовершенствовать систему контроля этих продуктов от изготовления до реализации.

References

Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T. (2016). Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products. Foodborne Pathogens and Disease, 13(3), 156–162.

Anderson, K. L., Lyman, R., Moury, K., Ray, D., Watson, D. W., & Correa, M. T. (2012). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. Journal of Dairy Science, 95(9), 4921–4930.

Argudin, M. A., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins, 2, 1751–1773.

Ateba, C. N., Mbewe, M., Moneoang, M. S., & Bezuidenhout, C. C. (2010). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa. South African Journal of Science, 106(11–12), 1–6.

Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J. N., Taminiau, B., Mainil, J. G., & Ote, I. (2013). Genotypic and phenotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. Letters in Applied Microbiology, 57(3), 181–186.

Basanisi, M. G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, I., & La Salandra, G. (2017). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. Food Microbiology, 62, 141–146.

Bharathy, S., Gunaseelan, L., Porteen, K., & Bojiraj, M. (2015). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milk: Can it be a potential public health threat. International Journal of Advanced Research, 3(2), 801–806.

Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Sorbara L., Dottarelli S., Battisti A., & Amatiste, S. (2015). Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. International Dairy Journal, 42, 12–15.

Crago, B., Ferrato, C., Drews, S. J., Svenson, L. W., Tyrrell, G., & Louie, M. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. Food Microbiology, 32(1), 202–205.

Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M., & Castiglioni, B. (2007). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. Letters in applied microbiology, 45(6), 586–591.

Davis, K. A., Stewart, J. J., Crouch, H. K., Florez, C. E., & Hospenthal, D. R. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. Clinical Infectious Diseases, 39(6), 776–782.

Doulgeraki, A. I., Di Ciccio, P., Ianieri, A., & Nychas, G. J. E. (2017). Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: A review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. Research in Microbiology, 168(1), 1–15.

Febler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S., & Schwarz, S. (2010). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST-398 from cases of bovine mastitis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(4), 619–625.

Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Stener, A., & Graber, H. U. (2008). Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Research in Veterinary Science, 85, 439–448.

Graber, H. U., Naskova, J., Studer, E., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Brechbühl, M., Schaeren, W., A. Steiner, A., & Fournier, C. (2009). Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. Journal of Dairy Science, 92, 1442–1451.

Habib, F., Rind, R., Durani, N., Bhutto, A. L., Buriro, R. S., Tunio, A., Aijaz, N., Lakho, S. A., Bugti, A. G., & Shoaib, M. (2015). Morphological and cultural characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from different animal species. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 5(2), 15–26.

Hamid, S., Bhat, M. A., Mir, I. A., Taku, A., Badroo, G. A., Nazki, S., & Malik, A. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. Veterinary World, 10(3), 363–367.

Jaber, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., & Stephan, R. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. Journal of Dairy Science, 98, 2944–2948.

Jaber, N. N. (2011). Isolation and biotyping of *Staphylococcus aureus* from white cheese in Basrah local markets. Basrah Journal of Veterinary Research, 10(2), 55–66.

Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Pokotylo, O. S., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Pokotylo, O. O. (2017) Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety, 3(1), 12–16.

Kwon, N. H., Park, K. T., Moon, J. S., Jung, W. K., Kim, S. H., Kim, J. M., Hong, S. K., Koo, H. C., Joo, Y S., & Park, Y. H. (2005). Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC mec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56(4), 624–632.

Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. New England Journal of Medicine, 339(8), 520–532.

Macori, G., Bellio, A., Bianchi, D. M., Gallina, S., Adriano, D., Zuccon, F., Chiesa, F., Acutis, P. L., Casalinuovo, F., & Decastelli, L. (2016). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolate responsible for staphylococcal poisoning incident in homemade food. Italian Journal of Food Safety, 5(2), 5736.

Macori, G., Giacinti, G., Bellio, A., Gallina, S., Bianchi, D. M., Sagrafoli, D., Marri, N., Giangolini, G., Amatiste, S., & Decastelli, L. (2017). Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the ovine dairy chain and in farm-related humans. Toxins, 9(5), 161.

Mahmmod, Y. S., Klaas, I. C., & Enevoldsen, C. (2017). DNA carryover in milk samples from routine milk recording used for PCR-based diagnosis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. Journal of Dairy Science, 100(7), 5709–5716.

Maurin, F., Mazerolles, G., Noel, Y., & Kodjo, A. (2004). Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. Revue de Medecine Veterinaire, 155(2), 92–96.

Mayer, S. (1999). Eingenschaften von aus Kuhmilch isolaten Staphylokokken in Hinblick auf die Beurteilung von Milch. Milchwissenschaft, 30, 607–608.

Mehli, L., Hoel, S., Thomassen, G. M. B., Jakobsen, A. N., & Karlsen, H. (2017). The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. International Dairy Journal, 65, 20–27.

Normanno, G. L., Salandra, A., Dambrosio, N. C., Quaglia, M., Corrente, A., Parisi, G., Santagada, A., Firinu, E., & Crisetti, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, 115(3), 290–296.

Paterson, G. K., Harrison, E. M., & Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 22(1), 42–47.

Sergelidis, D., & Angelidis, A. S. (2017). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A controversial food borne pathogen. Letters in Applied Microbiology, 64(6), 409–418.

Thaker, H. C., Brahmbhatt, M. N., Nayak, J. B., & Thaker, H. C. (2013). Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. Veterinary World, 6(1), 10–13.

Wang, S. C., Wu, C. M., Xia, S. C., Yong-Hua, Q. I., Xia, L. N., & Shen, J. Z. (2009). Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major diary production regions of China. Veterinary Microbiology, 137(3), 276–281.

Wang, X., Li, G., Xia, X., Yang, B., Xi, M., & Meng, J. (2014). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China. Foodborne Pathogens and Disease, 11(4), 281–286.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 389–396
doi: 10.15421/021760

Left ventricular diastolic function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome and obesity

I. A. Andreieva, O. I. Tokarenko

Zaporizhia Medical Academy of Post-Graduate Education Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, Ukraine

Article info

Received 29.06.2017
Received in revised form 10.08.2017
Accepted 13.08.2017

Zaporizhia Medical Academy of Post-Graduate Education Ministry of Health of Ukraine, bul'var Vintera, 20, Zaporizhia, 69000, Ukraine.
Tel. +38-061-279-16-38.
E-mail: andryana08@gmail.com

Andreieva, I. A., & Tokarenko, O. I. (2017). Left ventricular diastolic function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome and obesity. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 389–396. doi: 10.15421/021760

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a chronic disease characterized by recurrent episodes of complete or partial obstruction of the upper airways during sleep and results in sleep fragmentation, night hypoxemia, and daytime sleepiness. The aim of this study was to investigate the state of left ventricular diastolic function in patients with first diagnosed COAS and obesity and to define the determinants of diastolic dysfunction in this category of patients. There were 46 patients (33 men and 13 women) with OSAS and obesity and 52 patients with obesity without OSAS enrolled in the study. The control group included 22 practically healthy individuals. Each patient underwent assessment of body mass index (BMI), 24-hour ambulatory blood pressure monitoring, cardiorespiratory monitoring, transthoracic echocardiography. We found that patients with OSAS and obesity had significant impairment of diastolic function in comparison with patients with obesity without OSAS, which manifested itself in decreasing of E/A ratio, increasing deceleration time and increasing isovolumic relaxation time. Increasing body mass index and increasing level of hypoxia lead to impairment of diastolic dysfunction. Diastolic dysfunction was diagnosed in 4 obese patients without OSAS and in 17 patients with OSAS and obesity. All patients with diastolic dysfunction had second or third stage obesity and severe OSAS. Left ventricular hypertrophy was diagnosed in 9 patients with OSAS and obesity. Patients with concentric hypertrophy had significantly lower E/A in comparison with patients without hypertrophy or with concentric remodeling. We found that the deceleration time has positive correlation with body mass index and desaturation index and negative correlation with min SaO_2. Isovolumic relaxation time correlated only with desaturation index. According to the results of univariable regression analysis, five variables were allocated: body mass index, age, desaturation index, index apnea-hypopnea and left ventricular mass index. The multivariate analyses, after adjustment for age and sex and stepwise regression, showed that only the desaturation index was an independent predictor of left ventricular diastolic dysfunction in patients with OSAS and obesity. Obstructive sleep apnea syndrome combined with obesity leads to a deterioration of the diastolic function of the left ventricle even in patients without cardio-vascular diseases. The state of the diastolic function of the left ventricule worsens with an increase in the severity of hypoxic disorders in the syndrome of obstructive sleep apnea and with the degree of obesity. In multivariate regression analysis, the desaturation index was a predictor of left ventricular diastolic dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome and obesity.

Keywords: dystolic dysfunction; echocardiography; overweight; chronic disease

Стан діастолічної функції лівого шлуночка у хворих із синдромом обструктивного апное сну та ожирінням

Я. О. Андреєва, О. І. Токаренко

Запорізька медична академія післядипломної освіти, Запоріжжя, Україна

Досліджено стан діастолічної функції лівого шлуночка у пацієнтів з уперше діагностованим синдромом обструктивного апное сну (СОАС) та ожирінням і визначено детермінанти розвитку діастолічної дисфункції (ДД) у цієї категорії хворих. У дослідження включено 46 пацієнтів з СОАС і ожирінням і 52 пацієнти з ожирінням та без СОАС. Контрольну групу склали 22 практично здорові особи. Усім учасникам дослідження визначали рівень денної сонливості, індекс маси тіла, проводили добовий амбулаторний моніторинг артеріального тиску, кардіо-респіраторний моніторинг, ехокардіографію. ДД діагностовано у трьох пацієнтів з ожирінням та у 17 пацієнтів з СОАС та ожирінням. За допомогою кореляційного аналізу встановлено позитивний кореляційний зв'язок між часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка, індексом маси тіла та індексом десатурації, негативний кореляційний зв'язок – із min SaO_2. Показник E/A корелював тільки з індексом маси тіла. У багатофакторному регресійному аналізі продемонстровано, що тільки індекс десатурації – незалежний предиктор ДД у хворих із СОАС і ожирінням. Синдром обструктивного апное сну у поєднанні з ожирінням зумовлює погіршення діастолічної функції лівого шлуночка. Стан діастолічної функції міокарда лівого шлуночка погіршується

зі збільшенням ступеня тяжкості гіпоксичних порушень за синдрому обструктивного апное сну та ожиріння. У багатофакторному регресійному аналізі індекс десатурації – предиктор діастолічної дисфункції у хворих із синдромом обструктивного апное сну та ожирінням.

Ключові слова: діастолічна дисфункція; ехокардіографія; надмірна вага тіла; хронічні захворювання

Вступ

Синдром обструктивного апное сну (СОАС) – хронічне захворювання, що характеризується повторними епізодами повної або часткової обструкції верхніх дихальних шляхів під час сну. Це спричиняє фрагментацію сну, нічну періодичну гіпоксемію та денну сонливість (Jordan et al., 2014). СОАС – найчастіший розлад сну у світі. Поширеність у дорослих коливається в межах 9–38% (Peppard et al., 2013; Maeder et al., 2016; Sia et al., 2017). Понад 80% випадків СОАС залишаються недіагностованими, особливо серед жінок (Heinzer et al., 2015; Senaratna et al., 2017). Поширеність СОАС збільшується серед осіб похилого віку та серед чоловіків (Senaratna et al., 2017), осіб, які страждають на ожиріння (Hamilton et al., 2017). Серед інших факторів ризику розвитку СОАС виділяють пери- та постменопаузальний періоди та наявність черепно-лицьових аномалій. Ожиріння вважається найпотужнішим фактором ризику розвитку СОАС (Hamilton et al., 2017). Доведено тісний зв'язок між зростанням ваги та збільшенням шансів розвитку СОАС (Peppard et al., 2013; Heinzer et al., 2015; Sia et al., 2017). До 58% СОАС середньої тяжкості та тяжкого ступеня зумовлено ожирінням (Hamilton et al., 2017; Senaratna et al., 2017). Протягом останніх років доведено двонаправлений патогенетичний зв'язок між СОАС і ожирінням. Ожиріння збільшує ризик розвитку СОАС, при цьому СОАС потенційно спричиняє швидше збільшення ваги та залучення до порочного циклу «збільшення ваги та погіршення СОАС». Лікування обох станів необхідне для поліпшення результатів лікування пацієнтів у цілому (Ong et al., 2013).

СОАС і ожиріння – фактори ризику розвитку таких серцево-судинних ускладнень як серцева недостатність, гострий інфаркт міокарда, фібриляції передсердь, артеріальна гіпертензія, легенева гіпертензія та інсульт (Reis et al., 2014; Wang et al., 2015; Korcarz et al., 2016; Maeder et al., 2016). Установлено зв'язок між СОАС і розвитком гіпертрофії лівого шлуночка – один із факторів підвищення серцево-судинного ризику та фактор ризику розвитку та прогресування серцевої недостатності (Korcarz et al., 2016). Існують переконливі докази впливу ожиріння на розвиток гіпертрофії лівого шлуночка та діастолічну дисфункцію лівого шлуночка (Reis et al., 2014; Rider et al., 2014). Але дані про вплив поєднаного перебігу СОАС і ожиріння та первинні механізми впливу цих патологій на лівий шлуночок досі суперечливі. Патофізіологічні ефекти СОАС і ожиріння на серцево-судинну систему включають комплекс механічних, гемодинамічних, нейрогуморальних, запальних, ендотеліальних і окисних механізмів (Baguet et al., 2012). Деякі дослідники вважають, що структурні та функціональні зміни лівого шлуночка у першу чергу пов'язані з наявністю у пацієнта таких ускладнень СОАС та ожиріння як артеріальна гіпертензія, інсулінорезистентність, цукровий діабет (Korcarz et al., 2016; Sharma et al., 2017). З іншого боку, існують повідомлення про розвиток систолічної та діастолічної дисфункції в осіб із СОАС і ожирінням навіть без серцево-судинної патології (Altintas et al., 2012; Baguet et al., 2013), але ці дослідження поодинокі та результати їх суперечливі.

Мета цього дослідження – оцінити стан діастолічної функції лівого шлуночка у пацієнтів з уперше діагностованим СОАС і ожирінням, визначити детермінанти розвитку діастолічної дисфункції у вказаної категорії хворих.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженні брали участь 98 пацієнтів (основна група), яким за результатами визначення денної сонливості проведено кардіо-респіраторний моніторинг у період із листопада 2011 по серпень 2016 року. Дослідження проводили у пульмонологічному відділенні Центральної лікарні Комунарського району м. Запоріжжя. Протокол дослідження затверджено етичним комітетом ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України». Дослідження проведене відповідно до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення науково-медичних досліджень із поправками (2000, з поправками 2008), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (1997), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997). Письмова інформована згода отримана від усіх учасників.

Критерії включення у дослідження: ожиріння (індекс маси тіла, ІМТ – понад 30 кг/м^2), позитивна оцінка рівня денної сонливості за Епворт (понад 9 балів), наявність інформованої згоди на участь у дослідженні.

Критерії виключення з дослідження: наявність серцево-судинних, ендокринних і нефрологічних захворювань, центрального апное сну, дисліпідемії, неалкогольної жирової хвороби печінки, тяжкі інтелектуально-мнестичні порушення.

Основну групу пацієнтів поділено на дві групи, відповідно до результатів кардіо-респіраторного моніторингу: І група – 46 пацієнтів (33 чоловіки та 13 жінок) із СОАС (ІАГ > 5) та ожирінням (ІМТ – понад 30 кг/м^2); ІІ група – 52 пацієнти з ожирінням (ІМТ – понад 30 кг/м^2) та без СОАС (ІАГ < 5). Контрольну групу склали 22 практично здорові особи. Контрольна група мала подібний віковий (38,5 ± 3,6 років) та статевий (16 чоловіків та 6 жінок) склад.

Кожному учаснику дослідження крім визначення рівня денної сонливості за шкалою Епворт, визначення ІМТ і кардіо-респіраторного моніторингу, проведено ехокардіографію з доплерографією та добовий амбулаторний моніторинг артеріального тиску.

Визначення рівня денної сонливості проводили за шкалою Епворт відповідно до рекомендацій розробників шкали (Johns, 1993) та рекомендацій Американської асоціації сну (Mansukhani et al., 2014): 0–8 балів – нормальне значення, 9–12 балів – легка сонливість, 13–16 – середній рівень сонливості, понад 16 – тяжкий рівень сонливості.

Для достовірного виключення маскованої артеріальної гіпертензії усім хворих проводили добове моніторування АТ відповідно до рекомендацій Європейської асоціації артеріальної гіпертензії щодо методики амбулаторного моніторування артеріального тиску (2008). Дослідження проводили на апараті АВРМ-04 (Meditech, Угорщина). Визначали середньодобовий систолічний артеріальний тиск ($САТ_{доб}$) та середньодобовий діастолічний артеріальний тиск ($ДАТ_{доб}$). Наявність артеріальної гіпертензії визначали як артеріальний тиск (АТ) > 125/80 мм рт. ст. за добового моніторування артеріального тиску або застосування антигіпертензивних препаратів. ІМТ розраховували як відношення ваги до квадрата зросту (кг/м^2). Ступінь ожиріння визначали відповідно до класифікації ВОЗ і Міжнародної групи з ожиріння (WHO, 2014): І ступінь – 30 < ІМТ < 34,9 кг/м^2, ІІ ступінь – 35 < ІМТ < 39,9 кг/м^2, ІІІ ступінь – ІМТ > 40 кг/м^2.

Кардіо-респіраторний моніторинг проводили на апараті Somnocheck 2.0 (Weinmann, Німеччина) відповідно до рекомендацій Американської асоціації сну (2007). Індекс апное-гіпопное визначали як кількість епізодів апное та гіпопное за годину сну. Індекс десатурації визначали як кількість періодів десатурації протягом усього періоду оксигемометрії без артефактів. Також визначали середній рівень сатурації (mean SaO_2) протягом діагностичної ночі та мінімальну сатурацію (min SaO_2) протягом діагностичної ночі.

Хворих із СОАС поділили на три підгрупи відповідно до ступеня тяжкості СОАС. Тяжкість СОАС класифікована згідно з рекомендаціями Американської асоціації сну (Mansukhani et al., 2014). У ІА підгрупу увійшли пацієнти з СОАС легкого ступеня (5 < ІАГ < 15 под./год) – 18 осіб, до ІВ підгрупи – пацієнти з помірним СОАС (15 < ІАГ < 30 под./год) – 17 осіб, до ІС підгрупи – з важкою СОАС (ІАГ > 30 под./год) – 11 осіб.

Трансторакальна ехокардіографія проведена за допомогою апарату Siemens Acuson X300 з датчиком 1,75 МГц в М-модально-

му та двовимірному режимах у стандартних ехокардіографічних позиціях із використанням імпульсної доплерографії та кольорового доплерівського картування. Оцінено основні розміри лівого передсердя та лівого шлуночка в діастолу та систолу, товщину міжшлуночкової перетинки та задньої стінки лівого шлуночка, масу міокарда лівого шлуночка. Усі вимірювання проводили в М-режимі згідно з рекомендаціями Європейської асоціації ехокардіографії (2014). Також розраховано індекс маси міокарда лівого шлуночка та фракцію викиду. Гіпертрофію лівого шлуночка діагностували за індексу маси міокарда лівого шлуночка ≥ 125 г/м^2. Виділено чотири типи гіпертрофії лівого шлуночка: нормальна структура (індекс маси міокарда лівого шлуночка < 125 г/м^2 і товщина задньої стінки лівого шлуночка < 0,45), ексцентрична гіпертрофія (індекс маси міокарда лівого шлуночка ≥ 125 г/м^2 і товщина задньої стінки лівого шлуночка < 0,45), концентричне ремоделювання (індекс маси міокарда лівого шлуночка < 125 г/м^2 і товщина задньої стінки лівого шлуночка ≥ 0,45) і концентрична гіпертрофія (індекс маси міокарда лівого шлуночка ≥ 125 г/м^2 і товщина задньої стінки лівого шлучночка ≥ 0,45).

Оцінювання трансмітрального кровотоку проведене в режимі імпульсного доплера з верхівкової чотирикамерної позиції. Для оцінювання діастолічної функції вимірювали такі швидкісні та часові показники: максимальна швидкість кровотоку раннього діастолічного наповнення (E), максимальна швидкість кровотоку під час передсердної систоли (A), час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка (DT), час ізоволюметричного розслаблення (IVRT) і співвідношення E/A. Діастолічну дисфункцію встановлювали за збільшення часу ізоволюметричного розслаблення > 160 мс, збільшення часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка > 220 мс, зменшення співвідношення E/A < 1. Для диференціальної діагностики псевдонормалізації трансмітрального кровотоку та нормальної діастолічної функції проводили пробу Вальсальви. Пробу вважали позитивною за зменшення співвідношення E/A більше ніж на 40% після її проведення.

Відповідно до рекомендацій Nagueh et al. (2014) виділяють три типи порушень діастолічної функції міокарда ЛШ серця:

I тип – сповільненої релаксації – гіпертрофічний (E/A = 0,7–0,9; час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка підвищений);

II тип – псевдонормальний (E/A = 1,2–1,3; час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка підвищений);

III тип – рестриктивний тип наповнення ЛШ (E/A > 2; час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка знижений).

На початку дослідження перевіряли нормальність розподілу даних. У випадку нормального розподілу переходили до подальшого аналізу. Якщо розподіл даних відрізнявся від нормального, спочатку виконували процедуру перетворення Бокса – Кокса з переходом до подальшого аналізу. Кількісні змінні представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього (M ± SE). Категоріальні змінні наведені у відсотках. Відмінності кожної змінної оцінювали за допомогою t-тесту Стьюдента для безперервних змінних та тесту χ^2 для категоріальних змінних. Співвідношення між параметрами оцінювали за допомогою кореляційного аналізу Пірсона та однофакторного регресійного аналізу. Багатофакторний регресійний аналіз із використанням статистично значущих змінних з однофакторного аналізу проведений для виявлення змінних, які були незалежно пов'язані з показниками діастолічної дисфункції (співвідношення E/A). Результати вважали достовірними за P < 0,05. Розрахунки проводили за допомогою програмного забезпечення SPSS (версія 22.0; SPSS, Chicago, США).

Результати

Пацієнти з тяжким СОАС були старшими, мали вищі систолічний та діастолічний артеріальний тиск, але ці зміни не були достовірні під час порівняння з показниками IA та IB підгруп. Зареєстровано достовірне збільшення ІМТ у IC підгрупі порівняно з IA підгрупою. При цьому 9 пацієнтів із підгрупи IC мали III ступінь ожиріння, а 2 пацієнти мали II ступінь ожиріння. У підгрупі IB 14 пацієнтів мали II ступінь ожиріння, а 3 пацієнти – I ступінь ожиріння. У IA усі пацієнти мали I ступінь ожиріння. Рівень денної сонливості, оцінений за шкалою Епворт, достовірно не відрізнявся між I та II групами. Достовірні відмінності для цього показника встановлені між IC підгрупою та II групою, а також між IC підгрупою та IA підгрупою.

Як і очікували, денна сонливість, індекс апное-гіпопное та індекс десатурації найвищі у IC підгрупі (P < 0,01), а рівень середньої та мінімальної SaO_2 найнижчий у цій групі (P < 0,01). Зафіксовано достовірні зміни індексу апное-гіпопное та min SaO_2 у IC підгрупі порівняно не тільки з IA, а й із IB підгрупою. Достовірні відмінності під час порівняння I та II груп із контрольною групою встановлено для денної сонливості та ІМТ (табл. 1).

Таблиця 1

Клінічна характеристика обстежених осіб (M ± SE)

Показник	Контрольна група, n = 22	I група, n = 46			II група, n = 52
		IA група, n = 18	IB група, n = 17	IC група, n = 11	
Чоловіки/жінки	16/6	12/6	13/4	8/3	38/14
Середній вік, роки	38,5 ± 3,6	36,5 ± 6,8	37,7 ± 5,2	42,6 ± 6,2	35,6 ± 6,1
Рівень денної сонливості за Епворт, бали	1,4 ± 0,3	11,4 ± 2,6*	14,3 ± 3,1*	16,4 ± 3,8*γ,o	12,2 ± 0,6*
ІМТ, кг/м^2	23,1 ± 3,3	33,2 ± 5,3*	35,9 ± 5,6*	39,5 ± 4,6*γo	31,6 ± 7,2*
Добовий систолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.	112,3 ± 6,9	116,3 ± 10,6	117,2 ± 7,7	122,3 ± 10,6*	114,7 ± 11,3
Добовий діастолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.	73,1 ± 6,2	72,9 ± 6,5	77,3 ± 5,4	79,4 ± 9,3	74,7 ± 5,8
Індекс апное-гіпопное, еп./год	2,5 ± 1,0	11,2 ± 3,3*γ	24,3 ± 4,1*γ	33,8 ± 3,3*γo^	2,8 ± 1,4
Індекс десатурації, ум. од.	1,1 ± 0,4	10,5 ± 5,4*γ	25,9 ± 4,5*γ	28,6 ± 5,8*γ	1,3 ± 0,5
$MinSaO_2$, %	97,4 ± 1,5	89,4 ± 4,5*γ	87,3 ± 1,5*γ	80,3 ± 6,4*γo^	98,4 ± 1,6
$MinSaO_2$, %	98,3 ± 1,2	94,5 ± 3,2	92,4 ± 3,5*γ	89,9 ± 3,6*γo	97,4 ± 1,8

Примітки: * – достовірна різниця з контрольною групою (P < 0,05); o – достовірна різниця з IA підгрупою (P < 0,05); ^ – достовірна різниця з IB підгрупою (P < 0,05); γ – достовірна різниця з II групою (P < 0,05).

Враховуючи клінічні характеристики обстежених осіб (достовірне поглиблення гіпоксичних змін зі збільшенням ІМТ), ми вирішили провести порівняльний аналіз клінічних характеристик у пацієнтів I групи залежно від ступеня ожиріння (табл. 2). Пацієнти з різним ступенем ожиріння достовірно не відрізнялись за віком і статтю. Систолічний та діастолічний артеріальний тиск були вищими за III ступеня ожиріння, але ці зміни не достовірні. Найбільші респіраторні зміни зафіксовано за III ступеня ожиріння. Денна сонливість за шкалою Епворт достовірно перевищувала показники групи з I ступенем ожиріння (на 34,6%, P < 0,05). Індекс апное-гіпопное у пацієнтів з III ступенем ожиріння достовірно перевищував показники не тільки за I ступеня ожиріння (на 59,8%, P < 0,05), а і за II (на 31,7%, P < 0,05). Індекс десатурації і min SaO_2 за III ступеня ожиріння достовірно перевищували показники груп з I та II ступенем ожиріння.

За допомогою аналізу ехокардіографічних даних установлено, що систолічна функція в усіх обстежених осіб нормальна, вона достовірно не відрізняється від показників контрольної групи. Серед структурних і функціональних показників лівого шлуночка у різних групах установлено достовірні зміни (табл. 3).

Таблиця 2

Клінічна характеристика хворих із СОАС і ожирінням залежно від ступеня ожиріння (M ± SE)

Показник	Хворі із СОАС і ожирінням, n = 46		
	I ступінь ожиріння, n = 21	II ступінь ожиріння, n = 16	III ступінь ожиріння, n = 9
Чоловіки/жінки	15/6	13/3	5/4
Середній вік, роки	37,5 ± 6,3	38,1 ± 6,1	36,7 ± 5,7
Оцінка рівня денної сонливості за Епворт, бали	11,5 ± 3,1	15,7 ± 3,7	17,6 ± 3,9*
ІМТ, кг/м^2	32,6 ± 4,8	36,3 ± 6,1	41,1 ± 4,1
Добовий систолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.	113,2 ± 9,3	116,1 ± 6,2	121,3 ± 8,3
Добовий діастолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.	68,3 ± 5,2	73,1 ± 5,5	77,2 ± 8,3
Індекс апное-гіпопное, еп./год	13,7 ± 6,8*$^{\gamma}$	23,3 ± 5,2*$^{\gamma}$	34,1 ± 4,1*$^{\gamma}$
Індекс десатурації, ум. од.	11,2 ± 5,8*$^{\gamma}$	26,2 ± 4,4*$^{\gamma}$	30,1 ± 4,8*$^{\gamma}$
$MinSaO_2$, %	88,6 ± 5,2*$^{\gamma}$	86,2 ± 1,5*$^{\gamma}$	79,3 ± 4,4*$^{\gamma}$
$MinSaO_2$, %	95,3 ± 2,6	91,3 ± 3,5*$^{\gamma}$	88,2 ± 4,1*$^{\gamma}$

Примітки: * – достовірна різниця з групою I ступеня ожиріння (P < 0,05); $^{\gamma}$ – достовірна різниця з групою II ступеня ожиріння (P < 0,05).

Таблиця 3

Дані ехокардіографії в обстежених хворих (M ± SE)

Показник	Контрольна група, n = 22	I група, n = 46			II група, n = 52
		IA група, n = 18	IB група, n = 17	IC група, n = 11	
E, см/с	73,2 ± 5,3	68,7 ± 8,7*	63,5 ± 9,6	55,4 ± 11,0*$^{\gamma o}$	68,4 ± 3,6*
A, см/с	56,4 ± 9,5	62,4 ± 12,1	64,2 ± 9,2	68,3 ± 13,5*$^{\gamma}$	54,1 ± 10,1
E/A, ум. од.	1,30 ± 0,26	1,09 ± 0,42	0,92 ± 0,33*	0,82 ± 0,28*$^{\gamma}$	1,32 ± 0,31
Час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка, мс	177,3 ± 15,6	199,3 ± 20,4*	208,7 ± 16,4*	215,4 ± 14,3*$^{\gamma}$	196,3 ± 11,6*
Час ізоволюметричного розслаблення, мс	76,4 ± 10,2	86,7 ± 9,5	90,2 ± 6,9*	96,8 ± 10,4*$^{\gamma}$	81,3 ± 7,6
Фракція викиду, %	56,5 ± 3,1	56,2 ± 2,9	55,8 ± 2,5	55,1 ± 3,2	53,3 ± 3,1
Розмір лівого передсердя, см	2,66 ± 0,23	3,19 ± 0,44	3,26 ± 0,64*	3,48 ± 0,64*	2,95 ± 0,61
Маса міокарда лівого шлуночка, г	127,5 ± 21,7	156,7 ± 22,9	162,9 ± 26,3*	189,4 ± 33,4*$^{o\gamma}$	143,6 ± 27,3
Індекс маси міокарда лівого шлуночка, г/м^2	61,1 ± 11,3	72,1 ± 12,5	84,2 ± 25,1	96,2 ± 22,1*$^{\gamma}$	69,2 ± 10,2
Товщина задньої стінки лівого шлуночка, см	0,79 ± 0,12	0,91 ± 0,12	0,95 ± 0,14	1,13 ± 0,18*$^{\gamma}$	0,88 ± 0,11*
Товщина міжшлуночкової перетинки, см	0,76 ± 0,13	0,88 ± 0,14	1,03 ± 0,12*	1,14 ± 0,14*$^{\gamma}$	0,84 ± 0,11

Примітки: * – достовірна різниця з контрольною групою (P < 0,05); º – достовірна різниця з IA групою (P < 0,05); ^ – достовірна різниця з IB групою (P < 0,05); $^{\gamma}$ – достовірна різниця з II групою (P < 0,05).

Достовірна різниця між функціональними показниками лівого шлуночка в контрольній та II групах установлена лише для часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та піка E (P < 0,05). У I групі встановлене достовірне порівняно з контрольною групою зниження співвідношення E/A (на 35,1%, P < 0,05), підвищення часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка (14,8%, P < 0,05) та часу ізоволюметричного розслаблення (16,3%, P < 0,05). Порівняння показників I і II груп виявило достовірні зміни за показниками E/A, часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та часом ізоволюметричного розслаблення.

За допомогою аналізу діастолічної функції лівого шлуночка у підгрупах I групи виявлено такі зміни. Статистично достовірні відмінності встановлено між показниками підгрупи пацієнтів із середньотяжким і тяжким СОАС і показниками контрольної групи. У пацієнтів із середньотяжким перебігом СОАС установлено зниження потоку швидкого кровонаповнення на 13,3% (P < 0,05) порівняно з контрольною групою та на 11,1% порівняно з показниками II групи (P > 0,05). У пацієнтів IC підгрупи пік E нижчий на 24,3% (P < 0,05) порівняно з контрольною групою та на 22,4% порівняно з II групою (P < 0,05). Порівняння показників IB і IC підгруп із показниками IA підгрупи достовірних відмінностей виявило (P > 0,05). Пік A збільшувався в усіх групах порівняно з контрольною групою (достовірні ці зміни тільки у IC підгрупі). Максимальна швидкість кровотоку під час передсердної систоли (A) у хворих із тяжкою СОАС перевищує показник контрольної групи на 17,4% (P < 0,05). Відношення E/A знижується зі збільшенням тяжкості СОАС: воно найменше в IC підгруппі (на 36,9% нижче порівняно з групою контролю, P < 0,05, та на 37,9% порівняно з II групою, P < 0,05). Час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка у хворих IB і IC груп підвищений на 15,3% і 17,7% порівняно з контролем, відповідно (P < 0,05). Достовірна різниця також установлена між значеннями часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка у IC та II групах (P < 0,05). Під час аналізу часу ізоволюметричного розслаблення встановлене підвищення показника у хворих IA, IB і IC підгруп на 11,9%, 15,3% і 21,2%, відповідно порівняно з контрольною групою (P < 0,05). Також час ізоволюметричного розслаблення достовірно різнився у IC та II групах (P < 0,05). Таким чином, діастолічну дисфункцію діагностовано у 4 (8,0%) пацієнтів із II групи хворих з ожирінням та у 17 (36,9%) пацієнтів із I групи хворих з СОАС і ожирінням (7 із них із IB підгрупи (15,1%), а 10 осіб (21,7%) – з IC підгрупи). В усіх пацієнтів діагностовано діастолічну дисфункцію I типу (порушення релаксації).

Незначну дилатацію лівого передсердя діагностовано у пацієнтів IB та IC підгруп (P < 0,05). У пацієнтів IA підгрупи структурні зміни лівого передсердя порівняно з контрольною групою недостовірні. Серед структурних змін міокарда слід відмітити достовірне збільшення товщини задньої стінки лівого шлуночка, товщини міжшлуночкової перетинки, маси міокарда лівого шлуночка та індексу маси міокарда лівого шлуночка у пацієнтів із тяжким СОАС і ожирінням (IC підгрупа) порівняно з групою контролю. У IB підгрупі спостерігали достовірне збільшення товщини задньої стінки лівого шлуночка. Інші показники також були вищими порівняно з контрольною та IA підгрупами, але ці зміни недостовірні.

Під час дослідження структурних змін лівого шлуночка у 9 пацієнтів з усіх обстежених пруп діагностували гіпертрофію лівого шлуночка. Ці пацієнти мали тяжкий СОАС (індекс апное-гіпопное (43,6 ± 8,4 еп./год). Концентричне ремоделювання діагностоване у 8 хворих, а концентрична гіпертрофія – в одного пацієнта. Гіпертрофію лівого шлуночка у пацієнтів II групи не встановлено.

Також проведено аналіз даних ехокардіографії в обстежених пацієнтів залежно від ступеня ожиріння (табл. 4). У хворих з ожирінням I та II ступеня без СОАС достовірних змін порівняно з контрольними показниками не виявлено. У групі осіб з ожирінням III ступеня під час порівняння з контрольними значеннями виявлено достовірні зміни показників діастолічної функції. У 43,0% хво-

рих діагностовано діастолічну дисфункцію, при цьому всі пацієнти мали діастолічну дисфункцію I типу. У цієї категорії хворих спостерігали збільшення піка А та зменшення піка Е, а також співвідношення Е/А. Щодо структурних змін міокарда у пацієнтів з ожирінням без СОАС достовірні зміни встановлено лише для товщини міжшлуночкової перетинки (P < 0,05).

Таблиця 4

Дані ехокардіографії в обстежених пацієнтів залежно від ступеня ожиріння (M ± SE)

Показник	Хворі з СОАС і ожирінням, n = 46			Хворі з ожирінням без СОАС, n = 52			Контрольна група, n = 22
	I ступінь ожиріння, n = 21	II ступінь ожиріння, n = 16	III ступінь ожиріння, n = 9	I ступінь ожиріння, n = 26	II ступінь ожиріння, n = 19	III ступінь ожиріння, n = 7	
Е, см/с	67,7 ± 8,6	63,5 ± 9,6*	55,4 ± 9,1*°	72,8 ± 6,8	74,3 ± 5,8	66,8 ± 5,2*	73,2 ± 5,3
А, см/с	61,3 ± 9,2	65,9 ± 8,7*	70,4 ± 9,1*	57,2 ± 8,5	58,2 ± 11,1	63,2 ± 9,6*	56,4 ± 9,5
Е/А, ум. од.	1,18 ± 0,42	1,08 ± 0,23*	0,80 ± 0,27*°	1,32 ± 0,24	1,26 ± 0,31	1,01 ± 0,22*	1,30 ± 0,26
Час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка, мс	197,1 ± 17,2	210,6 ± 17,1*°	219,3 ± 16,2*°	181,2 ± 14,3	193,1 ± 11,9	201,4 ± 15,3*	177,3 ± 15,6
Час ізоволюметричного розслаблення, мс	84,2 ± 9,2	88,3 ± 7,2*	98,7 ± 10,4*°	79,1 ± 8,8	82,4 ± 6,9	88,3 ± 6,5*	76,4 ± 10,2
Фракція викиду, %	57,9 ± 3,4	56,3 ± 3,2	55,0 ± 3,9	62,1 ± 4,1	61,3 ± 3,8	58,2 ± 4,8	56,5 ± 3,1
Розмір лівого передсердя, см	3,09 ± 0,32	3,28 ± 0,55*°	3,52 ± 0,54*°	2,59 ± 0,21	2,92 ± 0,33	3,04 ± 0,22*	2,66 ± 0,23
Маса міокарда лівого шлуночка, г	153,2 ± 26,4	159,9 ± 20,4*	183,2 ± 25,5*°	129,4 ± 18,6	133,2 ± 26,4	139,3 ± 22,3	127,5 ± 21,7
Індекс маси міокарда лівого шлуночка, г/м^2	71,2 ± 12,7°	82,1 ± 11,2*	97,1 ± 18,1*°	64,0 ± 10,2	64,2 ± 11,1	69,9 ± 13,1	61,1 ± 11,3
Товщина задньої стінки лівого шлуночка, см	0,89 ± 0,11	0,91 ± 0,13	1,15 ± 0,14*°	0,77 ± 0,14	0,82 ± 0,10	0,86 ± 0,12	0,79 ± 0,12
Товщина міжшлуночкової перетинки, см	0,89 ± 0,10	1,03 ± 0,11*	1,18 ± 0,10*°	0,75 ± 0,11	0,88 ± 0,11	0,91 ± 0,12*	0,76 ± 0,13

Примітки: * – достовірна різниця з контрольною групою (P < 0,05); ° – достовірна різниця з IA підгрупою (P < 0,05); ^ – достовірна різниця з IB підгрупою (P < 0,05); ˠ – достовірна різниця з II групою (P < 0,05).

Порівнюючи показники у I групі, виявили погіршення діастолічної функції лівого шлуночка зі збільшенням ступеня ожиріння. Так, у пацієнтів із I ступенем ожиріння та СОАС не спостерігали достовірних змін діастолічної функції під час зіставлення з відповідними показниками у II групі хворих з ожирінням I ступеня та контрольною групою. Для пацієнтів з II ступенем ожиріння порівняння з контрольною групою встановило зниження максимальної швидкості кровотоку раннього діастолічного наповнення та підвищення максимальної швидкості кровотоку під час передсердної систоли, зниження співвідношення Е/А, підвищення часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та часу ізоволюметричного розслаблення. Діастолічну дисфункцію діагностовано у 51,0% хворих із СОАС і ожирінням II ступеня. Але порівняння показників діастолічної функції у хворих із II ступенем ожиріння у I та II групах достовірних змін не виявило (P > 0,05).

Серед структурних змін міокарда лівого шлуночка у пацієнтів I групи з ожирінням II ступеня порівняно з контрольною групою встановлене достовірне збільшення тільки товщини міжшлуночкової перетинки. При цьому наявність гіпертрофії лівого шлуночка встановлена в одного (6%) хворого із цієї групи. Аналіз показників у I групі хворих з ожирінням III ступеня виявив достовірні зміни діастолічної функції порівняно з показниками контрольної групи та показниками II групи з ожирінням III ступеня. Серед структурних змін установлено збільшення маси міокарда лівого шлуночка, індексу маси міокарда лівого шлуночка, товщини задньої стінки лівого шлуночка та товщини міжшлуночкової перетинки (P < 0,05). Гіпертрофія лівого шлуночка встановлена у 8 хворих з цієї групи (1 хворий мав концентричну гіпертрофію і 7 – концентричне ремоделювання міокарда лівого шлуночка).

У нашому дослідженні порівняно стан діастолічної функції у пацієнтів із гіпертрофією лівого шлуночка. Максимальна швидкість кровотоку раннього діастолічного наповнення знижена у пацієнтів із концентричним ремоделюванням і концентричною гіпертрофією порівняно з пацієнтами без гіпертрофії лівого шлуночка. Зареєстровано зниження відношення Е/А, особливо за концентричної гіпертрофії, але значення часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та часу ізоволюметричного розслаблення достовірно не відрізнялись.

Порівняння співвідношення Е/А у групах хворих без і з гіпертрофією лівого шлуночка виявило достовірне підвищення Е/А, але Е/А між групами з концентричним ремоделюванням і гіпертрофією достовірно не відрізнялося.

Кореляційний аналіз показав, що ІМТ тісно корелює з індексом апное-гіпопное та індексом десатурації (r = 0,712, 0,722, відповідно, R < 0,05). У пацієнтів I групи час уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка має позитивний зв'язок з ІМТ та індексом десатурації (r = 0,332, 0,481, відповідно, P < 0,05) і негативний – із min SaO_2 (r = –0,418, P < 0,05), а час ізоволюметричного розслаблення корелює тільки з індексом десатурації (r = 0,612, P < 0,05). Показник Е/А корелює тільки з ІМТ (r = –0,455, P < 0,05). Кореляційні зв'язки між структурними показниками та станом діастолічної функції лівого шлуночка показали, що у пацієнтів з СОАС і ожирінням індекс маси міокарда лівого шлуночка корелює з Е/А, часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та часом ізоволюметричного розслаблення (r = –0,572, 0,484, 0,612, відповідно, P < 0,05). Індекс маси міокарда лівого шлуночка корелює з індексом апное-гіпопное, індексом десатурації та min SaO_2 (r = 0,582, 0,535, –0,317, відповідно, P < 0,05) у пацієнтів I групи. У пацієнтів II групи встановлено кореляційні зв'язки між ІМТ, часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та часом ізоволюметричного розслаблення (r = 0,622, 0,484, відповідно, P < 0,05). Кореляційні зв'язки між гіпоксичними та функціональними параметрами у II групі не встановлені. Однофакторним регресійним аналізом установлено, що вік, індекс апное-гіпопное, індекс десатурації, ІМТ та індекс маси міокарда лівого шлуночка – незалежні предиктори змін показника Е/А (табл. 5).

Таблиця 5

Результати однофакторного регресійного аналізу

Показники	Уніваріантний регресійний аналіз	
	ВШ (ДІ 95%)	P
Вік, роки	1,14 (0,95–1,33)	0,001
Чоловіча стать	0,71 (0,44–0,98)	0,283
ІМТ, кг/м^2	1,05 (0,99–1,28)	0,001
Індекс апное-гіпопное, еп./год	1,07 (0,88–1,12)	0,016
Індекс десатурації, ум. од.	1,09 (0,87–1,56)	0,042
Середня SaO_2, %	0,80 (0,52–1,14)	0,324
Мінімальна SaO_2, %	0,74 (0,44–1,03)	0,161
Добовий систолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.	0,99 (0,95–1,66)	0,021
Добовий діастолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.	0,96 (0,84–1,22)	0,010
Індкс маси міокарда лівого шлуночка, г/м^2	1,13 (1,02–1,22)	0,004

Ці п'ять змінних протестовано у багатофакторній регресійній моделі. Для побудови кінцевої моделі застосовували покрокове уведення змінних до регресійної моделі. Після корегування за віком, статтю та ІМТ кінцева регресійна модель продемонструвала, що тільки індекс десатурації – незалежний предиктор діастолічної дисфункції ЛШ у хворих із СОАС і ожирінням (табл. 4).

Таблиця 6
Результати багатофакторного регресійного аналізу

Показники	Багатофакторний регресійний аналіз	
	ВШ (ДІ 95%)	P
Вік, роки	1,08 (0,96–1,26)	0,005
ІМТ, кг/м^2	1,04 (0,96–1,22)	0,037
Індекс апное-гіпопное, еп./год	0,95 (0,82–1,20)	0,084
Індекс десатурації, ум. од.	1,12 (1,09–1,42)	0,023
Індекс маси міокарда лівого шлуночка, г/м^2	1,06 (1,04–1,31)	0,062

Обговорення

Діастолічна дисфункція лівого шлуночка розглядається як доклінічна стадія серцевої недостатності, це фактор ризику розвитку та прогресування серцевої недостатності, що достовірно зменшує виживання навіть за безсимптомного перебігу (Bibra et al., 2016). У нашому дослідженні проведено оцінювання змін діастолічної функції лівого шлуночка у пацієнтів із поєднаним перебігом синдрому обструктивного апное сну та ожирінням, значення яких у розвитку діастолічної дисфункції доведене. Для виключення впливу додаткових факторів ризику діастолічної дисфункції на достовірність результатів аналізу пацієнтів із серцево-судинною, ендокринною, нефрологічною патологією, з неалкогольною жировою хворобою печінки та дисліпідемією не досліджували.

Аналіз стану діастолічної функції у хворих з ожирінням без СОАС і практично здорових осіб із нормальною вагою тіла виявив достовірні відмінності тільки між значеннями часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та піка Е, що за відсутності змін інших показників функціонального стану лівого шлуночка не є достовірним критерієм діастолічної дисфункції. Діастолічну дисфункцію діагностовано тільки у 4 (6,0%) пацієнтів із II групи хворих. Аналіз показників діастолічної функції залежно від ступеня ожиріння виявив достовірні зміни для всіх пацієнтів із III ступенем ожиріння порівняно з контрольною групою. У 57,0% хворих з ожирінням III ступеня виявлено діастолічну дисфункцію. Кореляційний аналіз показників у цій групі хворих виявив сильні зв'язки між ІМТ і часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка ($r = 0,622$, $P < 0,05$). Отримані результати можуть вказувати на погіршення діастолічної функції у разі збільшення ступеня ожиріння, навіть у пацієнтів молодого та зрілого віку без серцево-судинних захворювань. Результати нашого дослідження збігаються з результатами Wang et al. (2015).

Під час оцінювання стану діастолічної функції лівого шлуночка у хворих з ожирінням та СОАС легкого ступеня (IA підгрупа) порівняно з контрольною групою статистично достовірні відмінності встановлено між значеннями часу уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та піка Е. Порівняння з показниками II групи достовірних відмінностей не виявило.

Порівняння діастолічної функції у підгрупах IB, IC та II групі виявило достовірні відмінності між усіма показниками діастолічної дисфункції у IC підгрупі та II групі та відмінності між Е/А, часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка та часом ізоволюметричного розслаблення. Це вказує на погіршення діастолічної функції у пацієнтів із середньотяжким і тяжким СОАС. Результати аналізу діастолічної функції за поєднаного перебігу ожиріння та СОАС залежно від ступеня ожиріння встановили статистично достовірне погіршення діастолічної функції лівого шлуночка у пацієнтів з II та III ступенем ожиріння. Але майже всі пацієнти (крім 3) з IB та IC підгруп мали II та III ступінь ожиріння. Кореляційний аналіз виявив тісні зв'язки між ІМТ та гіпоксичними параметрами (індекс апное-гіпопное та індекс десатурації). Аналіз даних вимірів лівого передсердя виявив розширення лівого передсердя у пацієнтів із середньотяжким і тяжким СОАС, що низка авторів вважає маркером діастолічної дисфункції (Nagueh et al., 2014). Наявність ознак діастолічної дисфункції виявлено у 36,9% хворих із синдромом обструктивного апное сну та ожирінням та у 8% хворих із ожирінням без синдрому обструктивного апное сну. Тобто кількість пацієнтів із діагностовано діастолічною дисфункцією збільшилась майже учетверо за приєднання СОАС. Усі пацієнти з діагностованою діастолічною дисфункцією мали I тип дисфункції, що вказує на порушення релаксації міокарда лівого шлуночка. Відповідно до цих результатів можна стверджувати, що СОАС погіршує функціональний стан лівого шлуночка у хворих з ожирінням, при цьому збільшення ступеня гіпоксичних порушень і ступеня ожиріння викликає прогресування діастолічної дисфункції.

Проведено низку досліджень, у яких вивчено зв'язок діастолічної дисфункції з гіпоксичними показниками СОАС. Результати нашого дослідження частково збігаються з результатами цих авторів. Наприклад, у дослідженні Wachter et al. (2012) встановлено, що наявність середньотяжкого та тяжкого СОАС асоціюється з діастолічною дисфункцією. При цьому ступінь порушень діастолічної функції корелював тільки зі збільшенням індексу апное-гіпопное, на відміну від нашого дослідження, де встановлено кореляційний зв'язок між часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка, часом ізоволюметричного скорочення та індексом десатурації та між часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка і min SaO_2. Також у дослідженні Wachter et al. (2012) частина пацієнтів із тяжким СОАС мала II тип діастолічної дисфункції, на відміну від результатів нашого дослідження, де всі пацієнти мали I тип діастолічної дисфункції. Слід зазначити, що у дослідження Wachter et al. (2012) включено осіб, які мали фактори ризику розвитку діастолічної дисфункції, а саме артеріальну гіпертензію, цукровий діабет, дисліпідемію, що могло вплинуло на результати дослідження та зумовити відмінності у результатах досліджень.

У дослідженні Wang et al. (2015) проведено аналіз змін діастолічної функції лівого шлуночка за різних типів ремоделювання міокарда у хворих із СОАС. За результатами цього дослідження встановлено, що хвиля Е була значно нижчою в групі хворих із концентричним і ексцентричним типом гіпертрофії лівого шлуночка; співвідношення Е/А, достовірно нижче за концентричного ремоделювання міокарда та концентричної гіпертрофії лівого шлуночка. За даними кореляційного та регресійного аналізу в дослідженні Wang et al. (2015), встановлено тісний взаємозв'язок між структурними змінами міокарда та показниками діастолічної дисфункції. Ці дані частково збігаються з результатами нашого дослідження, де в усіх пацієнтів із концентричною гіпертрофією та ремоделюванням лівого шлуночка спостерігали погіршення діастолічної функції. У регресійному аналізі в нашому дослідженні взаємозв'язок між структурними змінами міокарда лівого шлуночка та діастолічною функцією не доведено. Розбіжності можуть бути зумовлені включенням у дослідження Wang et al. (2015) пацієнтів з артеріальною гіпертензією, яка має значний вплив на структурні та функціональні зміни лівого шлуночка.

За результатами однофакторного регресійного аналізу відібрано 5 змінних (ІМТ, індекс апное-гіпопное, індекс десатурації, індекс маси міокарда лівого шлуночка, вік), дві з яких – показники гіпоксії за СОАС. Після корегування моделі за віком, статтю та ІМТ тільки індекс десатурації показав предикторну здатність для прогнозування діастолічної дисфункції. Таким чином, можна припустити, що СОАС і ожиріння – предиктори початкових стадій діастолічної дисфункції, але діагностика цих станів вимагає чутливіших методик, як, наприклад, стрес-тест.

У дослідженні Bodez et al. (2016) застосовували глобальний стандартизований підхід до оцінювання первинної діастолічної дисфункції у когорті пацієнтів із СОАС і довели наявність діастолічної дисфункції у 37% пацієнтів із СОАС. Проте показники гіпоксії за СОАС не продемонстрували достатню предикторну здатність для діастолічної дисфункції лівого шлуночка у багатофакторному регресійному аналізі, на відміну від нашого дослідження, де індекс десатурації був незалежним предиктором діастолічної дисфункції. У дослідженні Bodez et al. (2016) індекс апное-гіпопное достовірно корелював з об'ємом лівого передсердя, на відміну від нашого дослідження, де достовірних змін між цими

показниками не встановлено. Припускаємо, що розбіжності між результатами досліджень можуть бути зумовлені відмінностями в методиці ехокардіографічного дослідження.

Зміни серцевої гемодинаміки за інтермітуючої гіпоксії та ожиріння добре досліджено на щурах. Результати цих досліджень опосередковано можуть пояснити знайдені в нашому експерименті ехокардіографічні зміни. За даними Danica et al. (2014), істотний внесок в ураження міокарда лівого шлуночка за СОАС робить підвищення трансмурального тиску в лівому передсерді та лівому шлуночку внаслідок коливань внутрішньогрудного тиску, що відбувається протягом епізоду апное-гіпопное як результат марних дихальних зусиль. У випадку ожиріння одним із провідних патогенетичних факторів уважається збільшення об'єму циркулюючої крові, що спричинює перенавантаження лівого шлуночка (Leopoldo et al., 2010; Usui, 2013). Можна припустити, що тривалі коливання тиску та об'єму за поєднаного перебігу СОАС і ожиріння зумовлює структурні та функціональні зміни у шлуночках серця, що спричинює погіршення діастолічної функції та серцевої недостатності у цих хворих (Wang et al., 2015). Описані експериментальні результати пояснюють знайдені у нашому дослідженні ознаки дилатації лівого передсердя, перевантаження та погіршення релаксації лівого шлуночка.

Незважаючи на деякі преваги, наше дослідження має низку обмежень. Перш за все, це невеликий обсяг вибірки, що не дозволив провести повноцінне статистичне опрацювання у деяких підгрупах. По-друге, це відсутність даних тканинної доплерографії фіброзних кілець мітрального та трикуспідального клапана, які можуть дати додаткову інформацію про стан діастолічної функції. На час початку цього дослідження ці вимірювання не рекомендовані для оцінювання стану діастолічної функції. По-третє, включення у дослідження тільки осіб з уперше діагностованим СОАС обмежує можливість оцінювання тривалості захворювання, що також може впливати на результати дослідження.

Висновки

Синдром обструктивного апное сну в поєднанні з ожирінням викликає погіршення діастолічної функції лівого шлуночка. Стан діастолічної функції міокарда лівого шлуночка погіршується зі збільшенням ступеня тяжкості гіпоксичних порушень за синдрому обструктивного апное сну та ступеня ожиріння.

Прояви діастолічної дисфункції зафіксовано у 36,9% хворих із синдромом обструктивного апное сну та ожирінням і у 8,0% хворих з ожирінням без синдрому обструктивного апное сну. Всі пацієнти з установленою діастолічною дисфункцією мали діастолічну дисфункцію за типом порушення релаксації.

У пацієнтів із синдромом обструктивного апное сну та ожирінням установлено позитивний кореляційний зв'язок між часом уповільнення кровотоку раннього діастолічного наповнення лівого шлуночка, індексом маси тіла та індексом десатурації та негативний кореляційний зв'язок із min SaO_2. Час ізоволюметричного розслаблення корелював тільки з індексом десатурації, а показник E/A – з індексом маси тіла.

У багатофакторному регресійному аналізі індекс десатурації був предиктором діастолічної дисфункції у хворих із синдромом обструктивного апное сну та ожирінням.

References

Altintas, N., Aslan, E., Helvaci, A., & Malhotra, A. (2012). Relationship between obstructive sleep apnea severity index and left ventricular function and volume. Annals of Saudi Medicine, 32(4), 384–390.

Baguet, J., Barone-Rochette, G., Tamisier, R., Levy, P., & Pépin, J. (2012). Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. Nature Reviews Cardiology, 9(12), 679–688.

Bibra, H., Paulus, W., & St. John Sutton, M. (2016). Cardiometabolic syndrome and increased risk of heart failure. Current Heart Failure Reports, 13(5), 219–229.

Bodez, D., Damy, T., Soulat-Dufour, L., Meuleman, C., & Cohen, A. (2016). Consequences of obstructive sleep apnoea syndrome on left ventricular geometry and diastolic function. Archives of Cardiovascular Diseases, 109(8–9), 494–503.

Bodez, D., Lang, S., Meuleman, C., Boyer-Châtenet, L., Nguyen, X., Soulat-Dufour, L., Boccara, F., Fleury, B., & Cohen, A. (2015). Left ventricular diastolic dysfunction in obstructive sleep apnoea syndrome by an echocardiographic standardized approach: An observational study. Archives of Cardiovascular Diseases, 108(10), 480–490.

Danica, L., Krotin, M., Zdravkovic, M., Soldatovic, I., Zdravkovic, D., Brajkovic, M., Gardijan, V., Saric, J., Pokrajac, R., Lovic, D., Stevanovic, P., Gajic, M., & Vukcevic, M. (2014). Early left ventricular systolic and diastolic dysfunction in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnoea and normal left ventricular ejection fraction. The Scientific World Journal, 2014, 1–7.

Hamilton, G. S., & Joosten, S. A. (2017) Obstructive sleep apnoea and obesity. Australian Family Physician, 46(7), 460–463.

Heinzer, R., Vat, S., Marques-Vidal, P., Marti-Soler, H., Andries, D., Tobback, N., Mooser, V., Preisig, M., Malhotra, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Tafti, M., & Haba-Rubio, J. (2015). Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: The HypnoLaus study. The Lancet Respiratory Medicine, 3(4), 310–318.

Johns, M. (1993). Daytime sleepiness, snoring, and obstructive sleep apnea. Chest, 103(1), 30–36.

Jordan, A., McSharry, D., & Malhotra, A. (2014). Adult obstructive sleep apnoea. The Lancet, 383(9918), 736–747.

Korcarz, C., Peppard, P., Young, T., Chapman, C., Hla, K., Barnet, J., Hagen, E., & Stein, J. (2016). Effects of obstructive sleep apnea and obesity on cardiac remodeling: The Wisconsin sleep cohort study. Sleep, 39(6), 1187–1195.

Leopoldo, A., Sugizaki, M., Lima-Leopoldo, A., do Nascimento, A., Luvizotto, R., de Campos, D., Okoshi, K., Pai-Silva, M., Padovani, C., & Cicogna, A. (2010). Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. Canadian Journal of Cardiology, 26(8), 423–429.

Maeder, M., Schoch, O., & Rickli, H. (2016). A clinical approach to obstructive sleep apnea as a risk factor for cardiovascular disease. Vascular Health and Risk Management, 85–103.

Mansukhani, M. P., Kolla, B. P., & Ramar, K. (2014). International classification of sleep disorders 2 and American Academy of Sleep Medicine practice parameters for central sleep apnea. Sleep Medicine Clinics, 9(1), 1–11.

Nagueh, S. F., Appleton, C. P., & Gillebert, T. C. (2009). CME test for Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function in echocardiography. Journal of the American Society of Echocardiography, 22(2), 208–209.

Ong, C., O'Driscoll, D., Truby, H., Naughton, M., & Hamilton, G. (2013). The reciprocal interaction between obesity and obstructive sleep apnoea. Sleep Medicine Reviews, 17(2), 123–131.

Patinkin, Z., Feinn, R., & Santos, M. (2017). Metabolic consequences of obstructive sleep apnea in adolescents with obesity: A systematic literature review and meta-analysis. Childhood Obesity, 13(2), 102–110.

Peppard, P. E., Young, T., Barnet, J. H., Palta, M., Hagen, E. W., & Hla, K. M. (2013). Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. American Journal of Epidemiology, 177(9), 1006–1014.

Qaseem, A., Dallas, P., Owens, D. K., Starkey, M., Holty, J.-E. C., & Shekelle, P. (2014). Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. Annals of Internal Medicine, 161(3), 210.

Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging (2014). European Heart Journal – Cardiovascular Imaging, 17(4), 412–412.

Reis, J., Allen, N., Gibbs, B., Gidding, S., Lee, J., Lewis, C., Lima, J., Lloyd-Jones, D., Loria, C., Powell-Wiley, T., Sharma, S., Wei, G., & Liu, K. (2014). Association of the degree of adiposity and duration of obesity with measures of cardiac structure and function: The CARDIA study. Obesity, 22(11), 2434–2440.

Rider, O., Lewis, A., & Neubauer, S. (2014). Structural and metabolic effects of obesity on the myocardium and the aorta. Obesity Facts, 7(5), 329–338.

Senaratna, C., Perret, J., Lodge, C., Lowe, A., Campbell, B., Matheson, M., Hamilton, G., & Dharmage, S. (2017). Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. Sleep Medicine Reviews, 34, 70–81.

Sharma, N., Lee, J., Youssef, I., Salifu, M., & McFarlane, S. (2017). Obesity, cardiovascular disease and sleep disorders: Insights into the rising epidemic. Journal of Sleep Disorders and Therapy, 6(1), 260

Sia, C., Hong, Y., Tan, L., van Dam, R., Lee, C., & Tan, A. (2017). Awareness and knowledge of obstructive sleep apnea among the general population. Sleep Medicine, 36, 10–17.

Usui, Y., Takata, Y., Inoue, Y., Tomiyama, H., Kurohane, S., Hashimura, Y., Kato, K., Saruhara, H., Asano, K., Shiina, K., & Yamashina, A. (2013). Severe obstructive sleep apnea impairs left ventricular diastolic function in non-obese men. Sleep Medicine, 14(2), 155–159.

Vrints, H., Shivalkar, B., Heuten, H., Vanderveken, O., Hamans, E., Van de Heyning, P., De Backer, W., & Verbraecken, J. (2013). Cardiovascular

mechanisms and consequences of obstructive sleep apnoea. Acta Clinica Belgica, 68(3), 169–178.

Wachter, R., Lüthje, L., Klemmstein, D., Lüers, C., Stahrenberg, R., Edelmann, F., Holzendorf, V., Hasenfuß, G., Andreas, S., & Pieske, B. (2012). Impact of obstructive sleep apnoea on diastolic function. European Respiratory Journal, 41(2), 376–383.

Wang, J., Zhang, H., Wu, C., Han, J., Guo, Z., Jia, C., Yang, L., Hao, Y., Xu, K., Liu, X., & Si, J. (2015). Correlation of left ventricular diastolic function and left ventricular geometry in patients with obstructive sleep Apnoea Syndrome. West Indian Medical Journal, 64(2), 92–98.

Wang, Y., Liang, C., Gopal, D., Ayalon, N., Donohue, C., Santhanakrishnan, R., Sandhu, H., Perez, A., Downing, J., Gokce, N., Colucci, W., & Ho, J. (2015). Preclinical systolic and diastolic dysfunctions in metabolically healthy and unhealthy obese individuals clinical perspective. Circulation: Heart Failure, 8(5), 897–904.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 397–402
doi: 10.15421/021761

Mechanism of changes of peripheral neuromuscular endings of the tongues of rats with experimental streptozotocyn diabetes mellitus

M. Luchynskyi, V. Luchinskyi, V. Shcherba, A. Demkovych, Y. Luchinska

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 14.06.2017
Received in revised form 18.08.2017
Accepted 19.08.2017

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Chekhov Str., 3, Ternopil, 46003, Ukraine.
Tel. +38-067-415-60-87.
E-mail: luch1959@ukr.net

Luchynskyi, M., Luchinskyi, V., Shcherba, V., Demkovych, A., & Luchinska, Y. (2017). Mechanism of changes of peripheral neuromuscular endings of the tongues of rats with experimental streptozotocyn diabetes mellitus. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 397–402. doi: 10.15421/021761

This paper presents the characteristics of dynamics of morphological changes of neuromuscular endings of the tongues of rats with experimentally induced streptozotocin diabetes mellitus. The hysto-ultrastructural research showed pathomorphological changes in different periods of the experimental diabetes mellitus. The patterns of these changes indicate the close interrelation between neuromuscular endings and elements of muscular tissues. During experimental streptozotocin diabetes mellitus, there occured interconnected structural changes of muscle fibers, myelin nerve fibers and the microcirculatory channel of the tongue with damage to the neuromuscular endings. In the dynamics of the diabetic process, three phases were distinguished: the phase of reactive-dystrophic changes with maximum severity two weeks after the beginning of the experimental modeling of streptozotocin diabetes mellitus; the phase of destructive-dystrophic processes, which began after the fourth week from the beginning of the modeling of experimental streptozotocin diabetes; the degenerative-destructive phase, which developed after the sixth week of the experiment. The dynamics of changes in the neuromuscular endings are also related to the duration of diabetes mellitus, they occur in two stages: in the first stage (up to 4 weeks) reactive processes were observed, in the second (6–8 weeks) – dystrophic processes. The uneven degree of their manifestation is related to the reaction of the microcirculatory channel of neuromuscular endings and composition of the tongue muscles. The greatest sensitivity to hyperglycemia was observed in muscle fibers of the intermediate type.

Keywords: diabetes mellitus; neuro-muscle endings; tongue

Механізм змін у периферичному нервово-м’язовому апараті язика за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету

М. А. Лучинський, В. М. Лучинський, В. В. Щерба, А. Є. Демкович, Ю. І. Лучинська

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна

Наведено характеристику динаміки морфологічних змін нервово-м’язових закінчень язика за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. У результаті гісто-ультраструктурного дослідження показано патоморфологічні зміни в різні терміни експериментального цукрового діабету, а їх закономірність вказує на тісний контакт нервово-м’язових закінчень і елементів м’язової тканини. За експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету відбувається поєднана структурна перебудова м’язових волокон, мієлінових нервових волокон і мікроциркуляторного русла язика з порушенням нервово-м’язових закінчень. У динаміці діабетичного процесу виділено три фази: фазу реактивно-дистрофічних змін із максимальною вираженістю через два тижні від початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, фазу деструктивно-дистрофічних процесів, яка починається після четвертого тижня від початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, дегенеративно-деструктивну фазу, яка розвивається після 6-го тижня досліду. При цьому динаміка змін у самих нервово-м’язових закінченнях також залежить від тривалості цукрового діабету, які проходять у дві стадії: у першій стадії (до 4 тижнів) спостерігаються реактивні, у другій (6–8-й тижні) – дистрофічні процеси. Неоднаковий ступінь їх вираженості пов’язаний із реакцією власного мікроциркуляторного русла нервово-м’язових закінчень і композицією м’язів язика. Найбільшу чутливість до гіперглікемії виявляють м’язові волокна проміжного типу.

Ключові слова: цукровий діабет; нервово-м’язові закінчення; язик

Вступ

Структурно-функціональні особливості язика визначають різноманітні клінічні варіанти його змін за багатьох соматичних захворювань і це вже давно привертає увагу вчених різних спеціалізацій (Sanders and Mu, 2013; Pourlis, 2014). За даними Popel’ et al. (2017) установлено, що нервово-трофічний компонент відіграє важливу роль у патогенезі дистрофічних і запальних уражень язика за цукрового діабету I типу, але механізми розвитку цих процесів вивчені недостатньо.

Розвиток експериментального цукрового діабету I типу моделюють шляхом внутрішньоочеревного введення стрептозотоцину, що супроводжується гіперглікемією різного ступеня важкості. Проблемі впливу гіперглікемії на різні органи та тканини організму людини та тварин присвячена низка наукових досліджень (O'Reilly and Long, 2008; Meo, 2009; Abdel-Reheim et al., 2014; Rukavina, 2016). Гіперглікемія змінює не тільки метаболізм м'язів, а й їх структуру (Westfall et al., 2015). Особливе місце серед проявів цукрового діабету посідає ураження нервово-м'язового апарату та судин мікроциркуляторного русла (Rezki et al., 2016). Нині відомості про зміни рухових нервово-м'язових закінчень язика та їх мікроциркуляторного русла за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету фрагментарні та вимагають узагальнення (Uemura, 2009; Jackowiak et al., 2014).

Донині не створено спільної точки зору відносно характеру патологічних змін мієлінових нервових волокон за діабетичного глоситу (Byrd et al., 2003; O'Reilly and Long, 2008). Одні дослідники дотримуються думки, що такі зміни – первинні (Nwayyir, 2017; Rehman and Akash, 2017), інші відносять їх до вторинних, які розвиваються внаслідок порушення місцевого кровообігу (Tooke, 2003; Uemura et al., 2009), треті – дотримуються теорії порушення нейрогуморальної регуляції місцевого метаболізму мієлінових нервових волокон (Pertseva et al., 2013). При цьому всі одностайно визнають швидкоплинність і зворотність процесів за вираженого характеру деструкції складових компонентів нервових провідників (Westfall et al., 2015). При цьому відсутні дані про зміни рухових закінчень у власних м'язах язика.

Тому, у світлі сучасних запитів практичної нейростоматології, вивчення механізмів структурно-адаптивних змін в окремих структурних компонентах язика за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету становлять значний інтерес (Abdel-Reheim et al., 2014).

Мета цієї статті – оцінити динаміку морфологічних змін нервово-м'язових закінчень язика, їх мікроциркуляторного русла за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету.

Матеріал і методи досліджень

Досліджували язик 45 лабораторних щурів лінії Вістар. Контрольна група складалася з 20 інтактних тварин. Цукровий діабет моделювали шляхом внутрішньочеревного введення 0,1 мл розчину стрептозотоцину (Colev, 2008; Semenko and Savytskyi, 2017). Для дослідження нервових і м'язових волокон язика застосовували гістологічний (забарвлення гематоксиліном і еозином, імпрегнація за Більшовським – Грос, методом Маркі) та електронно-мікроскопічний методи. Всі мієлінові нервові волокна за розміром поділяли на дрібні (1,0–4,0 мкм), середні (4,1–7,0 мкм) і великі (понад 7,0 мкм). Індекс g визначали за формулою $g = \frac{a}{d}$, де a – діаметр аксона, d – діаметр цілого МНВ.

Тварин у період дослідження утримували на стандартному раціоні віварію та виводили з експерименту через 2, 4, 6 і 8 тижнів від початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету згідно «Правил гуманного поводження з експериментальними тваринами» та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах».

Результати дослідження оброблені за допомогою пакета прикладних програм для медико-біологічних досліджень Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Вірогідність різниці між вибірками оцінювали за t-критерієм Стьюдента, з перевіркою нормальності розподілу. Різницю вважали вірогідною за $P < 0,05$.

Результати

У перші два тижні після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету в термінальних мієлінових нервових волокнах утворюються варикозні розширення, що на ультраструктурному рівні пов'язано з розшаруванням мієлінової оболонки. Відбувається вакуолізація цитоплазми нейролемоцитів, а в аксонах зменшується щільність матриксу мітохондрій і розширюється периаксональний простір. При цьому у претермінальних ділянках зменшується кількість розгалужень рухового аксона. У нервово-м'язових закінченнях зменшується периметр терміналі аксона, довжина синаптичних контактів, ширина активних зон, кількість синаптичних пухирців, фрагментуються кристи мітохондрій, збільшується відстань між синаптичними складками (рис. 1).

Через два тижні від початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету ядра м'язових волокон мають множинні інвагінації каріолеми, хроматин конденсований переважно на периферії нуклеоплазми. При цьому саркоплазма має знижену електронно-оптичну щільність та містить велику кількість вакуолей, частково втрачається поперечна смугастість. Такі зміни характерні переважно для м'язових волокон проміжного типу.

Через чотири тижні після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету в окремих мієлінових нервових волокнах дрібного та середнього діаметра спостерігаються периаксональні зміни у вигляді набряку та часткового руйнування мієлінової оболонки. Внаслідок цього виявляється їх нерівномірне забарвлення. Підтвердження цього – їх метричний перерозподіл (збільшення кількості середніх і великих за зменшення кількості дрібних нервових волокон) і зменшення показника g до 0,32 ум. од. (у контролі показник g становить 0,48 ум. од.). Претермінальні ділянки рухових аксонів утворюють локальні звуження та варикозні розширення, зменшується площа їх термінальних розгалужень.

В аксоплазмі термінальних мієлінових нервових волокон поряд із вищезгаданими змінами зростає ступінь агрегації філаментозно-тубулярних структур. При цьому виникає дезінтеграція більшості складок постсинаптичної мембрани, розширення синаптичної щілини та вростання в неї відростків кінцевих нейролемоцитів (рис. 2). У нервово-м'язових закінченнях зменшується кількість синаптичних пухирців та мітохондрій, вони мають просвітлений матрикс і зруйновані кристи. В цей термін з початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету супроводжується зменшенням периметра терміналі та довжини синаптичного контакту відповідно на 39,7% і 41,9% ($P < 0,05$).

Отримані дані свідчать про зниження інтенсивності цих процесів за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. У постсинаптичному відділі зменшується до 64,9% кількість синаптичних складок, відстань між ними зростає в 1,7 раза, ширина активних зон зменшується на 41,6% ($P < 0,05$).

Через чотири тижні після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету в м'язових волокнах наростає набряк саркоплазми, який викликає розшарування міофібрил. У 25,5% випадків у м'язових волокнах проміжного типу спостерігаються ядра із значним зменшенням осміофільності нуклеоплазми.

У цей термін починає яскраво проявлятись реакція кровоносного русла у вигляді звуження просвіту судин мікроциркуляторного русла, збільшенням кількості функціонуючих артеріоло-венозних анастомозів. Через це зменшується кількість внутрішньостовбурових капілярів та їх сумарна ємкість відповідно на 26,5% та 12,7%, тоді як площа «зон васкуляризації» одним внутрішньом'язовим гемокапіляром збільшується в середньому на 12,2% ($P < 0,05$). Це викликає збільшення на 22,5% кількості м'язових волокон, які припадають на один гемокапіляр, розташований у цій зоні.

Картина перебудови периферичного нервового апарату язика через шість тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету досить строката, що проявляється помітним набряком і нерівномірною імпрегнацією мієліну у 28,1% мієлінових нервових волокон, тоді як в інших волокнах (18,2%) зміни стосуються більшою мірою аксонів як мієлінових, так і безмієлінових нервових волокон. Обробка мієлінових нервових волокон методом Маркі дозволяє виявити значну кількість недоокиснених продуктів розпаду мієліну (у 15,4% мієлі-

нових нервових волокон). Ще одна група мієлінових нервових волокон (10,2%) характеризується вираженим набряком і вакуолізацією мієлінової оболонки. Це – причина її нерівномірного забарвлення за рахунок порушення дрібнокоміркової структури. В окремих мієлінових нервових волокнах, які складають 8,3% від їх загальної кількості, відбувається локальна деструкція мієлінової оболонки та сегментарне оголення аксонів. Ще 19,8% мієлінових нервових волокон залишаються інтактними.

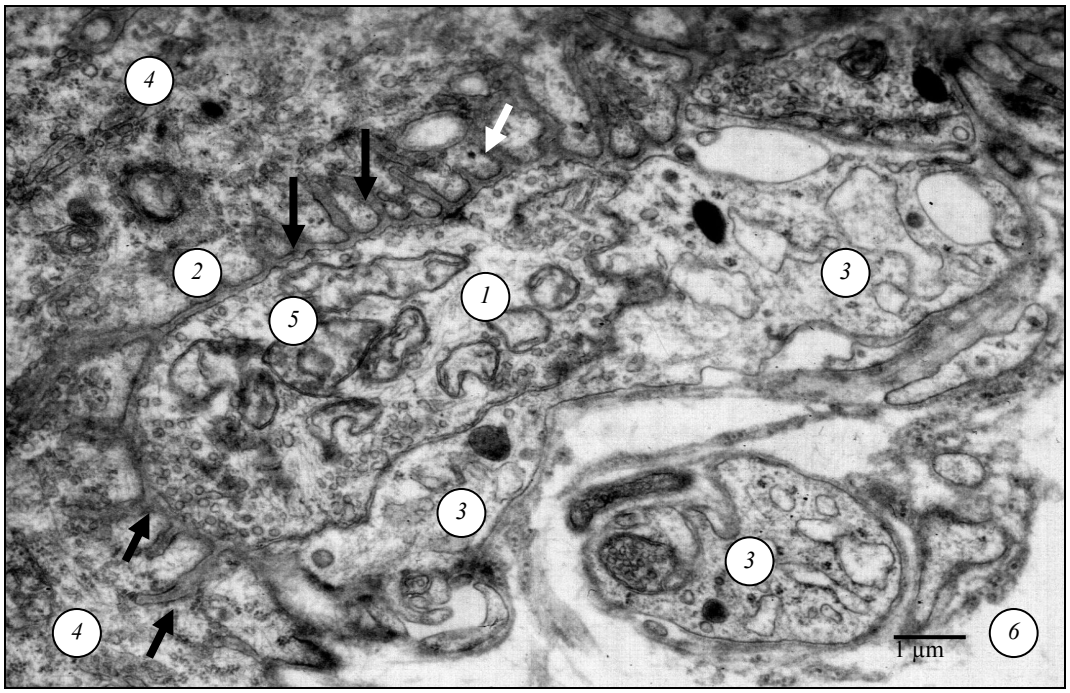


Рис. 1. Ультраструктура нервово-м'язового синапсу язика щура через два тижні після початку моделювання стрептозотоцинового цукрового діабету (стрілками показані постсинаптичні складки): *1* – пресинаптичний полюс, *2* – постсинаптичний полюс, *3* – кінцевий нейролемоцит, *4* – саркоплазма, *5* – мітохондрії, *6* – ендомізій

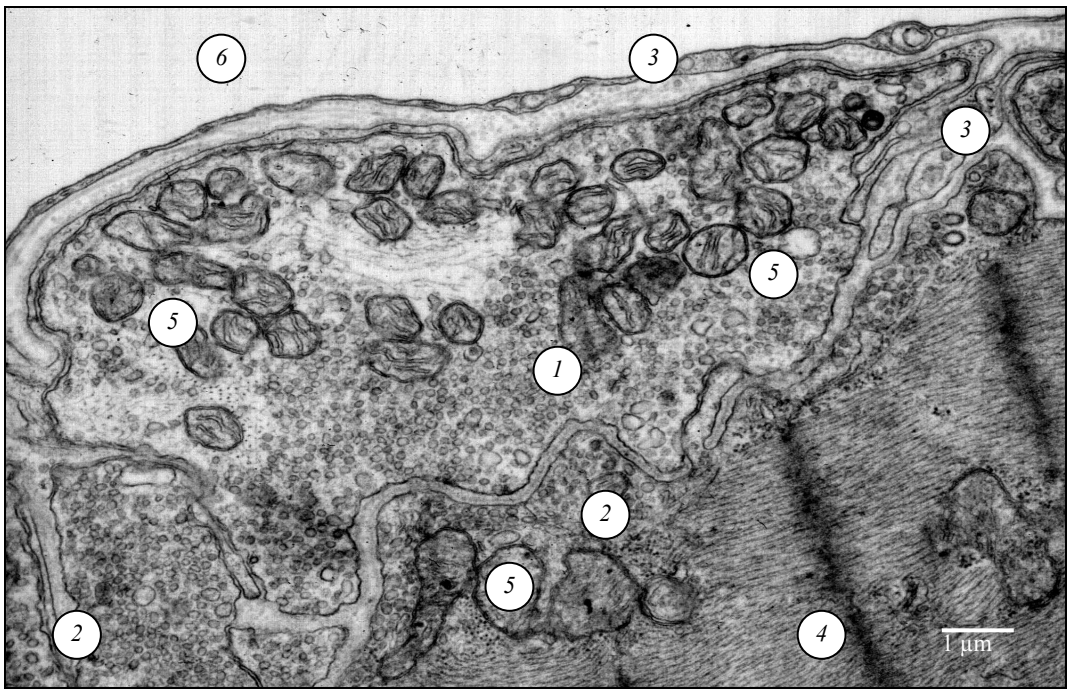


Рис. 2. Ультраструктура нервово-м'язового синапсу язика щура через чотири тижні після початку моделювання стрептозотоцинового цукрового діабету (стрілками показані постсинаптичні складки): *1* – пресинаптичний полюс, *2* – постсинаптичний полюс, *3* – відросток кінцевого нейролемоцита, *4* – саркоплазма, *5* – мітохондрії, *6* – ендомізій

Морфометричний аналіз, проведений на препаратах, забарвлених за Кульчицьким, показав, що на площі 1 мм^2 поперечного перерізу язика внаслідок демієлінізації аксонів зменшується загальна кількість мієлінових нервових волокон.

Середня площа нервово-м'язових закінчень зменшується порівняно з контролем на 56,1%, а порівняно з даними попереднього терміну експерименту – на 25,6% ($P < 0,05$). Аксоплазма переважена синаптичними пухирцями. Їх кількість на весь зріз через активну зону синапсу зростає в 3,6 раза порівняно з контрольними показниками та на 37,8% більше, ніж на етапі чотирьох тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. У субсинаптичній зоні визначається зменшення кількості рибосом і полірибосом, але збільшується кількість піноцитозних пухирців. При цьому зменшується кіль-

кість складок постсинаптичної мембрани, а отже і її площі. У цей термін експерименту продовжуються процеси деструкції окремих мієлінових нервових волокон. При цьому в ділянці нервово-м'язових закінчень зменшується кількість нейролемоцитів, збільшується аргірофілія їх ядер.

У цей час за рахунок розвитку вираженої вазоконстрикції відбувається розрідження судинної сітки язика, її капілярні петлі збільшуються у розмірах до 100–140 x 70–80 мкм, а кількість внутрішньом'язових гемосудин зменшується до 53,2 ± 2,14 на 1 мм^2 поперечного перерізу язика. Внаслідок зменшення діаметра просвіту складових частин гемомікроциркуляторного русла язика відбувається метричний перерозподіл гемокапілярів: значно зменшується кількість великих та збільшується дрібних і середніх за діаметром мікросудин. Унаслідок зменшення діаметра приносних судин гемомікроциркуляторного русла частина крові скидається через відкриті аретеріоло-венозні шунти.

У зв'язку зі зменшенням кількості внутрішьом'язових гемокапілярів віддаль між ними та радіус їх кровопостачання порівняно з тваринами контрольної групи збільшуються на 14,6%, що викликає розширення «зон васкуляризації» кожного з них та збільшення кількості нервових волокон в їх межах. Порівняно з тваринами контрольної групи у щурів експериментальної групи сумарна ємність кровоносного русла зменшується на 25,5% і складає 9 954 мкм^3.

Через вісім тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету мієло- та ангіоархітектоніка язика значно відрізняється від такої у тварин контрольної групи. Поряд із цим загальна кількість мієлінових нервових волокон порівняно з попереднім терміном (хоча не вірогідно) все ж залишається меншою ($P > 0,05$). Менше, порівняно з контрольною групою, нараховується мієлінових нервових волокон великого діаметра, тоді як кількість дрібних нервових волокон із витонченою мієліновою оболонкою більша, що підтверджує існування процесів демієлінізації. Показник g зменшується в усіх метричних групах мієлінових нервових волокон і складає 0,28 ум. од. Нейролемоцити таких нервових волокон містять ядра дрібного розміру з маргінально розподіленим хроматином.

У цей термін виявляються масові руйнування нервово-м'язових закінчень, гомогенізація мієлінових оболонок, атрофія термінальних розгалужень аксонів. Аксоплазма електроннощільна, в ній відсутні мікротрубочки.

У нервово-м'язових закінченнях термінальні розгалуження руйнуються, в результаті чого пресинаптичний полюс відсутній. У цих ділянках спостерігаються залишки аксоплазми. На цьому етапі експерименту спостерігали формування так званих атрофічних нервово-м'язових закінчень, для яких характерна ознака – периферичне розташування дрібних синаптичних пухирців з утворенням великих безпухирцевих зон у центральній частині аксоплазми та повна відсутність складок постсинаптичної мембрани.

Гіперглікемія, яка розвивається під час моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, протягом восьми тижнів, викликає деструкцію міофіламентів, що супроводжується порушенням структури M- і Z-ліній у міофібрилах. Мітохондрії зменшуються в розмірах, їх матрикс має низьку електронно-оптичну щільність, кристи дезорієнтовані, вкорочені, фрагментовані. У саркоплазмі переважно м'язових волокон проміжного типу спостерігається збільшення кількості включень різної електронно-оптичної щільності.

У кровоносному руслі язика у цей термін зберігається тенденція до зменшення просвіту його складових частин. При цьому діаметр просвіту судин артеріальної частини вірогідно відрізняється від норми, тоді як його венозна частина залишається розширеною. Все ж морфометрично встановлено зменшення кількості великих і середніх та збільшення числа дрібних гемокапілярів, збільшення середнього радіуса та площі зони кровопостачання кожного з них, зменшення сумарної ємності кровоносного русла. При цьому відносна кількість мієлінових нервових волокон на один гемокапіляр та їх кількість у «зонах васкуляризації» менша на 10,6%, ніж у попередній термін, і на 37,2%, ніж у тварин контрольної групи ($P < 0,05$). Між кількісним і якісним складом мієлінових нервових волокон і гемокапілярів відмічається низька кореляційна залежність ($r = 0,28$), що свідчить про зменшення взаємозумовленості мієло- та ангіоархітектоніки язика за стрептозотоцинового цукрового діабету.

Обговорення

Нині накопичено значні знання та опубліковано достатню кількість результатів досліджень, присвячених морфофункціональним, гістохімічним і ультраструктурним особливостям будови різних тканин людини та тварин за цукрового діабету (Meo, 2009; Abdel-Reheim et al., 2014; Rukavina, 2016; Rehman and Akash, 2017). Однак із цілої низки питань, пов'язаних із реакцією нервово-м'язових закінчень та їх мікроциркуляторного русла на гіперглікемію, немає спільної думки, а багато аспектів цієї проблеми потребують подальшого вивчення.

Результати досліджень, проведених окремими авторами (García et al., 2013; Ignacio and Felix, 2016), вказують на те, що цукровий діабет викликає структурні зміни нервово-м'язових закінчень, глибина яких залежить від тривалості гіперглікемії. Popel' et al. (2017) показали, що підвищений вміст глікозильованого гемоглобіну навіть на короткий термін спричиняє варикозні розширення мієлінових нервових волокон, зменшення площі нервово-м'язових закінчень, а також довжини аксонних терміналей (Konur and Yuste, 2004).

Установлене нами зменшення загальної кількості мієлінових нервових волокон, виявлене морфометричним аналізом препаратів язика, забарвлених за Кульчицьким, вказує на демієлінізацію аксонів уже через чотири тижні після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, що підтверджується даними інших авторів (Ohnishi et al., 1983), які виявили подібну картину в інших м'язах за цукрового діабету I та II типу. Менша кількість мієлінових нервових волокон великого діаметра та збільшення кількості дрібних нервових волокон із витонченою мієліновою оболонкою порівняно з тваринами контрольної групи підтверджує існування процесів демієлінізації вже через шість тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету.

Характерною картиною за такого діабету вважаємо виявлення підвищеної агрегації філаментозно-тубулярних структур в аксоплазмі термінальних мієлінових нервових волокон. Westfall et al. (2015) пов'язують зростання ступеня агрегації філаментозно-тубулярних структур в аксоплазмі термінальних мієлінових нервових волокон із порушенням аксонного транспорту. Агрегація мікротрубочок і нейрофіламентів може проходити в місцях підвищеної кислотності аксоплазми. Таке «закиснення», очевидно, – результат зміненої функції нейролемоцитів, які перебувають у неадекватних умовах і виділяють у навколишнє середовище кислий білок (Rosengren et al., 1977; Bera and Nandi, 2014). При цьому в цитоплазмі нейролемоцитів значно збільшується кількість вакуоль, що вказує на критичні процеси споживання рідини з міжклітинного простору, які спостерігали дослідники в інших тканинах за цукрового діабету (Zhou et al., 2011). При цьому мієлінова оболонка має множинні ділянки розшарування ламел мієліну – показник глибокого порушення обміну фосфоліпідів (Grigoletto et al., 2017).

У нервово-м'язових закінченнях зменшується кількість синаптичних пухирців та мітохондрій, які мають просвітлений матрикс і зруйновані кристи. При цьому нейролемоцити таких нервових волокон містять дрібні гетерохроматизовані ядра, що, на думку Kuznetsov et al. (2016), свідчить про глибоке порушення мітотичної та білоксинтезувальної активності клітини.

Зменшення кількості складок постсинаптичної мембрани – важке ускладнення гіперглікемії, що поряд із зменшенням її загальної площі спричиняє зниження кількості холінорецепторів (Jonsson and Eriksson, 2007). Якщо врахувати, що при цьому аксоплазма перевантажена синаптичними пухирцями, це в сукупності свідчить про значне порушення механізму екзоцитозу ацетилхоліну через синаптичні мембрани (Azam et al., 2003).

Виявлена нами деструкція окремих мієлінових нервових волокон викликає денервацію м'язових волокон, що проявляється зменшенням кількості нейролемоцитів у ділянці нервово-м'язових закінчень і аргірофілією їх ядер. Такі зміни спостерігали інші дослідники за порушення структури нервово-м'язових закінчень як при цукровому діабеті (Bril, 2014; Ignacio and Felix, 2016), так і за захворювань іншого генезу (Muntoni, 2012; Oyebode et al., 2012; Silinsky, 2013).

Виявлений нами набряк саркоплазми, який викликає розшарування міофібрил вже через чотири тижні після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету поряд зі значним зменшенням осміофільності нуклеоплазми у м'язових волокнах проміжного типу можна розглядати як прояв функціонального виснаження ядра (Shckorbatov et al., 2010).

Якщо врахувати, що за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету порушується окисний метаболізм (Rehman and Akash, 2017), в якому безпосередню участь беруть мітохондрії (Leem and Koh, 2012), то можна припустити, що атрофія м'язів зумовлена порушенням активного транспорту нейромедіатора в результаті дефіцитного енергозабезпечення аксо-м'язової передачі нервового імпульсу. При цьому відомо, що морфологічний субстрат порушення окисного фосфорилювання – фрагментація та редукція крист, яка проявляється зниженням активності сукцинатдегідрогенази (Carette et al., 2011; Nwayyir, 2017). Кількість мікровезикул із нейромедіатором і кількість мітохондрій у пресинаптичних терміналях аксона залежить, з одного боку, від синаптичної активності нейрона (Crone and Sharma, 2011), з іншого – від швидкості аксонного транспорту (McKelvey, 2014).

Постійна ознака за всіх форм і ступенів нейро- та міопатій – недостатність активної передачі імпульсу в зоні пресинаптичної мембрани (Bril, 2014; McKelvey, 2014). Результати, отримані нами, показують, що за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету до наявних деструктивних змін претермінальних нервових волокон і аксональних терміналей приєднується недостатність передачі імпульсів, унаслідок глибоких дегенеративних змін у постсинаптичних мембранах, які посилюють вплив інших несприятливих чинників на стан м'язових волокон. Оскільки на кінцевій стадії дослідження спостерігається тотальна деструкція нервово-м'язових закінчень, морфометричний аналіз провести не вдалося.

Поряд із цим зменшення кількості внутрішьом'язових гемокапілярів викликає значне розширення «зон васкуляризації», що, за даними Popel' et al. (2017), вказує на погіршення трофіки всіх тканин язика, які входять до цієї зони. Збільшення чисельності функціональних артеріоло-венозних анастомозів зумовлюється дією вазоактивних речовин, серед яких неспецифічні метаболіти, гістамін, серотонін, кініни, що у великій кількості утворюються у разі порушення в організмі утилізації глюкози (Pertseva et al., 2013; Nwayyir, 2017). Підвищене скидання артеріальної крові у вени через артеріо-венозні анастомози спричиняють зменшення артеріовенозного градієнта концентрації кисню, порушення окисно-відновних процесів і розвитку ацидозу в навколишніх тканинах (Xie et al., 2014), до якого чутливіші мієлінові нервові волокна порівняно з безмієліновими (Brownlee et al., 1986; Jin et al., 2008; Ishibashi et al., 2016).

Виявлені нами структурно-функціональні зміни мікросудинного русла нервово-м'язових закінчень за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету торкаються не тільки змін ендотеліоцитів, а і їх морфометричного перерозподілу. Зменшення діаметра просвіту складових частин гемомікроциркуляторного русла язика підтверджується даними Tooke (2003) і Popel' et al. (2017), які вказують на виражений метричний перерозподіл гемокапілярів власних м'язів язика за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. Внаслідок зменшення діаметра вони переповнюються форменними елементами крові, що викликає венозно-капілярний стаз. На думку окремих авторів (Demidova, 2010), тривала венозна гіперемія та стаз зумовлені затриманням продуктів розпаду мієліну та зниженням pH середовища, в якому закономірно підвищується концентрація кінінів (Wagner et al., 2008; Xie et al., 2014). Вони викликають парез артеріол, підвищення проникності судин, порушують місцеві ферментативні системи та підвищують чутливість тканин до кисневого голодування (Demidova, 2010).

Після 6–8 тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету виявлена нами деструкція нервово-м'язових закінчень поряд із гомогенізацією мієлінових оболонок і атрофією термінальних розгалужень аксонів може бути результатом втрати нейротрофічного впливу мотонейрона на м'язові волокна, що залежить від ступеня порушення аксонного транспорту. На це вказує низка досліджень під час його фармакологічної блокади (Borer, 2006; Garcia et al., 2013; McKelvey, 2014). Тому деструкцію аксоплазми за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету слід розцінювати як фактор, який послаблює нейротрофічний вплив на мембрану м'язових волокон.

Висновки

Проведене нами дослідження дає детальну уяву про динаміку структурно-функціональних змін нервово-м'язових закінчень у різні терміни від початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. В динаміці цього процесу виявляються дві фази: фаза реактивно-адаптаційних змін із максимальною вираженістю через 4 тижні експерименту та деструктивно-дегенеративна фаза, яка розвивається через 6–8 тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету.

Патоморфологічні зміни відображають структурно-функціональну взаємозумовленість нервово-м'язових закінчень і окремих елементів їх мікроциркуляторного русла, що проявляється їх поєднаною реакцією в різні терміни експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. Зміни в цих структурах спричинюють глибоку морфологічну перебудову м'язових волокон різного фенотипу за експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. Результати наших досліджень показують, що в м'язових волокнах язика разом зі зміненими мітохондріями та міофібрилами містяться пошкоджені органели в аксо-м'язових синапсах з ознаками як реактивних, так і деструктивних процесів. Це вказує на тісний морфофункціональний взаємозв'язок між цими структурами.

За експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету відбувається структурна перебудова мієлінових нервових волокон і мікроциркуляторного русла язика з порушенням організації нервово-м'язових закінчень.

References

Abdel-Reheim, E. S., Abd-Elmoneim, A. A., & Hosni, A. A. (2014). Fatty-sucrosed diet/minimal dose of streptozotocin-treated rat: A novel model of gestational diabetes mellitus, metabolic and inflammatory insight. Journal of Diabetes and Metabolism, 5(9), 430–435.

Azam, L., Winzer-Serhan, U., & Leslie, F. M. (2003). Co-expression of α7 and β2-nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. Neuroscience, 119(4), 965–977.

Bera, A., & Nandi, P. K. (2014). Nucleic acid induced unfolding of recombinant prion protein globular fragment is pH dependent. Protein Science, 23(12), 1780–1788.

Borer, J. (2006). Therapeutic effects of IF blockade: Evidence and perspective. Pharmacological Research, 53(5), 440–445.

Bril, V. (2014). Neuromuscular complications of diabetes mellitus. Continuum: Lifelong Learning in Neurology, 20, 531–544.

Brownlee, M., Vlassara, H., & Cerami, A. (1986). Trapped immunoglobulins on peripheral nerve myelin from patients with diabetes mellitus. Diabetes, 35(9), 999–1003.

Byrd, J. A., Bruce, A. J., & Rogers, R. S. (2003). Glossitis and other tongue disorders. Dermatologic Clinics, 21(1), 123–134.

Carette, C., Dubois-Laforgue, D., Gautier, J.-F., & Timsit, J. (2011). Diabetes mellitus and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: From one crisis to another. Diabetes and Metabolism, 37(1), 79–82.

Colev, V. (2008). Experimental models in studies of diabetes mellitus. Pathophysiology, 5, 242.

Crone, S. A., & Sharma, K. (2011). Patterning spinal motor activity in the absence of synaptic excitation. Neuron, 71(6), 957–959.

Demidova, T. Y. (2010). Vascular complications of type 2 diabetes mellitus beyond the reach of glycemic control. Diabetes Mellitus, 13(3), 111.

García, M. R., Pearlmutter, B. A., Wellstead, P. E., & Middleton, R. H. (2013). A slow axon antidromic blockade hypothesis for tremor reduction via deep brain stimulation. PLoS ONE, 8(9), 734–756.

Grigoletto, J., Pukaß, K., Gamliel, A., Davidi, D., Katz-Brull, R., Richter-Landsberg, C., & Sharon, R. (2017). Higher levels of myelin phospholipids in brains of neuronal α-synuclein transgenic mice precede myelin loss. Acta Neuropathologica Communications, 5(1), 1–10.

Ignacio, A. B., & Felix, L. S. (2016). Diabetes mellitus and neuromuscular blockade: Review. Journal of Diabetes and Metabolism, 7(6), 1–8.

Ishibashi, F., Kojima, R., Taniguchi, M., Kosaka, A., Uetake, H., & Tavakoli, M. (2016). The expanded bead size of corneal c-nerve fibers visualized by corneal confocal microscopy is associated with slow conduction velocity of the peripheral nerves in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of Diabetes Research, 20(16), 1–9.

Jackowiak, H., Skieresz-Szewczyk, K., Kwieciński, Z., Godynicki, S., Jackowiak, K., & Leszczyszyn, A. (2014). Light microscopy and scanning electron microscopy studies on the reduction of the tongue microstructures in the white stork (*Ciconia ciconia*, Aves). Acta Zoologica, 96, 436–441.

Jin, H. Y., Piao, M. H., Kim, S. Y., Kang, S. M., Kim, C. H., Kim, D. Y., Park, J. H., Baek, H. S., & Park, T. S. (2008). The morphological observation of gastric nerve fibers in experimental animals and people with diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice, 79, 84–85.

Jonsson, M., & Eriksson, L. I. (2007). Role of presynaptic acetylcholine autoreceptors at motor nerve endings on tetanic and train-of-four fade seen during a nondepolarizing neuromuscular block. Anesthesiology, 106(6), 1243–1244.

Konur, S., & Yuste, R. (2004). Imaging the motility of dendritic protrusions and axon terminals: Roles in axonsampling and synaptic competition. Molecular and Cellular Neuroscience, 27(4), 427–440.

Kuznetsov, K. A., Shckorbatov, Y. G., Kolchigin, N. N., & Nikolov, O. T. (2016). Changes of chromatin and cell membranes in exfoliated human buccal epithelium cells exposed to non-ionizing and ionizing electromagnetic fields. Conference Paper published Sep 2016 in 2016 8th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS).

Leem, J., & Koh, E. H. (2012). Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: Implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Experimental Diabetes Research, 20(12), 1–8.

McKelvey, C. (2014). Axon transport deficits: Neurodegeneration's first sign? Multiple Sclerosis Discovery Forum, 12, 1–10.

Meo, S. A. (2009). Diabetes mellitus: Health and wealth threat. International Journal of Diabetes Mellitus, 1(1), 42.

Muntoni, F. (2012). Novel neuromuscular diseases. Neuromuscular Disorders, 22(9–10), 804.

Nwayyir, H. A. (2017). Is glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency a risk factor for proliferative diabetic retinopathy in male patients with type 1 diabetes mellitus in basrah? Journal of Medical Science and Clinical Research, 5(1), 15173–15179.

O'Reilly, D., & Long, R. G. (2008). Diabetes and the gastro-intestinal tract. Digestive Diseases, 5(1), 57–64.

Ohnishi, A., Harada, M., Tateishi, J., Ogata, J., & Kawanami, S. (1983). Segmental demyelination and remyelination in lumbar spinal root of patients dying with diabetes mellitus. Annals of Neurology, 13(5), 541–548.

Oyebode, O. R. O., Hartley, R., Singhota, J., Thomson, D., & Ribchester, R. R. (2012). Differential protection of neuromuscular sensory and motor axons and their endings in WldS mutant mice. Neuroscience, 200, 142–158.

Pertseva, M. N., Kuznetsova, L. A., & Shpakov, A. O. (2013). New conceptual approach for search for molecular causes of diabetus mellitus, based on study of functioning of hormonal signaling systems. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 49(5), 457–468.

Popel', S. L., Baskevich, O. V., Zhurakivskyi, V. M., Zhurakivska, O. Y., Melnik, I. V., Krasnopolskiy, S. Z., & Atamanchuk, O. V. (2017). Three-dimensional structure of the lingual papillae of healthy rats and rats with experimental diabetes mellitus (in the context of mechanism of development of diabetic glossitis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 58–65.

Pourlis, A. F. (2014). Morphological features of the tongue in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). Journal of Morphological Sciences, 31(3), 177–181.

Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: How are they interlinked? Journal of Cellular Biochemistry, 99, 1–9.

Rezki, A., Merioud, B., Delmas, D., Cyril, C., Scheiwiller, R., Leblé, R., & Valensi, P. (2016). Sequential compression/decompression by a pulsating suit increases cutaneous microcirculatory blood flow in patients with type 2 diabetes. Diabetes and Metabolism, 42(4), 298.

Rosengren, L., Wronski, A., Haglid, K. G., Jarlstedt, J., & Rönnbäck, L. (1977). Amino acid incorporation into total protein and levels of S-100 protein in discrete rat brain areas after prolonged protein or amino acid restriction. Journal of Neuroscience Research, 3(2), 153–161.

Rukavina, M. (2016). Typ-1-Diabetes – Verhältnis Proinsulin/C-Peptid mit Pathogenese Assoziiert. Diabetologie und Stoffwechsel, 11(6), 384–396.

Sanders, I., & Mu, L. (2013). A three-dimensional atlas of human tongue muscles. Anatomical Record, 296(7), 1102–1114.

Semenko, V. V., & Savytskyi, I. V. (2017). Development of experimental model of diabetes mellitus. Journal of Endocrinology, 13(4), 276–280.

Shckorbatov, Y., Rudneva, I., Pasiuga, V., Grabina, V., Kolchigin, N., Ivanchenko, D., Kazanskiy, O., Shayda, V., & Dumin, O. (2010). Electromagnetic field effects on *Artemia* hatching and chromatin state. Open Life Sciences, 5(6).

Silinsky, E. M. (2013). Low-frequency neuromuscular depression is a consequence of a reduction in nerve terminal Ca^{2+} currents at mammalian motor nerve endings. Anesthesiology, 119(2), 326–334.

Tooke, J. E. (2003). The microcirculation in diabetes mellitus. International Textbook of Diabetes Mellitus.

Uemura, M., Tamada, Y., & Suwa, F. (2009). Morphological study of the connective tissue papillae and the capillary loops on the lingual dorsum in the type 2 diabetes mellitus model rats. Okajimas Folia Anatomica Japonica, 85(4), 139–149.

Wagner, O. F., Nowotny, P., Vierhapper, H., & Waldhäusl, W. (2008). Plasma concentrations of endothelin in man: Arterio-venous differences and release during venous stasis. European Journal of Clinical Investigation, 20(5), 502–505.

Westfall, S., Lomis, N., Singh, S. P., Dai, S. Y., & Prakash, S. (2015). The gut microflora and its metabolites regulate the molecular crosstalk between diabetes and neurodegeneration. Journal of Diabetes and Metabolism, 6(8), 577–580.

Xie, X.-J., Hu, Y., Cheng, C., Feng, T.-T., He, K., & Mao, X.-M. (2014). Should diabetic ketosis without acidosis be included in ketosis-prone type 2 diabetes mellitus? Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 30(1), 54–59.

Zhou, C., Gilbert, J. D., & Byard, R. W. (2011). How useful is basal renal tubular epithelial cell vacuolization as a marker for significant hyperglycemia at autopsy? Journal of Forensic Sciences, 56(6), 1531–1533.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 403–409
doi: 10.15421/021762

Changes in the elemental composition of winter wheat plants caused by the action of Megafol and retardants

I. M. Miroshnichenko, T. I. Makoveychuk, L. M. Mykhalska, V. V. Schwartau

Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 24.06.2017
Received in revised form 12.08.2017
Accepted 17.08.2017

Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylkivska Str., 31/17, Kyiv, 03022, Ukraine

Miroshnichenko, I. M., Makoveychuk, T. I., Mykhalska, L. M., & Schwartau, V. V. (2017). Changes in the elemental composition of winter wheat plants caused by the action of Megafol and retardants. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 403–409. doi: 10.15421/021762

In the course of field experiments conducted during the 2015–2016 vegetation seasons, retardants Medax Top, 1.0 l/ha (prohexadione-Ca and mepiquat-chloride), appeared more effective than Terpal, 1.5 l/ha (mepiquat-chloride and ethephon), on field plots with high-yield varieties. Foliar application of Megafol promoted the productivity of winter wheat varieties Smuglyanka and Podolyanka and reduced the negative influence of retardants on the wheat plants in the vegetation seasons which were characterized by moisture deficit. The influence of modern retardants – prohexadione-Ca + mepiquat-chloride (Medax Top) and mepiquat-chloride + etefone (Terpal, both BASF, Germany) on the accumulation of some macro- and micronutrients in winter wheat plants was determined. The assays were performed on an ICP-MS Agilent 7700x mass spectrometer (Agilent Technologies, USA) with ICP-MS Mass Hunter WorkStation. Samples of winter wheat plants were taken in the phase of flowering and grain ripening. The samples were dried, homogenized, 0.400 g of weight was dissolved in ICP-grade nitric acid in the Milestone Start D (Milestone Inc., USA). All solutions were prepared on 1st class water (18 MΩ cm^{-1}) obtained on the Scholar-UV Nex Up 1000 (Human Corporation, Korea) water purification system. The ICP-MS Complete Standard IV-ICPMS-71A was used as the external standard, and the internal standard was Sc, both of Inorganic Ventures, USA. According to the ICP-MS results of plant samples of winter wheat of Smuglylanka and Podolanka, it has been shown that, in conditions of wheat growing on light soils of Polissya, modern compositional retardants affect the ionome of plants during the vegetation season, as well as change the content of inorganic elements in the grain. It was found that winter wheat of the middle-stem intensive Podolyanka type reacted more responsively to retardant treatment than the short-stem highly intensive Smuglyanka type. At the same time, there was an increase in the content of nutrients in winter wheat of the Podolyanka variety. It should be noted that wheat grain of the Smuglyanka variety contained a significantly higher pool of macro- and trace elements than the Podolyanka variety. It was established that the treatment of Podolyanka winter wheat varieties by mepiquat-chloride and ethephon (Terpal, 1.5 l/ha) positively influenced the accumulation of potassium, magnesium and calcium and manganese, copper and zinc in the grain. We found that foliar application of compositions of amino acids simultaneously with retardants can reduce the negative action of PGRs on formation of the harvest in conditions of drought and influence the maintenance of composition of inorganic elements in the plants and in the grain. The composition of retardants with the content of cyclohexadione derivative (Medax Top) also significantly influenced the changes in the content of inorganic elements in plants and grains. We note the significant increase in the content of magnesium in the leaves and in grain due to the action of Medax Top. These differences in reaction of winter wheat varieties to the action of retardants of the class of cyclohexadione are important for clarifying the systems of nutrition of crops in intensive growing technologies, especially in the conditions of drought and high temperatures. Reduction in the pools of a number of inorganic elements in plants, for example iron, by the action of retardants may be due to the constraints on the entry of these elements from the poor soils of the Polissya zone and should be compensated via foliar nutrition. Also, the peculiarities of the activity of plant growth regulators have been shown to indicate a close relationship between signal systems of plants and changes in ionome.

Keywords: wheat; amino acids; retardants; ICP-MS; ionome

Зміни елементного складу рослин пшениці озимої за дії Мегафолу та ретардантів

І. М. Мірошниченко, Т. І. Маковейчук, Л. М. Михальська, В. В. Швартау

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна

У польових та виробничих дослідах вегетаційних сезонів 2015–2016 рр. на посівах високопродуктивних сортів пшениці озимої ретардант Медакс Топ, 1,0 л/га (прогексадіон Са + мепікват) виявився ефективнішим, ніж Терпал, 1,5 л/га (мепікват хлорид + етефон).

Позакореневе застосування Мегафолу підвищувало врожайність пшениці сортів Смуглянка та Подолянка та знижувало негативну дію ретардантів на рослини пшениці у вегетаційних сезонах, які характеризувалися нестачею вологи. За результатами ICP-MS аналізів зразків рослин пшениці озимої сортів Смуглянка та Подолянка встановлено, що за умов вирощування пшениці на легких ґрунтах Полісся сучасні добрива з умістом амінокислот і композиційні ретарданти впливають на елементний склад рослин протягом вегетації, а також змінюють вміст неорганічних елементів у зерні. Озима м'яка пшениця середньорослого сорту Подолянка інтенсивного типу чутливіше реагувала на обробку ретардантами, ніж короткостебловий високоінтенсивний сорт Смуглянка. При цьому спостерігали підвищення вмісту елементів живлення у зерні озимої пшениці сорту Подолянка. Композиція ретардантів із похідним ацилциклогексадіону (Медакс Топ) також суттєво впливала на зміни елементів іоному, підвищуючи вміст Mg та інших елементів у рослинах і зерні. Позакореневе застосування композицій амінокислот одночасно з ретардантами може знижувати негативну дію РРР на формування врожаю за посухи та впливає на збереження складу неорганічних елементів під час вегетації та у зерні. Ці відмінності у реакції сортів пшениці озимої на дію ретардантів класу ацилциклогексадіонів та інших мають значення для уточнення систем живлення посівів культури в інтенсивних технологіях вирощування, зокрема, в умовах посухи та високих температур. Зменшення пулів ряду неорганічних елементів у рослинах (наприклад заліза) за дії ретардантів може бути пов'язане з обмеженнями надходження цих елементів із бідних ґрунтів Поліської зони та повинно компенсуватися позакореневим підживленням. Установлені особливості прояву активності регуляторів росту рослин свідчать про тісний зв'язок між сигнальними системами рослин та змінами іоному.

Ключові слова: пшениця; амінокислоти; ретарданти; ICP-MS; іоном

Вступ

«Зелена революція» суттєво підвищила рівні врожайності пшениці та інших зернових колосових культур у світі. Зростання виробництва високоякісного зерна залишається головним напрямом сучасного зерновиробництва та однією з основ високого рівня рентабельності рослинництва в Україні (Morgun et al., 2010, 2015; Reynolds, 2011, 2012). Проте зростаючі дози внесення мінеральних азотних добрив під високопродуктивні короткостеблові та середньорослі сорти пшениці часто вимагають застосування ретардантів для протидії виляганню посівів (Berry et al., 2004; Espindula et al., 2009; Morgun et al., 2010, 2015; Merry et al., 2015). Більшість сучасних ретардантів за механізмом дії належать до класу інгібіторів біосинтезу гіберелінів. Серед відомих із кінця 1970-х років РРР хлормекватхлорид (або хлорхоліну хлорид, чи 2-хлоро-N,N,N-триметилетанамінохлорид), мепікват (або 1,1-диметилпіперидину хлорид), який використовують у формі хлориду або пентаборату, хлорфоніум (або трибутил[(2,4-дихлорофеніл)-метил]фосфонію) у формі хлориду, АМО-1618 (5-гідроксикарвакрил)триметиламонію хлорид 1-піперидину карбоксилат). Ці сполуки інгібують перетворення геранілгеранілпірофосфату до ent-каурену. Наступне перетворення до ent-кауренату каталізується цитохром-Р-450 залежними монооксигеназами. Ретарданти наступного покоління на основі N-гетероциклів: анцимідол (α-циклопропіл-α-(4-метоксифеніл)-5-піримідинметанол, флурпримідол (α-(1-метилетил)-α-[4-(трифлуорометокси)феніл]-5-піримідинметанол, тетцикласис (3aR,4R,4aS,6aR,7R,7aS)-rel-1-(4-хлорофеніл)-3a,4,4a,6a,7,7a-гексагідро-4,7-метано-1H-[1,2]-діазето-[3,4-f]-бензотриазол, паклобутразол ((αR,βR)-rel-β-[(4-хлорофеніл)метил]-α-(1,1-диметилетил)-1H-1,2,4-триазол-1-етанол), уніконазол-Р (βE)-β-[(4-хлорофеніл)метилен]-α-(1,1-диметилетил)-1H-1,2,4-триазол-1-етанол та інабенфід N-[4-хлор-2-(гідроксифенілметил)феніл]-4-піридинкарбоксамід інгібують ті самі ферменти утворення ent-каурену та ent-кауренату. В останні десятиріччя ефективні ретарданти також знаходять серед похідних відомого раніше винайденою присутністю граміцидів класу циклогексадіонів (ЦГД), зокрема – ацил-ЦГД, які ефективно блокують шляхи біосинтезу ГК, зменшують вміст активних гіберелінів $ГК_1$ і $ГК_4$ і широко використовуються у сучасному рослинництві (Evans, 1999; Matysiak, 2006). Ацил-ЦГД пригнічують фінальні стадії біосинтезу ГК, а саме гідроксилювання $ГК_{20}$ в $ГК_1$. Тринексапак-етил, прогексадіон-Ca та дамінозид інгібують переважно 3β-гідроксилювання та утворення високоактивних гіберелінів із неактивних похідних (Rademacher, 2000; Morgun et al., 2010; Rademacher, 2010; Schwartau et al., 2013). Це підтверджується детальними дослідженнями механізму дії ацил-ЦГД (Evans, 1999), якими встановлено, що за структурою молекула прогексадіону подібна до 2-оксоглутарової кислоти (ко-субстрат деоксигеназ, що каталізують гідроксилювання пізніх стадій біосинтезу ГК). Тому первинним сайтом дії прогексадіону кальцію може бути саме 3β-гідроксилювання. У результаті застосування прогексадіону відбувається зниження рівня накопичення $ГК_1$ (високоактивного РРР), що викликає акумулювання його попередника – $ГК_{20}$ (неактивної форми). При цьому на генетично близькому до пшениці та інших зернових колосових культур виді – куцоніжці двоколосковій (*Brachypodium distachyon* L. P. Beauv.) показано відсутність транскрипційної відповіді на дію фітогормонів, у тому числі прогександіону-Ca (Kakei et al., 2015).

Ретарданти класу похідних ацил-ЦГД легко засвоюються через листкову поверхню та переміщуються по рослині переважно акропетально, базипетальний рух обмежений. Вони можуть бути ефективними як за внесення у фазі кущіння, на початку виходу рослин у трубку, так і у фазі прапорцевого листка, коли активується ріст останнього підколосового міжвузля. Важливо, що у цей період усі елементи колоса вже закладені, тому внесення похідних ЦГД не має вираженого негативного впливу на продуктивність рослин (Morgun et al., 2010, 2015; Espindula, et al., 2009). Ця особливість прояву ретардантної активності нових РРР має значення щодо зменшення залежності технології вирощування зернових колосових культур від несприятливих умов вегетаційного сезону, зокрема дефіциту вологи, високих температур протягом другої половини вегетації. Саме несприятливі умови вегетаційних сезонів в останні роки часто знижують ефективність застосування ретардантів класу онієвих сполук, що на окремих сортах зернових культур спричиняє навіть зниження рівнів урожайності.

Механізм дії фітогормонів пов'язаний зі змінами вмісту неорганічних елементів у рослинах (Marschner, 1995; Chen et al., 1998; Bray et al., 2000; Battal et al., 2004; Marschner, 2012). ГК стимулює ріст і розвиток рослин, а саме проростання насіння, перехід із вегетативного до генеративного розвитку, від ювенільного до сформованого листка, визначає перебіг генеративної фази та розвиток зерна поряд із взаємодією різних факторів навколишнього середовища – світла, температури та вологи (Hedden, 2016). Також відомо про взаємозв'язок між проявом біологічної активності ГК і вмістом низки мікроелементів у рослинах, зокрема – заліза (Rademacher, 2000; Bray et al., 2000; Battal et al., 2004). Наприклад, установлено зміни вмісту іонів у рослинах за дії похідного ацил-ЦГД тринексапак-етилу на пшениці озимій (Virych et al., 2012).

При цьому інформація щодо впливу сучасних ретардантів, насамперед похідних ацил-ЦГД, на вміст біологічно важливих неорганічних елементів практично не досліджена. Інформація щодо змін іоному має значення для формування систем живлення культури для досягнення високих рівнів урожайності за внесення регуляторів росту рослин, у тому числі й за несприятливих ґрунтово-кліматичних умов вирощування пшениці.

Суттєве обмеження щодо використання ретардантів у технологіях отримання високих врожаїв зернових колосових культур – їх інгібувальна дія на формування врожаю за дефіциту вологи та високих температур. Для похідних класу ацил-ЦГД ця залежність проявляться у дещо меншому ступені, порівняно з хлорхолінхлоридом або етефоном. З урахуванням можливості їх застосування у пізніші фази розвитку, у тому числі на початку генеративного розвитку, доцільна обробка ретардантами у композиціях одночасно з іншими агрохімікатами з метою досягнення синергічної або адитивної взаємодії. Раніше було показано, що застосування ад'ювантів посилює ретардантну активність хлормекват хлориду та прогексадіону-Ca на посівах пшениці (Stachecki et al., 2004). Один із

важливих щодо зниження фітотоксичної дії агрохімікатів складових отримання високих врожаїв – добрива з умістом амінокислот, зокрема Мегафол тощо, у позакореневому застосуванні (Morgun et al., 2010, 2015; Petrozza et al., 2014). Також застосування добрив з умістом амінокислот, на відміну від мінеральних добрив для позакореневого підживлення, можливе й за низьких рівнів дефіциту вологи, що, одночасно, може посилювати ретарданту дію РРР. При цьому зміни елементного складу рослин протягом вегетації за дії ретардантів і амінокислот можуть охарактеризувати взаємодію цих класів агрохімікатів, проте до цього часу вони не досліджені. Тому мета досліджень – з'ясувати вплив низки сучасних ретардантів – комплексів на основі похідного ацил-ЦГД та інших, композицій амінокислот, на прикладі Мегафолу, на накопичення деяких макро- та мікроелементів у рослинах високопродуктивних сортів пшениці озимої.

Матеріал і методи досліджень

Польові досліди проводили на сортах пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) Смуглянка та Подолянка на базі Дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України в смт Глеваха Васильківського району Київської області у вегетаційних сезонах 2015–2016 років. Ґрунт темно-сірий опідзолений, піщано-суглинковий за механічним складом. Площа ділянки складала 12,95 м^2, облікової – 10,00 м^2. Повторність дослідних варіантів – 6–8-разова. Фон – $N_{120}P_{80}K_{140}$.

Виробничий дослід проводили у 2016 році на полях ТОВ «ПоділляЛатІнвест» (Тиврівський район Вінницької області).

Досліджували дію ретардантів прогексадіон Са + мепікват хлорид (препарат Медакс Топ) та мепікват хлорид + етефон (Терпал), обидва виробництва BASF (Німеччина), які вносили одноразово навесні у фазу GS39 (Zadoks, 1974) у дозах 1,0 і 1,5 л/га відповідно; а також водорозчинного комплексу амінокислот, отриманих гідролізом водоростей – Мегафол, виробництва компанії Valagro, Італія. Протягом вегетації рослини обробляли фунгіцидами та інсектицидами, зокрема, у фазу кущіння, цвітіння та по прапорцевому листку. Проводили підживлення рослин і фенологічні спостереження.

Вміст білка та клейковини у зерні визначали на ІЧ-спектрометрі Inframatic 8600 (Perten Instruments, Швеція).

Визначення вмісту неорганічних елементів у зразках проводили на мас-спектрометрі з індуктивно зв'язаною плазмою ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, США) з ICP-MS Mass Hunter WorkStation (табл. 1). Зразки рослин пшениці озимої відбирали у фази початку цвітіння та повної стиглості. Зразки висушували до постійної маси, гомогенізували, наважку 0,400 г озолювали в азотній кислоті кваліфікації ICP-grade в мікрохвильовій системі пробопідготовки Milestone Start D (Milestone Inc., США). Після охолодження зразки розчиняли, коефіцієнт розведення – 250X. Усі розчини готували на воді першого класу (18 МОм·cm^{-1}), отриманій на системі очищення води Scholar-UV Nex Up 1000 (Human Corporation, Корея). Як зовнішній калібрувальний стандарт використовували робочі розчини ICP-MS Complete Standard IV-ICPMS-71A, а внутрішнього стандарту – 1 ppb Sc, обидва виробництва фірми Inorganic Ventures (США).

Таблиця 1
Основні налаштування мас-спектрометра Agilent 7700x для аналізу неорганічних елементів

Показник	Параметри	Значення
Живлення	Потужність генератора, W	1550
Налаштування аргонової плазми	Потік газу-носія, л/хв.	16,0
	Потік гелію, л/хв.	0,2
Автоналаштування	CeO^+/Ce^+ (%)	1,114
	Ce^+/Ce^+ (%)	1,867
	Чутливість, імпульсів за секунду до мг/л	Li (62700), Y (92920), Tl (87080)

В аргоновій плазмі вибрані макро- та мікроелементи можуть утворювати хибні піки. Наприклад, рівні за масою CaO та ^{56}Fe, чи ArN або ArO з іншими ізотопами заліза. ArNH та KO можуть маскувати Mn, а Ba^{++} – Zn. Усі 6 ізотопів Ca можуть взаємодіяти з O, H та Ar, що спричиняє неточності у визначенні Cu, Fe, Sc, Se. Хоча мідь добре іонізується в аргоновій плазмі (90%), визначення ізотопу ^{63}Cu ускладнюється взаємодією NaAr та піками P, а ^{65}Cu перекривається SO_2/SO_2H; також ізотопи міді інтерферують з оксидами кальцію та титану. Тому визначення проводили у режимі продування гелієм, що ефективно видаляє згадані матричні та елементні інтерференції.

Статистичні обрахунки проводили у програмному забезпеченні ICP-MS Mass Hunter WorkStation. Застосовували дисперсійний аналіз, відмінності між середніми значеннями вважали вірогідними за $P < 0,05$. У таблицях наведено середні арифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати та їх обговорення

Ефективність ретардантів на посівах пшениці озимої значною мірою залежить як від особливостей сорту, вмісту мінеральних поживних компонентів агрофітоценозу, так і від погодно-кліматичних умов. РРР можна застосовувати за дефіциту вологи з метою оптимізації водного балансу культурних рослин (Rokhafrooz, 2016). Проте у виробництві їх використання за несприятливих умов вирощування часто не сприяє підвищенню врожаїв зернових колосових культур.

Найважливіші кліматичні чинники, що впливають на довжину колоса, – температура повітря, тривалість фотоперіоду, наявність продуктивної вологи в метровому шарі ґрунту. Розвиток колоса у зернових прискорює тривалий фотоперіод і високі температури. За високої температури, що значно перевищувала 25 ºС у 2015 році, раніше сформувався верхівковий колосок і передчасно припинився його розвиток, у результаті чого колос утворився коротший. Із підвищенням температури вже з 15 ºС до 25 ºС пришвидшується ріст зернівки, скорочується період від її збільшення до повної стиглості, що спричиняє зниження врожаю. За недостатнього вологозабезпечення сформовані зерна також не розвиваються. Близький за рівнем високих температур і нестачі вологи також вегетаційний сезон 2016 року.

За несприятливих погодних умов сезонів 2015 і 2016 років (табл. 2) вилягання пшениці сортів Смуглянка та Подолянка у дослідах не спостерігали. Підвищення врожаю на короткостебловому сорті Смуглянка за внесення Терпалу не виявлено. Найвищих у досліді рівнів урожаю досягнуто за спільного внесення амінокислот і ретардантів. Спільна за внесення Мегафолу з Терпалом тенденція до зниження врожаю за внесення ретарданту на фоні короткотривалих посух не встановлено.

Таблиця 2
Вплив ретардантів та Мегафолу на врожайність пшениці озимої (т/га, ДСВ ІФРГ НАН України, Київська обл.)

Варіанти	Смуглянка		Подолянка	
	2015 р.	2016 р.	2015 р.	2016 р.
Контроль	7,35	8,11	7,09	7,55
Терпал, 1,0 л/га	7,31	8,18	7,12	7,11
Медакс Топ, 1,0 л/га	7,64	8,40	7,76	7,81
Мегафол, 1,5 л/т	7,55	8,45	7,51	7,70
Терпал, 1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	7,44	8,51	7,32	7,40
Медакс Топ, 1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/т	7,75	8,48	7,51	7,90
$НІР_{0,05}$	0,15	0,11	0,16	0,18

Ця залежність спостерігалася й в умовах виробничого досліду у Вінницькій області. Ретардант Медакс Топ, як і у польових дослідах, виявився ефективнішим порівняно з Терпалом. В умовах вегетаційного сезону застосування ретардантів або не впливало на зростання врожаю (Терпал), або незначно підвищувало врожайність. При цьому спостерігали статистично достовірне зростання якісних показників зерна. Це, ймовірно, пов'язано з оптимізацією архітектоніки посіву та зростанням конкурентної здатності рослин пшениці відносно бур'янів, зокрема до метлюгу

звичайного (*Apera spica-venti* L.), що протягом періоду після внесення ретардантів спостерігали візуально.

Таблиця 3

Вплив ретардантів на врожайність пшениці озимої сорту Актер (ТОВ «ПоділляЛатІнвест», Вінницька область, 2016)

Варіанти	Врожай, т/га	Вміст білка/клейковини, %
Контроль	6,660	13,1/31,1
Терпал, 1,0 л/га	6,649	13,9/31,8
Медакс Топ, 1,0 л/га	7,061	14,0/32,2
$НІР_{0,05}$	0,101	0,5/0,9

Без фонового обприскування граміницидами лише на ділянках виробничого досліду, де вносили ретарданти, рослини метлюгу звичайного не піднімалися над посівом пшениці. Зростання якісних показників врожаю можливе також за посилення розвитку кореневої системи пшениці за дії ретардантів (Morgun et al., 2010, 2015).

Застосування ретардантів на озимій пшениці сорту Смуглянка слабко вплинуло на зниження висоти головного пагона (табл. 4). При цьому бічні пагони наближаються за довжиною до головних та візуально спостерігали суттєве вирівнювання посівів. Ретарданти (Терпал, Медакс Топ) слабко зменшували довжину четвертого міжвузля, орієнтовно до 20%, і п'ятого – на 3–7%. Застосування Мегафолу викликало вирівнювання стеблостою, при цьому спостерігали статистично достовірне посилення ретардантної активності. За внесення ретардантів шосте міжвузля не сформувалося, на відміну від варіанта із внесенням Мегафолу.

Таблиця 4

Вплив ретардантів і Мегафолу на біометричні показники головних пагонів рослин озимої пшениці сорту Смуглянка (ДСВ ІФРГ НАН України, 2015 р., M ± m, n = 30)

Варіанти	Кількість продуктивних пагонів, шт.	Висота продуктивних пагонів, см	Довжина міжвузлів, см					
			1	2	3	4	5	6
Контроль	3,4 ± 0,5	92,4 ± 7,6	6,0 ± 1,8	8,7 ± 2,5	16,9 ± 4,0	29,1 ± 4,1	35,1 ± 4,3	–
Терпал, 1,5 л/га	3,2 ± 0,4	86,6 ± 2,9	6,2 ± 1,8	9,1 ± 2,3	11,9 ± 2,7	20,5 ± 3,5*	32,6 ± 3,1	–
Медакс Топ, 1,0 л/га	3,4 ± 0,7	86,3 ± 6,9	6,1 ± 2,2	8,5 ± 2,5	12,8 ± 3,5	22,1 ± 6,4	33,6 ± 2,4	–
Мегафол, 1,5 л/га	3,2 ± 0,4	99,1 ± 2,6	6,3 ± 2,6	9,5 ± 2,4	15,1 ± 0,9	29,9 ± 3,5	34,5 ± 5,9	28,3 ± 4,6
Терпал, 1,5 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	3,0 ± 0,4	85,3 ± 2,4	4,6 ± 1,5	8,0 ± 1,5	13,1 ± 3,5	21,4 ± 3,8*	35,2 ± 1,9	–
Медакс Топ, 1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	3,2 ± 0,4	83,7 ± 3,8	5,2 ± 2,1	7,7 ± 3,3	13,7 ± 4,3	21,1 ± 3,4*	35,0 ± 3,2	–

Примітка: * – тут і в наступних таблицях відмінності показників щодо контролю вірогідні за P < 0,05.

Таблиця 5

Вплив ретардантів і Мегафолу на біометричні показники головних пагонів рослин озимої пшениці сорту Подолянка (ДСВ ІФРГ НАН України, 2015 р., M ± m, n = 30)

Варіанти	Кількість продуктивних пагагонів, шт.	Висота продуктивних пагонів, см	Довжина міжвузлів, см				
			1	2	3	4	5
Контроль	3,2 ± 0,4	103,9 ± 4,4	6,1 ± 2,2	10,9 ± 2,7	16,5 ± 4,2	28,0 ± 4,5	37,6 ± 2,1
Терпал, 1,5 л/га	3,4 ± 0,5	99,3 ± 6,3	6,2 ± 3,1	11,3 ± 3,2	14,8 ± 3,9	22,1 ± 6,3*	32,7 ± 5,1*
Медакс Топ, 1,0 л/га	3,2 ± 0,5	92,3 ± 6,5*	4,3 ± 2,3	9,9 ± 3,0	16,7 ± 4,8	27,3 ± 8,2	36,3 ± 1,9
Мегафол, 1,5 л/га	3,3 ± 0,5	102,1 ± 6,6	5,1 ± 1,4	11,2 ± 1,5	17,7 ± 4,3	28,6 ± 4,7	37,0 ± 1,4
Терпал, 1,5 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	3,3 ± 0,7	97,7 ± 4,2	4,7 ± 0,9	9,6 ± 1,4	13,5 ± 1,7*	22,9 ± 1,8*	38,4 ± 3,3
Медакс Топ,1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	3,4 ± 0,5	95,5 ± 7,0	4,4 ± 3,1	9,8 ± 3,2	14,3 ± 4,2	25,2 ± 7,4	36,6 ± 5,6

Застосування ретардантів на сорті Подолянка викликало деяке зменшення висоти рослин, порівняно з контролем (табл. 5). Обробка рослин прогексадіоном Са і мепікватом знижувало довжину стебла на 11,2%, тоді як Терпалом, 1,5 л/га – на 3,9%. Проте найвищий рівень скорочення третього – п'ятого міжвузлів виявлено на варіантах із Терпалом. Застосування на посівах озимої пшениці композиції ретардантів із Мегафолом теж сприяло зниженню висоти рослин, особливо за рахунок третього – четвертого міжвузлів.

Короткостебловий сорт пшениці озимої Смуглянка характеризується високими рівнями реутилізації пластичних речовин у другу половину вегетації (Mogun et al., 2010, 2015). Тому, на відміну від варіантів із сортом Подолянка, за внесення Мегафолу на короткостебловому сорті сформувалося шосте міжвузля.

Таким чином, в умовах виробничого та польових дослідів застосування ретарданту Медакс Топ суттєво переважало за ефективністю Терпал, внесення якого, переважно, не викликало підвищення врожаю у вегетаційних сезонах 2015 та 2016 років. Ефективність застосування Мегафолу була дещо вищою на середньорослому сорті Подолянка. Застосування Мегафолу з Терпалом у композиції підвищувало ефективність останнього щодо впливу на рівень урожаю пшениці.

Велика кількість іонів металів входить до складу низки білкових молекул як коферментів, кофакторів або простетичних груп. Частина з них проявляє властивості універсальних вторинних посередників (Ca^{2+}), формує електрохімічні градієнти мембран (K^+, Na^+), є одними з важливих елементів перебігу енергетичних і пластичних процесів (Mg^{2+}). Зміни іоному рослин генетично детерміновані (Pokhylko et al., 2016), можуть залежати від дії агрохімікатів (Kabata-Pendias et al., 1989). Застосування ретардантів – елемент технологій високих врожаїв і не розглядається без відповідних рівнів фону азотного живлення посівів пшениці (Shekoofa, 2008). Є відомості про взаємозв'язок між рівнем сірчаного живлення та впливом ретардантів на показники врожаю пшениці ярої (Hussain, 2007). При цьому інформація щодо напрямку змін має значення для формування високоефективних систем живлення посівів.

Обробка рослин ретардантами та амінокислотами впливала на зміни вмісту неорганічних елементів. Мепікват хлорид + етефон (Терпал, 1,5 л/га) окремо й у композиції з Мегафолом, 1,5 л/га підвищував накопичення калію листками пшениці озимої сорту Подолянка порівняно з контролем. У листках озимої пшениці сорту Смуглянка збільшення калію відбувалося лише за умови обробки сумішшю прогексадіону з мепікват хлоридом (Медакс Топ, 1,0 л/га) і комплексом амінокислот (Мегафол, 1,5 л/га) (табл. 6). Зростання вмісту калію, ймовірно, може бути зумовлене дією амінокислот, які входять до складу Мегафолу та стимулюють метаболічні процеси та засвоєння поживних речовин рослиною. При цьому вірогідна інтенсифікація процесів поглинання та транспорту К, який бере участь у біосинтезі целюлоз і геміцелюлоз, сприяє потовщенню клітинних стінок соломини злакових, підвищуючи їх стійкість до вилягання (Morgun et al., 2010, 2015). Пул калію у листках рослин сорту Подолянка на контрольному варіанті був дещо вищим за вміст елемента в листках рослин сорту Смуглянка, що збігається з відомою вищою посухостійкістю пшениці сорту Подолянка (Morgun et al., 2010, 2015).

Тенденція зниження пулу калію за дії ретардантів може мати негативний вплив в умовах посухи та високих температур. При цьому сортові відмінності накопичення основного неорганічного осмотичного чинника у клітинах, ймовірно, можуть бути викорис-

тані під час розроблення експрес-аналізів високопродуктивних сортів пшениці озимої на дію похідних ЦГД за дії посухи та високих температур. У попередні роки в умовах виробництва у східних регіонах України в умовах посухи протягом генеративного періоду розвитку пшениці спостерігали ушкодження рослин за внесення препаратів класу стробілуринів. Розгляд механізмів прояву ушкоджень сфокусований на дефіциті калію у надземних частинах рослин, навіть за високих рівнів вмісту елемента в ґрунтах. Використання біостимуляторів, насамперед гідролізатів амінокислот, може спричинити зростання пулу калію в надземних органах рослин протягом вегетації (Saa et al., 2015). Підсумовуючи власні та літературні дані, можна стверджувати, що позакореневе застосування амінокислот – перспективний елемент технологій позакореневого живлення зернових культур, особливо за дефіциту вологи протягом вегетаційного періоду.

Магній характеризується високою рухомістю та здатністю до реутилізації. Він входить до складу хлорофілу, бере участь у вуглеводневому обміні та впливає на активність окисно-відновних процесів; каталізує синтез АТФ і необхідний для біосинтезу білка (Marschner, 1995; Marschner, 2012). Підвищення накопичення магнію листками рослин пшениці спостерігали в обох сортів за обробки сумішшю мепікват хлориду з етефоном (Терпал 1,5 л/га) та сумішшю прогексадіону з мепікват хлоридом (Медакс Топ, 1,0 л/га). Вміст магнію в листках пшениці високоінтенсивного сорту Смуглянка контрольного варіанта вищий, ніж у сорту Подолянка. Зростання вмісту магнію за дії ретардантів класу ЦГД може бути елементом реакції щодо підвищення вмісту хлорофілу в листках і врожайності посівів, що показано й у попередніх публікаціях (Morgun et al., 2010, 2015; Virych et al., 2012).

Таблиця 6

Вплив ретардантів Терпал і Медакс Топ і Мегафолу на накопичення макроелементів у прапорцевих листках рослин пшениці озимої (г/кг, M ± m, n = 12)

Варіанти	Смуглянка			Подолянка		
	Mg	K	Ca	Mg	K	Ca
Контроль	2,35 ± 0,12	24,54 ± 1,23	0,87 ± 0,04	1,64 ± 0,08	25,19 ± 1,26	0,78 ± 0,04
Терпал, 1,5 л/га	2,53 ± 0,13	22,59 ± 1,13	0,73 ± 0,03	2,29 ± 0,11*	26,24 ± 1,31	0,80 ± 0,04
Медакс Топ, 1,0 л/га	3,12 ± 0,16*	19,32 ± 0,96*	0,94 ± 0,05*	2,85 ± 0,14*	21,13 ± 1,06*	0,94 ± 0,05*
Мегафол, 1,5 л/га	2,35 ± 0,12	24,88 ± 1,04	0,85 ± 0,04	2,20 ± 0,11*	29,89 ± 1,49*	0,70 ± 0,03
Терпал, 1,5 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	2,37 ± 0,10	22,61 ± 1,13	0,66 ± 0,03*	2,51 ± 0,12*	26,92 ± 1,35	0,76 ± 0,04
Медакс, 1,0 л/га + Мегафол Топ, 1,5 л/га	2,95 ± 0,10*	27,75 ± 1,39*	0,60 ± 0,03*	2,74 ± 0,12*	25,29 ± 1,26	0,66 ± 0,03*

Вміст кальцію в листках пшениці обох сортів дещо підвищувався за обробки препаратом Медакс Топ. У сорту Подолянка вміст кальцію дещо збільшується ще й у варіанті із застосуванням Терпалу. Мікроелементи – невід'ємна частина живлення рослин, без яких неможливий розвиток рослин і формування врожаю. Вони необхідні для життєдіяльності рослин, їх не можна замінити ніякими іншими речовинами. Кількість мікроелементів, необхідних для рослин, відносно невелика, порівняно з кількістю необхідних для них макроелементів. Але навіть невеликий дефіцит цих речовин може викликати захворювання, неможливість засвоєння основних мікроелементів живлення та навіть загибель рослин.

Обробка мепікват хлоридом з етефоном (Терпал) підвищувала вміст марганцю та міді у прапорцевих листках рослин озимої пшениці сорту Подолянка на 13,0% і 44,0% відповідно, тоді як прогексадіон Са з мепікват хлоридом (Медакс Топ) сприяв накопиченню марганцю та цинку на 14,0% і 18,0% більше, порівняно з контролем (табл. 7). Композиція Терпал + Мегафол сприяла зростанню вмісту Mn на 16,9%, тоді як цинку – на 12,8%. Цей сорт пшениці краще накопичував у прапорцевих листках і мідь майже в усіх варіантах, за винятком варіанта з Медакс Топ + Мегафол. У сорту Смуглянка збільшувався лише вміст цинку в усіх варіантах обробки, за винятком (як і в сорту Подолянка) поєднання Медакс Топ + Мегафол. Усі варіанти обробки рослин пшениці сорту Смуглянка спричинили зниження вмісту марганцю в її листках. Разом із цим, зазначимо також зниження вмісту заліза в обох сортів пшениці.

У зерні сорту Смуглянка вміст калію дещо зростав у варіанті з обробкою сумішшю мепікват хлориду з етефоном (Терпалом) на 3,8%, тоді як у сорту Подолянка за такої ж обробки він був на 46,8% вищим, ніж у контролі (табл. 8). Усі інші варіанти обробки рослин сприяли значному накопиченню в зерні як калію, так і магнію.

Таблиця 7

Вплив ретардантів Терпал і Медакс Топ і Мегафолу на накопичення мікроелементів у прапорцевих листках рослин пшениці озимої (мг/кг, M ± m, n = 12)

Варіанти	Смуглянка				Подолянка			
	Mn	Fe	Cu	Zn	Mn	Fe	Cu	Zn
Контроль	159 ± 8	150 ± 8	4,3 ± 0,2	11,6 ± 0,6	103 ± 5	94 ± 5	3,7 ± 0,2	11,9 ± 0,6
Терпал, 1,5 л/га	105 ± 5*	114 ± 6*	3,5 ± 0,2*	13,5 ± 0,8	149 ± 8*	76 ± 4*	5,4 ± 0,3*	10,9 ± 0,5
Медакс Топ, 1,0 л/га	122 ± 6*	113 ± 6*	3,2 ± 0,2*	13,9 ± 0,8	118 ± 6*	72 ± 4*	4,3 ± 0,3*	14,0 ± 0,7*
Мегафол, 1,5 л/га	127 ± 6*	114 ± 6*	4,9 ± 0,2*	14,7 ± 0,7*	101 ± 4	79 ± 4*	4,9 ± 0,2	16,0 ± 0,8*
Терпал, 1,5 л/га + Мегафол Топ, 1,5 л/га	116 ± 6*	95 ± 5*	4,4 ± 0,2	14,0 ± 0,6*	142 ± 6*	75 ± 4*	4,0 ± 0,2	15,3 ± 0,5*
Медакс Топ, 1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	95 ± 5*	89 ± 4*	4,5 ± 0,2	14,4 ± 0,6*	121 ± 5*	63 ± 3*	3,1 ± 0,1	15,8 ± 0,5*

Таблиця 8

Вплив ретардантів Терпал і Медакс Топ і Мегафолу на накопичення макроелементів у зерні пшениці озимої (г/кг, M ± m, n = 15)

Варіанти	Смуглянка			Подолянка		
	Mg	K	Ca	Mg	K	Ca
Контроль	0,95 ± 0,05	4,10 ± 0,20	0,03 ± 0,002	0,60 ± 0,03	2,78 ± 0,14	0,02 ± 0,001
Терпал, 1,5 л/га	0,89 ± 0,04	4,26 ± 0,21	0,04 ± 0,002	0,92 ± 0,05*	4,08 ± 0,20*	0,04 ± 0,002
Медакс Топ, 1,0 л/га	0,91 ± 0,04	4,01 ± 0,20	0,04 ± 0,002	0,95 ± 0,05*	3,88 ± 0,19*	0,04 ± 0,002
Мегафол, 1,5 л/га	0,92 ± 0,05	4,29 ± 0,21	0,04 ± 0,002	0,93 ± 0,05*	3,75 ± 0,19*	0,03 ± 0,002
Терпал, 1,5 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	0,96 ± 0,05	3,92 ± 0,20	0,03 ± 0,002	0,83 ± 0,04*	3,76 ± 0,19*	0,03 ± 0,002
Медакс Топ, 1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	0,93 ± 0,05	3,92 ± 0,20	0,03 ± 0,001	0,88 ± 0,04*	3,51 ± 0,18*	0,02 ± 0,001

Вміст кальцію у зерні сорту Подолянка досить високий у всіх варіантах обробки рослин, тоді як у зерні сорту Смуглянка він збільшувався за обробки мепікват хлоридом з етефоном (Терпал) і прогексадіон Са з мепікват хлоридом (Медакс Топ). Необхідно зазначити, що зерно пшениці сорту Смуглянка в контрольному варіанті містило значно вищий пул макро- та мікроелементів, ніж зерно сорту Подолянка. Достатня кількість Mn – необхідна умова нормального фізіологічного розвитку рослин і отримання високих врожаїв. Уміст у зерні марганцю, як одного з необхідних для людини мікроелементів, – важливий показник якості зерна. Накопи-

чення Mn рослиною зумовлене не тільки факторами, які впливають на його кількість і доступність для рослин у ґрунті, а й ефективністю поглинання мікроелемента рослиною (Marschner, 1995).

Обробка регуляторами росту (Терпал, Медакс Топ) викликала підвищення вмісту марганцю на 3,0–5,4% у сорту Смуглянка і на 54,9–60,4% – у сорту Подолянка порівняно з контролем. Вміст цинку в зерні зростав у всіх варіантах обробки рослин, в обох сортів пшениці, але більше виражений – на сорті Подолянка (табл. 9). Комбінація діючих речовин прогексадіон Са з мепікват хлоридом (Медакс Топ) зумовлювала підвищення майже удвічі вмісту міді в зерні озимої пшениці, проте це не перевищило гранично допустимі межі цього елемента (за DSTU 3768-2010 10 мг/кг).

Таблиця 9

Вплив ретардантів Терпал і Медакс Топ і Мегафолу на накопичення мікроелементів у зерні пшениці озимої (мг/кг, M ± m, n = 15)

Варіанти	Смуглянка				Подолянка			
	Mn	Fe	Cu	Zn	Mn	Fe	Cu	Zn
Контроль	36,9 ± 1,9	37,7 ± 1,9	1,8 ± 0,1	13,6 ± 0,7	24,3 ± 1,2	21,1 ± 1,1	1,4 ± 0,1	8,5 ± 0,4
Терпал, 1,5 л/га	38,1 ± 1,9	29,4 ± 1,5	1,7 ± 0,1	18,4 ± 0,9*	37,7 ± 1,9*	33,1 ± 1,7*	2,1 ± 0,1*	14,6 ± 0,7*
Медакс Топ, 1,0 л/га	38,9 ± 1,9	32,5 ± 1,6	2,8 ± 0,2*	14,2 ± 0,7	39,0 ± 2,0*	36,0 ± 1,8*	2,3 ± 0,1*	12,6 ± 0,6*
Мегафол, 1,5 л/га	45,5 ± 2,3*	34,8 ± 1,7	2,0 ± 0,1	19,4 ± 1,0*	41,5 ± 2,1*	36,1 ± 1,8*	2,1 ± 0,1*	14,8 ± 0,7*
Терпал, 1,5 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	43,2 ± 1,7*	34,3 ± 1,7	2,1 ± 0,1*	18,9 ± 0,7*	35,3 ± 1,8*	31,1 ± 1,6*	1,9 ± 0,1*	13,1 ± 0,7*
Медакс Топ, 1,0 л/га + Мегафол, 1,5 л/га	46,1 ± 1,8*	32,7 ± 1,6	2,6 ± 0,1*	16,3 ± 0,8*	33,7 ± 1,7*	33,3 ± 1,7*	2,0 ± 0,1*	12,2 ± 0,6*

Отже, застосування Мегафолу та регуляторів росту на пшениці озимій сорту Подолянка позитивно впливало на накопичення як калію, магнію та кальцію, так і марганцю, заліза, міді та цинку в зерні. Таким чином, озима м'яка пшениця сорту Подолянка, яка належить до середньостеблового, інтенсивного типу, більш чутливо реагувала на обробку амінокислотами та ретардантами підвищенням вмісту елементів у зерні, ніж короткостебловий високоінтенсивний сорт Смуглянка. Необхідно зазначити, що зерно пшениці високопродуктивного сорту Смуглянка на контролі містило значно вищий пул макро- та мікроелементів, ніж зерно середньорослого сорту Подолянка.

Висновки

В умовах польових та виробничого дослідів вегетаційних сезонів 2015–2016 рр. на посівах високопродуктивних сортів пшениці озимої ретардант Медакс Топ, 1,0 л/га (прогексадіон Са + мепікват хлорид) виявився ефективнішим, ніж Терпал, 1,5 л/га (мепікват хлорид + етефон). Позакореневе застосування Мегафолу сприяло підвищенню врожайності пшениці озимої сортів Смуглянка та Подолянка та знижувало від'ємну дію ретардантів на рослини пшениці у вегетаційних сезонах, які характеризувалися нестачею вологи. За результатами визначення вмісту неорганічних елементів методом мас-спектрометрії у зразках рослин пшениці озимої сортів Смуглянка та Подолянка показано, що в умовах вирощування пшениці на легких ґрунтах Полісся сучасні композиційні ретарданти впливають на елементний склад рослин протягом вегетації, а також змінюють вміст неорганічних елементів у зерні.

Озима м'яка пшениця середньорослого сорту Подолянка інтенсивного типу чутливіше реагувала на обробку амінокислотами та ретардантами, ніж короткостебловий високоінтенсивний сорт Смуглянка. При цьому спостерігали підвищення вмісту елементів живлення в зерні озимої пшениці сорту Подолянка. Варто зазначити, що зерно пшениці сорту Смуглянка на контрольному варіанті містило вищий пул макро- та мікроелементів, ніж зерно сорту Подолянка.

Обробка рослин пшениці озимої сорту Подолянка мепікват хлоридом і етефоном (Терпал, 1,5 л/га) позитивно впливала на накопичення як калію, магнію та кальцію, так і марганцю, заліза, міді та цинку в зерні. Композиція ретардантів з умістом похідного ЦГД (Медакс Топ) також суттєво впливала на зміни вмісту неорганічних елементів у рослинах і у зерні. Зазначимо суттєве зростання вмісту магнію в листках і у зерні за дії препарату Медакс Топ. Зростання вмісту магнію у прапорцевих листках збігалося з показаним раніше зростанням вмісту хлорофілу.

Протягом досліджень у вегетаційних сезонах 2015–2016 років періодичні посухи були найбільш значущим абіотичним стресом, що обмежували ріст і продуктивність посівів пшениці. Позакореневе застосування композицій амінокислот одночасно з ретардантами може знижувати інгібувальну дію РРР на формування врожаю в умовах посухи та впливає на збереження складу неорганічних елементів протягом вегетації та у зерні.

Такі відмінності у реакції сортів пшениці озимої на дію сучасних ретардантів мають значення для уточнення систем живлення посівів культури в інтенсивних технологіях вирощування, зокрема, в умовах посухи та високих температур. Зменшення пулів ряду неорганічних елементів у рослинах за дії ретардантів, наприклад, заліза, ймовірно пов'язане з обмеженнями надходження цих елементів із бідних ґрунтів Поліської зони та повинно компенсовуватися позакореневим підживленням. Установлені особливості прояву активності регуляторів росту рослин свідчать про тісний зв'язок між сигнальними системами рослин та змінами іоному.

Внесення ретардантів Медакс Топ, 1,0 л/га (прогексадіон Са + мепікват хлорид) та Терпалу, 1,5 л/га (мепікват хлорид + етефон) – запорука високих врожаїв на посівах високопродуктивних короткостеблового сорту Смуглянка та середньорослого Подолянка, а застосування ретардантів у композиціях із добривами з умістом амінокислот (Мегафол).

References

Battal, P. (2004). Effects of some mineral nutrients on gibberellic acid levels in maize plants (*Zea mays* L.). Economic Botany, 58, 195.

Berry, P. M., Sterling, M., Spink, J. H., Baker, C. J., Bradley, S. R., Mooney, S. J., Tams, A. R., & Ennos, A. R. (2004). Understanding and reducing lodging in cereals. Advances in Agronomy, 84, 217–271.

Bray, E. A., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. Gruissem, W. et al. (eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158–1249.

Chen, J.-G., Cheng, S.-H., Cao, W., & Zhou, X. (1998). Involvement of endogenous plant hormones in the effect of mixed nitrogen source on growth and tillering of wheat. Journal of Plant Nutrition, 21(1), 87–97.

Espindula, M. C., Rocha, V. S., Grossi, J. A. S., Souza, M. A., Souza, L. T., & Favarato, L. F. (2009). Use of growth retardants in wheat. Planta Daninha, 27(2), 379–387.

Evans, J. R., Evans, R. R., Regusci, C. L., & Rademacher, W. (1999). Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125W, prohexadione-calcium. HortScience, 34(7), 1200–1201.

Hedden, P., & Stephen, G. T. (2016). Annual plant reviews. The Gibberellins. John Wiley & Sons. March, 11.

Hussain, Z., & Leitch, M. H. (2007). The effect of sulphur and growth regulators on growth characteristics and grain yield of spring sown wheat. Journal of Plant Nutrition, 30, 67–77.

Kabata-Pendias, A., & Pendias, H. (1989). Mikroyelementy v pochvah i rasteniyah [Microelements in soils and plants]. Mir, Moscow (in Russian).

Kakei, Y., Mochida, K., Sakurai, T., Yoshida, T., Shinozaki, K., & Shimada, Y. (2015). Transcriptome analysis of hormone-induced gene expression in *Brachypodium distachyon*. Scientific Reports, 5, 14476.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

Marschner, P. (2012). Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 3d ed.

Matysiak, K. (2006). Influence of trinexapac-ethyl on growth and development of winter wheat. Journal of Plant Protection Research, 46(2), 133–143.

Merry, A. M., Carew, A. L., Leith, P., Nelson, R., & Acuna, T. B. (2015). Agronomist use of PGR – A survey. Agricultural Science, 27(2), 24–32.

Morgun, V. V., Sanin, Y. V., & Schwartau, V. V. (2015). Klub 100 centneriv. Suchasni sorty ta optimal'ni sistemi zhivlennya j zahistu ozimoyi pshenyci

[Club 100 centners. Modern varieties and optimal systems of nutrition and protection of winter wheat]. Logos, Kyiv (in Ukrainian).

Morgun, V. V., Schwartau, V. V., & Kiriziy, D. A. (2010). Fiziologicheskie osnovy formirovaniya vysokoj produktivnosti zernovyh zlakov [Physiological bases of forming of the high productivity of cereals]. Fiziologia i Biohimiya Kulturnyh Rasteniy, 42(5), 374–392 (in Russian).

Petrozza, A., Santaniello, A., Summerer, S., Di Tommaso, G., Di Tommaso, D., Paparelli, E., Piaggesi, A., Perata, P., & Cellini, F. (2014). Physiological responses to Megafol (R) treatments in tomato plants under drought stress: A phenomic and molecular approach. Scientia Horticulturae, 174(1), 185–192.

Pokhylko, S. Y., Schwartau, V. V., Mykhalska, L. M., Dugan, O. V., & Morgun, B. V. (2016). ICP-MS analysis of bread wheat carrying the GPC-B1gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Biotechnologia Acta, 9(5), 64–69.

Rademacher, W. (2000). Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51, 501–531.

Rademacher, W. (2010). Control of lodging in intense european cereal production. Plant Growth Regulation Society of America.

Reynolds, M., Bonnett, D., Chapman, S. C., Furbank, R. T., Manes, Y., Mather, D. E., & Parry, M. A. J. (2011). Raising yield potential of wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies. Journal of Experimental Botany, 62, 439–452.

Reynolds, M., Foulkes, J., Furbank, R., Griffiths, S., King, J., Murchie, E., & Slafer, G. (2012). Achieving yield gains in wheat. Plant, Cell and Environment, 35, 1799–1823.

Rokhafrooz, K., Emam, Y., & Pirasteh-Anosheh, H. (2016) The effect of chlormequat chloride on yield and yield components of three wheat cultivars under drought stress conditions. Journal of Crop Production and Processing, 6(20), 111–123.

Saa, S., Olivos-Del Rio, A., Castro, S., & Brown, P. H. (2015). Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). Frontiers in Plant Science, 23(6), 87.

Schwartau, V. V., & Myhal'ska, L. M. (2013). Gerbicydy. Fiziko-himichni ta biolohichni vlastyvosti [Herbicides. Physical, chemical, and biological properties]. Logos, Kyiv (in Ukrainian).

Schwartau, V. V., Mykhalska, L. M., & Miroshnichenko, I. M. (2016). Physiological role of amino acids in the nutrition of highly productive varieties of winter wheat. Sortovyvchennya ta Ohorona Prav na Sorty Roslyn, 3, 52–57.

Schwartau, V. V., Virych, P. A., Makoveychuk, T. I., & Artemenko, A. U. (2014). Kal'ciy v rastitel'nyh kletkah [Calcium in Plant Cells]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 22(1), 19–32 (in Russian).

Shekoofa, A., & Emam, Y. (2008). Effects of nitrogen fertilization and plant growth regulators (PGRs) on yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Shiraz Journal of Agricultural Science and Technology, 10(1), 101–108.

Stachecki, S., Praczyk, T., & Adamczewski, K. (2004). Adjuvant effects on plant growth regulators in winter wheat. Journal of Plant Protection Research, 44(4), 365–371.

Virych, P. A., Vedmedenko, H. Y., & Schwartau, V. V. (2014). Vliyanie trineksapak-ethila na soderzhanije pigmentov i anionov v list'jah pschenicy (*Triticum aestivum* L.) [Influence of trinexapac-ethyl on pigment and anionic content of wheat flag-leaf (*Triticum aestivum* L.)]. Naukovi Praci Instytutu Energetychnyh Kultur i Cukrovyh Buryakiv, 20, 17–20 (in Russian).

Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research, 14, 415–421.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 410–416
doi: 10.15421/021763

Endemic course of epidemic diarrhea of pigs in the stabilized focus of infection

D. M. Masiuk*, O. I. Sosnitsky*, V. S. Nedzvetsky*, **, A. V. Kokarev*, S. G. Koliada*

*Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine
**Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine
***Bingol University, Bingol, Turkey

Article info

Received 02.07.2017
Received in revised form 11.08.2017
Accepted 17.08.2017

Dnipro State Agrarian and Economic University, Sergei Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine. Tel.+38-056-236-17-14. E-mail: plppm@ua.fm

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine. E-mail: nedzvetskyvictor@gmail.com

Bingol University, Selahaddin-i Eyyubi Mah. Aydinlik Cad., 12000, Bingol, Turkey.

Masiuk, D. M., Sosnitsky, O. I., Nedzvetsky, V. S., Kokarev, A. V., & Koliada, S. G. (2017). Endemic course of epidemic diarrhea of pigs in the stabilized focus of infection. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 410–416. doi: 10.15421/021763

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) has been circulating in Ukraine since 2014 and induces an especially dangerous viral infection with a lethal diarrheal syndrome in newborn piglets, with the initial appearance at the focus of infection. The number of infected cases and lethality among diseased piglets of 1–5 days of age can reach 100%, which together with the forced anti-epizootic measures brings significant economic losses. PED can spread to all pigs, but the emergent quality of infectious pathology appears in newborn piglets. No effective and biologically safe means of specific antiviral prophylaxis, which substantially halts the epizootic process is registered, and etiopathogenetic therapy is not developed, therefore PED is an emergent infection which is difficult to control. Over time there appear stationary foci of infection, where evolutionary changes in relationships in the host-parasite system take place fairly rapidly, since pigs are prolific and fast maturing animals able to replace each generation up to three times each year. This leads to a significant variability in interpopulation relationships and the induction of biodiversity in the molecular mechanisms of adaptation and processing of the viral genome. Clinically, genetic modifications of local variants of PEDV – populations are manifested in the form of changes in epizootic peculiarities in the course of infectious pathology in different age groups of animals. Modifications of PEDV may be accompanied by a slight weakening of the intensity of the infectious process, a decrease in mortality and a decrease in the severity of the pathogenesis of diarrheal syndrome. At the same time, the age range of severe abdominal lesions expands from newborn piglets to fattening animals of older age groups of 28, 32, 70 days. Using a set of measures to combat the PED, including "reverse feeding" recycled infected biomaterial from convalescent pigs, eradication of the pathogen from the environment of the host macroorganisms through a total disinfection regime and strict compliance with veterinary and sanitary rules of animal husbandry provide temporary positive results, but in theory this approach is incorrect, since contamination of animals leads to the dispersal of the virus and the formation of endemic foci of infection. The persistence of the virus in convalescent organisms is not fixed, the external inanimate environment can only be a mechanical factor in transmission of the pathogen preserving the viability of PEDV over time. Stabilization of the epizootic foci of infection is possible due to three factors: a) dissemination of the virus in "reverse feeding"; b) preservation of the virus in the external environment as a result of poor-quality disinfection; c) occurrence of a non-immune element among the convalescent young gilts, who as a result of juvenile insufficiency of the immune system have a low titer accumulation of colostral antibodies to the virus received in the biomaterial through reverse feeding. Due to the lack of "lactogenic immunity", neonatal pigs as biological indicators for the presence of PEDV in the environment begin reproducing the virus in the enterocytes and develop a typical diarrheal syndrome PED.

Keywords: PED; PEDV; genome-equivalent; PCR-RT; ELISA

Эндемическое течение эпидемической диареи свиней в стабилизированном очаге инфекции

Д. Н. Масюк*, А. И. Сосницкий*, В. С. Недзвецкий**, ***, А. В. Кокарев*, С. Г. Коляда*

*Днепровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, Украина
**Днепровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепр, Украина
***Бингельский университет, Бингель, Турция

Вирус эпидемической диареи свиней (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) циркулирует в Украине с 2014 года и индуцирует особо опасный вирусный зооноз – эпидемическую диарею свиней (ЭДС) с летальным диарейным синдромом у новорожденных поросят, при первичном возникновении очага инфекции. Количество инфицированных и летальность среди заболевших поросят 1–5-дневного возраста

может достигать 100%, что в совокупности с вынужденными противоэпизоотическими мероприятиями приносит значительные экономические убытки. ЭДС может распространяться на все поголовье свиней, но эмерджентные качества инфекционная патология проявляет на новорожденных поросятах. Эффективных и биобезопасных средств специфической антивирусной профилактики, кардинально обрывающих эпизоотический процесс, не зарегистрировано, а этиопатогенетическая терапия не разработана, поэтому ЭДС является трудно контролируемой эмерджентной инфекцией. С течением времени возникают стационарные очаги инфекции, где достаточно быстро происходят эволюционные изменения взаимоотношений в системе «паразит – хозяин», так как свиньи являются многоплодными и скороспелыми животными и смена поколений у них осуществляется до трех раз за год. Это приводит к существенной вариабельности межпопуляционных взаимоотношений и индукции биоразнообразия молекулярных механизмов адаптации и процессинга вирусного генома. Клинически генетические модификации локальных вариантов PEDV-популяций проявляются в виде изменений эпизоотических особенностей течения инфекционной патологии у различных возрастных групп животных. Модификации PEDV могут сопровождаться незначительным ослаблением напряженности инфекционного процесса, уменьшением смертности и снижением тяжести патогенеза диарейного синдрома. В то же время, возрастной диапазон тяжелых абдоминальных поражений расширяется с группы новорожденных поросят на откормочных животных старших возрастных групп 28, 32, 70 суток. Использование паллиативного комплекса мер борьбы с ЭДС, включающего «обратное скармливание» переработанного инфицированного биоматериала от переболевших поросят, эрадикацию возбудителя из внешней среды обитания макроорганизма с помощью жесткой тотальной дезинфекции и строжайшего соблюдения ветеринарно-санитарных правил ведения животноводства дает временные положительные результаты, но теоретически является некорректным, так как перезаражение животных приводит к рассеиванию вируса и формированию эндемического очага инфекции. Персистенция вируса в реконвалесцентном организме не зафиксирована, внешняя «неживая» среда может быть только механическим фактором передачи возбудителя инфекции в течение времени сохранения жизнеспособности PEDV. Стабилизация эпизоотического очага инфекции наиболее часто происходит в результате сочетания трех факторов: а) рассеивания вируса при «обратном скармливании»; б) сохранения вируса во внешней среде в результате некачественной дезинфекции; в) возникновения прослойки не иммунного молодняка от ремонтных свинок, у которых вследствие ювенальной недостаточности функциональной активности иммунной системы, формируется накопление колостральных антител в низких титрах на вирусный антиген в биоматериале при «обратном скармливании». Вследствие отсутствия или низкой напряженности «лактогенного иммунитета», неонатальные поросята, как биоиндикатор наличия PEDV в окружающей среде, начинают репродуцировать вирус в энтероцитах и развивается типичный диарейный синдром ЭДС.

Ключевые слова: диарейный синдром; ЭДС; PEDV; геном-эквивалент; PCR-RT; ELISA

Введение

Эпидемическая диарея свиней (ЭДС) – эмерджентное высококонтагиозное вирусное зоонозное заболевание свиней всех возрастов с развитием диарейного синдрома. Возбудитель – Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), gender – Alphacoronavirus, family – Coronaviridae. Вирионы сложные, плеоморфные, чаще сферической формы 95–130 нм, состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и ЛПО (липопротеидная оболочка s. суперкапсид s. пеплос s. envelope), на поверхности которой имеются радиальные булавовидные пепломеры, длиной 18–23 нм, формирующие «солнечную корону» (Li et al., 2012; Diel et al., 2016).

Наиболее часто употребляемые синонимы для PEDV – инфекции: эпидемическая диарея поросят – ЭДП; эпизоотическая диарея свиней – ЭДС; ТГС-подобное заболевание; Womiting and wasting disease in piglets (англ.); Erbrechen und Kummern bein Saugferkel (нем.) (Li et al., 2012; Carvajal et al., 2015; Diel et al., 2016).

ЭДС впервые зарегистрировали в Англии в 1971 г., затем в Бельгии в 1978 г., где изолировали референтный штамм CV 777. С 1980 по 1990 гг. ЭДС широко распространилась в Европе. С 1995 по 2011 гг. ЭДС проникла в Японию, Корею, Китай и Таиланд. Из Китая северокитайские штаммы PEDV попали в США, что поставило на грань экономической катастрофы свиноводческую отрасль страны. В 2005 г. ЭДС выявлена в России, в 2014 г. – в Украине. Глобальное распространение PEDV продолжается. Усилия МЭБ и национальных служб ветеринарной медицины по локализации и контролю над ЭДС малоэффективны (Song et al., 2005; Martelli et al., 2008; Puranaveja et al., 2009; Strizhakova, 2013; Gerber et al., 2014; Wang et al., 2014; Vlasova et al., 2014; Dastjerdi et al., 2015).

PEDV-инфекция у неимунных новорожденных поросят протекает по классическому типу эпизоотического процесса с безэстафетной передачей возбудителя и летальными абдоминальными явлениями, включающими изнурительную водянистую диарею, дегидратацию и истощение, упорную рвоту, тяжелую интоксикацию, инфекционно-аллергические процессы, тонические судороги, глубокую депрессию с исходом в смерть (Kim and Chae, 2003; Martelli et al., 2008; Carvajal et al., 2015; Dastjerdi et al., 2015; Goede et al., 2015; Diel et al., 2016; Masiuk et al., 2017).

Заболеваемость и летальность у новорожденных поросят до 5-дневного возраста могут достигать 100%, однако с увеличением возраста до 14–15 дней, летальность снижается до 3–5%. Гибель свиней в результате PEDV-инфекции возможна в любом возрасте, однако у животных на откорме летальный исход имеет спорадический характер и не представляет экономической угрозы для хозяйства (Martelli et al., 2008; Strizhakova, 2013; Carvajal et al., 2014; Dastjerdi et al., 2015; Bjustrom-Kraft et al., 2016).

ЭДС признана МЭБ и ФАО одним из пяти основных вирозов наряду с АЧС, КЧС, РРСС и цирковирозом, представляющих наибольшую экономическую опасность для свиноводста. PEDV – оболочечный одноцепочный РНК-вирус (оцРНК), подверженный частым мутациям (как и все оцРНК вирусы), что приводит к рецидивированию диарейного синдрома и стабилизации эпизоотического очага инфекции, с эндемической формой протекания инфекционного процесса, а неординарно высокая контагиозность возбудителя и его исключительная патогенность для новорожденных поросят приводит к глобализации инфекционной патологии (Martelli et al., 2008; Strizhakova, 2013; Gerber et al., 2014; Goede et al., 2015; Diel et al., 2016).

Эмерджентность возбудителя и особо крупный экономический ущерб, причиняемый трудно управляемой инфекцией, побудили исследователей к интенсивному изучению вируса, поэтому молекулярно-биологические характеристики PEDV достаточно хорошо изучены. Геном PEDV состоит из крупной (~ 28 kb) одноцепочной смысловой РНК, которая содержит 7 открытых рамок считывания (ORF1a, ORF1b и ORF2-6). ORF 1a и 1b детерминируют крупные полипротеины (pp1a и pp1b), которые расщепляются протеазами, кодированными вирусом, на 16 неструктурных белков (nsp1 – nsp16), берущими участие в основных механизмах транскрипции и репликации вирусной РНК. ORFs2–6 кодируют четыре структурных белка, включающих S-гликопротеин (Spike), интегральный E-белок оболочки (envelope), мембранный M-белок и N-белок нуклеокапсида, а также вспомогательный белок ORF3. Этот белок формирует ионные каналы в мембранах инфицированных клеток кишечника, что является одним из механизмов регуляции продукции вируса. В ходе адаптации и размножения вируса в КК ген ORF3 мутирует и это явление линейно коррелирует с аттенуацией вируса к организму новорожденных поросят (Jung et al., 2015; Gerbera and Opriessniga, 2015; Poonsuk et al., 2016; Diel et al., 2016).

Среди структурных белков S-гликопротеин (150–220 kD) играет важную роль в адсорбции вирионов на энтероцитах кишечника, связывании вируса с клеточными рецепторами, в сплавлении клеточных мембран и пеплоса вируса, и кроме того является основной мишенью для вируснейтрализующих антител (ВНА). В его составе идентифицированы 4 ВНА-эпитопа. Для PEDV выявлена связь между белком S, адаптацией к размножению в КК и вирулентностью. Ген S-белка часто подвергается эпидемиологи-

ческим исследования, включающим филогенетический анализ и ряд молекулярных и серологических диагностических анализов (Chang et al., 2002; Annamalai et al., 2015; Clement et al., 2016; Poonsuk et al., 2016).

Белки M и N широко используются с целью разработки молекулярных и серологических диагностических тестов для ЭДС. Белок M (20–30 kD) участвует в процессе сборки вирионов, индуцирует синтез ВНА, способных нейтрализовать вирус в присутствии комплемента и α-интерферона. Белок N (57–58 kD) – щелочной фосфопротеин, ассоциированный с вирусным геномом, участвует в индукции клеточно-опосредованного иммунитета. Негликолизированный белок E ЛПО совместно с S-гликопротеином играет важную роль на дебютных этапах репродукции вируса (Knuchel et al., 1992; Li et al., 2007; Diel et al., 2016).

Разработка технологии культивирования вируса в лабораторных условиях является принципиально важным вопросом для дифференциации отдельных устойчивых штаммов, которые спонтанно образуются в ходе мутаций вируса. Первые результаты успешной пролиферации PEDV получены методом пероральной инокуляции новорожденным поросятам гомогената тонкого кишечника от больных животных. Впоследствии удалось адаптировать вирус к КК Vero в присутствии экзогенного трипсина. Размножение вируса сопровождалось ЦПЭ, который выражался в вакуолизации клеток и формировании синцития. Адаптированный к КК Vero вирус можно поддерживать в линиях КК как свиного, так и несвиного происхождения. Поступают сообщения о культивировании в КК утиных фибробластов, обработанных аминопептидазами, а также о способности штамма МК реплицироваться в нейронах новорожденных мышей, после интрацеребрального заражения с явлениями нейровирулентности (Kweon et al., 1994; Quist-Rybachuk et al., 2015; Mahesh, 2015).

После фекально-оральной передачи PEDV репродуцируется в энтероцитах тонкого кишечника и приводит к развитию катарально-геморрагического воспаления с последующим некрозом эпителия кишечника. После инкубационного периода от 12–24 часов до 3–6 суток развиваются клинические признаки заболевания, характерные для ЭДС и включающие водянистую изнурительную диарею, упорную рвоту, интоксикацию, обезвоживание, истощение, тяжелейшую депрессию и высокую летальность у новорожденных поросят. В благоприятных случаях заболевание продолжается 5–10 дней и завершается выздоровлением с постинфекционной астенией и снижением продуктивности. Выделение PEDV с фекалиями наблюдается на протяжении 6–30 суток. Затем выделение прекращается и реконвалесценты освобождаются от вируса (Knuchel et al., 1992; Jung et al., 2015; Diel et al., 2016; Tun et al., 2016).

Все штаммы ЭДС, выделенные в различных странах мира, практически идентичны по антигенной структуре и представляют собой один серотип вируса. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов N и S, а также аминокислотных последовательностей их продуктов у прототипного штамма CV 777, корейского Chinju 99 и нескольких эпизоотических изолятов корейского и японского происхождения обнаружило высокую (до 96,7%) гомологию (Kim and Chae, 2003; Li et al., 2012; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Особую опасность представляет мутационный потенциал вирусной популяции PEDV, в связи с формированием эндемических очагов инфекционной патологии и рецидивированием диарейного синдрома с интервалом 4–12 месяцев. Отсутствие эффективных, кардинально обрывающих эпизоотическую цепь мероприятий специфической профилактики при любых генетических вариантах возбудителя способствует интенсивному распространению вироза в хозяйствах, делая эпизоотическую ситуацию трудно управляемой с неэффективными мерами борьбы и профилактики. Существующие методы создания лактогенного иммунитета с помощью «обратного скармливания», согласно ветеринарному законодательству Украины, являются архаичными и теоретически подрывают основы биобезопасности и основополагающие противоэпизоотологические принципы борьбы с инфекцией. Реальное прогрессивное распространение данной инфекции показывает крайнюю необходимость применения паллиативных методов борьбы с PEDV, которые могут включать в себя компоненты стратегии «обратного скармливания» и ветеринарно-санитарные меры по эрадикации вируса во внешней среде. Существующие вакцинные препараты в условиях широкого эспериментального применения являются малоэффективными, а иногда оказывают негативное влияние, не обеспечивая надежный протективный иммунитет как у новорожденных поросят, так и у промышленного стада (Arriba et al., 2002; Stevenson et al., 2013; Strizhakova, 2013; Goede and Morrison, 2016; Langel et al., 2016; Tun et al., 2016; Srijangwad et al., 2017).

Цель статьи – охарактеризовать клинико-эпизоотологические особенности диарейного синдрома, индуцированного PEDV, провести мониторинг эндемического течения ЭДС на примере крупного современного свинокомплекса и охарактеризовать этиопатогенез заболевания у животных разных возрастных групп при стабилизации эпизоотического очага инфекции.

Материал и методы исследований

Экспериментальное исследование биоматериала от больных животных проведено в НИЦ биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК Днепропетровского ГАЭУ. Выявление, идентификация и дифференциация PEDV в биоматериале (кишечник, внутренние органы, фекалии) и его количественная характеристика осуществлены методом PCR-RT с помощью тест-системы «Bio-T kit®PEDV all – TGEV» («Biosellal», Франция) на амплификаторе CFX 96 Real-Time System фирмы Bio Rad (США).

Серодиагностику ЭДС проводили методом ELISA с использованием иммуноферментного анализатора-фотометра ELx800 («BioTek», США) и тест-системы «ID Screen PEDV Indirect» («ID.vet», Франция). Согласно рекомендациям производителя, сыворотки считаются положительными (содержащими специфические иммуноглобулины к антигенам вируса в титре 1 : 200), по ЭДС при значении S/P образца выше 0,4 Ед.

Состав микробионтов содержимого кишечника поросят исследовали с помощью стандартных микробиологических методик (Gerhardt et al., 1984). Патогенность изолированных эпизоотических культур микроорганизмов определяли в биопробе на лабораторных животных.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Для сравнения результатов использовали критерий Стьюдента и его непараметрический аналог – критерий Уилкоксона. Выборочные параметры, указанные в тексте, имеют следующие обозначения: x – выборочное среднее, SE – стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически достоверными при $P < 0,05$.

Результаты

Мониторинговые исследования особенностей энзоотического течения ЭДС при стабилизации инфекционного очага проводили в одном из свинокомплексов Запорожской области в течение 2015–2017 годов. В хозяйстве на высоком уровне поддерживалась ветеринарно-санитарная культура ведения свиноводства, стандартные меры биобезопасности соблюдались должным образом в соответствии с требованиями ветеринарного законодательства и эпизоотической ситуации. Животные были надежно защищены от проникновения внешней инфекции и находились под постоянным контролем службы ветеринарной медицины. Хозяйство оценивалось как благополучное относительно острых и хронических инфекций. В зимне-весенний период 2015 г. (февраль – март) на свинокоплексе, где проводила клинико-эпизоотологический мониторинг ветеринарная служба предприятия, выявлено, что у свиней появилась инфекционная патология с диарейным синдромом. Заболевание возникло внезапно с массовым охватом поголовья, ранее подобная инфекционная патология не встречалась. Наиболее уязвимыми для инфекции оказались новорожденные поросята,

которые погибали уже на первый – второй день жизни, заболеваемость и летальность у них доходили до 100%. В качестве основных симптоматических признаков PEDV-инфекции зарегистрированы водянистая диарея и рвота, а также быстрая поголовная гибель новорожденных поросят до 1–5-дневного возраста. При этом смертность среди 6–10-дневных поросят составила 50–60%, а среди 10–15-дневных – 30%. Падеж среди более взрослых свиней составил около 3–4% при относительно легком течении диарейного синдрома.

Результаты мониторинга пораженной группы животных показали, что диарея достаточно широко проявлялась у свиней всех возрастов, но яркие клинические проявления в тяжелой форме отмечались только у отдельных особей. При этом гибели среди свиней старших возрастных групп не зафиксировано. Симптомокомплекс кишечного расстройства включал быстро проходящую водянистую диарею и рвоту без тяжелых патофизиологических организменных отклонений от физиологической нормы, температурная реакция отсутствовала, незначительно снизился аппетит, о чем свидетельствовало уменьшение объема потребляемого корма, объемы потребления корма незначительно уменьшились, поведенческие реакции не изменились, признаки депрессии не выявлены. Через 5–7 суток после появления первых случаев относительно легкого клинического течения диарейного синдрома состояние животных старших возрастных групп нормализовалось, расстройство ЖКТ не представляло опасности для жизни и продуктивности животных, восстановление нарушенных физиологических функций происходило самопроизвольно.

В то же время, диарейный синдром у новорожденных поросят протекал сверхостро, сопровождался частыми водянисто-слизистыми дефекациями зеленовато-желтого цвета, прогрессирующей дегидратацией и истощением, мучительной рвотой и абдоминальными болями, редкими тоническими судорогами, интоксикацией, общим угнетением при полном сохранении сознания и тактильной чувствительности (рис. 1). Температура находилась в пределах нормы, перед смертью снижалась.

Рис. 1. Трупы новорожденных поросят, павших от ЭДС

При патологоанатомическом осмотре трупы были в состоянии кахексии и дегидратации. Кожа истонченная, сморщенная, неэластичная, бледная с желтоватым оттенком, с контурирующими костными образованиями от морды до седалищных бугров, глаза запавшие. Признаков конъюнктивита и ринита не выявлено. На коже у поросят обнаруживали ограниченные припухлости фиолетово-багрового цвета с желеобразным подкожным отеком инфекционно-аллергической природы.

Таким образом, одной из основных причин летального исхода инфекции является метаболическое истощение организма поросят. Инфекционный агент – высокопатогенный и облигатно летальный для новорожденных животных, индуцирует критические нарушения, не совместимые с жизнью поросят. Патологоанатомические исследования поросят с летальным исходом показали наличие признаков инфекционного патогенеза (рис. 2). Кровь не свернувшаяся, светлая, кровоизлияний на коже и в подкожной клетчатке нет. Патогномоничные изменения локализованы в тонкой кишке в виде чрезвычайно интенсивного катарально-геморрагического воспаления с десквамацией эпителия и истончением кишечной стенки. У поросят, павших от диареи в 5-дневном возрасте, катарально-геморрагическое воспаление обнаружено также и в толстой кишке. В желудке не установили патологических изменений слизистой оболочки, наполнение желудка слизистым содержимым не отличалось от нормы. Регионарные лимфоузлы отечны и гиперемированы. В других внутренних органах патологических нарушений не обнаружено. В частности, селезенка не увеличена, ярко-красного цвета; печень не увеличена, с незначительными сероватыми участками белково-липидной дистрофии; почки и легкие соответствовали норме. В ткани сердца обнаружены участки дегенеративного перерождения. Во внутренних полостях незначительное количество транссудата.

Рис. 2. Патологоанатомические изменения внутренних органов поросенка 5-дневного возраста, павшего от ЭДС

Индикацию возбудителя проводили в НИЦ ДГАЭУ в совместном гомогенате из двух биоматериалов образцов тонкой кишки тканей поросят, павших от диарейного синдрома на вторые сутки жизни, с помощью PCR-RT. В пробах тонкого кишечника поросят идентифицирован PEDV в количестве $7{,}0 \times 10^2$ геном-эквивалентов (г. э.) в одном грамме, что является достаточным основанием для установления позитивного результата инфекции PEDV.

С целью определения широты распространения инфекции среди восприимчивых животных проведена ретроспективная сероиндикация IgG к АГ капсида PEDV в ELISA. Для проведения серологических исследований отбирали образцы крови у 10% животных из свинарника, в котором зафиксировано клиническое проявление заболевания (n = 80) методом рандомизированной выборки. Результаты серологического исследования показали наличие диагностических титров у 42% образцов в разведении 1 : 200, что подтвердило предварительный комплексный диагноз на ЭДС. В 76% проб фекалий от этих же животных методом PCR-RT идентифицирована РНК PEDV в концентрации $1{,}86 \times 10^7 \pm 0{,}14 \times 10^6$ г. э./г биологического материала.

Для изучения состава видового состава микроорганизмов кишечной трубки отобрали биоматериал (пораженный кишечник и фекалии) у 13 павших от ЭДС поросят 3–8-суточного возраста и провели бактериологическое исследование общепринятыми методами оценки видового состава микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт (табл. 1). При бактериологическом обследовании общепринятыми методами содержимого кишечника и фекалий у поросят, павших от ЭДС, не были изолированы физиологически полезные микробионты: аэрококки (*Aerococcus viridans*), лактобактерии и бифидобактерии. В содержимом кишечника не выявлены плесневые грибы и дрожжи. Кишечная микрофлора представлена стандартной транзиторной микрофлорой, попавшей в пищеварительный тракт поросят из окружающей среды, преимущественно она состояла из гнилостных микроорганизмов с высокой ферментативной активностью. Изолированы бактерии семейства Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Coccaceae. Культуры прокариот обладали типичными для вида морфотинкториальными, культуральными и биохимическими свойствами. Высокой глико-

литической активностью характеризовались культуры *C. perfringens*, сильно выраженным протеолитическим потенциалом обладали культуры антракоидных бацилл, *E. coli* и *P. vulgaris*. При исследовании патогенных свойств идентифицированных культур прокариот на белых мышах гибели инфицированных животных не отмечали в течение пяти суток наблюдения. При посеве культур на 5% кровяной МПА гемолиз не обнаружен, что является показателем апатогенности кишечной микрофлоры.

Таблица 1
Видовой состав микробиоценоза кишечника поросят, павших от ЭДС (n = 13)

Название	Номер биоматериала												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aerococcus viridans	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Lactobacillus	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bifidobacterium	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Escherichia coli	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium perfringens	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–
Bacillus cereus	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+
Bacillus subtilis	–	–	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+
Bacillus mycoides	+	–	+	+	+	–	–	+	+	–	+	+	–
Bacillus megaterium	–	–	+	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+
Enterococcus	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	+	+	–
Staphylococcus	+	+	–	–	+	–	+	+	+	–	–	+	–

Примечание: "+" – наличие, "–" – отсутствие бактерии.

Результаты комплексного диагноза ЭДС-позитивных образцов среди ранее благополучного поголовья свиней приняты в качестве основного аргумента в выборе решения о санации хозяйства от зарегистрированного вируса методом «обратного скармливания» и эрадикации возбудителя из экосистемы обитания свиней без применения вакцин.

На первом этапе с помощью PCR-RT определили концентрацию вируса в биоматериале для «обратного скармливания». Исследованию подлежали ткани тонкого кишечника 12 2–3-дневных поросят, павших от ЭДС. Результаты молекулярно-генетического анализа показали следующие значения содержания PEDV в тонкой кишке павших от ЭДС новорожденных поросят (г. э./г, рис. 3): $1{,}69 \times 10^5$; $4{,}55 \times 10^5$; $5{,}29 \times 10^5$; $8{,}30 \times 10^5$; $1{,}01 \times 10^6$; $1{,}42 \times 10^6$; $2{,}60 \times 10^6$; $4{,}79 \times 10^6$; $4{,}70 \times 10^7$; $9{,}67 \times 10^7$; $9{,}79 \times 10^7$; $1{,}01 \times 10^8$.

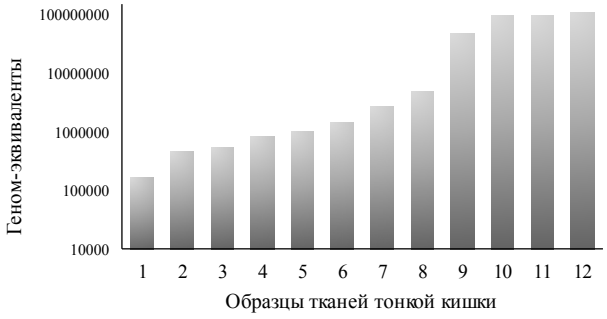


Рис. 3. Концентрация геном-эквивалентов PEDV в образцах тонкой кишки павших от ЭДС новорожденных поросят

Вирусная нагрузка в пораженных тканях колеблется в широких пределах, от 5 до 8 lg вирионов в грамме биоматериала, при этом диапазон $x \pm SE = 4{,}11 \times 10^6 \pm 3{,}42 \times 10^5$ г. э./г.

Процедуру «обратного скармливания» проводили с использованием биоматериала от павших новорожденных поросят. Гомогенат биоматериала кишечной трубки в состоянии катарально-геморрагического воспаления изготавливали на измельчителе тканей РТ-2. Из полученного гомогената ex tempere готовили водную суспензию с содержанием возбудителя в пределах 6 lg вирионов в грамме конечного продукта. С целью формирования эффективного колострального иммунитета у новорожденных поросят всех супоросных свиноматок не позднее двух недель до опороса инфицировали *per os* подготовленным гомогенатом в виде водной суспензии, содержащей известную концентрацию эпизоотического варианта PEDV. Одновременно с мероприятиями, направленными на создание коллективного иммунитета у животных, с целью снижения уровня прессинга и предупреждения распространения PEDV на свиноводческом предприятии, согласно рекомендациям ветеринарного законодательства Украины, проведена предельно тщательная механическая очистка животноводческих помещений и строжайшая тотальная дезинфекция, с терминальным контролем качества дезинфекции и подтверждением факта эрадикации PEDV из окружающей среды с помощью PCR-RT. Возбудитель выявлен только на одном из элементов внутреннего оборудования – в смывах с пластикового пола без стока для мочи.

Все павшие от ЭДС животные были утилизированы как источник инфекции. Для подтверждения или опровержения факта персистенции PEDV в организме животных-реконвалесцентов методом PCR-RT проведено исследование 68 образцов фекалий от переболевших свиней различных возрастных групп, начиная от поросят на подсосе до супоросных свиноматок и ремонтного молодняка. Результаты исследования показали отсутствие PEDV в образцах. Кроме этого, 14 наименее продуктивных животных-реконвалесцентов, отнесенных к санитарному браку, отобранных из всех технологических групп содержания тестировали с помощью PCR-RT на наличие PEDV в слизистой оболочке кишечника, регионарных лимфоузлов, печени, селезенки и костного мозга. Ни в одном из исследуемых объектов вирус не обнаружен. Предпринятые энергичные меры безвакцинного эпизоотического воздействия на функционирование эпизоотической цепи привели к тому, что диарейный синдром PEDV-этиологии был клинически купирован.

Однако нестабильное эпизоотическое благополучие сохранялось относительно недолго (в течение 6 месяцев), до того момента, пока в основное стадо не ввели осемененных ремонтных свинок. В 4 гнездах из 64 возникла типичная клиническая картина ЭДС, с последующим распространением инфекции на других восприимчивых животных. Вспышка ЭДС среди новорожденных поросят продолжалась в течение двух недель. Все заболевшие животные убиты и утилизированы, биоматериал (кишечник) использован для «обратного скармливания». Проведена тщательная тотальная дезинфекция с терминальным подтверждением качества санации в PCR-RT. Вследствие предпринятых противоэпизоотических мероприятий инфекционный процесс ЭДС ликвидирован и свинокомплекс оздоровлен.

Обсуждение

Генетические модификации эпизоотического вируса при стабилизации эпизоотического очага инфекции индуцируют широкую вариабельность клинико-эпизоотического течения инфекционного процесса на разновозрастном поголовье, а также обеспечивают возможность супрессии имунно-биологической резистентности макроорганизма. Быстрая смена туров опороса и многоплодность свиноматок создают плотную и восприимчивую биологическую среду для пассажирования и селекции наиболее трансмиссивных и активно репродуцирующихся генетических вариантов возбудителя, способных колонизировать экологическую нишу обитания (энтероциты кишечника свиней) с развитием летального сверхострого диарейного синдрома у новорожденных поросят, что совпадает с экспериментальными данными, опубликованными Hou et al. (2007), Yu et al. (2008), Di-qiu et al. (2012), Koh et al. (2015), Ouyang et al. (2015), Srijangwad et al. (2017).

Из данных Arriba et al. (2002), Annamalai et al. (2015) и Jung et al. (2015) следует, что возрастные процессы в макроорганизме способствуют повышению иммунобиологической резистентности и обеспечивают устойчивость к развитию острого инфекционного процесса, что приводит к значительному снижению смертности и ослаблению тяжести течения диарейного синдрома. На основании

собственных исследований и анализа литературных источников мы установили, что персистенции вируса не происходит, макроорганизм полностью освобождается от присутствия чужеродной генетической информации в пространстве, контролируемом собственной иммунной системой (Lin et al., 2015; Langel et al., 2016; Li et al., 2016; Tun et al., 2016). Переживание вируса возможно только на объектах внешней неживой природы с последующим инфицированием восприимчивых организмов и возобновлением цикла репродукции в виде рецидивирования эндемического процесса в стабилизированном очаге вирусной инфекции.

Работы Annamalai et al. (2015), Poonsuk et al. (2016) и Clement et al. (2016) показывают, что в данной парадигме жизненного цикла PEDV наиболее слабым звеном при безвакцинальном способе разрыва эпизоотической цепи являются ремонтные свинки, так как ювенильный, физиологически незрелый организм в условиях неполноценного кормления не может гарантированно синтезировать необходимое количество колостральных Ig, и, тем самым, создать полноценный и напряженный лактогенный иммунитет у новорожденных поросят. Потомство от таких животных представляет группу повышенного риска и может стать дебютным звеном эпизоотической цепи ЭДС (Gerber et al., 2014; Lin et al., 2015; Goede and Morrison, 2016; Langel et al., 2016; Srijangwad et al., 2017).

Учитывая, что PEDV является исключительно контагиозным, высокопатогенным и облигатно летальным инфекционным агентом для неимунных новорожденных поросят, у которых при первичной вспышке ЭДС среди благополучного поголовья индуцирует сверхострое эмерджентное течение диарейного синдрома по классическому типу эпизоотического процесса с безэстафетной передачей возбудителя, заболеваемостью и смертностью до 100% инфицированных поросят, Martelli et al. (2008), Carvajal et al. (2015) и Diel et al. (2015) считают важнейшим направлением дальнейших биологических исследований мониторинг эпизоотологического процесса при ЭДС. При этом необходимо сосредоточить усилия на углубленном изучении молекулярной биологии возбудителя, корреляционных связей между генетическими характеристиками эпизоотических изолятов PEDV и клинико-эпизоотологическими особенностями инфекционного процесса вируса на различных возрастных группах поросят при пространственно-временной стабилизации очага инфекции с углублением в молекулярную эпизоотологию межпопуляционного взаимодействия PEDV и организма новорожденных поросят (Kweon et al., 1994; Arriba et al., 2002; Suo et al., 2012; Lin et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Song et al. (2008), Stevenson et al. (2013) и Diel et al. (2016) считают, что практика ведения свиноводства нуждается в эффективных и основанных на биологии инфекционного агента специфических средствах профилактики. При разработке таких средств они рекомендуют использовать различные облегченные вариации stamping-aut, направленные на эрадикацию возбудителя и создание доступными способами иммунного фона, препятствующего репродукции вируса, и, тем самым, обрывающего эпизоотическую цепь. Это утверждение совпадает с нашими выводами и рекомендациями по борьбе с ЭДС.

Изучение молекулярной эпизоотологии PEDV, индуцирующего классический тип инфекционного процесса без эстафетной передачи возбудителя на восприимчивом поголовье – новорожденных поросятах, которые являются биоиндикатором PEDV, представляет уникальную возможность проследить процесс взаимодействия двух антагонистических популяций микро- и макроорганизмов, выяснить общебиологические закономерности сосуществования популяций микроорганизмов и позвоночных (Arriba et al., 2002; Lin et al., 2015; Clement et al., 2016; Li et al., 2016).

Парадигмальной эпизоотологической особенностью этиопатогенеза ЭДС является узкий временной диапазон летального поражения чувствительных клеток-мишеней кишечника неимунных животных с элиминацией вируса после репродукции, то есть короткий жизненный цикл пребывания вируса в макроорганизме с последующей полной элиминацией возбудителя. Это сводит стратегию борьбы с ЭДС к созданию невосприимчивого макроорганизменного фона (популяционный иммунитет) для вируса и его эрадикации во внешней технологической среде (Clement et al., 2016; Langel et al., 2016; Li et al., 2016; Srijangwad et al., 2017).

В заключение необходимо подчеркнуть, что на современном этапе эволюционного развития PEDV, биологический межвидовой летальный антагонизм между вирусом и неимунными новорожденными поросятами не преодолен, популяция PEDV и организм новорожденных поросят биологически, как несингенные генетические системы, несовместимы и в едином биотопе сосуществовать не могут.

Выводы

Персистенция PEDV в организме реконвалесцентных животных не зафиксирована, макроорганизм после переболевания полностью освобождается от возбудителя. Формирование стабильного эндемического очага инфекции возможно за счет сохранения вируса на технологических объектах внешней среды и инфицирования неимунных животных, прежде всего новорожденных.

Новорожденные поросята, полученные от ремонтных свинок, представляют повышенную группу риска, так как ювенильные животные с низким уровнем иммунной резистентности при неудовлетворительном кормлении после «обратного скармливания» могут формировать лактогенный иммунитет недостаточной напряженности, и неимунные новорожденные поросята, как биоиндикатор наличия во внешней среде PEDV, становятся дебютным звеном эпизоотической цепи ЭДС.

При стабилизации эпизоотического очага ЭДС во времени и пространстве происходит увеличение инфицирования в результате расширения возрастного диапазона поражения на более старшие возрастные группы (28–70 суток), при этом незначительно снижается тяжесть патогенеза и уменьшается смертность. Из эмерджентного качества патогенез не выходит, что свидетельствует о начальном этапе адаптации и слабой аттенуации популяции PEDV к экосистеме организма поросят.

References

Annamalai, T., Saif, L. J., Lu, Z., & Jung, K. (2015). Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. Veterinary Immunology and Immunopathology, 168(3), 193–202.

Arriba, M. L., Carvajal, A., Pozo, J., & Rubio, P. (2002). Isotype-specific antibody-secreting cells in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of conventional pigs inoculated with PEDV. Veterinary Immunology and Immunopathology, 84(1), 1–16.

Arriba, M. L., Carvajal, A., Pozo, J., & Rubio, P. (2002). Lymphoproliferative responses and protection in conventional piglets inoculated orally with virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. Journal of Virological Methods, 105(1), 37–47.

Bjustrom-Kraft, J., Woodard, K., Giménez-Lirola, L., Rotolo, M., Wang, C., Sun, Y., Lasley, P., Zhang, J., Baum, D., Gauger, P., & Zimmerman, J. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. BMC Veterinary Research, 12, 99–107.

Carvajal, A., Argüello, H., Martínez-Lobo, F. J.,Costillas, S., Miranda, R., de Nova, P. J. G., & Rubio, P. (2015). Porcine epidemic diarrhoea: New insights into an old disease. Porcine Health Management, 1(12), 1–8.

Chang, S. H., Bae, J. L., Kang, T. J., Kim, J., Chung, G. H., Lim, C. W., Laude, H., Yang, M. S., & Jang, Y. S. (2002). Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. Journal of Molecules and Cells, 14(2), 295–299.

Choudhury, B., Dastjerdi, A., Doyle, N., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016). From the field to the lab – An european view on the global spread of PEDV. Virus Research, 226, 40–49.

Clement, T., Singrey, A., Lawson, S., Okda, F., Nelson, J., Diel, D., Nelson, E. A., & Christopher-Hennings, J. (2016). Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback. Journal of Swine Health and Production, 24(3), 147–153.

Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R. J., Steinbach, F., & Williamson, S. (2015). Porcine Epidemic Diarrhea Virus among farmed pigs, Ukraine. Emerging Infectious Diseases, 21(12), 2235–2237.

Diel, D. G., Lawson, S., Okda, F., Singrey, A., Clement, T., Fernandes, M. H. V., Christopher-Hennings, J., & Nelson, E. A. (2016). Porcine epidemic diarrhea

virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. Virus Research, 226(2), 60–70.

Di-Qiu, L., Jun-Wei, G., Xin-Yuan, Q., Yan-Ping, J., Song-Mei, L., & Yi-Jing, L. (2012). High-level mucosal and systemic immune responses induced by oral administration with *Lactobacillus*-expressed porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) S_1 region combined with *Lactobacillus*-expressed N protein. Applied Microbiology and Biotechnology, 93(6), 2437–2446.

Gerber, P. F., & Opriessnig, T. (2015). Detection of immunoglobulin (Ig) A antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in fecal and serum samples. MethodsX, 2, 368–373.

Gerber, P. F., Gong, Q., Huang, Y. W., Wang, C., Holtkamp, D. & Opriessnig, T. (2014). Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. The Veterinary Journal, 202(1), 33–36.

Goede, D., & Morrison, R. B. (2016). Production impact and time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Preventive Veterinary Medicine, 123(1), 202–207.

Goede, D., Murtaugh, M. P., Nerem, J., Yeske, P., Rossow, K., & Morrison, R. (2015). Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain. Veterinary Microbiology, 176(1), 161–164.

Hou, X.-L., Yu, L. Y., Liu, J., & Wang, G. H. (2007). Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. Journal of Vaccine, 26(1), 24–31.

Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z., & Saif, L. J. (2015). Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. Veterinary Microbiology, 178(1), 31–40.

Khatri, M. (2015). Porcine Epidemic Diarrhea Virus replication in duck intestinal cell line. Emerging Infectious Diseases, 21(3), 549–550.

Kim, O., & Chae, C. (2003). Experimental infection of piglets with a korean strain of porcine epidemic diarrhoea virus. Journal of Comparative Pathology, 129(1), 55–60.

Knuchel, M., Ackermann, M., Müller, H. K., & Kihm, U. (1992). An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. Veterinary Microbiology, 32(2), 117–134.

Koh, H. W., Kim, M. S., Lee, J. S., Kim, H., & Park, S. J. (2015). Changes in the swine gut microbiota in response to porcine epidemic diarrhea infection. Microbes and Environments, 30(3), 284–287.

Kweon, C. H., Kwon, B. J., Kang, Y. B., & An, S. H. (1994). Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) infection in Korea. Korean Journal of Veterinary Research, 34(2), 321–326.

Langel, S. N., Paim, F. C., Lager, K. M., Vlasova, A. N., & Saif, L. J. (2016). Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. Virus Research, 226, 93–107.

Li, B. X., Ge, J. W., & Li, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. Journal of Virology, 365(1), 166–172.

Li, W., Kuppeveld, F. J. M., He, Q., Rottier, P. J. M., & Bosch, B. J. (2016). Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. Journal of Virus Research, 226, 117–127.

Li, Z.-L., Zhu, L., Ma, J.-Y., Zhou, Q.-F., Song, Y.-H., Sun, B.-L., Chen, R.-A., Xie, Q.-M., & Bee, Y.-Z. (2012). Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China. Virus Genes, 45, 181–185.

Lin, C. M., Annamalai, T., Liu, X., Gao, X., Lu, Z., El-Tholoth, M., Hu, H., Saif, L. J., & Wang, Q. (2015). Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. Veterinary Research, 46, 134–147.

Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A. D., Merialdi, G., Alborali, L. G., & Pensaert, M. B. (2008). Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. Veterinary Record, 162(10), 307.

Masiuk, D., Sosnitskiy, A., Kokarev, A., & Koliada, S. (2017). Experimental infection of pigs porcine epidemic diarrhea virus. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 19(77), 208–213.

Poonsuk, K., Zhang, J., Chen, Q., Gonzalez, W., Correa da Silva Carrion, L., Sun, Y., Ji, J., Wang, C., Main, R., & Zimmerman, J. (2016). Quantifying the effect of lactogenic antibody on porcine epidemic diarrhea virus infection in neonatal piglets. Veterinary Microbiology, 197, 83–92.

Puranaveja, S., Poolperm, P., Lertwatchharasarakul, P., Kesdaengsakonwut, S., Boonsoongnem, A., Urairong, K., Kitikoon, P., Choojai, P., Kedkovid, R., Teankum, K., & Thanawongnuwech, R. (2009). Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. Emerging Infectious Diseases, 15, 1112–1115.

Quist-Rybachuk, G. V., Nauwynck, H. J., & Kalmar, I. D. (2015). Sensitivity of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to pH and heat treatment in the presence or absence of porcine plasma. Veterinary Microbiology, 181(3), 283–288.

Song, D. S., Oh, J. S., Kang, B. K., Yang, J. S., Song, J. Y., Moon, H. J., Kim, T. Y., Yoo, H. S., Jang, Y. S., & Park, B. K. (2005). Fecal shedding of a highly cell-culture-adaptrd porcine epidemic diarrhea virus after oral inoculation in pigs. Journal of Swine Health and Production, 13(5), 269–272.

Srijangwad, A., Stott, C. J., Temeeyasen, G., Senasuthum, R., Chongcharoen, W., Tantituvanont, A., & Nilubol, D. (2017). Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus. Archives of Virology, 162, 2029–2034.

Stevenson, G. W., Hoang, H., Schwartz, K. J., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B. J., Koster, L. G., Killian, M. L., & Yoon, K. J. (2013). Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: Clinical signs, lesions and viral genomic sequences. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 25, 649–654.

Strizhakova, O. M. (2013). Vydelenie i identifikacija virusa epizooticheskoj diarei cvinej pri vspyshke v krupnom svinovodcheskom hoziajstve [Isolation and identification of epizootic diarrhea virus in pigs under outbreak at a large farm]. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya, 4, 65–69 (in Russian).

Suo, S., Ren, Y., Li, G., Zarlenga, D., Bu, R., Su, D., Li, X., Li, P., Meng, F., & Wang, C. (2012). Immune responses induced by DNA vaccines bearing Spike gene of PEDV combined with porcine IL-18. Virus Research, 167(2), 259–266.

Tun, H. M., Cai, Z., & Khafipour, E. (2016). Monitoring survivability and infectivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDv) in the infected on-farm Earthen Manure Storages (EMS). Frontiers in Microbiology, 7, 265–276.

Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A., Collins, J., & Saif, L. J. (2014). Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013 – February 2014. Emerging Infectious Diseases, 20(10), 1620–1628.

Wang, L., Byrum, B., & Zhang, Y. (2014). New variant of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, United States. Emerging Infectious Diseases, 20(5), 917–919.

Yu, L., Zhao, Z., Hou, X., Cao, H., & Wang, G. (2008). Study on the surface displayed Porcine Epidemic Diarrhea Viral (PEDV) S1 on lactic acid bacteria. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 4, 45–47.

Zhang, X., Pan, Y., Wang, D., Tian, X., Song, Y., & Cao, Y. (2015). Identification and pathogenicity of a variant porcine epidemic diarrhea virus field strain with reduced virulence. Virology Journal, 12, 88–93.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 417–422
doi: 10.15421/021764

Enrichment of meat products with selenium by its introduction to mixed feed compounds for birds

A. Sobolev*, B. Gutyj**, N. Grynevych*, V. Bilkevych*, Y. Mashkin*

*Bila Tserkva National Agrarian University, Ukraine
**Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Article info

Received 12.06.2017
Received in revised form 21.07.2017
Accepted 26.07.2017

Bila Tserkva National Agricultural University, Soborna sq., 8/1, Bila Tserkva, 09100, Ukraine. Tel.: +38-096-443-91-50. E-mail: sobolev_a_i@ukr.net

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine. Tel.: +38-068-136-20-54. E-mail: bvh@ukr.net

Sobolev, A., Gutyj, B., Grynevych, N., Bilkevych, V., & Mashkin, Y. (2017). Enrichment of meat products with selenium by its introduction to mixed feed compounds for birds. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 417–422. doi: 10.15421/021764

Selenium is a biologically active microelement, contained in a number of hormones and enzymes. In a bird or animal organism selenium performs the following functions: strengthens the immune system, stimulates formation of antibodies, macrophages and interferons. Also, it is a powerful antioxidant agent. It stimulates processes of metabolism in the organism, protects the organism against toxic manifestations of cadmium, lead, thalium and silver; stimulates reproductive function, decreases acute development of inflammatory processes; stabilizes functioning of the nervous system; normalizes functioning of the endocrine system. Furthermore, it stimulates synthesis of hemoglobin, takes part in secretion of erythrocutes, neutralizes toxins, prevents and stops development of malignant tumors. It also has a positive effect on the cardiovascular system of an animal organism: prevents myocardosis and decreases the risk of development of cardiovascular diseases. Deficiency of selenium in the organism causes (depending upon the extent of deficiency) either physiological changes within the regulatory norm, significant disorders of the metabolism, or specific diseases. Around 75 different diseases and symptoms of pain are related to selenium deficiency. In most countries, the level of selenium consumption remains low (20–40 µg/day). There are several ways of improving of the selenium consumption of a population: consumption of selenium as a medication or dietary supplement, producing selenium-enriched bread, growing greens and vegetables rich in selenium, producing selenium-enriched beverages, products of animal origin, which would be rich in selenium. In the scientific-agricultural sphere studies have been made on the influence of adding different doses (0.2–0.6 mg/kg) of selenium in mixed feeds and peculiarities of its depositing and distribution in the muscle tissues of young growth of different species of poultry. It has been found that feeding broiler chickens, baby geese and ducklings with mixed feeds containing selenium in studied doses contributed to a reliable increase in concentration of this microelement in the chest muscles respectively by 21.7–106.7%, 35.1–40.0% and 23.2–66.0% and the leg muscles – by 13.0–85.7%, 57.4–61.7% and 20.5–79.4%. The meat of these types of birds is safe for human consumption from the perspective of food hygiene, for its selenium content is not higher than the TLV of this microelement for meat products (1.0 mg/kg). Consuming selenium-enriched meat of chickens, baby geese and ducklings within recommended physiological norms (115 g of meat products/day) satisfies the daily need of an adult for this microelement (70 µg) y 12.0–23.5%, 29.1–30.6% and 11.3–21.5% respectively. Taking this into account, selenium-enriched bird meat can be considered a dietary foodstuff suitable for biocorrectional function in humans. The viability of enriching bird meat products with selenium by adding selenium-containing premixes to fodder was proven experimentally. It was proven that adding optimum doses of selenium to mixed feeds for young birds bred for meat has a positive effect on the quality of meat, particularly on its biological value.

Keywords: dose; mixed feed; bird meat; accumulation; human

Introduction

The history of the discovery of selenium goes way back to past centuries. According to available information, selenium is considered to be have been discovered around 1300 by alchemist Arnold of Villanova (who lived from about 1235–1310), who studied medicine at the Sorbonne in Paris, and later became a doctor of P. V. Clemens. In the book Rosarium Philosophorum, he describes a red-brown sediment which was left in the furnace after sulfur had been evaporated. It has been suggested that this was an allotropic modification of selenium of a red colour. Unfortunately, the discovery of selenium was forgotten for next 500 years (Baxter, 2005).

The biological role of selenium was first mentioned in the literature in 1842, after the discovery that *Bacillus ferreus* was able to recover conjunctions of selenium. Later studies (in 1885) proved that plants are able to absorb selenium, dissolved for them in water. Futher research proved the impact of selenium on oxidation processes of cell metabolism (Gromova and Gogoleva, 2007). The role of selenium in the diet of animals began to be understood in 1931, after the discovery that the cause to a number of endemic diseases of cattle, swine and poultry in the territory of the Great Plains of America was consumption of plants and seeds with an excessive content of selenium. The manifestations of poisoning by selenium were: loss of weight, hair loss, impacts on articulations, bones, hooves and skin, loss of sight (animals stumbled), paralysis, which caused death from exhaustion.

Similar symptoms were described in 1856 in a case with horses. But they were not mentioned in relation to selenium toxicosis (Schrauzer et al., 2009). Later, areas with excessive content of selenium

in plants and the soil and cases of selenium toxicosis in animals were found in Canada, Ireland, Columbia, Australia, England, countries of the Commonwealth of Independent States and other countries.

Until 1958, selenium was considered only as a toxic microelement. And only in 1958 did K. Schwarz and C. Foltz from the National Institute of Health (USA) prove the vital need for selenium by demonstrating through a series of classic experiments that this particular microelement prevents the development of necrotic degeneration of the liver of rats. This initiated usage of selenium compounds in treatment of alimentary hepatitis of swine, exudative diathesis, encephatomacia of poultry and other diseases (Rocha et al., 2017).

In 1974, the Food and Drug Administration of the USA (FDA) aproved adding selenium to the diet of animals and poultry in the form of sodium selenite in doses of 0.1 mg/kg. Then, 5 years later the FDA reconsidered the maximum permissible level of selenium in mixed feeds, and raised it up to 0.3 mg/kg. Later, due to the studies by a number of authors, this level was raised further up to 0.5–1.0 mg/kg, depending on the country (Arnér, 2012).

Over the following years both Ukrainian and foreign researchers conducted significant amount of work on further study of the biological role and mechanism of selenium in organisms.

Selenium is one of the most efficient antioxidants. The antioxidant properties of selenium affect the ways of activating glutathione peroxidase, one of the key enzymes of the system of glutathione functioning. Deficiency of this metal in the organism causes dysfunctions in forming the active form of glutathione peroxidase, which in its turn is followed by significant disorders in functioning of the entire glutathione system (Kumara and Priyadarsinib, 2014; Prashanth et al., 2015; Hariv and Gutyj, 2016; Khariv et al., 2016; Martyshuk et al., 2016; Reich et al., 2016; Gutyj et al., 2017).

At first, the discovery of biological properties of selenium justified its usage for preventing and treating a number of diseases, connected with selenium deficiency, and later – its usage for stimulating growth and development of young birds, and also for improving egg yield, preservation of poultry, improving incubatory characteristics of eggs and a number of other productive qualities.

Many studies have shown that grain fodders which are used for feeding different species and age groups of poultry are deficient in selenium (Papazjan et al., 2008; Surai et al., 2008; Sobolev and Povoznikov, 2016; Sobolev et al., 2017). Nowadays, providing poultry with selenium can be achieved only by adding nonorganic or organic forms of this microelement to mixed feeds (the commonest way is adding selenium to mixed feed through mineral premix). In the future, it is unlikely, that changing the type of plant nutrients will increase the content of the microelement in the main components of mixed feeds to such level which would fully meet the requirements of highly productive poultry for selenium.

Around 75 different diseases and pain symptoms are related to selenium deficiency (Rayman, 2012). Selenium deficiency is considered as a possible etiological factor for 14 cardiovascular diseases, including congestive cardiomyopathy (Keshan disease), atherosclerosis, ishemic heart disease, myocardial infraction, hypertension, and others (Benstoem et al., 2015). Some scholars consider Kashin-Beck disease to be related to selenium deficiency in soils, plants and food products. This severe osteo-articular human disease (which mostly strikes children) is common in the south-east regions of Chita Oblast in Russia, North Korea, North-East China (Yao et al., 2011).

An inverse relationship has been found between the incidence of cancer among people and the content of selenium in food products, organism and environment. In regions with low content of selenium, the risk of malignant neoplasm in the lungs, stomach, colon, rectum, pancreas, mammary glands, prostatitis is heightened (Zachara et al., 2005; Roman et al., 2014; Cai et al., 2016). Pathogenesis of cataract and fibrocystic disease of the pancreas is related to deficiency of a number of elements, including selenium (Kumar et al., 2014). Also, deficiency of selenium is a cause of chronic hepatitis and rhematoid arthritis (Olesińska and Tuszkiewicz-Misztal, 2005; Khan et al., 2012; Rauf et al., 2012).

Provision of selenium to an organism is considered significant for prevention of neuorodegeneration (Alzheimer's disease, Parkinson's disease) (Loef et al., 2011; Pillai et al., 2014). People with selenium deficiency have dysfunctions in the reproductive system, infertility, impotence, and decline of life expectancy due to premature aging (Oguntibeju et al., 2009; Stoffaneller and Morse, 2015).

Nowadays it is already proven that sudden infant death syndrome is caused by deficiency of selenium and vitamin E (Reid, 2007).

Analysis of the population's actual consumption of selenium with crop and livestock products shows insignificant (or even low) level of the organism's provision with this microelement.

Average human consumption of selenium fluctuates significantly: from 10 μg in selenium-deficient regions to 1400 μg in regions with selenoses. Many countries are characterized by mild or low indicators of selenium consumption, and the indicator has been found to be high (to 200 μg/day and higher) only in Canada, Venezuela, the Philippines, Thailand and Japan (Mishanin, 2008). In most countries, the level of selenium consumption with food products remains low (μg/day): New Guinea – 20; Nepal – 23; India – 27; Egypt – 29; Belgium, Serbia, Slovenia – 30; Turkey – 32; England, Spain, Slovakia – 35; Sweden, France, Portugal – 38; Germany, Italy – 43; Austria – 48. Researchers have obseved an annual decrease in consumption of Seelenium (Surai, 2006).

The daily norm of selenium recomended by experts of FAO/WHO is 50–200 μg and is considered sufficient and safe. The minimum human requirement for selenium, according to some studies, is 14 μg/day for women and 19 μg/day for men (Yang et al., 1987), and 40 μg/day, according to other studies (Whanger, 1998). The upper apropriate (safe) level of selenium consumption is 400 μg/day. Globally, the maximum acceptable dose of daily selenium is 800 μg (Fairweather-Tait et al., 2011; Huang et al., 2013).

A number of countries have developed reccomended norms of selenium consumption, such are (μg/day): Great Britain – 75 (men) and 60 (women), Australia – 85 (men) and 70 (women) (Tinggi, 2003); northern countries – 30–60 (adults); Germany, Austria, Switzerland – 70 (men) and 60 (women) (Kipp et al., 2015); Spain – 70 (men) and 55 (women) (Adame et al., 2012); Canada – 50 (adults) (Rayman, 2000); USA – 55 (adults) (Levander, 1999); Russia – 63 (adults) (Tutel'jan, 2009); Belarus – 70 (adults) (Zajcev et al., 2005); Ukraine – 70 (adults) (Normy, 1999); Finland – 120 (adults) (Alfthan et al., 2005). Extrapolation of the abovementioned numbers taking into account the body weight of infants and teenagers allows one to calculate their physiological requirement for selenium.

There are several ways of improving the selenium-consuption status of the population: consumption of selenium as medications or dietary supplements, producing selenium-enriched bread (mostly from imported grains), cultivating greens and vegetables rich in selenium (dill, radish, garlic, etc.), selenium-enrichement of beverages, producing livestock products enriched with selenium (Gorelikova, 2008). The most safe and efficient way of providing the organism with the necessary amount of selenium is through products of livestock and poultry, through compulsory addition to fodder of premixes containing highly efficient biologically acceptable forms of selenium. This would provide a relatively high content of the microelement in meat and dietary products (eggs and milk) and would prevent cases of toxicosis among the population due to the buffer effect of animal tissues. At the same time, such approach would improve the productive qualities of agricultural animals and poultry.

The aim of our research was to study the peculiarities of depositing and distribution of selenium in the muscle tissues of the young of different species of poultry, in relation to its level in the mixed feeds. Also, as the main source for selenium in the human organism is food products, we were interested in whether increasing its concentration in the meat of chickens, goslings and ducklings fed with mixed feeds containing additions of the microelement is safe from the perspective of food hygiene.

Materials and methods

The study was conducted on broiler chickens of COBB 500 cross, goslings of the Gorki breed and ducklings of the Ukrainian white

breed (Ukrainian White (UW) line 7), grown for meat. For three scientific-agricultural experiments, we formed three groups of daily young according to principle of analogues with consideration of body weight, origin and physiological condition (moveability, condition of funiculus and feathering). The first scientific-agricultural experiment was conducted on broiler chickens (duration – 42 days), the second – on goslings grown for meat (duration – 75 days), the third – on ducklings grown for meat (duration – 56 days). The duration of every experiment corresponded to a period of growing the species of poultry for meat.

In all scientific-agricultural experiments, the diet of the tested poultry consisted of dry complete mixed feeds, balanced in main nutrient and biologically active components according to the current norms. According to the schemes of experiments, different amounts of selenium were additionaly added to mixed feeds of the poultry from experimental groups (Table 1).

Table 1
The schemes of scientific-agricultural experiments

Group	The number of birds in the group, individuals	Addition of selenium to the mixed feed, mg/kg
I scientific-agricultural experiment		
1 control	100	Main diet (mixed feed) – MD
2 experimental	100	MD + 0.2
3 experimental	100	MD + 0.3
4 experimental	100	MD + 0.4
II scientific-agricultural experiment		
1 control	80	Main diet (mixed feed) – MD
2 experimental	80	MD + 0.4
3 experimental	80	MD + 0.5
4 experimental	80	MD + 0.6
III scientific-agricultural experiment		
1 control	100	Main diet (mixed feed) – MD
2 experimental	100	MD + 0.2
3 experimental	100	MD + 0.4
4 experimental	100	MD + 0.6

Note: selenium was added to the mixed feed for poultry in mineral premixes; as a source of selenium, sodium selenite of "Ch" classification (TC 6-09-17-209-88 registered in identifier of chemical substances (CAS) by the number 10102-18-8), with coefficient of conversion of element into oxide equals 2.19.

The young poultry of all species were reared on deep litter with free access to fodder and water, in compliance with technological parameters of stocking density, microclimate and illumination according to current norms. After scientific-agricultural experiments, we chose 4 individuals (2 females and 2 males) of birds from each group, and executed control slaughter according to the generally accepted method. During anatomical analysis and deboning of meat, we collected average samples of chest and leg muscles for chemical analysis.

The content of selenium in meat was defined through atomic absorption method using AAS "Saturn-3 P1" [Сатурн-3 П1] with air-acetylene flame and provisional humid mineralization of samples. Relative biological meat value was calculated using the micromethod with test-organism of *Tetrahymena pyriformis* ciliate, biological strain WH14. Mathematical analysis of the study results was conducted in Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Differences between average values were considered statistically significant at P < 0.05 (ANOVA).

Results and discussion

The data obtained allowed to conclude that increase in the level of selenium in mixed feeds for the young poultry of different species causes increase in selenium concentration in their muscle tissues. Analysis of samples of broiler chickens' muscle tissues showed that selenium concentration in chest muscles of the young from the second experimental group, compared to the control, was significantly higher by 21.7%, from the third group – by 70.0% and from fourth – by 106.7% and in absolute values, it equaled 7.3 μg % (P < 0.05), 10.2 (P < 0.01) and 12.4 μg % (P < 0.001) of fresh tissues (Table 2).

Clearly manifested difference among the broiler chickens from experimental groups was observed also for concentration of selenium in leg muscles. This indicator for the young of the control group equaled 7.7 μg %. At the same time, among the birds of the same age from the second experimental group the indicator was higher by 13.0% (P < 0.01), from the third group – by 57.1 (P < 0.001) and the fourth – by 85.7% (P < 0.001). We should also mention the fact that depositing of selenium in the chest muscles of broiler chickens was manifested less clearly than in the leg muscles, which is possibly related to functional peculiarities of these two groups of muscle tissues.

Concentrations of selenium in muscle tissues of goslings was quite different (Table 3). Among the birds from the control group, concentration of selenium was higher in the chest muscles (11.5 against 13.1 μg %). Feeding goslings of the experimental groups while they were reared on mixed feeds enriched with different doses of selenium contributed to better accumulation of the microelement in the muscle tissues. Leg muscles of the young from the experimental groups (except the fourth group) contained more selenium than chest muscles. Leg muscles of goslings from the second experimental group contained the concentration of the microelement which was reliably higher (P < 0.001) by 57.4%, from the third group – by 60.0 and from the fourth – by 61.7% compared to the corresponding indicator of the control group (11.5 μg %).

Compared to the control group, the difference in concentration in chest muscles was higher among birds from the experimental groups (2–4) and was only 35.1%, 38.9% and 42.0% respectively, though this had a high probability (P < 0.001).

It should also be mentioned that the concentration of selenium in chest and leg muscles of goslings from the fourth experimental group, where selenium was added to the mixed feed in amount of 0.6 mg/kg, was the same and equaled 18.6 μg %. Analysis of the character of the microelemnt deposits allows us to state that increase in the level of selenium in mixed feeds for goslings slows the increase in its concentration in the muscles. The obtained results indicate that the birds' ability to accumulate selenium in the organs and tissues is limited.

Table 2
Concentration of selenium in muscle tissues of broiler chickens (μg %, x ± SD, n = 4)

Group of muscles	Group			
	1 control	2 experimental	3 experimental	4 experimental
Chest muscles	6.0 ± 0.34	7.3 ± 0.23*	10.2 ± 0.71**	12.4 ± 0.70***
Leg muscles	7.7 ± 0.17	8.7 ± 0.13**	12.1 ± 0.32***	14.3 ± 0.43***

Note: in this and next tables significant difference between the control and the experimental groups: * – P < 0.05, ** – P < 0.01, *** – P < 0.001.

The results of the analysis of duck meat showed that selenium was found in all studied samples. The meat of ducklings which were fed with mixed feed with addition of selenium contained a larger concentration of the microelement (Table 4). The concentration of selenium in chest and leg muscles of ducklings from the control group was only 5.6 and 7.3 μg % respectively.

The level of selenium in muscles of ducklings from the experimental groups was related to its concentration in the mixed feeds. It was higher in chest muscles of ducklings from the second experimental group by 23.2% (P < 0.05), from the third – by 60.7% (P < 0.01) and from the fourth – by 66.0% (P < 0.01) than among birds of control group. The concentration of selenium in leg muscles of the young from the second experimental group increased to 8.8 μg %, from the third – to 12.8 and from the fourth – to 13.1 μg %. The difference in relation to the control group was 20.5%, 75.3% (P < 0.001) and 79.4% (P < 0.001) respectively. It should also be mentioned that ducklings grown for meat from the control and experimental groups were different from broiler chickens and goslings grown for meat in their relatively lower cumulative capacities, which is probably related to species, genetic and physiological factors.

Growing young poultry for meat is related to significant expenses for basic means of production, inputs and labour resources, which pay

off only if the final product meets technological requirements. Therefore the ultimate indicator of efficiency of poultry meat production is the quality of the goods, its ability to satisfy clients. Analysis of data from the available literature showed that researchers who studied the impact of selenium on bird organisms, have covered the aspect of meat quality insignificantly. Researchers were first of all studying the quantative indicators (live weight and preservation of birds, conversion of fodder, morphological compound of carcass, etc.), and only then analyzing the qualitative compound of meat (content of water, protein, fat and mineral substances). The impact of selenium additives to mixed feeds on the biological meat value of different species of poultry, its physical and chemical and organoleptic properties has remained almost unresearched. It is known, that chemical compound of meat does not fully determine the biological value of product, but has a certain importance in evaluating its quality. The real value of a product depends on the extent of its absorption by and safety for the human organism.

Nowadays, more complex evaluation of quality of poultry meat in scientific stydies uses biological express methods. Among the criteria recommended for evaluation of meat quality, the most objective is the indicator of the biological value, which determines the level of a product's accordance to optimum needs of humans and which guarantees safety in compliance with physiological norms. Toxic-biological evaluation of meat products uses one of the most promising test objects – *Tetrahymena pyriformis*. The intensity of ciliates' breeding in meat samples indicates its biological value, and number of dead ciliates and altered forms of ciliates indicate the toxicity of samples.

The criteria of relative biological meat value is the number (expressed in percents) of ciliates grown over three days in experimental samples compared to number of ciliates grown in control samples. Considering the significance of this issue, we also studied the impact of adding different doses of selenium to mixed feeds on biological value of muscle tissues of broiler chickens, goslings and ducklings, grown for meat. Data provided in Table 5 shows that adding different doses of selenium to mixed feeds generally had a positive, although mixed, effect on the biological meat value of broiler chickens.

The relative biological value of chest muscles of broiler chickens from the experimental groups increased by 3.9–5.4% compared to the control group. It should be mentioned that of all selenium doses, the biggest impact on biological value of chest muscles of the young was achieved with the dose of 0.2 mg/kg. With addition of selenium in doses of 0.3 and 0.4 mg/kg to mixed feeds, a tendency of gradual decrease in the indicator of relative biological value of chest muscles was observed.

A tendency of increase in relative biological value of hip muscles was observed only among the young from the third and the fourth experimental groups – by 2.8 and 1.7% respectively; at the same time among birds from the second experimental group it was lower by 1.0% compared to the control. Study of muscular tissue samples of goslings showed that the young from experimental groups mainly had slightly better indicators of meat quality. Despite the absence of reliable differences between groups, values of the biological value of chest and leg muscles of birds from experimental groups in a certain way indicates the impact of adding selenium (Table 6). The number of grown ciliates in the samples of chest muscles of goslings from the experimental groups was higher compared to the control samples: in the second group – by 4.0%, in the third – by 3.0% and in the fourth – by 2.9%. The difference between the groups according to the similar indicator of leg muscles was lower – respectively 3.4%, 2.8% and 2.1% (higher in the experimental groups). The data provided in able 7 shows that feeding goslings with complete mixed feeds enriched with selenium in a dose of 0.2 mg/kg, resulted in indicators practically similar to the control group. The difference between the control and the second experimental group in the number of grown ciliates in samples of chest and leg muscles was 1.2% and 1.0% relatively.

Table 3
Concentration of selenium in muscle tissues of goslings reared for meat (μg %, x ± SD, n = 4)

Group of muscles	Group			
	1 control	2 experimental	3 experimental	4 experimental
Chest muscles	13.1 ± 0.29	17.7 ± 0.58***	18.2 ± 0.66***	18.6 ± 0.39***
Leg muscles	11.5 ± 0.31	18.1 ± 0.71***	18.4 ± 1.12***	18.6 ± 0.36***

Table 4
Concentration of selenium in muscle tissues of ducklings grown for meat (μg %, x ± SD, n = 4)

Group of muscles	Group			
	1 control	2 experimental	3 experimental	4 experimental
Chest muscles	5.6 ± 0.19	6.9 ± 0.38*	9.0 ± 0.54**	9.3 ± 0.54**
Leg muscles	7.3 ± 0.36	8.8 ± 1.77	12.8 ± 0.18***	13.1 ± 0.31***

Table 5
Biological value meat of broiler chickens (x ± SD, n = 4)

Indicator	Group			
	1 control	2 experimental	3 experimental	4 experimental
	Chest muscles			
Number of grown ciliates, individuals/ml	$6.41 \pm 0.274 \times 10^4$	$6.76 \pm 0.109 \times 10^4$	$6.71 \pm 0.153 \times 10^4$	$6.66 \pm 0.108 \times 10^4$
Relative biological value, %	100.0	105.4	104.7	103.9
	Leg muscles			
Number of grown ciliates, individuals/ml	$8.69 \pm 0.266 \times 10^4$	$8.60 \pm 0.330 \times 10^4$	$8.93 \pm 0.086 \times 10^4$	$8.84 \pm 0.117 \times 10^4$
Relative biological value, %	100.0	99.0	102.8	101.7

Table 6
Biological value of meat of goslings (x ± SD, n = 4)

Indicator	Group			
	1 control	2 experimental	3 experimental	4 experimental
	Chest muscles			
Number of grown ciliates, individuals/ml	$6.23 \pm 0.352 \times 10^4$	$6.48 \pm 0.169 \times 10^4$	$6.42 \pm 0.341 \times 10^4$	$6.41 \pm 0.196 \times 10^4$
Relative biological value, %	100.0	104.0	103.0	102.9
	Leg muscles			
Number of grown ciliates, individuals/ml	$8.08 \pm 0.229 \times 10^4$	$8.36 \pm 0.144 \times 10^4$	$8.31 \pm 0.206 \times 10^4$	$8.25 \pm 0.220 \times 10^4$
Relative biological value, %	100.0	103.4	102.8	102.1

Table 7
Biological value of meat of ducklings, (x ± SD, n = 4)

Indicator	Group			
	1 control	2 experimental	3 experimental	4 experimental
	Chest muscles			
Number of grown ciliates, individuals/ml	$5.79 \pm 0.083 \times 10^4$	$5.86 \pm 0.143 \times 10^4$	$6.14 \pm 0.075 \times 10^4$*	$6.11 \pm 0.095 \times 10^4$*
Relative biological value, %	100.0	101.2	106.0	105.5
	Leg muscles			
Number of grown ciliates, individuals/ml	$7.72 \pm 0.095 \times 10^4$	$7.73 \pm 0.124 \times 10^4$	$8.01 \pm 0.073 \times 10^4$*	$7.94 \pm 0.101 \times 10^4$
Relative biological value, %	100.0	100.1	103.7	102.8

Note: see Table 2.

After higher doses of selenium in mixed feeds (0.4 and 0.6 mg/kg), the intensity of breeding of ciliates was higher in the meat of the young from the experimental groups compared to the control, though the difference was significantly higher. The indicator for the samples of chest muscles of ducklings from the control group was 5.79×10^4 individuals/ml, whereas for the poultry from the third and the fourth experimental groups, the indicator was significantly higher ($P < 0.05$) by 6.0% and 5.5% respectively. Relative biological value of leg muscles of ducklings from the third and the fourth experimental groups was higher by 3.7 ($P < 0.05$) and 2.8% respectively compared to the control. We should also mention the fact that in all studied samples of meat of broiler chickens, ducklings and goslings we found no dead or altered ciliates after 24 hours of incubation, which indicates non-toxicity of the samples, therefore safety for human.

Researchers who studied the connection between selenium and quality of poultry meat products explain increase in biological meat value through positive changes in content and profiles of essential amino acids in proteins and fatty-acid compound of lypids, on the one hand, and through slowing of oxydation of proteins and unsaturated fatty acids in lypids, and decomposition of formed peroxids, on the other hand. Thus, the possibility of enriching poultry meat products with selenium by adding selenium-containing premixes to fodders was experimentally proven. Such approach achieves a dampening effect for humans and eliminates the possibility of toxicoses, which would be possible due to specific dietary preferences of particular individuals and binge consumption of a product enriched with micronutrient.

Considering the obtained results, we can state that meat of the young of different poultry, which were given selenium additives of the abovementioned doses in mixed feeds, is a good source of this microelement for humans, where it appears in the most useful form as protein metalorganic complexes. Consuming selenium-enriched meat of chickens, goslings and ducklings within the recommended physiological norm (115 g of meat products a day) would satisfy an adult's daily need in the microelement (70 μg) by 12.0–23.5%, 29.1–30.6% and 11.3–21.5% respectively.

Therefore, our studies showed that adding optimum doses of selenium to mixed feeds of the young poultry grown for meat, positively affects the quality of the meat, particularly its biological value.

Conclusions

Feeding broiler chickens, goslings and ducklings with mixed feeds with additions of selenium in the studied doses, which are considered to be safe from the perspective of food hygene, increases the concentration of this microelement in chest muscles by 21.7–106.7%, 35.1–40.0% and 23.2–66.0% respectively and in leg muscles – by 13.0–85.7%, 57.4–61.7% and 20.5–79.4%, which does not exceed TLV for meat products (1.0 mg/kg).

The value of selenium deposits in muscle tissues is related to species of poultry, group of muscles and its level in mixed feeds.

Considering the abovementioned evidence, selenium-enriched poultry meat can be considered a dietary food product of functional significance for humans, with biocorrectional effect.

The authors express their sincere gratitude to the staff of the Laboratory of Analytical Chemistry and Monitoring of Toxic Substances of the Occupational Medicine Institute of the Academy of Medical Sciences of Ukraine (Kyiv) for technical help in chemical analysis of the poultry meat.

References

Adame, E. M., Florea, D., Pérez, L. S., López, J. M., López-González, B., Cruz, A. P., & Pozo, E. P. (2012). Deficient selenium status of a healthy adult Spanish population. Nutrición Hospitalaria, 27(2), 524–528.

Benstoem, C., Goetzenich, A., Kraemer, S., Borosch, S., Manzanares, W., Hardy, G., & Stoppe, C. (2015). Selenium and its supplementation in cardiovascular disease – What do we know? Nutrients, 7(5), 3094–3118.

Cai, X., Wang, C., Yu, W., Fan, W., Wang, S., Shen, N., Wu, P., Li, X., & Wang, F. (2016). Selenium exposure and cancer risk: An updated meta-analysis and meta-regression. Scientific Reports, 6, 19213.

Fairweather-Tait, S. J., Bao, Y., Broadley, M. R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J. E., & Hurst, R. (2011). Selenium in human health and disease. Antioxidants and Redox Signaling, 14(7), 1337–1383.

Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxity of the experimental drug Amprolinsyl. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 41–45.

Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. (2017). Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 304–309.

Hariv, M. I., & Gutyj, B. V. (2016). Vplyv liposomalnoho preparatu Butaintervit na proteinsyntezuvalnu funktsiiu pechinky shchuriv za otruiennia tetrakhlormetanom [Influence of the liposomal preparation Butaintervite on protein synthesis function in the livers of rats under the influence of carbon tetrachloride poisoning]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 7(2), 123–126 (in Ukrainian).

Huang, Y., Wang, Q., Gao, J., Lin, Z., Banuelos, Gary S., Yuan, L., & Yin, X. (2013). Daily dietary selenium intake in a high selenium area of Enshi, China. Nutrients, 5, 700–710.

Khan, M. S., Dilawar, S., Ali, I., & Rauf, N. (2012). The possible role of selenium concentration in hepatitis B and C patients. Saudi Journal of Gastroenterology, 18, 106–110.

Khariv, M., Gutyj, B., Butsyak, V., & Khariv, I. (2016). Hematolohichni pokaznyky orhanizmu shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za diji liposomalnoho preparatu [Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(1), 276–289 (in Ukrainian).

Kipp, A. P., Strohm, D., Brigelius-Flohea, R., Schomburg, L., Bechthold, A., Leschik-Bonnet, E., & Heseker, H. (2015). Revised reference values for selenium intake. Trace Elements in Medicine and Biology, 32, 195–199.

Kumara, B. S., & Priyadarsinib, K. I. (2014). Selenium nutrition: How important is it? Biomedicine Preventive Nutrition, 4(2), 333–341.

Levander, O. A. (1999). Developing human dietary recommendations of selenium. Proceeding the Alvin Lloyd Moxon Honorary Lectures on Selenium and Vitamin E, 100–110.

Loef, M., Schrauzer, G. N., & Walach, H. (2011). Selenium and Alzheimer's disease: A systematic review. Alzheimers Disease, 26(1), 81–104.

Martyshuk, T. V., Gutyj, B. V., & Vishchur, O. I. (2016). Riven produktiv perekysnoho okysnennia lipidiv u krovi shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomalnoho preparatu "Butaselmevit" [Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of "Butaselmevit"]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 22–27 (in Ukrainian).

Oguntibeju, O. O., Esterhuyse, J. S., & Truter, E. J. (2009). Selenium: Its potential role in male infertility. Pakistan Journal of Medical Sciences, 25(2), 332–337.

Olesińska, E., & Tuszkiewicz-Misztal, E. (2005). The suspected role of selenium in pathogenesis of rheumatoid arthritis. Reumatologia, 43(1), 31–34.

Papazjan, T., & Golubkina, N. (2008). Selen v kormah sel'skohozjajstvennoj pticy [Selenium in the food of poultry]. Pticevodstvo, 10, 45–46 (in Russian).

Pillai, R., Uyehara-Lock, J. H., & Bellinger, F. P. (2014). Selenium and selenoprotein function in brain disorders. IUBMB Life, 66(4), 229–308.
Prashanth, L., Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R., & Prasad, L. K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. NTR University of Health Sciences, 4, 75–85.
Rauf, N., Tahir, S. S., Dilawar, S., Ahmad, I., & Parvez, S. (2012). Serum selenium concentration in liver cirrhotic patients suffering from hepatitis B and C in Pakistan. Biological Trace Element Research, 145(2), 144–150.
Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. Lancet, 366, 233–241.
Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. Lancet, 379, 1256–1268.
Reich, H. J., & Hondal, R. J. (2016). Why nature chose selenium. American Chemical Society. Chemical Biology, 11, 821–841.
Reid, G. M. (2007). Sudden infant death syndrome: Selenium administered above dietary needs stabilizes the electrocardiograms of subjects deprived of exercise stimuli to the brain. Medical Hypotheses, 68(6), 1265–1267.
Rocha, J. B. T., Piccoli, B. C., & Oliveirab, C. S. (2017). Biological and chemical interest in selenium: A brief historical account. Arkivoc, 2, 457–491.
Roman, M., Jitaru, P., & Barbante, C. (2014). Selenium biochemistry and its role for human health. Metallomics, 6(1), 25–54.
Sobolev, A. I., Gutyj, B. V., Petryshak, O. I., Golodjuk, I. P., Petryshak, R. A., & Naumyuk, O. S. (2017). Morfolohichni ta biokhimichni pokaznyky krovi kacheniat, shcho vyroshchuiutsia na miaso, za riznoho rivnia selenu v kombikormakh [Morphological and biochemical blood indicators of ducklings, which are raised for the purpose of meat with the different level of selenium in feeding-stuffs]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 74, 57–62 (in Ukrainian).
Stoffaneller, R., & Morse, N. L. (2015). A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. Nutrients, 7(3), 1494–1537.
Surai, P. F. (2006). Selenium in nutrition and health. University Press, Nottingham.
Surai, P. F., & Taylor-Pickar, J. A. (2008). Current advances in selenium research and applications. Wageningen Academic Publishers, Netherlanls.
Tinggi, U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: A review. Toxicology Letters, 137, 103–110.
Whanger, P. D. (1998). Metabolism of selenium in humans. Trace Element in Experimental Medicine, 11, 227–240.
Yang, G. Q., Qian, P. C., & Zhu, L. Z. (1987). Human. Selenium requirements in China. Selenium in Biology and Medicine, 589–607.
Yao, Y., Pei, F., & Kang, P. (2011). Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease. Nutrition, 27, 1095–1100.
Zachara, B. A., Szewczyk-Gole, K., Tyloch, J., Wolski, Z., Szylberg, T., Stepien, S., Kwiatkowski, S., Bloch-Boguslawska, E., & Wasowicz, W. (2005). Blood and tissue selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with prostate cancer and benign prostate hyperplasia. Neoplasma, 52, 248–254.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 423–426
doi: 10.15421/021765

Dynamics of biochemical and immunological blood markers in patients with pseudoarthrosis of the femoral neck after total hip arthroplasty

S. E. Bondarenko*, M. Akonjom*, V. A. Filipenko*, D. V. Morozenko*, A. Badnaoui*, K. V. Gliebova**

*Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
**National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 14.07.2017
Received in revised form 09.08.2017
Accepted 13.08.2017

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of National Ukrainian Academy of Medical Sciences, Pushkinskaya Str., 80, Kharkiv, 61024, Ukraine. Tel.: +38-067-574-01-51. Email: bondarenke@gmail.com

National University of Pharmacy, Pushkinska Str., 53, Kharkiv, 61002, Ukraine

Bondarenko, S. E., Akonjom, M., Filipenko, V. A., Morozenko, D. V., Badnaoui, A., & Gliebova, K. V. (2017). Dynamics of biochemical and immunological blood markers in patients with pseudoarthrosis of the femoral neck after total hip arthroplasty. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 423–426. doi: 10.15421/021765

The importance of biomarkers to predict recovery following total hip arthroplasty (THA) is still unclear to clinicians. To assess the preoperative biomarkers of patients with pseudoarthrosis of the femoral neck and their dynamics in the early postoperative period after THA, 50 patients aged 33 to 82 years old, 18 males and 32 females diagnosed with pseudoarthrosis of the femoral neck after failed internal fixation and failed conservative management were studied. The control group consisted of 30 healthy people aged 27 to 50 years, 13 males, 17 females. Patients' blood was examined for biochemical markers upon admission, and then on the 7th and 14th days after surgery. Their blood serum content of total protein, albumin, glycoproteins, sialic acids, chondroitin sulfates, haptoglobin, glucose, cholesterol, triglycerides, ALT, AST, alkaline phosphatase, GGT, acid phosphatase, thymol index; interleukins (IL-1, IL-4 and IL-6.) and C-reactive protein was measured. The content of glycoproteins in the blood exceeded the norm by 2.3 times, chondroitin sulfate by 4.7 times, sialic acids by 1.5 times, haptoglobin by 55.8%, fibrinogen by 19.1%, globulin by 19,6%, alkaline phosphatase activity by 72.3%, IL-1 by 94.7 and IL-6 by 3 times, C-reactive protein by 2.6 times. After THA there was a gradual decrease in blood biochemical and immunological markers. The most informative laboratory markers were glycoproteins, chondroitin sulfates, sialic acids, haptoglobin, activity of alkaline phosphatase, IL-1, IL-6 and IL-4, and C-reactive protein. Subsequent research is required to validate these dynamics.

Keywords: biomarkers; interleukins; glycoproteins; sialic acids; total hip replacement

Introduction

Pseudoarthrosis of the femoral neck is a common complication of femoral neck fracture following operative and conservative treatment (Dargan et al., 2012). Metabolic disorders in patients after THA may reveal themselves through changes in blood biochemical markers, including C-reactive protein, vitamins C, E and free radicals (Conway et al., 2015). Even the evaluation of the degree of invasiveness of surgery such as THA could be determined from the results of biochemical and immunological tests, especially creatine phosphokinase (CPK) and C-reactive protein (CRP); which are thought to be markers of muscle damage and post-operative inflammatory changes, respectively (Musil et al., 2008). It has been observed that in patients undergoing THA through a muscle sparing minimal invasive approach, activity of CPK and CRP was lower than in patients undergoing surgery following the standard procedure (Musil et al., 2008).

The use of laboratory diagnostic markers of hip pathology for the assessment of the condition of patients prior to THA; and to predict their recovery and functional outcome based on these markers still remains a prognostic challenge to clinicians (Yu et al., 2015; Wasko et al., 2015; Chen et al., 2016; Szypuła et al., 2016; Parvizi et al., 2016). So far, there is no clear list of hematological, immunological and biochemical tests for the initial assessment of health status of patients and monitoring the dynamics of their metabolic status following THA; much less the possibility of predicting their recovery. Some patients do well immediately post-op, and some take longer to fully recover. Whether the level of preoperative laboratory markers predicts the speed of postoperative recovery is yet to be ascertained. What could these markers and their levels possibly be?

Our study aims to assess the preoperative markers of patients with pseudoarthrosis of the femoral neck and their dynamics in the early postoperative period after THA. This may give clinicians a clue towards identifying prognostic information for recovery of patients.

Materials and methods

This study was conducted at the Department of Joint Pathology in conjunction with the department of Laboratory Diagnostics and Immunology of the Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. The period of the study covers 2011–2016. The study involved 50 patients aged 33 to 82 years old, 18 males and 32 females diagnosed with pseudoarthrosis of the femoral neck following failed internal fixation and failed conservative management requiring THA (Fig. 1, 2). The control group consisted of 30 healthy people aged 27 to 50 years, among them 13 males and 17 females.

Patients were excluded from this study if they did not have pseudoarthrosis due to prior hip fracture; were less than 20 years old, were known diabetics, known cancer patients, had known hepatic or renal dysfunction, and a history of hematological disorder or hypertension.

Fig. 1. Radiograph of a patient with pseudoarthrosis of the femoral neck following failed internal fixation: *a* – preoperative, *b* – postoperative radiograph after THA

The following markers were detected in the blood serum of patients: total protein by biuret test, albumin by reaction with bromocresol green, glycoproteins by the modified A. P. Stenberg and Y. N. Dotsenko method, sialic acids by the Hess method, chondroitin sulfate by the Nemeth-Csoka method modified by L. I. Slutsky, haptoglobin by reaction with rivanol, glucose by the enzymatic method. Total cholesterol content was determined by an enzymatic colorimetric method, triglyceride content was measured colorimetrically. The activity of the enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) was determined by kinetic methods. The activity of acid phosphatase by the Bodansky method, the thymol test was performed following the method of Popper and Huergo. The content of fibrinogen in the blood plasma of patients was determined using ready-made sets of reagents. Contents of interleukins (IL-1, IL-4, IL-6) and C-reactive protein in patients' blood serum was determined by solid-phase "sandwich" method – a variation of immunoenzyme analysis. Measurements were made at a wavelength λ = 450 nm for all cytokines. Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 software (Statsoft Inc., USA); by parametric Student criterion and non-parametric Wilcoxon criterion.

Fig. 2. Radiograph of a patient with pseudoarthrosis of the femoral neck following conservative management: *a* – preoperative, *b* – postoperative radiograph after THA

Results

In patients with pseudoarthrosis of the femoral neck, the glycolproteins content in the blood was increased by 2.3 times, chondroitin sulphates content by 4.7 times, sialic acids by 1.5 times compared with the control group (Table).

Table

Biochemical and immunological markers of the serum of patients with pseudoarthrosis of the femoral neck and compared with control group

Biochemical and immulogical markers	Control, n = 30	Patients, n = 50	Preceding the surgery	7 days following the surgery	14 days following the surgery
	M ± m, Me	M ± m		Me, %25–%75	
Glycoproteins, g/l	0.57 ± 0.01, 0.57	1.33 ± 0.03***	1.33, 1.14–1.44	1.04, 0.96–1.16	0.79◊, 0.73–0.90
Chondroitin sulfates, g/l	0.07 ± 0.01, 0.07	0.33 ± 0.01***	0.32, 0.28–0.35	0.25◊, 0.22–0.28	0.12◊, 0.11–0.14
Sialic acids, mmol/l	2.05 ± 0.05, 1.97	3.50 ± 0.08***	3.40, 3.10–4.04	2.75◊, 2.29–3.04	2.25◊, 1.80–2.69
Haptoglobin, g/l	0.77 ± 0.04, 0.80	1.20 ± 0.03***	1.19, 1.06–1.34	0.86◊, 0.80–0.94	0.74◊, 0.86–0.92
Glucose, mmol/l	4.93 ± 0.10, 4.85	4.70 ± 0.07	4.80, 4.30–5.10	4.74, 4.28–5.10	4.91, 4.53–5.32
Alkaline phosphatase, U/L	157.07 ± 8.05, 151.50	270.52 ± 5.11***	278.00, 251.50–290.00	228.53◊, 201.54–247.86	196.53◊, 173.32–213.16
Acid phosphatase, U/L	3.90 ± 0.16, 4.00	4.20 ± 0.06	4.10, 4.00–4.30	4.20, 3.90–4.50	4.22, 3.90–4.50
GGT, U/L	27.43 ± 1.81, 31.50	37.26 ± 1.84**	34.00, 27.25–44.75	31.96, 27.16–42.86	27.42, 20.70–38.24
Total cholesterol, mmol/l	4.59 ± 0.12, 4.65	4.73 ± 0.04	4.76, 4.43–5.00	4.70, 4.48–5.04	4.76, 4.53–5.03
Triglyceride, mmol/l	1.12 ± 0.05, 1.12	1.26 ± 0.03	1.23, 1.12–1.43	1.24, 1.11–1.43	1.27, 1.12–1.45
Thymol test, U.	3.10 ± 0.32, 2.75	4.69 ± 0.24*	5.00, 3.25–6.00	4.35, 2.83–5.22	2.61◊, 1.96–3.35
Fibrinogen, g/l	2.33 ± 0.10, 2.40	2.74 ± 0.08*	2.79, 2.20–3.28	2.43, 1.88–2.75	1.80◊, 1.59–2.06
Interleukin-1, pg/ml	6.63 ± 0.37, 6.65	12.91 ± 0.47***	12.17, 10.59–14.14	8.54◊, 7.49–9.99	7.42◊, 6.54–8.58
Interleukin-6, pg/ml	5.60 ± 0.42, 5.60	16.60 ± 0.48***	16.72, 14.04–19.33	14.82, 12.29–17.28	11.59◊, 9.15–13.33
Interleukin-4, pg/ml	7.48 ± 0.57, 8.05	13.85 ± 0.37***	13.45, 12.15–15.66	13.40, 11.90–15.19	9.52◊, 8.28–11.56
CRP, mg/l	4.78 ± 0.17, 4.90	12.50 ± 0.47***	12.00, 10.53–14.50	8.28◊, 7.26–10.01	5.80◊, 5.08–7.00

Notes: * – P < 0.05, ** – P < 0.01, *** – P < 0.001 compared with the control group; ◊ – significance by Wilcoxon compared with the index before surgery.

Haptoglobin content in the blood was increased by 55.8%, fibrinogen by 19.1%, globulins by 19.6% as compared with the control group. Alkaline phosphatase activity as a marker of bone metabolism and disturbances was increased by 72.3%, activity of acid phosphatase was not significantly changed (Table).

Activity of IL-1 and IL-6 increased by 3 times, and by 94.7%; and C-reactive protein increased by 2.6 times as indicators of acute inflammation alongside with increased IL-4 by 85.2% (Fig. 3). Also in this group of patients, there were increased liver enzyme activities probably due to uncontrolled intake of non-steroidal anti-inflammatory drugs as evidenced by increase in GGT activity by 36.1%, as well as the presence of moderate hypoalbuminemia in the blood (Table). We were careful to exclude any systemic illness that could increase serum levels of these biomarkers. After THA, there was a

decrease in the blood level of glycoproteins only on the 14th day. The decrease in content of chondroitin sulfate, sialic acids, haptoglobin, and alkaline phosphatase activity was gradual and was recorded on the 7th and 14th days of the post-operative period. Thymol test, fibrinogen, IL-6 and IL-4 decreased in the blood only on the 14th day, and IL-1 and C-reactive protein content was decreased gradually from the 7th to the 14th days before reaching the level of the control group (Table and Fig. 3).

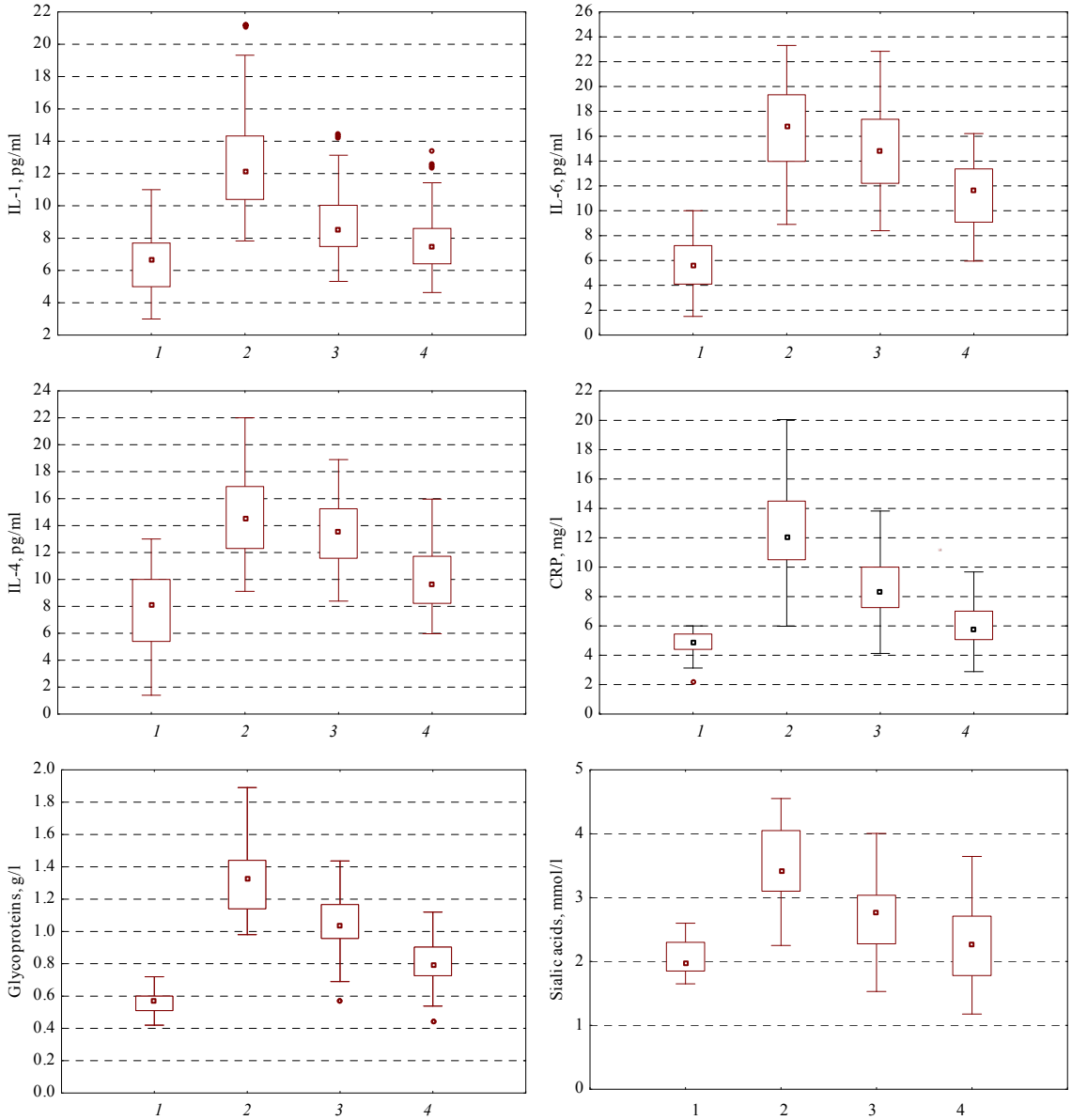


Fig. 3. The dynamics of biochemical and immunological markers in blood of patients with pseudoarthrosis of the femoral neck after total hip arthroplasty (Me): *1* – clinically healthy patients (controls), *2* – patients before surgery, *3* – 7 days post-operative, *4* – 14 days post-operative (Table)

Discussion

Biochemical markers of bone turnover consist of proteins, enzymes, or molecules which are released into the circulation during formation or resorption and are measured in serum or in urine (Mark et al., 2015). The markers reflect enzymatic activities in the bone cells as measured by alkaline phosphatase level. The evaluation of biochemical and immunological markers is necessary considering that their release and clearance may be affected by other systemic factors which may complicate healing and prognosis (Singh et al., 2015). Moreover, biomarkers enable the physician to design a personalized treatment scheme which is individually tailored to the patient's need. However, widespread use of biomarkers has been limited due to the reported discrepancies that are mainly due to unclear biological function, variability and insufficient evidence of their prognostic value (Rissanen, 2013). The changes reflected in our results indicate pronounced inflammatory changes and subsequent attempts at healing in the body of patients with pseudoarthrosis of femoral neck following failed operative and conservative treatment. Typically, at the bone nonunion site, regenerative and inflammatory processes take place, this in the case of instability can trigger alternative changes in bone tissue leading to subsequent destruction (Mark et al., 2015). In the fracture zone the migration of neutrophils and macrophages occurs with secretion of a variety of cytokines, which in turn determine proliferation, angiogenesis and phagocytosis in the lesion (Mark et al., 2015). These processes are accompanied by a number of systemic hormonal changes that might provoke bone remodeling and subsequent resorption, involving osteoclasts. However, it should be noted that these morphological and biochemical changes in the body decrease in the 2–3 weeks after fracture. This may explain the lack of significant increase of acid phosphatase activity in patients' serum (Reikeras et al., 2014). The subsequent attempt at healing and formation of granulation tissue in the long-standing hip fracture site is subjected to mechanical strain leading to a false joint and

instability, creating significant clinical disorders and impairment of function that require surgical treatment (Mark et al., 2015).

In patients undergoing THA due to pseudoarthrosis of the femoral neck, a decrease in inflammatory and biochemical markers according to the results of laboratory blood tests was observed (Drago et al., 2011; Reikeras et al., 2014). The study of biochemical and immunological markers of inflammation (interleukins, C-reactive protein), according to some authors, is essential for evaluating the degree of surgical trauma and identifying complications, mainly postoperative inflammation of periprosthetic tissue and periprosthetic infection (Drago et al., 2011; Reikeras et al., 2014). A common cause of revision THA is periprosthetic osteolysis (Eastwood et al., 2015). With the development of periprosthetic osteolysis in patients after failed THA, an increase in histochemical indicators of periprosthetic tissue responsible for the immune response to the implant implicates interleukins, mainly IL-1, IL-6 and IL-4 (Singh et al., 2015). It is also known that IL-6 is a marker for detecting persistent periprosthetic infection after primary as well as after revision THA (He et al., 2013; Hoell et al., 2015).

Another study showed that IL-6 is the most accurate laboratory marker for the diagnosis of periprosthetic infection compared with ESR, C-reactive protein and white blood cell count. IL-6 is an excellent screening test for the detection of patients with periprosthetic infection, with sensitivity of almost 100% (Abou-El-Khier et al., 2013; Elgeidi et al., 2014). There is evidence that interleukin-level control in the blood of patients is important to evaluate their health condition and predict their postoperative recovery.

The content of IL-1, IL-6 and IL-10 in the serum of patients after the first day of THA was significantly higher than before the surgery ($P < 0.001$), reached its peak levels on day 3 and subsequently decreased. However, the content of IL-2 in the serum of patients after surgery was significantly lower and gradually decreased to the level of standard (Mei et al., 2011). Furthermore, in obese patients with THA correlation between the level of IL-1 and IL-6 in the blood and body mass index was found. This signifies strengthening of the inflammatory response after surgery as a result of obesity complicating the surgery (Motaghedi et al., 2014).

Our study moved a step further to research not only the positive prognostic value of interleukins (IL-1, IL-4, IL-6) but also of other laboratory markers like glycoproteins, sialic acids, chondroitin sulfates, haptoglobin and fibrinogen, the dynamics of which show significant differences in the preoperative and postoperative periods ($p < 0.001$) (see Table I and Fig. 3–8). Reduction of these parameters on the 14th day after the operation, along with IL-1, IL-6 and IL-4, indicate a decrease in the activity of systemic inflammation in the bodies of patients. Analyzing the dynamics of these markers may prognosticate outcome and also predict the functional recovery of patients following THA. This is evidenced by the improvement of the clinical condition of patients after THA.

Conclusion

The most informative laboratory markers that could be suggested from our findings for assessing the condition of patients with pseudoarthrosis of the femoral neck before and after THA are C-reactive proteins; inflammatory cytokines IL-1, IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-4, glycoproteins, chondroitin sulfates, sialic acids, haptoglobin, activity alkaline phosphatase ($p < 0.005$). Gradual decrease in the biochemical markers on the 7th and 14th days after the operation indicates improvement in the condition of patients in the early postoperative period. Subsequent research is required to validate the dynamics of these markers in order to prognosticate outcome.

References

Abou-El-Khier, N. T., Ganainy, A.-R., Elgeidy, A., & Rakha, S. A. (2013). Assessment of interleukin-6 and other inflammatory markers in the diagnosis of Egyptian patients with periprosthetic joint infection. Egyptian Journal of Immunology, 20(2), 93–99.

Berbari, E., Mabry, T., Tsaras, G., Spangehl, M., Erwin, P. J., Murad, M. H., Steckelberg, J., & Osmon, D. (2010). Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: A systematic review and meta-analysis. Journal of Bone and Joint Surgery. 1,92(11), 2102–2109.

Chen, X. X., Wang, T., Li, J., & Kang, H. (2016). Relationship between inflammatory response and estimated complication rate after total hip arthroplasty. Chinese Medical Journal, 129(21), 2546–2551.

Conway, F. J., Talwar, D., & McMillan, D. C. (2015). The relationship between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma ascorbic acid, alpha-tocopherol and lipid peroxidation after elective hip arthroplasty. Clinical Nutrition, 34(4), 642–646.

Dargan, D., McCaffrey, D., & Kealey, W. D. C. (2012). Pseudoarthrosis of femoral neck stress fracture treated with open reduction, sliding hip screw and bone morphogenic protein. International Journal of Surgery Case Reports, 3(11), 529–532.

Drago, L., Vassena, C., Dozio, E., Corsi, M. M., De Vecchi, E., Mattina, R., & Romanò, C. (2011). Procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, and soluble intercellular adhesion molecule-1 as markers of postoperative orthopaedic joint prosthesis infections. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 24(2), 433–340.

Eastwood, S. E., John, A., Jones, S. A., Hodgson, H., Mason, D., Waddington, R., & Wei, X. (2015). Osteoclastogenesis-related cytokines and peri-prosthetic osteolysis in revision metal-on-metal total hip replacements. Hip International, 25(4), 355–360.

Elgeidi, A., Elganainy, A. E., Abou Elkhier, N., & Rakha, S. (2014). Interleukin-6 and other inflammatory markers in diagnosis of periprosthetic joint infection. International Orthopaedics, 38(12), 2591–2595.

Glehr, M., Friesenbichler, J., Hofmann, G., & Bernhardt, G. A. (2013). Novel biomarkers to detect infection in revision hip and knee arthroplasties. Clinical Orthopaedics and Related Research, 471(8), 2621–2628.

He, T., Wu, W., Huang, Y., Zhang, X., Tang, T., & Dai, K. (2013). Multiple biomarkers analysis for the early detection of prosthetic aseptic loosening of hip arthroplasty. International Orthopaedics, 37(6), 1025–1031.

Hoell, S., Borgers, L., Gosheger, G., Dieckmann, R., Schulz, D., Gerss, J., & Hardes, J. (2015). Interleukin-6 in two-stage revision arthroplasty: What is the threshold value to exclude persistent infection before re-implantation? Bone and Joint Journal, 97B(1), 71–75.

Mei, X. L., Guo, T., & Zhao, J. N. (2011). Clinical significance and expression of the inflammatory cytokines (IL-1, IL-2, IL-6 and IL-10) in blood serum of the patients after total hip replacement. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 24(6), 463–465.

Motaghedi, R., Bae, J. J., Memtsoudis, S. G., & Kim, D. H. (2014). Association of obesity with inflammation and pain after total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research, 472(5), 1442–1448.

Musil, D., Stehlík, J., & Verner, M. (2008) A comparison of operative invasiveness in minimally invasive anterolateral hip replacement (MIS-AL) and standard hip procedure, using biochemical markers. Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca, 75(1), 16–20.

Parvizi, J., Fassihi, S. C., & Enayatollahi, M. A. (2016). Diagnosis of periprosthetic joint infection following hip and knee arthroplasty. Orthopedic Clinics of North America, 47(3), 505–515.

Reikeras, O., Borgen, P., Reseland, J. E., & Lyngstadaas, S. P. (2014). Changes in serum cytokines in response to musculoskeletal surgical trauma. BMC Research Notes, 7, 7.

Rissanen, J. (2013) Markers of bone turnover in preclinical development of drugs for skeletal diseases. Department of Cell Biology and Anatomy, University of Turku Doctoral Programme, Finland, p. 13–14.

Singh, G., Nuechtern, J. V., Meyer, H., Fiedler, G. M., Awiszus, F., Junk-Jantsch, S., Bruegel, M., Pflueger, G., & Lohmann, C. H. (2015). Particle characterisation and cytokine expression in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties. Journal of Bone and Joint Surgery, 97B(7), 917–923.

Szypuła, J., Cabak, A., Kiljański, M., Boguszewski, D., & Tomaszewski, W. (2016). Comparison of biocompatibility of cemented vs. cementless hip joint endoprostheses based on postoperative evaluation of proinflammatory cytokine levels. Medical Science Monitor, 22, 4830–4835.

Wasko, M. K., Bobecka-Wesołowska, K., Tomasiuk, R., & Kowalczewski, J. (2015). Measurement of the inflammatory response in the early postoperative period after hip and knee arthroplasty. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 53(11), 1785–1792.

Yu, D., Yin, Z., Fu, C., & Yu, R. (2014). Impact on red blood cell immunity patterns in postoperative phase following total hip arthroplasty. Central-European Journal of Immunology, 39(3), 377–383.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 427–432
doi: 10.15421/021766

The influence of Metisevit on biochemical and morphological indicators of blood of piglets under nitrate loading

B. Gutyj, K. Leskiv, A. Shcherbatyy, V. Pritsak, V. Fedorovych, O. Fedorovych, V. Rusyn, I. Kolomiiets

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

Article info

Received 04.07.2017
Received in revised form 23.07.2017
Accepted 29.07.2017

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine. Tel.: +38-068-136-20-54. E-mail: bvh@ukr.net

Gutyj, B., Leskiv, K., Shcherbatyy, A., Pritsak, V., Fedorovych, V., Fedorovych, O., Rusyn, V., & Kolomiiets, I. (2017). The influence of Metisevit on biochemical and morphological indicators of blood of piglets under nitrate loading. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 427–432. doi: 10.15421/021766

The article presents the results of research on the influence of the developed complex preparation Metisevit on the dynamics of morphological and biochemical blood indicators of piglets under nitrate loading. The research established that sodium nitrate intoxication causes disbalance of the physiological level of hematological indicators of the tested animals' organisms. This was indicated by the manifestations of subclinical chronic nitrate-nitrite toxicosis: the increase in the level of nitrates, nitrites and methemoglobin in the blood. After prolonged feeding of the piglets with sodium nitrate at a dose of 0.3 g nitrate ion/kg, the concentration of nitrates and nitrites in the blood serum reached its maximum on the 60th day of the experiment. Also, the number of leukocytes and erythrocytes in the blood increased, and the activity of aspartate- and alanineaminotransferase in the blood serum increased. We rank the extent of liver intoxication with nitrates according to intensity of aminotransferase in the blood serum of the tested piglets. The normalization of morphological and biochemical blood indicators of piglets under nitrate-nitrite intoxication requires usage of a preparation which contains vitamins, zeolites and antioxidants. If the fodder contains high doses of nitrates, 1.0 mg/kg dose of Metisevit is added to the fodder for preventing subclinical nitrate-nitrite toxicosis. Metisevit contains the following agents: phenozan acid, methionine, zeolite, selenium, vitamins E and C. The research conducted proved the feasibility of using Metisevit for preventing chronic nitrate-nitrite toxicosis in piglets. This preparation caused a decrease in the concentration of nitrates, nitrites and in the level of methemoglobin in the blood of piglets. Usage of Metisevit on piglets showed normalization of the number of erythrocytes and hemoglobin in the blood on the 10th day, and normalization of ASAT and ALAT on 30th and 90th days. The mechanism of Metisevit activity is connected with the direct contribution of its elements to the inhibition of the processes of absorbing metabolites which cause a toxic effect on the cell membranes of an animal's organism. The absorbing activity of zeolite leads to decrease in concentration of agents which can be substrates for processes of peroxidation of lipids in the alimentary canal, and also to elimination of toxic pro-oxidant metabolites from the blood. This process occurs through osmosis and diffusion of these elements in the capillaries of microvilli of the small intestine and through their further fixation on sorbent granules.

Keywords: toxicology; sodium nitrate; vitamins; zeolite; phenozan acid; methionine

Introduction

Swine breeding is an important sphere of livestock farming in Ukraine; it produces the bulk of food products of animal origin. The main role in development and progressive functioning of this sphere is swine reproduction. The method of intensive pig rearing in the conditions of farms of different types using high-yielding breeds and industrial technology of maintenance is significantly different from the traditional methods of rearing. It should be noted that in such conditions, early weaning of piglets, transferring animals etc. are stress factors which contribute to the decrease in neonatal adaptation of the organism of piglets, which causes disbalance between the activity of the antioxidant system and lipid peroxidation, reducing the animals to a stressed condition. This is followed by stunting, increase of incidence of disease and mortality of pigs, reproductive dysfunctions and decrease in the quality of the meat products (Todoriuk et al., 2016; Todoriuk et al., 2017). Also, it should be noted that environmental pollution with nitrates and their undesirable impact on pigs' organisms makes the study of the mechanism of nitrates and their toxic effect especially relevant both on a theoretical and practical level. Questions connected with nitrate-nitrite toxicosis in animals and birds have been addressed in numerous scientific works by Ukrainian and foreign researchers (Douglas, 1970; Hegesh and Shiloah, 1982; Horner, 1982; Nordkvist et al., 1984; Saito et al., 1996; Medeiros et al., 2003; Aslani and Vojdani, 2007; Issi et al., 2008; Harvey et al., 2010; Gutyj et al., 2016; Katabami et al., 2016). Much of this research has explored the peculiarities of metabolism and physiological dysfunctions.

Medicines have been observed to be highly effective in cases of nitrate-nitrite intoxication and this can be only achieved using complex therapy. In particular, this is directed towards the alleviating the consequences of incorrect application of rearing and feeding technology and also towards increase in resistance of the organism. During the last few years, the practice of veterinary medicine has accumulated a significant amount of experience in using different vitamin preparations for treating animals suffering from nitrate intoxication. The aim of this research is to study the impact of Metisevit on biochemical and morphological indicators of the blood of piglets under nitrate loading.

Materials and methods

The studied objects were 10 three month old piglets of the Yorkshire breed. The research was conducted in "Komarnovs'ke" Scientific-teaching Animal Rearing Centre of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyi. According to the method of analogue-groups, two groups were formed: control and experimental. The piglets of the control group were fed with $NaNO_3$ at doses of 0.3 g of nitrate ion/kg of body weight once a day. The piglets of the experimental group were fed with $NaNO_3$ at doses of 0.3 g of ntrate ion/kg of body weight and Metisevit at doses of 1.0 mg/kg of body weight once a day. Metisevit consists of the following substances: phenozan acid, methionine, zeolite, selenium, vitamins E and C.

Maintenance, feeding, care and all manipulations of the animals were conducted according to European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986) and "General ethical principles of conducting experiments on animals" agreed at The First National Congress in Bioethics (Kyiv, 2001). The experiments were conducted in accordance with the principles of humanity set out in the directive of the European Community.

The number of erythrocytes and leukocytes was calculated using a hemocytometer in accordance with the recognized methods. The level of blood hemoglobin was calculated using the cyanhemoglobin method with photoelectric colorimeter-M according to V. Derviz's and A. Vorobiev's method. Concentration of methemoglobin was calculated according to the method of Boyarchuk and co-authors (Vlizlo, 2012). Using standard sets of reagents of the firm "Simko Ltd" (Czech Republic), we measured the activity of aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) in the blood serum according to the Reitman Frankel dinitrophenylhydrazine method.

The results were analyzed statistically using ANOVA. Differences between the samples were considered statistically significant at $P < 0.05$. In the figures x ± SD is presented.

Results

An important diagnostic indicator of the toxic effect of nitrates and nitrites on the organism of animals is measuring the concentration of nitrates, nitrites and methemoglobin in the blood (Robert et al., 1999; Gutyj et al., 2016). According to data from the literature, it is well known that nitrates are present at a low level in the blood of pigs and that nitrites are absent.

When feeding piglets with fodder containing nitrates at a dose of 0.3 g of nitrate ion/kg of body weight, we observed an increase in the concentration of nitrates and nitrites among the piglets throughout the experiment (Fig. 1, 2). By the 10th day of the experiment, the concentration of nitrates in the blood of piglets from the control group had increased to 0.150 ± 0.005 mg/l, and the concentration of nitrites had increased to 0.00713 ± 0.00032 mg/l. By the 30th day of the experiment, the concentration of nitrates and nitrites had increased respectively by 3.01 and 7.71 times compared to blood indicators on the 10th day of the experiment. On the 60th day of the experiment, the concentration of nitrates and nitrites in the blood of piglets from the control group reached its maximum, and was respectively: nitrates 0.664 ± 0.0073 mg/l, nitrites 0.0281 ± 0.00023 mg/l. On the 90th day of the experiment, we observed a decrease in the concentration of nitrates and nitrites in the blood of animals from the control group, where the animals received nitrate loading. This, perhaps, could be explained by the adaptation of the organism to prolonged feeding with sodium nitrate.

Feeding piglets with fodder containing sodium nitrate and Metisevit contributed to decrease in the concentration of nitrates and nitrites in their blood. On the 10th day of the experiment, we observed a decrease in the concentration of nitrates in the blood of animals from the experimental group by 34.7% compared to the animals from the control group. On the 30th day of the experiment, the concentration of nitrates in the blood of piglets from the experimental group was growing, but was lower by 52.5% compared to the animals from the control group. Therefore, using Metisevit contributed to a decrease in concentration of nitrates in the blood of piglets from the experimental group. Apart from decrease in concentration of nitrates in the blood of animals from the experimental group, a decrease in concentration of nitrites was observed, as shown in Figure 2.

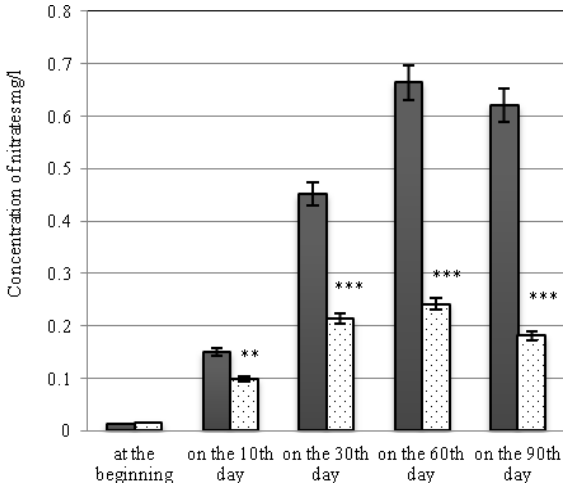


Fig. 1. The impact of Metisevit on the concentration of nitrates in the blood of piglets under nitrate loading: dark column – control group, bright column – experimental group (n = 5, x ± SD); * – P < 0.05, ** – P < 0.01, *** – P < 0.001

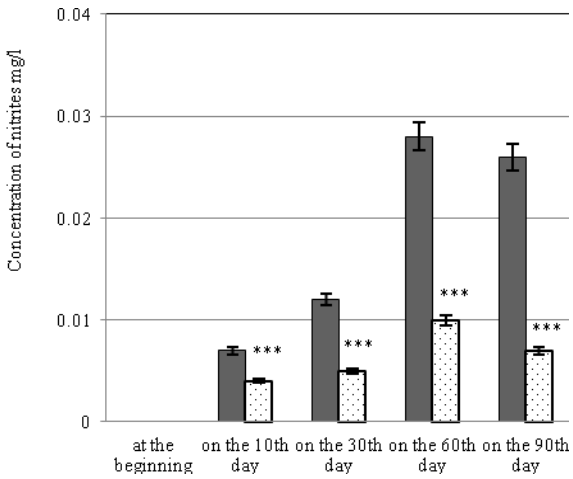


Fig. 2. The impact of Metisevit on the concentration of nitrites in the blood of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

On the 10th day of the experiment, the concentration of nitrites in the blood of animals from the experimental group was 0.00442 ± 0.00031 mg/l, whereas the concentration of nitrites in the blood of piglets from the control group was 0.00713 ± 0.00032 mg/l. By the 30th day of the experiment, the concentration of nitrites in the blood of animals had decreased by 49.8% in relation to the indicators of piglets from the control group. By the 60th day of experiment, the concentration of nitrites had insignificantly increased compared to the previous days of the experiment; nevertheless it was lower than the indicators of the animals from the control group. On the 90th day of the experiment, the concentration of nitrites in the blood of animals from the experimental group which were given Metisevit equaled the values from the 10th day of the experiment. As is known, one of the main indicators of nitrate-nitrite toxicosis is formation of methemoglobin. Our experiments showed that feeding piglets with sodium nitrate at a dose 0.3 g of nitrate ion/kg of body weight caused

an increase in the level of methemoglobin among piglets from the control group throughout the experiment (Fig 3). A possible increase in the content of methemoglobin in the blood of piglets from the control group was observed on the 30th, 60th and 90th days of the experiment, where its level increased in 2.43, 4.71 and 4.25 relative to the initial values. The high level of methemoglobin in the blood of piglets during the abovementioned periods is connected with increase of concentration of nitrates and nitrites during the same periods of the experiments.

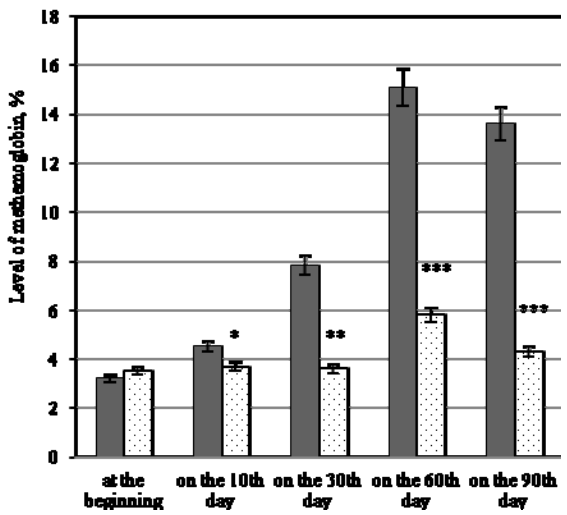


Fig. 3. The impact of Metisevit on the level of methemoglobin in the blood of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

Using Metisevit with sodium nitrate prevented the development of nitrate-nitrite toxicosis among piglets of the experimental group. On the 10th day of the experiment, the level of methemoglobin in the blood of animals which were fed with fodder containing Metisevit was lower by 17.8% compared to animals of the control group. On the 30th day of experiment, the level of methemoglobin in blood of piglets from the experimental group was 3.6 ± 0.039%,, whereas among the animals from the control group, this indicator equaled 7,8 ± 0.051%. On the 60th day of the experiment, we observed a high level of methemoglobin in the blood of animals from the experimental group, which is related to high content of nitrates and nitrites in the blood of piglets in this period of the experiment. In this period, the level of methemoglobin in the blood of animals from the experimental group was 2.60 times lower compared to indicators of methemoglobin in the blood of animals from the control group. On the 90th day of the experiment, the level of methemoglobin in the blood of piglets from the experimental group fluctuated within the values 4.3 ± 0.032%.

It is known that hemoglobin is an oxygen pigment of blood, which mainly acts as an agent which transports molecular oxygen from the breathing organs to the tissues. As is seen from the data in Figure 4, the level of hemoglobin in the blood of animals from the control group grew throughout the experiment. This is related to resistive and adaptive reactions of the organism to formation of methemoglobin. In particular, it fluctuated within the values of 98.4 ± 1.32 g/l. to 108.8 ± 1.17 g/l. The highest level of hemoglobin in blood was observed on the 60th day of the experiment among animals from the control group, where it increased by 10.6% even before feeding with nitrates. Using Metisevit caused stabilization of the level of hemoglobin in the blood of the tested piglets, which is shown by the results of experiment presented in Figure 4.

Erythrocytes are the most numerous clusters of blood cells. As is shown in Figure 5, feeding piglets of the control group with sodium nitrate at a dose of 0.3 g of nitrate-ion/kg of body weight caused increase in erythrocytes: on the 30th day of the experiment the level of erythrocytes was higher by 6.3% compared to initial values. The highest number of erythrocytes in the blood of piglets from the control group was observed on the 60th day of experiment – 7.18 ± 0.12 T/l. This is explained by resistive and adaptive reactions of the organism to a high level of methemoglobin, which is directed to the transportation of oxygen to the tissues as a result of development of hemic hypoxia. Feeding piglets with fodder which contains methyphenum contributed to normalization of the number of erythrocytes in the blood of animals from the experimental group.

The results of tests on piglets (Fig. 6) showed that feeding with sodium nitrate caused gradual increase in the number of leukocytes in the blood throughout the experiment: on the 10th day the level of leukocytes had increased by 7.9%, on the 30th day – by 10.9%, on the 60th day – by 14.9%, on the 90th day – by 9.9%.

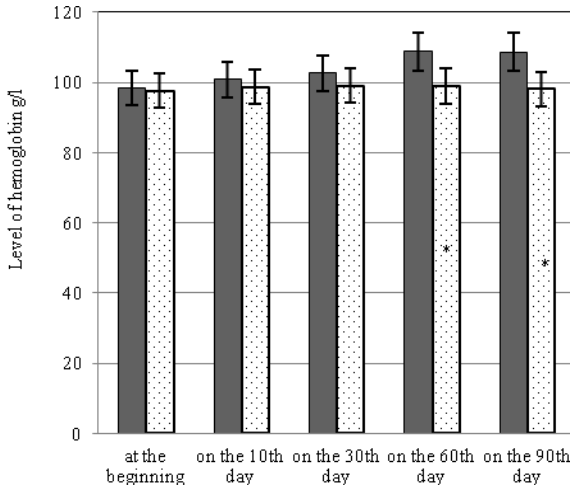


Fig. 4. The impact of Metisevit on the level of hemoglobin in the blood of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

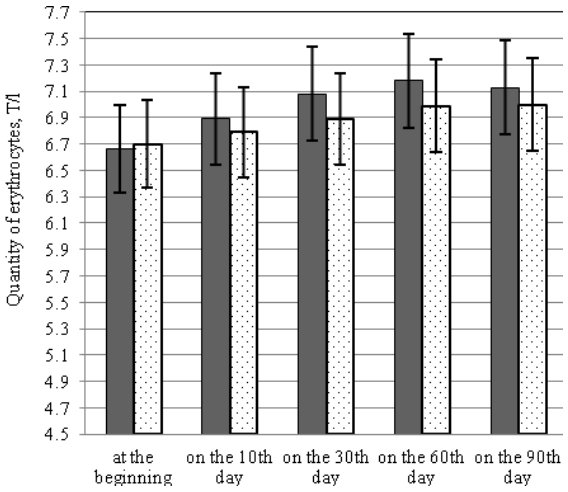


Fig. 5. The impact of Metisevit on the number of erythrocytes in the blood of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

Feeding piglets under nitrate loading with fodder which contains Metisevit caused a decrease in the number of leukocytes in the blood of the tested animals: on the 10th day the level of leukocytes had decreased by 3.7%. On the 30th day the number of leukocytes in the blood of the tested piglets was 10.7 ± 0.30 G/l.

The liver function of piglets under chronic nitrate-nitrite toxicosis was studied through measuring aminotransferase activity, in the blood serum, in particular by measuring the activity of aspartate- and alanine aminotransferase.

We observed that in piglets subject to chronic nitrate-nitrite toxicosis, aminotransferase activity increased in the blood serum of piglets from the control group. By the 10th day of the experiment, aspartate aminotransferase activity had increased by 5.3%, and by the

30th day – by 8.9% compared to initial values (Fig. 7). On the 60th day of the experiment, ASAT activity in the blood serum of animals from the control group, which were given sodium nitrate, was 0.426 ± 0.012 mmol/l·h, which is 18.3% higher than initial values. ASAT activity continued to increase: on the 90th day of experiment it equaled 0.429 ± 0.053 mmol/l·h.

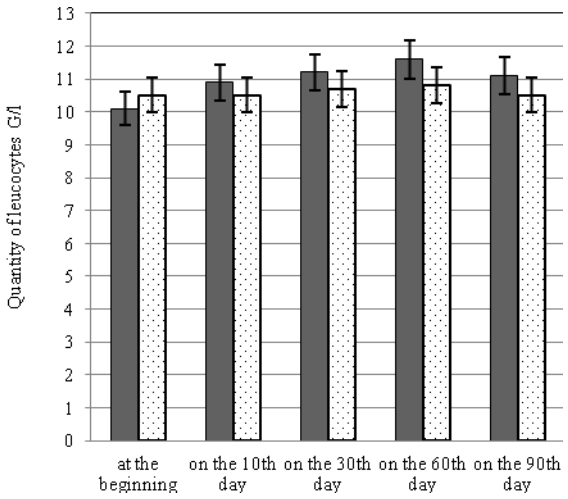


Fig. 6. The impact of Metisevit on the number of leukocytes in the blood of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

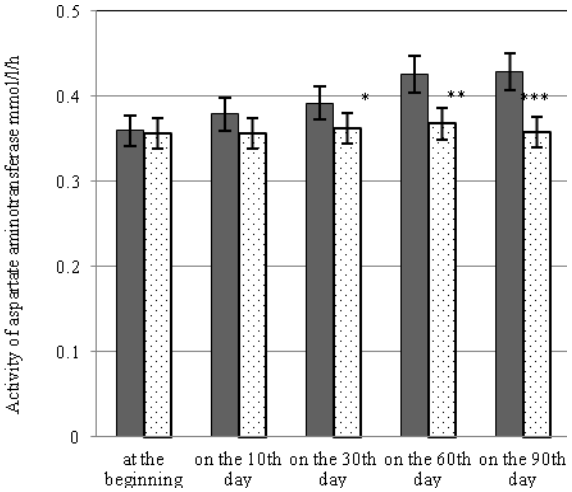


Fig. 7. The impact of Metisevit on aspartate aminotrasferase activity in the blood serum of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

Analysis of ASAT activity in the blood serum of piglets fed with Metisevit shows that on the 30th day of the experiment, activity of the enzyme was lower by 7.7% and on the 60th day of experiment – lower by 13.6% compared to the animals of the control group.

Figure 8 shows the changes in activity of alanine aminotrasferace in blood serum of piglets under the nitrate load and Metisevit. The ALT activity of piglets which at the time were not under nitrate loading fluctuated within the range of 0.215–0.222 mmol/l·h. After provision of fodder with sodium nitrate by doses of 0.3 g of nitrate ion/kg of body weight, ALT activity in the blood serum of piglets from control group on the 10th day of experiment increased by 29.9%, and on 30th day increased by 45.5%, on 60th day – by 51.8%, on the 90th day – by 53.2% in relation to initial values.

Analysis of data on ALT indicators of animals from the experimental and control groups found a significant decrease in activity of the ALT enzyme among the animals from the control group throughout the experiment. On the 10th day, the activity of ALT in the blood serum of animals from the experimental group fluctuated within the range of 0.223 ± 0.011 mmol/l·h, whereas among the animals of the control group it was 0.286 ± 0.013 mmol/l·h. On the 30th day of the experiment, we observed a decrease by 27.8% in the activity of the enzyme in the blood serum of animals from the experimental group in relation to initial values. On the 60th day of the experiment, the activity of ALT in the blood serum of piglets from the experimental group showed a slight increase compared to the previous period of research, though it was 28.7% lower than the values of piglets from the control group. On the 90th day of experiment, the activity of ALT in the blood of piglets from the experimental group reached physiological values.

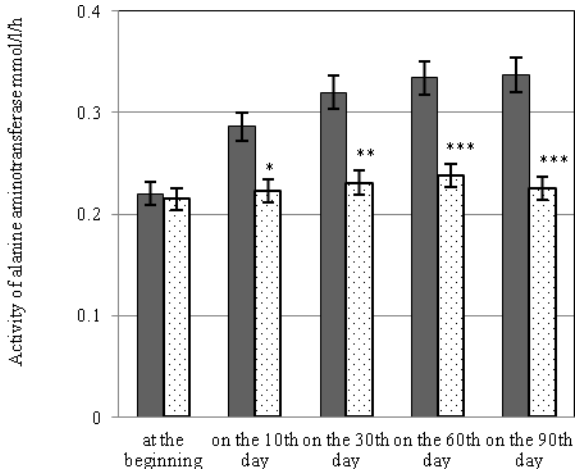


Fig. 8. The impact of alanine aminotransferase activity in the blood serum of piglets under nitrate loading: see Fig. 1

Therefore, increase in activity of aminotransferase – alanine- and aspartateaminotransferase in the blood serum of piglets from the experimental group is possibly conditioned by the fact that nitrites cause damage to cell membranes, and as a result these enzymes along with hepatocytes penetrate the blood. And the more significant the structural damage to biological membranes, the higher the activity of aminotransferas activity. Nevertheless, using the preparation Metisevit (which includes methionine, fenaron and methyphenum) on piglets from the experimental group under nitrate loading caused a heaptoprotective effect, which is manifested by a decrease in aminotransferase activity in the blood.

Discussion

Production and usage of mineral fertilizers is continuing to increase globally. It is generally accepted that their usage improves agricultural productivity 3–4 times. In such conditions, the key factor of forming crop production is nitrogen, and its main source is nitrates. A number of scholars consider that nitrates are toxic to plants, while their further transformation in the organism of humans or animals can have negative effects (Gutyj et al., 2016). It is scientifically proven that an energy deficient diet, a rapid change of fodder, and incorrect preparation of fodder cause development of substances which are products of incomplete breakdown of nitrates, namely nitrites, which are highly toxic.

Nitrate intoxication of animals causes death of productive young of agricultural animals (Nordkvist et al., 1984; Issi et al., 2008; Gutyj et al., 2016), especially pigs, after weaning, and causes significant economic damage. Therefore, in-depth study of pathogenesis of nitrate-nitrite toxicosis of pigs and methods of its treatment are of great value.

Recent research has shown that nitrate-nitrite toxicosis of agricultural animals is followed by disorders of many systems of the organism, and therefore studying blood is a matter of high priority for any negative effect of foreign agents causes disorder in the morphological content of blood (Gutyj et al., 2016; Khariv et al., 2016; Martyshuk et al., 2016; Gutyj et al., 2017).

Through our experiments, we demonstrated that nitrates and nitrites have a negative impact on the functional condition of the organism and biochemical indicators of piglets' blood. Over a period of feeding piglets with fodder with sodium nitrate at a dose of 0.3 g of nitrate ion/kg, the concentration of nitrates and nitrites in the blood serum increased, and was the highest on the 60th day of the experiment. The high level of nitrates and nitrites in the blood serum of piglets is related to the prolonged provision of nitrates in the fodder. According to data from the literature, this is directly proportional to the intake of nitrates into the organism, i.e. the greater the dose of sodium nitrate fed to animals, the higher the content of nitrates and nitrites in the blood serum (Douglas, 1970; Saito et al., 1996; Gutyj et al., 2016).

The nonuniform increase in the level of nitrates and nitrites in the blood serum of piglets during the experiment could be explained by the gradual adaptation of the organism to excessive amount of nitrates in the fodder and activation of compensatory mechanisms of neutralizing nitrates in the organism of these animals.

The increase in the level of nitrates in the blood of piglets from the experimental group led to formation of methemoglobin, the content of which increased throughout the experiment. It is known that its level in the blood of animals is one of the main diagnostic criteria of nitrate-nitrite toxicosis (Horner, 1982; Robert et al., 1999). The normal content of methemoglobin in the blood of agricultural animals is 2–5% of total content of hemoglobin, because methemoglobin is always formed during the methabolic processes (Saito et al., 1996; Gutyj et al., 2016).

In the case of experimental chronic nitrate-nitrite toxicosis in pigs, in our experiments we observed that the level of methemoglobin in the blood of piglets from the control group on the 30th day of the experiment was 7.8%, on the 60th day – 15.1% and on the 90th day – 13.3%. Such a level of methemoglobin in the blood of piglets indicates the development of intoxication. Prolonged feeding of piglets with sodium nitrate at a dose of 0.3 g nitrate ion/kg of body mass causes development of subclinical chronic nitrate-nitrite toxicosis, which is characterized by a high level of nitrates, nitrites and methemoglobin (Douglas, 1970; Gutyj et al., 2016).

Therefore, the results of our experiments concur with the conclusions of other authors on the leading role of methemoglobin in the pathogenesis of nirate-nitrite toxicosis in farm animals (Douglas, 1970; Horner, 1982; Saito et al., 1996). The extent of methemoglobin manifestations depends upon the dose of nitrates, species and age of the animal. In young animals the functioning of methemoglobin reductase is insufficient and so when its activity is low the level of methemoglobin in the blood is higher than among mature animals.

The increase in the level of methemoglobin in the blood of piglets under the nitrate intoxication is manifested also in the level of hemoglobin. On the basis of experimental studies, we have found that there is a gradual rise in the level of hemoglobin, which was highest on the 60th day of the experiment. The increase in this indicator resulted from resistive and adaptive reactions of the organism of piglets exposed to prolonged intake of nitrates and the formation of methemoglobin.

According to the literature, a high level of methemoglobin in the blood causes development of so-called tissue hypoxia (Gutyj et al., 2016; Khariv et al., 2016; Martyshuk et al., 2016), which in its turn provokes morphological and biochemical changes in the blood of piglets and causes significant metabolic changes.

Our experiments proved that if piglets' fodder contains nitrates at a dose of 0.3 g of nitrate ion/kg of body weight, this primarily damages the morphological compound of the blood – one of the most reactive tissues of the organism. Its cells are highly organized and constantly operating complexes. Also they form the morphological basis of homeostasis. Morphological analysis of the quantitative and qualitative compound of blood provides objective data on the functional condition of the hematopoietic system of piglets (Robert et al., 1999; Hariv and Gutyj, 2016).

The aim of our research was to study the changes of certain indicators of the peripheral blood of piglets under chronic nitrate toxicosis. We found that by the 30th, 60th and 90th days of the experiment, nitrates had caused an increase in the level of erythrocytes, by 6.3%, 8.3% and 7.1% respectively. Such changes in the morphological compound of the blood occurred as a result of the irritating impact of nitrates on the mononuclear system with further release of erythrocytes from the blood pool into the blood channel (Gutyj et al., 2016).

We consider that the increase in the level of hemoglobin in the blood of piglets resulted from an increase in the total number of erythrocytes. Thus, in this case an increase in the total volume of blood occurred, which in its turn caused an increase in the level of hemoglobin. Leukocytes in animals' organisms perform protective, transport and trophic functions (Khariv et al., 2016). During feeding of piglets with fodder which contains sodium nitrate at a subtoxic dose, the amount of leukocytes in the blood increased throughout the experiment. Leukocytosis is certainly conditioned by development of inflammatory processes in the gastrointestinal tract impacted by the toxic effect of nitrates and nitrites, which leads to an increase in the number of erythrocytes in the blood of piglets. Similar changes in the increase in the number of leukocytes of animals of different species under chronic nitrate-nitrite toxicosis have been noted in studies by other authors.

Due to the fact that nitrites have a negative effect on the liver, the functioning condition of the liver should be studied in relation to aspartate- and alanine- aminotransferase activity. According to data from the literature, high activity of aminotransferases in the blood serum of agricultural animals, in most cases, is connected with liver failure (Hariv and Gutyj, 2016). Our research found that development of chronic nitrate-nitrite toxicosis of piglets is followed by increase in activity of aspartate- and alanine- aminotransferase in the blood serum. On the 60th and 90th days of the experiment, we observed the maximum activity of aminotransferases in the blood serum of piglets from the experimental group. Also, it should be mentioned that the increase in alanine aminotransferase was greater than that of aspartate aminotransferase. This is related to the fact that ALAT under even insignificant damage to hepatocyte membranes easily becomes released in the blood, whereas AST is contained in the mitochondria of hepatocytes, therefore the release of this enzyme into the blood is more complicated, for apart from the outer membrane of the cell, it should also penetrate through the mitochondria membrane; which can occur in the case of activity of nitrates at high doses (Gutyj et al., 2016).

Thus, chronic nitrate-nitrite toxicosis damages the biological membranes of cells, which results in release of intercellular aminotrasferases from hepatocytes and the cardiac muscle into the blood. The deeper the structural damage to biological membranes of cells, the higher the level of aminotransferase in the blood (Hariv and Gutyj, 2016).

The results of our studies on change in activity of alanine- and aspartateaminotrasferase in the blood serum of piglets under nitrate-nitrite toxicosis concur with results of studies by other authors on cattle and birds (Douglas, 1970; Medeiros et al., 2003; Gutyj et al., 2016).

The results we provide indicate the usefulness of Metisevit in preventing chronic nitrate-nitrite toxicosis in pigs. The preparation is capable of decreasing concentration of nitrates and nitrites in the blood of piglets, and this, in its turn, leads to decrease in the level of methemoglobin in the blood, where it had decreased to 5.8% on the 60th day of the experiment. When using Metisevit on piglets under chronic nitrate-nitrite toxicosis, we observed normalization in the number of erythrocytes and hemoglobin in the blood on the 10th day of the experiment. This, perhaps, is a result of recovery of hematopoietic function thanks to the preparation.

The decrease in the number of leukocytes in the blood of piglets from the experimental group is explained by the fact that Metisevit decreases the formation of toxic substances, which contribute to development of inflammatory processes in the intestines and therefore normalizes the number of leukocytes in the blood of animals. For this reason, Metisevit includes zeolite. The adsorbing activity of zeolite causes a decrease in the concentration of agents which can be substrates for development of inflammatory processes in the intestines.

Many researchers mention that the activity of enzymes in blood serum often changes earlier than other biochemical tests, therefore research on the activity of aminotransferases in the blood of piglets is

highly significant for studying the therapeutic efficiency of preparations in conditions of nitrate-nitrite toxicosis (Khariv et al., 2016; Gutyj et al., 2017). Usage of Metisevit in the conditions of nitrate loading decreased the activity of ASAT and ALT in the blood of piglets from the experimental group, and on the 30th and 90th days of the experiment it fluctuated within the norm of physiological indicators. Changes in activity of aminotransferases in the blood of piglets are explained by the preparation's hepatoprotective action.

Conclusions

Feeding piglets with fodder containing sodium nitrate at a dose of 0.3 g nitrate ion/kg of body weight increased the concentration of nitrates and nitrites, the level of methemoglobin and hemoglobin, the number of erythrocytes and leukocytes in the blood and activity of aminotransferases in the blood serum. Using methyphenum on piglets under nitrate loading contributed to normalization of morphological and biochemical indicators of the blood of the tested piglets. For preventing chronic nitrate-nitrite toxicosis in pigs, we recommend using Metisevit at a dose of 1 mg/kg of body weight.

References

Aslani, M. R., & Vojdani, M. (2007). Nitrate intoxication due to ingestion of pig weed red-root (*Amaranthus retroflexus*) in cattle. Iranian Journal of Veterinary Research, 8, 377–380.

Gutyj, B. V., Hufriy, D. F., Hunchak, V. M., Khariv, I. I., Levkivska, N. D., & Huberuk, V. O. (2016). The influence of metisevit and metifen on the intensity of lipid per oxidation in the blood of bulls on nitrate load. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18, 3(70), 67–70.

Gutyj, B. V., Murs'ka, S. D., Gufrij, D. F., Hariv, I. I., Levkivs'ka, N. D., Nazaruk, N. V., Gajdjuk, M. B., Pryjma, O. B., Bilyk, O. J., & Guta, Z. A. (2016). Vplyv kadmiievoho navantazhennia na systemu antyoksydantnoho zakhystu orhanizmu buhaitsiv [Influence of cadmium loading on the state of the antioxidant system in the organism of bulls]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 96–102.

Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxity of the experimental drug Amprolinsyl. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 41–45.

Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. (2017). Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 304–309.

Hariv, M. I., & Gutyj, B. V. (2016). Vplyv liposomalnoho preparatu Butaintervit na proteinsyntezuvalnu funktsiiu pechinky shchuriv za otruiennia tetrakhlor-metanom [Influence of the liposomal preparation Butaintervite on protein synthesis function in the livers of rats under the influence of carbon tetrachloride poisoning]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 7(2), 123–126 (in Ukrainian).

Harvey, M., Cave, G., & Chanwai, G. (2010). Fatal methaemoglobinaemia induced by self-poisoning with sodium nitrite. Emergency Medicine Australasia, 22(5), 463–465.

Hegesh, E., & Shiloah, J. (1982). Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. Clinica Chimica Acta, 125(2), 107–115.

Horner, R. F. (1982). Suspected ammonium nitrate fertilizer poisoning in cattle. Veterinary Record, 110, 472–474.

Issi, M., Gul, Y., Atessahin, A., & Karahan, I. (2008). Acute nitrate poisoning in two cattle. Toxicology and Environmental Chemistry, 90, 135–140.

Katabami, K., Hayakawa, M., & Gando, S. (2016). Severe Methemoglobinemia due to sodium nitrite poisoning. Case Reports in Emergency Medicine, 3.

Khariv, M., Gutyj, B., Butsyak, V., & Khariv, I. (2016). Hematolohichni pokaznyky orhanizmu shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomal'noho preparatu [Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(1), 276–289 (in Ukrainian).

Lee, D. H. K. (1970). Nitrates, nitrites, and methemoglobinemia. Environmental Research, 3(5–6), 484–511.

Martyshuk, T. V., Gutyj, B. V., & Vishchur, O. I. (2016). Riven produktiv perekysnoho okysnennia lipidiv u krovi shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomalnoho preparatu "Butaselmevit" [Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of "Butaselmevit"]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 22–27 (in Ukrainian).

Medeiros, R. M. T., Riet-Correa, F., Tabosa, I. M., Silva, Z. A., Barbosa, R. C., Marques, A. V. M. S., & Nogueira, F. R. B. (2003). Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba Nitrate and nitrite poisoning in cattle caused by the ingestion of Echinochloa polystachya and *Pennisetum purpureum* in the semiarid region of the state of Paraíba. Pesquisa Veterinária Brasileira, 23(1), 17–20.

Nordkvist, M., Rehbinder, C., Mukherjee, S. C., & Erne, K. (1984). Pathology of acute and subchronic nitrate poisoning in reindeer (*Rangifer tarandus* L). Rangifer, 4(1), 9–15.

Robert, O. W., William, J. L., & Alan, D. W. (1999). Methemoglobinemia: Etiology, pharmacology, and clinical management. Annals of Emergency Medicine, 34, 646–656.

Saito, T., Takeichi, S., Yukawa, N., & Osawa, M. (1996). Fatal methemoglobinemia caused by liniment solutions containing sodium nitrite. Journal of Forensic Sciences, 41(1), 169–171.

Todoriuk, V. B., Hunchak, V. M., Hufrii, D. F., Hutyi, B. V., Khariv, I. I., Khomyk, R. I., Vasiv, R. O., Slobodiuk, N. M., Vyniarska, A. V., Zhuravlov, O. I., Husar, P. T., Nazaruk, N. V., Nazaruk, N. I., & Soltys, M. P. (2017). Doslidzhennia hostroi ta khronichnoi toksychnosti eksperymentalnoho preparatu "Ferosel T" [Research on the acute and chronic toxicity of the experimental medicine "Ferosel T"]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 73, 104–111 (in Ukrainian).

Todoriuk, V. B., Hutyi, B. V., Khomyk, R. I., & Vasiv, R. O. (2016). Vplyv ferrovetu 7,5% i feroselu T na kontsentratsiiu mineralnykh rechovyn v syrovattsi krovi porosiat, khvorykh na ferumdefitsytnu anemiiu [Influence of Ferrovet 7.55 and Ferosel T on concentrations of mineral substances in the blood serum of piglets with ferrum defecit anemia]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18, 3(71), 139–143 (in Ukrainian).

Vlizlo, V. V. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnytstvi ta veterynarniy medytsyni [Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary medicine]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 433–437
doi: 10.15421/021767

Dietary energy source affecting fat deposition mechanism, muscle fiber metabolic and overall meat quality

M. Al-Hijazeen, G. Al-Rabadi

Mu'tah University, Karak, Jordan

Article info

Received 28.06.2017
Received in revised form 20.07.2017
Accepted 23.07.2017

Mu'tah University, Karak, Mu'tah, 61710, Jordan, P.O. Box(7). Tel.: 00962-772-665-287. E-mail: ghaid78@yahoo.com, alhijazeenmarwan@gmail.com

Al-Hijazeen, M., & Al-Rabadi, G. (2017). Dietary energy source affecting fat deposition mechanism, muscle fiber metabolic and overall meat quality. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 433–437. doi: 10.15421/021767

A study was conducted to investigate the effect of two dietary energy sources, soy bean oil, and sucrose on regulatory mechanisms of meat preservation. Twenty one day-old Hubbard commercial broilers were randomly allocated into two dietary treatment groups with six replicates per treatment, and four broilers per replicate. All birds were coded for the influence of energy source: fat based diet (FD), and sugar based diet (SD). Formulated grower diets were isonitrogenous and isocaloric. The chickens were slaughtered and then boneless, skinless ground chicken tight meat was prepared. Both raw and cooked meats were analyzed for lipid and protein oxidation, and sensory panel evaluation. In addition, meat from the small muscles of the raw thigh was used to evaluate other meat quality characteristics. Proximate analyses showed no significant differences between both dietary treatments on protein, ash and moisture percentage values. Meat samples of the group that was fed FD showed higher significant values of both TBARS and total carbonyl at day 7 of storage time. However, samples of the second group (Fed SD) showed lower values of both ultimate pH and water separation % using raw thigh meat. The effect of FD treatment on the meat composition appeared clearly especially on fat percentage content. In addition, meat samples obtained from chickens fed SD showed better significant values of the overall acceptability attribute. According to the current findings, sucrose could be an excellent alternative to oil in dietary broilers which improved the meat preservation bio-system, and post-mortem storage stability.

Keywords: poultry; sucrose; thigh meat; lipid oxidation; protein oxidation

Introduction

Oil is considered the richest energy source among other nutrients (oil contains 2.25 times the energy content of carbohydrate and protein) and thus is used to increase caloric density of diets fed to broilers (Waheed et al., 2004). In addition, oil has been reported to increase the absorption of fat soluble vitamins, increase palatability of the feed and thus feed intake, reduce the passage rate of digesta, which allows higher nutrient absorption (Baiao and Lara, 2005). However, potential hazard is associated in feeding high fat diets if handled incorrectly, one such problem being oil rancidity (Shermer, 1990), this leads to reduction in caloric density of broiler diets. In addition, it may produce off flavours which can reduce broiler feed intake, depress growth, and eliminate the body reservoir of antioxidants (Shermer, 1990; Baiao and Lara, 2005; Tavarez et al., 2011). The harmful influence of oil rancidity brings direct economic losses to broiler farmers and can negatively affect carcass quality (Alao and Balnave, 1984; Zelenka et al., 1997; Crespo and Esteve Garcia, 2002). Therefore, the source of dietary lipid may affect total body fat deposition, fatty acid composition, and overall meat quality (Ellis and Mckeith, 1999; Baiao and Lara, 2005; Fuad and El-Senousey 2014). In addition, it can influence consumer perception, health, and indirectly their food safety (Savell and Cross, 1988). Fatty acid profile and freshness of meat carcass are highly affected and correlated with the fat deposition mechanism. However, the type and degree of polyunsaturated fatty acid is also as important as the total amount of fat deposition in meat, which makes thigh meat more susceptible to lipid per-oxidation compared to other carcass muscles (Min et al., 2008). In addition, cooked meat is more affected by free radicals and oxidized faster than raw meat (Gray et al., 1992; Lee et al., 2003). Thus, initial carcass lipid and protein oxidation level can influence storage stability of chicken meat, especially after thermal processing. Other meat quality characteristics, such as colour, texture, and water holding capacity can also be influenced by the oxidation mechanism and their free radicals formation (Jensen et al., 1997; Du et al., 2000). A sugar (sucrose) has been reported as a better energy source than starch and could be replaced, partially, by fat in poultry diet (Hashim et al., 2013; Hussein et al., 2016). Sucrose is a disaccharide that can be easily digested by poultry (Wang, 2014) and has been reported to have a higher AMEn than glucose (3750 vs. 3330 kcal/kg) (Leeson and Summers, 2001). In avian species, glucose has been reported to have a sparing effect on amino acid oxidation (Yadalam, 2005). Furthermore, excess of glucose is stored as glycogen or directed for de novo lipogensis in the liver (Hermier, 1997). In addition, glucose has a higher heat increment compared to lipid. Thus, feeding sucrose may reduce energy delivery to broilers compared to lipid. Reducing energy level in broilers have been reported to decrease total body fat deposition by mechanisms related to decrease in the activity of enzymes linked to hepatic lipogenisis (Tanaka et al., 1983; Fuad and El-Senousey, 2014). Furthermore, change in the dietary energy source will affect the metabolic of muscle fiber type (type I and II), lactic acid accumulation, and postmortem muscle pH (Aalhus et al., 2009). Lipid in broilers accumulates mainly in the form of polyunsaturated fatty acids (PUFA), which make it more susceptible to oxidative deterioration during storage (Ahn et al., 2002; Min et al., 2008). In modern broiler strains, Choct et al. (2013) reported that broilers contain up to

20% fat and more than 85% of this fat has no physiological function and thus, reducing fat component in broilers may enhance carcass stability and quality after slaughtering. The aim of current study was to investigate the effect of replacing soy bean oil in broiler grower diet with sucrose on regulatory mechanisms of meat preservation.

Materials and methods

1. Birds and diet formulation. Forty eight broilers were raised for 21 days (from 21 to 42 days old) according to general commercial husbandry practices. This experiment was reviewed and approved by the Department of Animal Production, and all chickens were checked and their health and welfare cleared by veterinarians. Two groups of 48 broilers were randomly assigned into two dietary treatments (each treatment contains 6 replicates and 4 broilers per replicate). During the experimental period, all birds were raised in floor cages and were offered one of two dietary treatments and water ad lib by using trough feeders and drinkers. The two dietary treatments were formulated to be iso-calroic and iso-nitrogenous. Dietary treatments were coded for the influence of energy source: Fat based diet (FD) and Sugar based diet (SD). The ingredients and chemical composition of experimental diets are shown in Table 1.

Table 1
Ingredients (%) and chemical composition (%)
of fat based diet (FD) and Sucrose based diet (SD)

Ingredients (%)	FD	SD
Corn	50.04	63.62
Soya bean meal	27.93	16.55
[a]Broncon concentrate	10.50	11.49
NaCl	0.19	0.19
Limestone	1.75	0.89
[b]Vit. and mineral premix	0.10	0.10
L-Lysine.HCL (78%)	0.10	3.36
DL-Methioine	0.23	0.40
Degamed soybean oil	5.27	0.00
Monocalcium phosphate	0.41	0.01
Sucrose	0.00	3.30
[c]Antifungi	0.10	0.10
Wheat bran	3.39	0.00
[d]Chemical composition (%)		
ME, Kcal/kg	3050	3050
Crude protein	21.00	21.00
Crude fibre	3.93	3.10
Ca	1.30	0.90
Non phytate phosphorus	0.46	0.35
Methioine	0.67	0.80
Lysine	1.25	4.25
Cyctein	0.22	0.20
Na	0.22	0.23
Cl	0.15	0.15

Note: [a] – Brocon Concentrate® (Wafa, B. V., Alblasserdam, Holland); [b] – vitamin premix provided per kilogram of premix: Vitamin A, 700,000 IU; vitamin D_3, 150,000 IU; vitamin E, 75 mg; vitamin B_1, 100 mg; vitamin K, 175 mg; vitamin B_5, 600 mg; manganese oxide, 4000 mg; ferrous sulphate, 9000 mg; zinc oxide, 6000 mg; magnesum oxide, 2500 mg; potassium iodide, 70 mg; sodium selenite, 125 mg; copper sulphate, 100 mg; cobalt sulphate, 50 mg; dicalcium phosphate, 7000 mg; sodium chloride, 10000 mg; [c] – mold inhibitor for animal feed (Kemin Industries, U.S.A); [d] – calculated based on analyzed values of feed ingredients (feed composition tables) from poultry NRC (1994).

2. Sample preparation. On day 42, the broilers were slaughtered (Mu'tah University, Agriculture Collage: Department of Animal Production-farm facilities) using standard guidelines of poultry slaughterring in Jordan (Ministry of Agriculture) and under the supervision of veterinarians. The chicken carcasses were chilled in ice water for 2h and drained in a laboratory cold room, and the muscles (thigh meat) were separated from the carcasses at 24h after slaughtering. Boneless thigh muscles were cleaned, skins removed, external fats trimmed off, vacuum packaged in oxygen impermeable bags, and stored at –18 °C in a freezer until used for further analysis. Thigh meat was selected for this study analysis because of its high fat content and myoglobin pigment, and its mixture of muscle fiber (different metabolic) type. Separated raw meat samples were stored for 7 days at 4 °C and were used to evaluate meat quality characteristics. Different parameters were measured to evaluate the effect of dietary energy source on muscle fiber metabolic, fat deposition mechanisms indirectly; and on meat preservation. For stability analysis (lipid and protein oxidation) frozen meats were thawed in a walk-in cooler (4 °C), ground twice through 8 and a 3 mm plates (Moulinex, Type DKA1, France), respectively, before use. Meats of each treatment replicate (n = 6) were ground and homogenated as a single batch, and subdivided into 50 g of ground meat patties. The prepared raw meat patties were packaged in oxygen permeable bags (Size: 11 x 25 cm, Future for Plastic Industry, Al-Moumtaz bags, Co. LTD, Jordan) in a cold room at 4 °C for up to 7 days for quality analysis. In the study related cooked-patties, the raw meat was placed in oxygen impermeable vacuum plastic-bags (Ehsan & Tahssin Baalbaki Co, Bayader Wadi Al-Seer, Amman, Jordan), then cooked in-bag in a 90 °C water bath (Memmert, WNB 14; GMbH + Co. KH, D-91107 Schwabach, Germany). Samples were moved out when the internal temperature of the meat patties was 75 °C. After cooling, the cooked meat patties (50 g) was placed inside new oxygen-permeable bags, stored at 4 °C, and analyzed for lipid (TBARS) and protein oxidation at three time intervals. Same preparation procedure was done for all sensory analysis treatment samples. However, the ground chicken (raw thigh) meat patties were stored at 4 °C up to 4 days before cooking, and for each evaluation session.

3. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) measurement. Briefly, the TBARS values in the meat samples were measured according to the method described by Ahn et al. (1998). The TBARS values were calculated based on malonaldehyde (MDA) stander carve (TEP standard solution) and reported as mg of MDA per kg of meat.

4. Protein oxidation (total carbonyl). Protein oxidation was determined by the method of Lund et al. (2008) with minor modifycations as described by Al-Hijazeen et al. (2016). In addition, carbonyl content was recorded as nmol/mg protein using absorption coefficient of 22,000/M·cm as described by Levine et al. (1994).

5. Proximate analysis. Proximate analysis was determined for all treatment samples according to the method of AOAC (2003). Moisture, crude protein, fat and ash (%) were analyzed using thigh meat samples. Samples of each treatment were selected randomly and the averages of 6 sub-samples (2 sample/replicate) were statistically analyzed.

6. pH of raw thigh meat. Acidity of the chicken raw meat samples was measured using a pH meter (PL-600, pH/mV/Temp Meter, Taiwan) after homogenizing the 1.0 g samples with 9 ml deionzed distilled water (DDW) (Sebranek et al., 2001).

7. Cooking loss %. Chicken thigh meat samples (30 g) were weighed and packaged in oxygen impermeable vacuum bags. The meat was cooked at a constant temperature using pre-heated water bath (Memmert, WNB 14; GMbH + Co. KH, D-91107 Schwabach, Germany) to the internal temperature of 80 °C for 90 min for the maximum water loss expected (Murphy and Marks, 2000). After cooking, all meat samples were cooled in a cold water bath until the internal temperature of the samples reached 20 °C, then water blotted or purged until the samples became dry. The cooking loss percentage was calculated as percent weight reduction of the cooked sample compared to the raw meat sample using the following equation:

$$\text{Cooking loss \%} = \frac{100\times (\text{Weight of raw meat} - \text{Weight of cooked meat})}{(\text{Weight of raw meat})}$$

8. Water separation (Centrifuge method). Samples of 20 g (meat/water mixture) were placed into 50 mL centrifuged tubes to measure their separated water as described by Sebranek et al. (2001) with minor modification. The samples were placed in tubes then centrifuged at the speed of 10,000 rpm for 20 minutes (High Speed Centerfuige, TG16G, Hunan Kaida, China). After centrifugation, the excess water was decanted and tubes were re-weighed. Water separation percentage (expression of water holding ability) was calculated as ratio of centrifuged water to the original sample weight. This method measures how strongly water is bound or held by meat proteins.

9. Sensory evaluation. Trained sensory panels were used to evaluate the sensory characteristics of the ground chicken thigh meat.

Sensory panels evaluated the colour, aroma, and overall acceptability of both raw and cooked meat. Two different treatments were prepared with the same method described in the oxidation analysis (lipid and protein oxidation). The meat was refrigerated at 4 ºC for three days before each evaluation session. Ten trained panelists (Muta'h University, students and staff), participated in each session. The evaluations were done twice after three days of storage time at 4 ºC. For training, 3 one-hour sessions were held using commercial ground chicken meat to develop descriptive terms for the desired attributes. The raw meat was evaluated for colour (redness), visual fat, oxidative odour, and overall acceptability. On the other hand, cooked meats were evaluated for cooked chicken odor, oxidative odour, sulfur odour, and overall acceptability.

All attributes were measured using a line scale without numbers (numerical value 9 units) with graduation from 0 to 9. For example, overall acceptability; where 9 represented extremely desirable, and 0 represented extremely undesirable (9 – extremely desirable, 8 – very, 7 – moderate, 6 – slightly, 5 – neither nor, 4 – slightly undesirable, 3 – moderately undesirable, 2 – very undesirable, and 1 – extremely undesirable). Similar terminology (e.g detectable or undetectable) underline was used for the other attributes. Cooked and raw meat evaluation sessions were done on separate days to decrease any variability.

Refrigerated (4 ºC) samples were evaluated by the panelists for each treatment. The panelist was served 1 glass vial, 20 ml volume, of each treatment to evaluate colour and odor of raw thigh meat. All ground meat samples were packaged in oxygen permeable bags before the evaluation session. The panelists were asked to evaluate the ground meat patties (color) and open the vials to evaluate odour. The raw meat samples of 10 g each were placed in small vials (20 mL) capped with a septum in order to evaluate odor attributes. All sample vials were labeled by a three digit number selected randomly. For cooked meat, samples (4 g) at 0 day of cooking were placed in a three digit coded 20 mL sample vial and capped with a septum. Panelists were asked to smell samples in random order and record the intensity of odor or overall acceptability on the scale line.

10. Statistical analysis. Data were analyzed using statistical analysis of SAS program, version 9.3 (2012). For all analysis, the student t test at 5% level of significance was used to compare the measured means between the two treatments. Mean values and standard deviation of the means (Mean ± SD) were reported.

Results and discussion

Proximate analysis. In order to evaluate the effect of adding different dietary energy sources on the meat preservation system, it is important to analyze meat composition. There were no significant differences ($P > 0.05$) between both treatments of their moisture, protein, and ash percentage (Table 2). However, the moisture values were numerically lower using FD treatment samples. This may be due to higher ($P < 0.05$) value of fat in their lean meat tissues (Table 2).

Table 2
Proximate analysis of raw chicken thigh meat (Mean ± SD, n = 6)

Treatment	Fat %	Protein %	Ash %	Moisture %
FD	7.23 ± 0.10	21.4 ± 0.76	0.98 ± 0.017	70.4 ± 0.82
SD	6.23 ± 0.27	21.6 ± 0.99	0.98 ± 0.017	71.2 ± 1.14
P-value	< 0.0001	0.7993	1.0000	0.1613

Although both dietary treatments were formulated to be isocalric and isonitrogenous, Glucose/sugar has a higher heat increment compared to lipid after metabolism (De Groote et al., 1971). Thus, feeding sucrose may reduce net energy delivery to the broilers compared to lipid. Reducing energy level in broilers has the result of decreasing total body fat deposition (Tanaka et al., 1983). Furthermore, broilers fed SD had a lower feed intake (Data were not shown). Lower feed intake through feed restriction has been reported to decreased energy delivery and thus body fat accumulation (Rezaei et al., 2010; Chen et al., 2012; Wu et al., 2012). This significant difference in fat meat should be the major factor which can affect meat quality and their stability during storage time. However, low fat content may affect negatively some eating quality characteristics (tenderness, juiciness, odor, and flavor) and consumer acceptance (Savell and Cross, 1988; Ellis and Mckeith, 1999).

Lipid oxidation. There were no significant differences ($P > 0.05$) between TBARS values (raw and cooked thigh meat) of both FD and SD treatment at day 0 (Table 3).

Table 3
TBARS* values (mg/kg) of ground chicken thigh meat at different storage time (Mean ± SD; n = 6)

Time	FD	SD	P-value
		Raw	
Day 0	0.232 ± 0.029	0.247 ± 0.047	0.5408
Day 4	0.968 ± 0.069	0.289 ± 0.028	< 0.0001
Day 7	2.495 ± 0.042	1.244 ± 0.015	< 0.0001
		Cooked	
Day 0	1.207 ± 0.510	1.064 ± 0.143	0.5350
Day 4	3.537 ± 0.182	1.832 ± 0.652	0.0010
Day 7	7.416 ± 0.234	5.198 ± 0.869	0.0011

Note: * – TBARS value in mg malonaldehyde/kg meat.

This was in agreement with the previous research studies conducted on ground chicken meat (Rababah et al., 2006; Chouliara et al., 2007; Al-Hijazeen et al., 2016). In addition, TBARS values of raw meat samples obtained from FD treatment were significantly ($P < 0.05$) higher at day 4 of storage time. Furthermore, TBARS values of FD treatment were significantly ($P < 0.05$) lower using raw meat at day 7 of storage time. This may be due to the higher fat content and fatty acid profile in meat samples of broilers that were fed FD. However, initiation and propagation steps (autoxidation reaction) in lipid oxidation mechanism are highly affected by fatty acid saturation and their profile sequences (Ahn et al., 2009). In addition, the TBARS values using cooked meat were significantly ($P < 0.05$) higher for FD treatment compared to SD treatment. Generally, the TBARS values in cooked chicken meat were higher than raw meat, and the signifycances could be better if cooked meat was used (Min et al., 2008; Ahn et al., 2009). This may be due to the low free iron content and high ferric ion reducing capacity in fresh meat (Min et al., 2008). In addition, the oxidative change is usually higher in cooked meat because enzymes denatured, iron ion released to the extracellular compartment, membrane bi-layers damaged, and phospholipids were oxidized faster during cooking (Gray et al., 1996). So the TBARS values of SD treatment increased during storage time with a lower rate compared to the FD treatment. However, farther research studies are needed to investigate the mechanism of fatty acid deposition using different dietary energy.

Protein oxidation. There were no significant differences ($P > 0.05$) of the total carbonyl (nmol/mg protein) values using both dietary treatments at day 0. However, these values of FD treatment were significantly higher ($P < 0.05$) at days 4 and 7 of storage time using both raw and cooked meat (Table 4).

Table 4
Effect of using different dietary energy sources on protein oxidation in ground chicken meat at different storage time (carbonyl, nmol/mg of protein; Mean ± SD, n = 6)

Time	FD	SD	P-value
		Raw	
Day 0	0.785±0.140	0.761±0.063	0.712
Day 4	1.429±0.049	0.953±0.078	< 0.0001
Day 7	1.711±0.463	1.168±0.061	0.0343
		Cooked	
Day 0	1.398±0.099	1.384±0.132	0.8424
Day 4	2.712±0.364	2.167±0.108	0.0131
Day 7	4.334±0.304	2.629±0.252	< 0.0001

This may be due to free radical formation, which accelerates during storage time (Estevez, 2011). Sugar based diet (SD) treatment showed a lower increasing rate during storage time of the raw meat samples. Furthermore, total carbonyl values in cooked meat were much higher than those of raw meat and reached up to 4 nmol/mg

protein by the end of storage time (Table 4). Total estimated carbonyl values were reported in the range of 1–3 nmol/mg protein for raw meat and up to 5 nmol/mg protein for cooked meat (Estevez et al., 2005; Sun et al., 2010; Estevez, 2011). This increasing trend of total carbonyl formation was connected to the TBARS or MDA changing the rate of the SD treatment. Certainly, the interaction between both lipid and protein oxidation support this explanation (Xiong, 2000).

These results were in agreement with the findings of Al-Hijazeen et al. (2016), where the TBARS values in both raw and cooked ground chicken meat increased during storage. In addition, the effect of using different levels of essential amino acids with high energy poultry diet has been reported to affect their carcass quality (Moran and Bilgili, 1990; Ellis and Mckeith, 1999; Aletor et al., 2000). In addition, the suitable protein usage in all feeding systems is important economically and nutritionally (Beski et al., 2015). Finally, these results reflect the effect of changes in energy metabolism, nutrient absorption, and amino acid profile due to dietary energy sources (Krajmalnik-Brown et al., 2012).

Meat quality parameters. Water binding ability is considered important in meat quality and its processing characteristics. However, it will affect other eating quality characteristics such as juiciness, texture; flavour and meat marketing benefit (Huff-Lonergan et al., 2005; Cheng and Sun, 2008). In addition to the water binding ability, cooking loss and ultimate pH value of thigh meat samples were measured. Data analysis of the current study showed no significant differences (P > 0.05) between both treatments values of cooking loss (Table 5).

Table 5
Effect of dietary treatment on meat quality characteristics (cooking loss, water separation), and pH value of thigh chicken meat (Mean ± SD, n = 6)

Parameter	FD	SD	P-value
[1]Cook L	0.201 ± 0.017	0.166 ± 0.043	0.088
[2]WS	0.257 ± 0.020	0.211 ± 0.024	0.016
[3]pH value	6.240 ± 0.179	5.713 ± 0.262	0.002

Note: [1] – Cook L – cooking loss percentage; [2] – WS – water separation percentage; [3] – pH – ultimate pH value at day 0.

On the other hand, ultimate pH values of meat samples from SD treatment were significantly lower (P < 0.05) compared to FD treatment. This effect may be due to glycogen (multi-branched polysaccharide of glucose) stored in the muscle cells, which may affect final pH value in the meat after slaughtering (Den Hertog-Meischke et al., 1997). However, the effect of dietary energy sources on early postmortem muscle metabolism (Glycolytic enzyme) had been reported in several studies (Greenhaff et al., 1988; Li et al., 2017). In addition, treatment samples of FD showed higher significant values of water separation compared to the SD treatment. Despite the lower pH value in the sample of SD, it showed better water binding ability. The reason for this may be due to the effect of fat composition, and the negative effect of lipid oxidation on meat protein. Finally, water holding capacity of raw meat is complicated by many internal and external factors (Huff-Lonergan et al., 2005), for example, physiological, rearing conditions and factors with regard to slaughter and farther processing (Den Hertog-Meischke et al., 1997).

Sensory analysis. Different sensory attributes were evaluated reflecting the relationship between regulator mechanism of meat preservation (pre-postmortem time) and overall meat quality. The evaluation panel of the cooked samples showed no significant differences (P > 0.05) between both treatments (FD and SD) using colour and sulfur odour attributes. However, this significant difference could be clearer if the meat samples were evaluated by chemical or instrumenttal analysis. In addition, FD treatment showed higher significant (P < 0.05) scores of the oxidation odour attribute compared to SD (Table 6).

Fatty acids profile and high fat composition of FD samples in muscle tissues may be the reason behind this variation among these attributes (Ellis and Mckeith, 1999; Ahn et al., 2009). In addition, changes in dietary energy source may affect gut microbes, and the mechanism of nutrient absorption (Krajmalnik-Brown et al., 2012). Overall, cooked meat samples from SD treatment were significantly (P < 0.05) more acceptable compared to the FD samples (overall acceptability). This could be explained by the differences in fatty acid profile and their amino acid composition (Melton, 1990). These differences usually affect odour, flavour, colour, and other meat quality characteristics, and correlated with lipid and protein oxidation (Min et al., 2008; Ahn et al., 2009).

Table 6
Sensory attributes[b] means of ground chicken thigh meat patties (Mean ± SD)

TRT*	Cooked Colour	Sulfur Odour	Oxidation Odour	Over All Acceptability
		Cooked		
Fat Diet	5.74 ± 1.87	5.28 ± 1.33	7.18 ± 0.74	5.87 ± 1.31
Sugar Diet	7.02 ± 0.97	5.60 ± 0.93	3.99 ± 0.69	7.86 ± 0.77
P-value	0.0688	0.5400	< 0.0001	0.0006
TRT*	Redness Colour	Visual Fat	Oxidation Odour	Over All Acceptability
		Raw		
Fat Diet	5.74 ± 1.45	5.83 ± 0.81	5.73 ± 0.43	4.38 ± 0.93
Sugar Diet	7.13 ± 1.02	2.87 ± 0.48	3.28 ± 0.59	7.75 ± 0.87
P-value	0.0233	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Note: * – treatments – fat diet, sugar diet; [b] – sensory attributes – samples of cooked and raw meat were evaluated at day 0 and 3 respectively (n = 10).

Raw meat samples of SD treatment showed higher significant (P > 0.05) scores using redness attribute compared to FD treatment. In addition it showed better cooked meat colour scores compared to the FD treatment. Clearly, FD treatment showed higher significant (P > 0.05) scores of visual fat attribute. This may be due to the higher fat accumulation in the muscle tissues of broilers that were fed with soy bean oil. Similar to the cooking evaluation, FD treatment samples had significantly (P < 0.05) higher scores of oxidation odour using raw meat samples. In addition, SD treatment showed higher significant (P < 0.05) scores of the overall acceptability attribute.

Conclusion

The SD treatment showed the lowest significant (P < 0.05) lipid and protein oxidation values compared to the other treatment. In addition, FD treatment showed higher significant water separation of raw thigh meat samples. Results of the sensory evaluation were in agreement with the previous chemical analysis data. It can be concluded that SD treatment could be a good replacement to the FD in term of meat storage stability if used in a suitable level. However, more research studies are needed to ascertain all meat quality characteristics. Finally, this regulatory bio-system approach should have a promising future in poultry production and meat preservation. In addition, it will enhance food safety, decrease carcinogenic and toxicological effects of free radicals, and improve human health.

This study was financially supported by the Deanship of Scientific Research at Mu'tah University, Al-Karak, Jordan. This funding is highly appreciated. We also convey our profound gratitude to all other Animal Science Department staff for their help and expert advice.

References

Ahn, D. U., & Lee, E. J. (2002). Production of off-odor volatiles from liposome-containing amino acid homopolymers by irradiation. Journal of Food Science, 67(7), 2659–2665.

Ahn, D. U., Nam, K. C., & Lee, E. J. (2009). Lipid oxidation and flavor. In: Du, M., & McCormick, R. J. (Eds.). Applied muscle biology and meat science. CRC Press, Taylor and Francis Group, Baco Raton, FL. Cap 12, pp. 227–246.

Ahn, D. U., Olson, D. G., Jo, C., Chen, X., Wu, C., & Lee, J. I. (1998). Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production and color in raw pork patties. Meat Science, 49, 27–39.

Alao, S. J., & Balnave, D. (1984). Growth and carcass composition of broiler fed sunflower and olive oil. British Poultry Science, 25, 209–219.

Aletor, V. A., Hamid, I. I., Nieb, E., & Pfeffer, E. (2000). Low-protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: Effects on performance, carcass characteristics, whole-body composition and efficiencies of nutrient utilization. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(5), 547–554.

Al-Hijazeen, M., Lee, E. J., Mendonca, A., & Ahn, D. U. (2016). Effect of oregano essential oil (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) on the storage stability and quality parameters of ground chicken breast meat. Antioxidant (MDPI), 5, 18.

AOAC (2003). Official methods of Analysis (17th ed., 2nd revision). Association of Official Analytical Chemists, Virginia, USA.

Baiao, N. C., & Lara, L. J. C. (2005). Oil and fat in broiler nutrition. Brazilian Journal of Poultry Science, 7, 129–141.

Beski, S. S. M., Swick, R. A., & Ljji, P. A. (2015). Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review. Animal Nutrition, 1(2), 47–53.

Chen, W., Guo, Y. M., Huang, Y. Q., Shi, Y. H., Zhang, C. X., & Wang, J. W. (2012). Effect of energy restriction on growth, slaughter performance, serum biochemical parameters and Lpin2/WDTC1 mRNA expression of broiler in the later phase. Journal of Poultry Science, 49, 12–19.

Cheng, Q., & Sun, D. W. (2008). Factors affecting the water holding capacity of red meat products: A review of recent research advances. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(2), 137–159.

Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 C. Food Microbiology, 24, 607–617.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002). Nutrient and fatty acid deposition in broilers fed different fatty acid profiles. Poultry Science, 81, 1533–1542.

De Groote, G., Reyntens, N., & Amich-Gali, J. (1971). Fat studies. The metabolic efficiency of energy utilization of glucose, soybean oil and different animal fats by growing chickens. Poultry Science, 50, 808–818.

Den Hertog-Meischke, M. J. A., Van Laack, R. J. L. M., & Smulders, F. J. M. (1997). The water-holding capacity of fresh meat. Veterinary Quarterly, 19(4), 175–181.

Du, M., & Ahn, D. U. (2002). Effect of antioxidant on the quality of irradiated sausages prepared with Turkey thigh meat. Poultry Science, 81, 1251–1256.

Du, M., Ahn, D. U., Nam, K. C., & Sell, J. L. (2000). Influence of dietary conjugated linoleic acid on the volatile, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. Meat Science, 56, 387–395.

Ellis, M., & Mckeith, F. K. (1999). Effect of nutrition on meat quality. Non-ruminant nutrition and meat quality. 2nd Annual Reciprocal Meat Conference, 52, 15–23.

Estevez, M. (2011). Protein carbonyls in meat system: A review. Meat Science, 89, 259–279.

Estevez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on color and texture deterioration. Journal of Food Science, 70, 427–432.

Fouad, A. M., & El-Senousey, H. K. (2014). Nutritional factors affecting abdominal fat deposition in poultry: A Review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27(7), 1057–1068.

Gray, J. I., & Monahan, F. J. (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. Trend in Food Science and Technology, 3, 315–319.

Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. Meat Science, 43, 111–123.

Greenhaff, P. L., Gleeson, M., & Maughan, R. J. (1988). The effect of diet on muscle pH and metabolism during high intensity exercise. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 57(5), 531–539.

Hall, G. (1987). Interactions between products of lipid oxidation and proteins. Food Science and Technology Today, 1, 155–158.

Hashim, I. B., Hussein, A. S., & Afifi, H. S. (2013). Quality of breast and thigh meats when broilers are fed rations containing graded levels of sugar syrup. Poultry Science, 92(8), 2195–2200.

Hermier, D. (1997). Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. Journal of Nutrition, 127, 805–808.

Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. Meat Science, 71(1), 194–204.

Hussein, A. S., Al Ghurair, J., John, P. G. K., Habib, H. M., & Sulaiman, M. (2016). Graded levels of sugar syrup in broiler rations and its effect on growth performance and blood biochemical parameters. Animal Nutrition, 2, 180–185.

Jensen, C., Guidera, J., Skovgaard, I. M., Staun, H., Skibstead, L. H., Jensen, S. K., Moller, A. J., Bukley, J., & Bertelsen, G. (1997). Effect of dietary α-tocopherol deposition in porcine *m. psoas major* and *m. longissimus dorsi* and on drip loss, colour stability of pork meat. Meat Science, 45(4), 491–500.

Krajmalnik-Brown, R., Iihan, Z., Kang, D., & Dibaise, J. K. (2012). Effect of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. Nutrition in Clinical Practice, 27(2), 201–214.

Lee, K., Everts, H., Kappert, H., Yeom, K., & Beynen, C. (2003). Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. Journal of Applied Poultry Research, 12, 394–399.

Leeson, S., & Summers, J. D. (2001). Nutrition of the chicken. 4th edition. M. L. Scott and Associates, Ithaca, N.Y.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Methods in Enzymology, 233, 346–357.

Li, Y., Yu, C., Li, J., Zhang, L., Gao, F., & Zhou, G. (2017). Effect of dietary energy sources on early postmortem muscle metabolism of finishing pigs. Asian-Australians Journal of Animal Science, in press.

Lund, M. N., Hviid, M. S., Claudi-Magnussen, C., & Skibsted, L. H. (2008). Effects of dietary soybean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage. Meat Science, 79, 727–733.

Melton, S. L. (1990). Effect of feed on flavor of red meat: A review. Journal of Animal Science, 68(12), 4421–4435.

Min, B. R., Nam, K. C., Cordray, J. C., & Ahn, D. U. (2008). Factors affecting oxidative stability of pork, beef, and chicken meat. Animal Industry Report, AS654, ASL R2257.

Moran, E. T., & Bilgili, S. F. (1990). Processing losses, carcass quality, and meat yields of broiler chickens receiving diets marginally deficient to adequate in lysine prior to marketing. Poultry Science, 69(4), 702–710.

Murphy, R. Y., & Marks, B. P. (2000). Effect of meat temperature on proteins, texture and cook loss for ground chicken breast patties. Poultry Science, 79, 99–104.

Rababah, T., Hettiarachchy, N. S., Horax, R., Cho, M. J., Davis, B., & Dicksons, J. (2006). Thiobarbituric acid reactive substances and volatile compounds in chicken breast meat infused with plant extracts and subjected to electron beam irradiation. Poultry Science, 85, 1107–1113.

Rezaei, M., & Hajati, H. (2010). Effect of diet dilution at early age on performance, carcass characteristics and blood parameters of broiler chicks. Italian Journal of Animal Science, 9, 93–100.

Savell, J. W., & Cross, H. R. (1988). Technological option to improve the nutritional attributes of animal product options in the marketplace. Washington (DC): National Academic Press (US). The role of fat in the palatability of beef, pork, and lamb. pp. 1–94.

Sebranek, J. G., Lonergan, S. M., King-Brink, M., & Larson, E. (2001). Meat science and processing. Lab-Manual. 3rd ed. Zenda, WI, Peerage Press. pp. 141–143.

Shermer, W. D. (1990). Effects of oxidation on the quality of ingredients and feed of poultry. In: 37º Maryland Nutrition Conference. Maryland, EUA.

Sun, W. Q., Zhang, Y. J., Zhou, G. H., Xu, X. L., & Peng, Z. Q. (2010). Effect of apple polyphenol on oxidative stability of sliced cooked cured beef and pork hams during chilled storage. Journal of Muscle Food, 21, 722–737.

Tanaka, K., Ohyani, S., & Shigeno, K. (1983). Effect of increasing dietary energy on hepatic lipogenesis in growing chicks. II. Increasing energy by fat or protein supplementation. Poultry Science, 62, 452–458.

Tavarez, M. A., Boler, D. D., Bess, K. N., Zhao, J., Yan, F., Dilger, A. C., McKeith, F. K., & Killefer, J. (2011). Effect of antioxidant inclusion and oil quality on broiler performance, meat quality, and lipid oxidation. Poultry Science, 90(4), 922–930.

Waheed, A., Ahmed, T., Yousaf, A., & Zaefer, I. J. (2004). Effect of various levels of fat and antioxidant on the quality of broiler rations stored at high temperature for different periods. Pakistan Veterinary Journal, 24(2), 70–75.

Wang, A. (2014). The effects of different feeding program and inclusion of glycerol, glucose or sucrose in broiler starter diets on growth performance and intestinal development. Master thesis. Dalhousie University, Halifax, Canada.

Wu, L., Guo, X., & Fang, Y. (2012). Effect of diet dilution ratio at early age on growth performance, carcass characteristics and hepatic lipogensis of Pekin ducks. Brazilian Journal of Poultry Science, 14, 43–49.

Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In: Decker, E. A., Faustman, C., & Lopez-Bote, C. J. (Eds.), Antioxidants in muscle foods. Wiley, New Yourk. pp. 85–111.

Yadalam, S. (2005). Modeling broiler energy and protein metabolism. PhD thesis. Faculty of the Graduate College, Oklahoma State University, USA.

Zelenka, W., Knaus, W., Aichinger, F., & Lettner, F. (1997). Effects of different dietary fat sources on performance and carcass characteristics of broilers. Animal Feed Science and Technology, 66, 63–73.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 438–443
doi: 10.15421/021768

The impact of endogenous intoxication on biochemical indicators of blood of pregnant cows

B. Gutyj, Y. Grymak, M. Drach, O. Bilyk, O. Matsjuk, N. Magrelo, M. Zmiya, O. Katsaraba

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

Article info

Received 04.06.2017
Received in revised form 12.07.2017
Accepted 20.07.2017

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine. Tel.: +38-066-538-69-42. E-mail: bvh@ukr.net

Gutyj, B., Grymak, Y., Drach, M., Bilyk, O., Matsjuk, O., Magrelo, N., Zmiya, M., & Katsaraba, O. (2017). The impact of endogenous intoxication on biochemical indicators of blood of pregnant cows. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 438–443. doi: 10.15421/021768

The notion "endotoxin" is conditional, for any normal metabolit has a toxic impact if it has an excessive accumulation in an organism. Endotoxins include products of breakdown of tissue proteins, peroxides and other products of free radical oxidation, low molecular weight toxins, toxins of microorganisms. Current knowledge on the mechanism of endotoxin action on the organism of pregnant cows is based on the key role of the immune system: it provides animals with protection against infections, eliminates extraneous elements of endogenous and exogenous origin. It is understood that under endogenous intoxication, toxic metabolites suppress the activity of an organism's immune system and decreases the resistance of an organism to negative effects of environmental factors. Animals under endogenous intoxication had the following clinical symptoms: swelling of mammary gland, edemas of external genitals, anemia of mucous membranes, functional disorders of proventriculuses and intestines, and the animals were stressed. It was found that under endogenous intoxication at 8–9 months of pregnancy, the blood of highly-productive cows had a tendency of decrease in the number of erythrocytes by 21.0% and decrease in the level of hemoglobin by 24.3%, and increase in the number of leucocytes by 7.6% compared to the value for the blood of cows with physiological pregnancy process. The development of endogenous intoxication among pregnant cows causes disorders in protein-synthesizing function of liver, which is indicated by decrease in the level of total protein and its fractions. We found that endogenous intoxication decreased the content of total protein in the blood by 18.4%. Over the period of study, among pregnant cows under the development of endogenous intoxication, heightened activity of amino transferases in the blood was observed. In the ninth month of pregnancy, the activity of amino transferases in blood serum of cows from the experimental group increased by 28.6%, and the activity of aspartate aminotransferase increased by 20.1% respectively. Increase in the activity of amino transferases and decrease in the level of total protein and its fractions in the blood serum is one of the first biochemical tests for the diagnosis of endotoxin manifestations and indicates destructive processes in the liver. We found that pregnant cows under the development of endogenous intoxication suffered disorders in detoxicating function of the liver and disorders in filtrating function of the kidneys. The developing endogenous intoxication of pregnant cows suppressed the activity of enzymes in their glutathione system of antioxidant protection, which is indicated by decrease in the activity of glutathione peroxidase by 27.5%, glutathione reductase by 42.9%, glucose-6-phosphate dehydrogenase by 11.2% in the blood serum. The lowest activity of enzymes of glutathione system in the blood of highly-productive cows under endogenous intoxication was observed in their ninth month of pregnancy, which is related to increase in activation of processes of lipid peroxidation and imbalance between the activity of antioxidant system and intensity of lipid peroxidation. A significant increase in the content of lipid hydroperoxides by 70.9% and in concentration of malondialdehide by 54.8% was observed. Imbalance in generation of active forms of oxygen and their metabolites, exhaustion of antioxidant system and disorders in its balance cause oxidative stress.

Keywords: toxicology; midwifery; endotoxin; enzymes; antioxidants; total protein; urine; creatinine

Introduction

It is known that conditions of feeding and maintaining pregnant cows significantly impact on their offspring (Sheldon et al., 2006; Mainardes and DeVries, 2016; Fabris et al., 2017; Fedorovych, 2017). Therefore, from the beginning of pregnancy, a cow should be provided with the necessary amount of nutrients, which would satisfy its own vital needs, and the needs of the fetus and lactation. Deficiency or excessive amount of energy, biologically active agents in diets causes disorders in the metabolism of pregnant cows (van der Drift et al., 2015; Macmillan et al., 2017; Slivinska et al., 2017; Vieira-Neto et al., 2017).

Many publications on the development of endogenous intoxication of different etiology among pregnant animals have given cause for concern (Gutyj et al., 2016; Rodríguez et al., 2017). Researchers distinguish several important biochemical mechanisms of development of endogenous intoxication of animals, particularly the activation of processes of free radical oxidation (Gutyj et al., 2016; Hariv and Gutyj, 2016; Khariv et al., 2016; Martyshuk et al., 2016; Khariv and Gutyj, 2017).

It has been shown that in the conditions of development of endogenous intoxication among pregnant cows, in the ninth month, the content of triiodthyronine and thyroxine decreases and the level of thyrotropic hormone of the pituitary gland increases. Therefore endogenous intoxication of pregnant cows causes suppression of thyroid gland function, which impacts on fat, protein and carbohydrate metabolism (Hrymak and Hunchak, 2014). The development of endogenous intoxication of pregnant cows causes decrease in arterial oxygen content and development of tissue hypoxia, which slows the processes of oxidation and recovery of NADP, a coenzyme of more than 250 dehydrogenases

(Andersen, 2003; Hrymak et al., 2015; Panevnyk and Suprovych, 2016). We should also mention that uterus is especially vulnerable to hypoxia. The symptoms include decrease in macroergic compounds, particularly acid phosphatase and adenosine triphosphate, which causes general suppression of organisms of pregnant cows.

Veterinary medicine often focuses on studying indicators of animals' blood, for the values can indicate the extent of intensity of metabolic processes, development of intoxications, diseases, both of infectious and non-infectious etiology. Therefore this research aims at studying the impact of endogenous intoxication on hematological and biochemical indicators of the blood of pregnant cows.

Materials and methods

The research was conducted in "Barkom" PLC, Yampil' village of Pustomytovs'ky district of Lviv oblast. The research used pregnant cows of Ukrainian black and speckled dairy breed. All experimental studies were conducted in compliance with bioethical requirements, according to the Law of Ukraine "Protecting Animals from Abuse", 28.03.2006 and "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes", 13.11.1987.

The study used 20 selected cows, which were divided into two groups, each consisting of 10 individuals: the control and experimental group. The cows of the control group were healthy and had a physiological process of pregnancy. The cows of the experimental group had typical manifestations of endogenous intoxication. In particular the symptoms were: anemia of mucous membranes, functional disorders of proventriculuses and intestines, swelling of mammary glands and edemas of external genitals.

The blood of cows in 8th and 9th month of pregnancy was taken from the jugular vein for biochemical analysis. The number of leucocytes was calculated using a haemocytometer; the number of erythrocytes – using methodic of Havrylets et al.; the concentration of hemoglobin – using the method of Pimenova et al.; the content of total bilirubin, urea, creatinine – methods described in the handbook "Laboratory Methods of Researchn in Biology, Stock-breeding and Veterinary Medicine"; the level of total protein – method of Delektorskaya; fractional compound of proteins – method of electrophoresis in polyacrylamide gel; the level of malondialdehyde – method of Korobeynikov; the content of hydroperoxides of lipids – method described by Mironchuk; activity of amino transferases – Reitman Frankel method modified by Kapetanaki; activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) – method of Lemeshko; activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) – method of Baquezetal (Vlizlo, 2012).

Mathematical analysis of the results was made in Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). The differences between average values were considered statistically significant at $P < 0.05$ (ANOVA).

Results

We found that under the development of endogenous intoxication, the number of erythrocytes of cows in the 8th month of pregnancy from the experimental group decreased by 13.5%. Further into the experiment the number of erythrocytes continued to decrease, and in the 9th month of pregnancy it was 5.93 ± 0.32 T/l, respectively, i.e. it decreased by 21.0% compared to the control (Table 1). Similar changes were observed in the study of hemoglobin. The blood of cows from the control group with physiological process of pregnancy had the level of hemoglobin fluctuating within 110.0–119.1 g/l, whereas the hemoglobin content of cows with manifestations of endogenous intoxication was significantly lower: lower by 13.6% in the eighth month of pregnancy, and by 24.3% in the ninth month respectively.

In the control group, we observed an insignificant increase in the number of leukocytes among the cows in the ninth month of pregnancy compared to the cows in the eighth month of pregnancy. The number of leukocytes in the blood of the animals from this group fluctuated within 7.58–7.61 g/l. Over the progression of endogenous intoxication, the number of leukocytes in blood of cows from the experimental group began to increase, and in the eight month of pregnancy it increased by 4.7%, and in the ninth month – by 7.6%. The significant increase in the number of leukocytes in the blood of intoxicated animals is related to progressing inflammatory processes in the organism of pregnant cows as a result of the progression of endogenous intoxication.

The content of total protein and its fractions in the blood of cows from the control group was within the physiological values, whereas its content in the blood of cows from the experimental group was significantly decreasing already from the eight month of pregnancy (Table 2). The level of total protein in the blood of cows from the experimental group decreased by 12.8% in the eighth month of their pregnancy, and by 18.5% in the ninth month.

Table 1
Morphological indicators of the blood of pregnant cows with progressing endogenous intoxication (x ± SE, n = 10)

Month of pregnancy	Group of animals	Erythrocytes T/l	Hemoglobin g/l	Leukocytes G/l
8	C	7.10 ± 0.24	110.01 ± 4.02	7.58 ± 0.32
	E	6.14 ± 0.28*	95.09 ± 3.18*	7.94 ± 0.27
9	C	7.51 ± 0.25	119.11 ± 4.71	7.61 ± 0.28
	E	5.93 ± 0.32**	90.19 ± 2.82***	8.19 ± 0.17*

Note: * – $P < 0.05$; ** – $P < 0.01$; *** – $P < 0.001$.

Table 2
The content of total protein and its fractions in the blood of pregnant cows with progressing endogenous intoxication (x ± SE, n = 10)

Month of pregnancy	Group of animals	Total protein, g/l	Protein fractions, %			
			albumins	globulins		
				alpha-	beta-	gamma-
8	C	79.67 ± 1.68	44.11 ± 0.31	16.55± 0.21	14.24 ± 0.18	25.06 ± 0.45
	E	69.44 ± 1.87***	40.61 ± 0.25**	19.14 ± 0.13**	16.36 ± 0.19**	23.85 ± 0.40*
9	C	78.72 ± 1.89	43.86 ± 0.52	16.85 ± 0.16	15.03 ± 0.15	24.22 ± 0.64
	E	64.19 ± 1.92***	38.94 ± 0.40**	21.54 ± 0.11**	16.89 ± 0.24**	22.59 ± 0.38*

Note: see Table 1.

The analysis of protein fractions in the blood of cows from the control group found that the content of albumin was 44.1% in the eighth month of pregnancy, but its content insignificantly decreased in the ninth month of pregnancy. A significant decrease in the level of albumins was observed in the blood of cows from the experimental group, which had typical clinical symptoms of endogenous intoxication. This indicator decreased by 7.9% on the eight month of their pregnancy, and by 11.2% in the ninth month compared to the control. The decrease in the level of albumin in blood of pregnant cows with symptoms of endotoxicosis indicates deficiency of amino acid and protein in the cows' organism. Similar changes were observed in the analysis of the content of γ-globulins in the blood of cows from the experimental group, where it decreased by 4.8% in the eighth month of pregnancy and by 6.7% in the ninth month compared to blood

indicators of cows with physiological process of pregnancy. The analysis of α- and β-globulins in the blood of cows in the eighth month of pregnancy from the experimental group showed an increase of 19.1% and 16.4% respectively. In the ninth month of pregnancy, the level of α- and β-globulins in the blood of cows with manifestations of endogenous intoxication was high and increased by 27.8% and 12.4% respectively compared to the control.

We found that the activity of alanine- and aspartate aminotransferase in the blood serum of cows in the ninth month of pregnancy from the control group slightly increased compared to the values in the eighth month of pregnancy: the activity of alanine aminotransferases increased by 28.6%, and the activity of aspartate aminotransferase – by 20.0%. Such changes in the activity of aminotransferases in the blood of cows with physiological process of pregnancy is related to intensifying metabolic processes as a result of organism's preparation for birth.

Table 3
The activity of aminotransferases in the blood serum of pregnant cows with progressing endogenous intoxication (x ± SE, n = 10)

Month of pregnancy	Group of animals	ALAT, IU/l	ASAT, IU/l	De Ritis ratio
8	C	26.9 ± 0.51	42.9 ± 0.69	1.59 ± 0.07
	E	32.0 ± 0.81***	50.4 ± 0.71***	1.57 ± 0.05
9	C	29.6 ± 0.50	46.0 ± 0.64	1.55 ± 0.06
	E	38.1 ± 0.14***	55.2 ± 0.57***	1.45 ± 0.04

A significant increase in activity of alanine- and aspartate aminotransferases of cows from the experimental group, which had clinical symptoms of endogenous intoxication, was observed throughout the experiment. In the eighth month of their pregnancy, the activity of ALAT and ASAT in the blood serum of intoxicated cows increased by 19.0% and 17.5% respectively. In the ninth month of pregnancy, an increase in activity of the aminotransferases in the blood of cows from the experimental group was observed. This was a result of toxic impact of toxins, free radicals, active forms of oxygen on the liver cells. A significant increase of ALAT and ASAT in the blood serum of cows from the experimental group in the eighth and ninth months of pregnancy indicates disorders in the functional condition of the liver. This was proved by the decrease in De Ritis ratio (AST/ALT ratio).

In the blood of cows from the experimental group, we observed excessive content of total bilirubin. In the eighth month of cows' pregnancy it increased by 17.8%. In the ninth month, the content of total bilirubin in the blood of intoxicated cows reached 6.0 ± 0.14 μmol/l.

The indicator for concentration of urea in the blood of animals the was within physiological values for the cows of the control group, whereas in the blood of cows from the experimental group, the urea concentration decreased by 14.9 and 31.3% in the eighth and ninth months of pregnancy respectively, compared to the control.

Table 4
Biochemical indicators for blood of pregnant cows with progressing endogenous intoxication (x ± SE, n = 10)

Month of pregnancy	Group of animals	Urea, μmol /l	Creatinine, μmol/l	Total bilirubin, μmol /l
8	C	4.6 ± 0.17	102.0 ± 3.51	4.4 ± 0.23
	E	3.9 ± 0.12**	106.3 ± 4.07	5.2 ± 0.19*
9	C	4.7 ± 0.17	101.4 ± 3.03	4.5 ± 0.15
	E	3.2 ± 0.14***	112.3 ± 3.02*	6.0 ± 0.14***

The analysis of the level of creatinine in the blood of pregnant cows showed a significant increase in the blood of cows from the experimental group in the ninth month of pregnancy: it increased by 10.7% compared to the control.

Analysis of the results (Table 5) revealed a decrease in the activity of glutathione peroxidase in the blood serum of cows with typical clinical symptoms of endogenous intoxication. On the eighth month of pregnancy, the activity of the enzyme in the intoxicated cows fluctuated between 20.5 ± 1.02 nmol GSH/min·mg of proteins, which was lower by 21.5% compared to the control. In the ninth month of pregnancy, a decrease in the activity of glutathione peroxidase was observed: it became lower by 27.5% compared to the control. The analysis of activity of glutathione reductase determined that in the blood of cows from the control group in the ninth month of pregnancy this enzyme was slightly higher than values in the eighth month of pregnancy. The analysis of blood of animals from the experimental group (cows with manifestations of endogenous intoxication) showed a significant reliable decrease in the activity of glutathione reductase by 25.0% and 42.9% respectively compared to the control.

Table 5
Activity of glutathione system in the organism of cows with progressive endogenous intoxication (x ± SE, n = 10)

Month of pregnancy	Group of animals	Glutathione peroxidase, nmol GSH/min·mg of proteins	Glutathione reductase, Глутатион-редуктаза, nmol NADPH/min·mg of proteins	Glucose-6-phosphate dehydrogenase, nmol NADPH/ min·mg of proteins
8	C	26.1 ± 1.25	3.2 ± 0.13	65.2 ± 2.01
	E	20.5 ± 1.02**	2.4 ± 0.16**	59.1 ± 2.62
9	C	26.9 ± 1.58	3.5 ± 0.07	65.9 ± 2.42
	E	19.5 ± 1.15**	2.0 ± 0.14***	58.5 ± 2.58*

It is known that the activity of glutathione reductase in a cell decreases due to accumulation of oxidant form of NADP. Catalytic activity of the enzyme is related to regeneration of NADPH, one of the products of dehydrogenase reaction of pentose phosphate pathway.

Analysis of activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the blood of cows from the experimental group showed a significant decrease in the activity of the enzyme in the ninth month of pregnancy: it decreased by 11.2% compared to the control.

Therefore, we can state that the processes of lipid peroxidation have a key role in the pathogenesis of progression of endogenous intoxication of cows: they activate and then cause imbalance in the complex "Antioxidant system ↔ lipid peroxidation".

Table 6 shows that the concentration of malondialdehyde and lipid peroxids, products of lipid peroxidation, in the plasma of blood of pregnant cows fluctuated within 235.4–240.2 E x 1000/ml (LOPs), 4.0–4.2 nmol/ml (MDA). The blood indicates the general condition of peroxidative processes in tissues, therefore the results given in Table 6 indicate that the organism of pregnant cows with progressing endogenous intoxication is affected by the processes typical for oxidative stress, which is manifested by increase in the products of lipid peroxidation in the blood of tested animals.

Table 6
The level of products of lipid peroxidation in the blood of cows with progressive endogenous intoxication (x ± SE, n = 10)

Month of pregnancy	Group of animals	Lipid peroxides, E x 1000/ml	Malondialdehyde, nmol/ml
8	C	235.4 ± 9.81	4.0 ± 0.15
	E	389.5 ± 12.99***	5.8 ± 0.22***
9	C	240.2 ± 8.16	4.2 ± 0.17
	E	410.5 ± 13.75***	6.5 ± 0.26***

Lipid peroxides in the blood of cows from the experimental group increased in the eighth and ninth month of pregnancy by 65.5% and 70.9% respectively. Concerning thiobarbituric acid active products: their level significantly increased in the blood of cows with clinical symptoms of endogenous intoxication by 45.0% and 54.8% in the eighth and ninth month of pregnancy relspectively.

Discussion

It is common knowledge that many animal diseases are followed by development of endogenous intoxication (Hrymak et al., 2015; Gutyj et al., 2017; Shcherbatyy et al., 2017). The destructive effect of endogenous intoxication on the organism of pregnant cows consists of the following main processes: a stoppage of metabolic processes; development of the so-called "lethal synthesis", which further results in accumulation of highly toxic agents in the interior milieu; is most

dangerous as a form of damage to cell membranes (Katholm and Andersen, 1992; Eades, 1993; Andersen, 2003; Hrymak et al., 2015).

The notion "endotoxin" is conditional, for any normal metabolit has a toxic impact if it accumulates to excess in an organism (Culbertson and Osburn, 1980; Boosman et al., 1991; Clark et al., 1991; Luzhnikov et al., 2007). According to data from the literature , endotoxins include products of breakdown of tissue proteins, peroxides and other products of free radical oxidation, low molecular weight toxins, toxins of microorganisms (Clark et al., 1991; Luzhnikov et al., 2007; Hrymak et al., 2015). For studying development of endogenous intoxication in animals, hematological blood analysis is essential, for the blood performs a crucial role in vital activity of an organism. The content of blood reflects qualitative and quantitative changes in an organism affected by various pathological processes of intoxication (Gutyj et al., 2016).

We found that the pregnant cows with development of endogenous intoxication were affected by suppression of the hematopoiesis function of the bone marrow, which is identified by decrease in the number erythrocytes and hemoglobin in blood. Disproportional decrease in the amount of erythrocytes and hemoglobin is related to the toxic effect of toxins on the bone marrow and suppression of erythropoiesis. Such changes in the amount of erythrocytes and hemoglobin in the blood of animals with developing endogenous intoxication are mentioned by other authors (Clark et al., 1991; Andersen, 2003). Also decrease in erythrocytes is related to the fact that they are especially sensitive to the effect of oxidative stress, which develops together with the progression of endogenous intoxication of animals.

Apart from calculating the values of blood indicators, which provided the basis for analyzing the condition of hematopoiesis function of the bone marrow, we analyzed the indicators of leukocytes. Leukocytes in the organism of animals are responsible for a number of functions, particularly: protective, trophic and transport functions (Khariv et al., 2016). With development of endogenous intoxication, the number of leukocytes in the blood of pregnant cows increased in the 8th and 9th months of pregnancy. Leukocytosis is related to the progression of inflammatory processes caused by the impact of toxins on the organism of pregnant cows.

Analysis of the functional condition of the liver is considered of great value in clinical veterinary diagnostics and in the treatment of various intoxications. The liver is a barrier between toxic substances and homeostasis of animal organism. Therefore it is first to suffer the impact of toxins (Hariv and Gutyj, 2016; Kryshtalska et al., 2017).

Changes during pregnancy to a certain extent affect the organism and systems of mothers' organisms, and also affect metabolic processses. Progression of endogenous intoxication of pregnant cows results in liver disorders, which causes suppression of resynthesis of glucose and glycogen from lactic acid. In these conditions, the tissues of animal organisms suffer acidosis and disorders of proteins and nucleic acid, which causes development of progressive cell dystrophy.

Diagnostic tests for liver disorders are analysis of activity of aminotransferases, content of total protein and its fractions in blood serum. Blood proteins are functionally connected with proteins of different tissues and reflect the changes, which occur in the organisms of animals with metabolic disorders caused by endogenous intoxication (Martyshuk et al., 2016).

With development of endogenous intoxication, pregnant cows were observed to have a decrease in the level of total protein in the blood serum. Perhaps, the decrease in total protein is related to progression of hepatosis as a result of the negative impact of toxins. Hepatosis suppresses resynthesis of glucose and glycogen from lactic acid. These processes induce development of acidosis in the tissues of an animal's organism, which causes alterations of biochemical reaction. As a result, synthesis of proteins and nucleic acids is suppressed, resulting in progressive cell dystrophy.

Decrease in the content of albumins in the blood serum of pregnant cows is related to the effect of toxins on the liver and to weakening of its protein-synthesizing function. The liver synthesizes 80% of all albumins. Significant decrease in the level of albumin indicates deficiency of amino acid and proteins in the organism of pregnant cows. Compared to the control, the cows with endogenous intoxication were observed to have an increase in α- and β-globulins by 15.6% and 14.9% in the eighth month. Hyperglobulinemia of intoxicated animals is related to inflammatory processes in their organism under progressive endogenous intoxication. We found that the decrease in the level of total protein and its fractions in the blood serum is the consequence of suppression of the protein-synthesizing function of the liver of pregnant cows.

The study of the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase is significant for defining the general physiological condition of an animal organism (Khariv et al., 2016). The pregnant cows with progressive endogenous intoxication were observed to have a significant increase in the activity of the above-mentioned aminotransferases in their blood over the last months of pregnancy. High activity of aminotransferases in blood serum of pregnant cows was a result of their release from the cells into the blood serum, which heighted the activity of the enzymes. This occurs after endogenous toxin impacts on cell membranes, increasing their penetrability.

Therefore, establishing an increase in the activity of aminotransferases and decrease in the level of total protein in the blood serum is one of the first biochemical tests for diagnosing the manifestations of endogenous intoxication, which also indicates significant destructive processes in the liver.

Our experiments showed a decrease in the concentration of urea in the blood serum of cows with progressing endogenous intoxication, which is, perhaps, related to weakening of its synthesis in the liver. Low concentration of urea in the blood serum of cows was observed in the ninth month of their pregnancy. Such changes indicate decrease in the activity of metabolic processes in the cows' organism and suppression of protein-synthesizing function of the liver. High level of creatinine in the blood serum of pregnant cows with progressing endogenous intoxication is an indicator of not only the functional condition of the liver, but also the functional condition of the kidneys.

On the basis of our experimental studies, we found that pregnant cows with developing endogenous intoxication had intensified formation of free radicals and active forms of oxygen, which have a negative impact on cell membranes. Most authors (Lavryshyn et al., 2015; Chala and Rusak, 2016; Lavriv, 2016) consider intensification of formation of free radicals to be one of the universal mechanisms of disorganizing the structural-functional unity of an animal's organism. Therefore, it should be mentioned that increase in the activity of lipid peroxidation processes in physiological conditions is considered as an adaptive reaction of an organism to stress factors, including progression of endogenous intoxication (Hunchak et al., 2016; Martyshuk et al., 2016; Gutyj et al., 2017).

Initial activation of lipid peroxidation indicates a danger for the organism (Lavriv, 2016). We found that the organism of pregnant cows with progressing endogenous intoxication has intensifying lipid peroxidation in the blood, which is indicated by increase in the concentration of intermediate and final products of lipid peroxidation in the blood serum. Perhaps, such changes are related to the fact that a significant part of the mechanism of endogenous intoxication is intensified formation of active forms of oxygen, which later results in imbalance between the content of oxidants and antioxidants in the organism of pregnant cows. It is also worth mentioning significant changes in the level of lipid peroxides compared to the changes in the level of malondialdehyde. A less intensive, compared to the lipid peroxides, increase in the level of malondialdehyde is related to the fact that lipid peroxides are formed in the early stages of lipid peroxidation, whereas malondialdehyde is formed in the late stages (Lavryshyn et al., 2015). According to the data from the literature, changes in the level of malondialdehyde are related to its ability to form complexes with a number of compounds. Therefore, low concentration of malondialdehyde does not always reflect absence of intensified lipid peroxidation.

The results obtained coincide with the reports on intensification of lipid peroxidation processes under pathological process of any genesis (Chala and Rusak, 2016; Lavriv, 2016; Shcherbatyy et al., 2017). These reports are mentioned in the literature review. Free radical reactions of

lipid peroxidation, which occur in the lipid layer of biological membranes, are significant for the mechanism of progression of endogenous intoxication of animals. In such conditions, endotoxins cause negthe ative effect on functional condition of regulatory systems (Boosman et al., 1991; Hrymak and Hunchak, 2014; Gutyj et al., 2016).

Data from the literature (Lavryshyn et al., 2015; Martyshuk et al., 2016) and the preliminary results of our study (Hrymak et al., 2015) indicate that disorders in oxidative homeostasis, which is typical for increase in the products of lipid peroxidation as a result of decrease in the activity of the enzymatic and non-enzymatic part of antioxidant protection, is one of the pathogenetic factors of endogenous intoxication of pregnant cows.

The antioxidant protection system of an animal's organism is a powerful mechanism, which prevents development of the so-called oxidative stress and exponential free radical and oxidative reactions in the organism (Lavryshyn et al., 2015; Huberuk et al., 2017). A significant part of the antioxidant protection is the glutathione system of antioxidant protection. The components of this system consist of metabolite glutathione and enzymes, particularly: glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.

The results of our studies on pregnant cows with clinical symptoms of endogenous intoxication showed possible changes in the system of antioxidant protection of their organism. The results of our studies indicate that the activity of enzymes of the glutathione system of antioxidant protection significantly increased in the eighth and ninth months of pregnancy. Lowered activity of enzymes-antioxydants is related to accumulation of lipid peroxidation products, which suppress the activity of enzymes.

The changes in the activity of enzymes of the glutathione system of antioxidant protection in the blood of pregnant cows discovered in our research show the additional aspects of toxic effect of endotoxins and could be used as a criterion for evaluating not only the condition of organisms, but also the efficiency of antidotal preparations for treating endogenous intoxication.

Therefore, the research conducted provides data on the dynamics of changes in main parameters of the glutathione system in the blood of cows with progressive endogenous intoxication during the last months of pregnancy, which indicate the significance of the glutathione system for the processes of detoxication. The research found a deficiency in the resources of the glutathione system of antioxidant protection of the organism of cows as a result of its exhaustion in the eighth and ninth months of pregnancy.

The study also determined that endogenous intoxication in an animal organism causes stress to the the animal. In stressed agricultural animals , two hormones form: adrenaline and cortisol. They contribute to the increase in the frequency of the heart rate and breathing, and also suppress the immune system of an organism. Stress also affects the reproductive function, decreasing secretion of sex hormones, and later results in cardiovascular diseases (Hrymak and Hunchak, 2014). During the stress, the organism of animals experiences the following processes: at the initial stage adrenaline, the hormones extracted in the adrenal glands flow into the blood. It causes tachycardia, at the same time increasing arterial pressure and blood sugar level, and reorganizing the blood flow: blood flow to the brain and limbs intensifies, and blood flow to the digestive system and skin reduces. Breathing increases and becomes shallow, and only the top of the lungs is active. Reserves of fat and sugar begin to be exhausted through the production of additional energy (Hrymak et al., 2015; Hunchak et al., 2016).

Therefore, after analyzing Ukrainian and foreign literature, a conclusion can be made that treating endogenous intoxication of pregnant cows requires preparations which should include antioxidants, iodine and magnesium.

Conclusions

Development of endogenous intoxication of pregnant cows in the eighth and ninth months of pregnancy is followed by decrease in the number of erythrocytes in the blood and decrease in hemoglobin and total protein. Also we observed an increase in the number of leukocytes, and increase in the activity of alanine- and aspartateaminotransferases compared to the animals of the control group. Progression of endogenous intoxication of pregnant cows causes disorders in condition of liver, disorders of protein-synthesis and disorders of the detoxicating function of hepatocytes. The progression of endogenous intoxication of pregnant cows suppresses the activity of enzymes of the glutathione system of antioxidant protection, which was indicated by the significantly low activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Significant increase in the content of primary products of lipid peroxidation in the blood plasma of cows with symptoms of endogenous intoxication was followed by significant increase in the concentration of malondialdehyde. Imbalance in the generation of active forms of oxygen and their metabolites, exhaustion of antioxidant system and disorders in its balance cause oxidative stress.

References

Andersen, P. H. (2003). Bovine Endotoxicosis – Aspects of relevance to production diseases. A review. Acta Veterinaria Scandinavica, 44(1), 57.

Boosman, R., Mutsaers, C. W., & Klarenbeek, A. (1991). The role of endotoxin in the pathogenesis of acute bovine laminitis. Veterinary Quarterly, 13, 155–162.

Chala, I. V., & Rusak, V. S. (2016). Redoks-potencial ta stan perekysnogo okysnennja lipidiv krovi koriv, shho utrymujut'sja u ekologichno nespryjatlyvyh umovah [Redox-potential and the state of peroxide oxidation of blood lipids in cows kept under ecologically unfavorable conditions]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 66, 197–201 (in Ukrainian).

Clark, E. S., Gantley, B., & Moore, J. N. (1991). Effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin on systemic haemodynamics in conscious horses. Equine Veterinary Journal, 23, 18–21.

Culbertson, R., & Osburn, B. I. (1980). The biologic effects of bacterial endotoxin: A short review. Veterinary Research Communications, 4, 3–14.

Eades, S. C. (1993). Endotoxemia in dairy cattle: Role of eicosanoids in reticulorumen stasis. Journal of Dairy Science, 76, 414–420.

Fabris, T. F., Laporta, J., Corra, F. N., Torres, Y. M., Kirk, D. J., McLean, D. J., Chapman, J. D., & Dahl, G. E. (2017). Effect of nutritional immunomodulation and heat stress during the dry period on subsequent performance of cows. Journal of Dairy Science, 100(8), 6733–6742.

Fedorovych, V. V. (2017). Vplyv pokaznykiv vidtvornoji zdatnosti na formuvannja molochnoji produktyvnosti koriv symental's'koji porody [The impact of reproductive capacity indicators of Simmental cattle on their milk productivity]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 74, 52–56 (in Ukrainian).

Gutyj, B. V., Hufriy, D. F., Hunchak, V. M., Khariv, I. I., Levkivska, N. D., & Huberuk, V. O. (2016). The influence of metisevit and metifen on the intensity of lipid per oxidation in the blood of bulls on nitrate load. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 70, 67–70.

Gutyj, B. V., Murs'ka, S. D., Gufrij, D. F., Hariv, I. I., Levkivs'ka, N. D., Nazaruk, N. V., Gajdjuk, M. B., Pryjma, O. B., Bilyk, O. J., & Guta, Z. A. (2016). Influence of cadmium loading on the state of the antioxidant system in the organism of bulls. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 96–102.

Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxity of the experimental drug Amprolinsyl. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 41–45.

Gutyj, B., Lavryshyn, Y., Binkevych, V., Binkevych, O., Paladischuk, O., Strons'kyj, J., & Hariv, I. (2016). Influence of Metisevit on the activity of enzyme and nonenzyme link of antioxidant protection under the bull's body cadmium loading. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 66, 52–58.

Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. (2017). Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 304–309.

Gutyj, B., Paska, M., Levkivska, N., Pelenyo, R., Nazaruk, N., & Guta, Z. (2016). Study of acute and chronic toxicity of 'injectable mevesel' investigational drug. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 174–180.

Hariv, M. I., & Gutyj, B. V. (2016). Influence of the liposomal preparation Butaintervite on protein synthesis function in the livers of rats under the influence of carbon tetrachloride poisoning. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 7(2), 123–126.

Hrymak, Y. I., & Hunchak, V. M. (2014). Yodna nedostatnist ta korektsija reproduktyvnoji funktsiji tvaryn preparatamy yodu [Iodine deficiency and correction of the cows' reproductive function using iodine Preparation]. Naukovyi

Visnyk Lvivskoho Natsionalnoho Universytetu Veterynarnoi Medytsyny ta Biotekhnolohii imeni S. Z. Gzhytskoho, 59, 23–41 (in Ukrainian).

Hrymak, Y. I., Hunchak, V. M., & Hutyi, B. V. (2015). Patent na korysnu model № 1026518. Sposib korektsiji fermentnoji systemy antyoksydantnoho zakhystu orhanizmu hlybokotilnykh koriv za endotoksykozu [Methods of correction of the enzyme system of antioxidant protection of the organism of cows in advanced pregnancy with endotoxicosis]; zaiavnyk ta patentovlasnyk Lvivskyi Natsionalnyi Universytet Veterynarnoi Medytsyny ta Biotekhnolohii imeni S. Z. Gzhytskoho. zaiavl. 15.04.2015; opubl. 10.11.2015, Bull. 21 (in Ukrainian).

Huberuk, V., Gutyj, B., Gufriy, D., Binkevych, V., Hariv, I., Binkevych, O., & Salata, R. (2017). Impact of antioxidants on enzyme activities of glutatione system of antioxidant defense in bodies of bulls with acute nitrate and nitrite toxicity. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 77, 220–224.

Hunchak, A. V., Ratych, I. B., Gutyj, B. V., & Paskevych, H. A. (2016). Metabolichna diia yodu v orhanizmi ptytsi za yoho nestachi abo nadlyshku v ratsioni [Metabolic effects of iodine in poultry for its deficiency or excess in the diet]. Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii imeni S. Z. Gzhytskoho, 67, 70–76 (in Ukrainian).

Katholm, J., & Andersen, P. H. (1992). Acute coliform mastitis in dairy cows: Endotoxin and biochemical changes in plasma and colony-forming units in milk. Veterinary Record, 131, 513–514.

Khariv, M., & Gutyj, B. (2017). Dynamika fagocytarnoji aktyvnosti nejtrofiliv u shhuriv za umov oksydacijnogo stresu ta diji liposomal'nogo preparatu [Dynamics of phagocytic activity of neutrophils in rats under oxidative stress and the action of liposomal preparation]. Animal Biology, 19(1), 119–124 (in Ukrainian).

Khariv, M., Gutyj, B., Butsyak, V., & Khariv, I. (2016). Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(1), 276–289.

Kryshtalska, M., Hunchak, V., & Gutyj, B. (2017). Influence of the drug "Trifuzol" on the functional state of the liver in chickens for eymeriozic invasion. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 77, 76–79.

Lavriv, P. Y. (2016). Antioxidant protection and peroxydation lipid of body cows of high calves for the prevention of salmonella under the influence of nanpreparation Germakap. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 66, 112–115.

Lavryshyn, Y. Y., Varkholyak, I. S., Martyschuk, T. V., Guta, Z. A., Ivankiv, L. B., Paladischuk, O. R., Murska, S. D., Gutyj, B. V., & Gufriy, D. F. (2016). The biological significance of the antioxidant defense system of animals body. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 66, 100–111.

Luzhnikov, Y. A., Goldfarb, Y. S., & Ilyashenko, K. K. (2007). Endotoxicosis as the contents of posresuscitative disease in acute poisoning. Obsaa Reanimatologia, 3(6), 48–54.

Macmillan, K., López Helguera, I., Behrouzi, A., Gobikrushanth, M., Hoff, B., & Colazo, M. G. (2017). Accuracy of a cow-side test for the diagnosis of hyperketonemia and hypoglycemia in lactating dairy cows. Research in Veterinary Science, 115, 327–331.

Mainardes, G. A., & DeVries, T. J. (2016). Effect of social feeding environment on the feeding behaviour of dairy cows and their willingness to consume a novel feed. Applied Animal Behaviour Science, 185, 23–29.

Martyshuk, T. V., Gutyj, B. V., & Vishchur, O. I. (2016). Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of "Butaselmevit". Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 22–27.

Panevnyk, V., & Suprovych, T. (2016). Etiologichni chynnyky mastytiv koriv ukrai'ns'koji chorno-rjaboji molochnoji porody [Etiological factors of mastitis of the Ukrainian black-pied dairy breed of cows]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 70, 191–195 (in Ukrainian).

Rodríguez, E. M., Arís, A., & Bach, A. (2017). Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. Journal of Dairy Science, 2017.

Shcherbatyy, A. G., Slivinska, L. G., Gutyj, B. V., Golovakha, V. I., Piddubnyak, A. V., & Fedorovuch, V. L. (2017). The influence of a mineral-vitamin premix on the metabolism of pregnant horses with microelemetosis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 293–398.

Sheldon, I. M., Wathes, D. C., & Dobson, H. (2006). The management of bovine reproduction in elite herds. Veterinary Journal, 171, 70–78.

Slivinska, L., Demydjuk, S., Shcherbatyy, A., Fedorovich, V., & Tyndyk, I. (2017). Etiologija ta kliniko-biohimichni pokaznyky krovi za alimentarnoji osteodystrofiji koriv [Etiology and clinical biochemical parameters of blood for nutritional osteodystrophy of cows]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 73, 79–83 (in Ukrainian).

Smolynets', I. B., Gutyj, B. V., Khariv, I. I., Petryshak, O. Y., & Lytvyn, R. I. (2016). Pharmaceutical marketing: objectives and types. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 69, 151–154.

van der Drift, S. G. A., Houweling, M., Bouman, M., Koets, A. P., Tielens, A. G. M., Nielen, M., & Jorritsma, R. (2015). Effects of a single glucocorticoid injection on propylene glycol-treated cows with clinical ketosis. Veterinary Journal, 204(2), 144–149.

Vieira-Neto, A., Lima, I. R. P., Lopes, F., Lopera, C., Zimpel, R., Sinedino, L. D. P., Jeong, K. C., Galvão, K., Thatcher, W. W., Nelson, C. D., & Santos, J. E. P. (2017). Use of calcitriol to maintain postpartum blood calcium and improve immune function in dairy cows. Journal of Dairy Science, 100(7), 5805–5823.

Vlizlo, V. V. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnytstvi ta veterynarniy medytsyni [Laboratory methods of research in biology, stockbreeding and veterinary medicine]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 444–454
doi: 10.15421/021769

Radiomonitoring of plant products and soils of Polissia during the long-term period after the disaster at the Chornobyl Nuclear Power Plant

L. D. Romanchuk, T. P. Fedonuk, G. O. Khant

Zhytomyr National Agroecological University, Zhytomyr, Ukraine

Article info

Received 29.06.2017
Received in revised form 20.07.2017
Accepted 27.07.2017

Zhytomyr National Agroecological University, Staryi Blvd., 7, Zhytomyr, 10008, Ukraine. Tel.: +38-068-677-59-95. E-mail: tanyavasiluk2015@gmail.com

Romanchuk, L. D., Fedonuk, T. P., & Khant, G. O. (2017). Radiomonitoring of plant products and soils of Polissia during the long-term period after the disaster at the Chornobyl Nuclear Power Plant. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 444–454. doi: 10.15421/021769

The article highlights the consequences of the Chernobyl disaster. Northern Polissia has been and still remains the most polluted area. Full scale and limited economic activity is carried out on part of the contaminated territories. The zone of radioactive contamination includes half of the territory of this region, one third of the agricultural land and almost the same amount of the arable land. 9 districts, 734 towns and villages are located within the zone of radioactive contamination. In the long-term period after the disaster the situation in the contaminated areas has improved and become predictable due to natural processes of recovery and implementation of countermeasures based on results of monitoring. However, until today regions of Ukrainian Polissia continue to produce agricultural products which do not meet the requirements of government regulations concerning the content of radionuclides in food and appear to present a threat to consumers. To assess the accumulation of ^{137}Cs in plant products, we investigated the activity of these radionuclides in potatoes, vegetables, root crops and grains, and calculated the ratios of its transition from the ground to the products, which helped evaluate the intensity and amount of accumulation of radionuclides during the completion of the half-life period of ^{137}Cs and evaluate the radiological situation in the northern regions of Polissia. The density of soil contamination with ^{137}Cs and its specific activity in plant products grown on private plots were studied in three different districts of Zhytomyr region: Narodychi, Korosten and Ovruch. Analysis of the density of soil pollution with the ^{137}Cs isotopes in the northern part of Zhytomyr region in the post-disaster period shows that even 30 years after the tragedy, significant areas of arable land under certain conditions remain potentially dangerous on account of contaminated plant products. The specific activity of ^{137}Cs in plant products grown on private plots was studied in residential places where soil contamination was detected. In particular, the list of studied crops included: potato tubers, white cabbage, fresh tomatoes, table beets, carrots, onions, beans, oat grains, corn grains. The most critical were populated areas located in zone II – village Vystupovychi of Ovruch district, village Loznytsia and village Khrystynivka of Narodychi district. In these settlements an excess of DR-2006 in plant products was noted despite the fact that an excess over the maximum permissible level of density of soil pollution was not observed. In decreasing order by the amount of CT ^{137}Cs, we ranked crops as follows: beans > table beets > carrots > potato tubers > corn grains > oats grains > white cabbage > onions > fresh tomatoes. For the population living on radioactively contaminated territories, plant products grown on private plots have been and still remain the main source of ^{137}Cs radionuclides entering the body.

Keywords: radionuclides; contamination; radioactive; rural population; agriculture

Introduction

As a result of the Chornobyl disaster, a significant amount of territory in Belarus, Russia, Ukraine, and Western Europe, especially Scandinavia and the Alpine region, suffered severe contamination (Handl et al., 2003, Michel et al., 2015). The consequences of the Chernobyl disaster have been eliminated over 30 years, however, the process of understanding and generalization of the results of research is still ongoing (Zablotska, 2016).

Virtually the whole territory of Ukraine was, to a greater or lesser extent, exposed to the consequences of the Chornobyl disaster (Evangeliou et al., 2016, Maringer et al., 2017). The most contaminated territory is northern Polissia, and some of its parts (first of all, the Chernobyl zone) are so polluted that any economic activity and residence are prohibited there. In a part of the contaminated territories there is full-scale or limited economic activity. Zhytomyr region was one of the first to feel the consequences of the accident. The most significant radioactive traces were found in the northern districts of the region. The zone of radioactive contamination includes half of its territory, one third of the agricultural land and almost the same amount of arable land. The contamination area of ^{137}Cs over 37 kBq/m^2 (>1.0 Cu/km^2) amounts to 977.6 thousand hectares. 9 districts and 734 settlements where 386.3 thousand people lived were included into the zone of radioactive contamination. Up to the present, quite a large amount of research has been conducted on the study of the migration of ^{137}Cs into facilities of agricultural production, their accumulation in plant products and the evaluation of the effective dose of radiation for local inhabitants (Michel et al., 2005, Michel et al., 2015). The focus is on ^{137}Cs, which is the main dose-forming radionuclide (Goulko et al., 1998; Dancause et al., 2010).

The main ecological consequence of the Chernobyl disaster is the contamination of soil and agricultural products with biologically meaningful long-living radionuclide ^{137}Cs. Analysis of experimental data obtained from different traces after fallout of emissions from Chernobyl NPP showed that the dynamics of radionuclide transfer from soil to plants significantly depends on the physical and chemical

properties of the soil, properties of radionuclides as radioisotopes of specific chemical elements and correlations of different fallout components on different emission tracks (Prister et al., 1992; Ivanov et al., 1997). Soils of agricultural landscapes are one of the main objects where radionuclides ^{137}Cs are concentrated. They intensively transfer from the soil into biogenic migration along trophic chains and accumulate in plant and animal products and subsequently enter the human body (Strand et al., 1996; Michel et al., 2015).

The population living in areas which suffered from the Chornobyl disaster additionally receives extra doses of external and internal exposure above natural levels. Additional external radiation is caused by the high content of ^{137}Cs in the soil, the decay of which increases the amount of gamma radiation in this territory and internal radiation is caused by ^{137}Cs radionuclides entering the body when plant products obtained in contaminated areas are consumed (Prister et al., 1992; Jacob et al., 2009). In fact, plant products obtained from private plots are the main source of nutrition and intake of radionuclide ^{137}Cs for the rural population.

To assess the contribution of plant products grown on private land plots to the radiation dose, the specific activity of ^{137}Cs and the coefficients of its transition to plant products of Narodychi, Korosten and Ovruch districts of Zhytomyr region were calculated.

It is known that according to the Resolution of the Cabinet of Ministers of the Ukrainian SSR. On the organization of implementing resolutions of the Verkhovna Rada of the Ukrainian SSR on the order of introduction of the Law of Ukrainian SSR "On the legal regime of the area contaminated by the Chernobyl disaster" and "On status and social protection of citizens affected by the Chernobyl disaster" of 23 July 1991 number 106, residential places of Narodychi district: the small town Narodychi, the villages Rozsokhivske, Selets, Loznytsia and Hrystynivka were assigned to the zone of unconditional (mandatory) evacuation, and the village Radcha to the zone of guaranteed voluntary resettlement. Residential places of Korosten district, the village Obykhody were assigned to the zone of unconditional (mandatory) resettlement (zone 2), the town Korosten, the villages Bekhy, Grozyne, Voroneve and Berestovets to the zone of voluntary guaranteed resettlement (zone 3). Residential places of Ovruch district: the villages Rudnia and Vystupovychi to the zone of unconditional (mandatory) resettlement (zone 2), the town Ovruch, the villages Slovechne, Mozhari, Lystvyn and Novi Velidnyky to the zone of voluntary guaranteed resettlement (zone 3). According to the data of the radiological survey conducted in 2008, in the six northern districts of Zhytomyr region, 259.5 thousand hectares of agricultural land out of 377.3 thousand hectares, which constitutes 68.8%, are contaminated with ^{137}Cs, the contamination being distributed as follows: Korosten – 88.7, Lugyny – 48.7, Malyn – 88.7, Narodychi – 88.7, Ovruch – 44.3, Olevsk – 73.9% (Fig. 1). The majority of the districts of Zhytomyr region, except the six abovementioned and three districts (Novograd-Volynskyi, Volodarsko-Volynskyi and Yemilchyno) where the density of contamination of the territory to 37 kBq/km^2 amounts to 91.7–99.5%, belong to the category of districts with a density of pollution of agricultural land with ^{137}Cs to 1 Cu/km^2; the rest of the land has a radioactivity ranging from 37 to 185 kBq/m^2 (0.5–8.3% of the contaminated agricultural land).

The territory of the northern districts of the region was scaled according to ^{137}Cs as follows: from 1 to 5 Cu/km^2: Korosten – 44.7%, Lugyny – 90.2%, Malyn – 19.8%, Ovruch – 84.6%, Naryodychi – 81.2%, Olevsk – 61.9% of the total area of the contaminated territory. The percentage of the territory with a pollution density from 5 to 15 Cu/km^2 is as follows: Korosten – 2.9%, Lugyny – 2.4%, Malyn – 0.2%, Ovruch – 1.0%, Narodychi – 13.1%, Olevsk – 13.3% (Romanchuck, 2015). On such territories products "free" from radiation cannot be obtained. This is despite the fact that 30 years have passed since the Chernobyl disaster (Maringer et al., 2017).

Investigation of the ^{137}Cs content in the external environment showed that it amounts to 90% in the upper 20–30 cm layer. According to Michel et al. (2005), due to the penetration of radionuclides into the lower layers of the soil, inaccessible to the root system, as well as fixation with soil particles on average 0.7% of ^{137}Cs is lost per year.

The content of ^{137}Cs in the diet of the inhabitants of any area depends on the degree of pollution of the components of local food products, as well as on the ratio of imported and local products in the diet, the structure of the diet itself. In the US, the main source of ^{137}Cs is milk and meat (up to 60–70% of its total consumption), in Belarusian and Ukrainian Polissia these are milk (over 70% of daily intake) and potatoes (10–27%), but not bakery products as in other regions. This can be explained by the fact that bakery products are brought here from clean areas, and so local factors do not affect the concentration of ^{137}Cs in them (Matson et al., 2000, Maringer et al., 2017).

The natural processes of radionuclide decay in the 30 years since the disaster at the Chernobyl NPP have caused significant adjustments to the structure of radionuclide distribution in Ukraine. During this period the area of the territory where the contamination levels of ^{137}Cs exceeded 10 kBq/m^2 decreased by almost two times (Fig. 1).

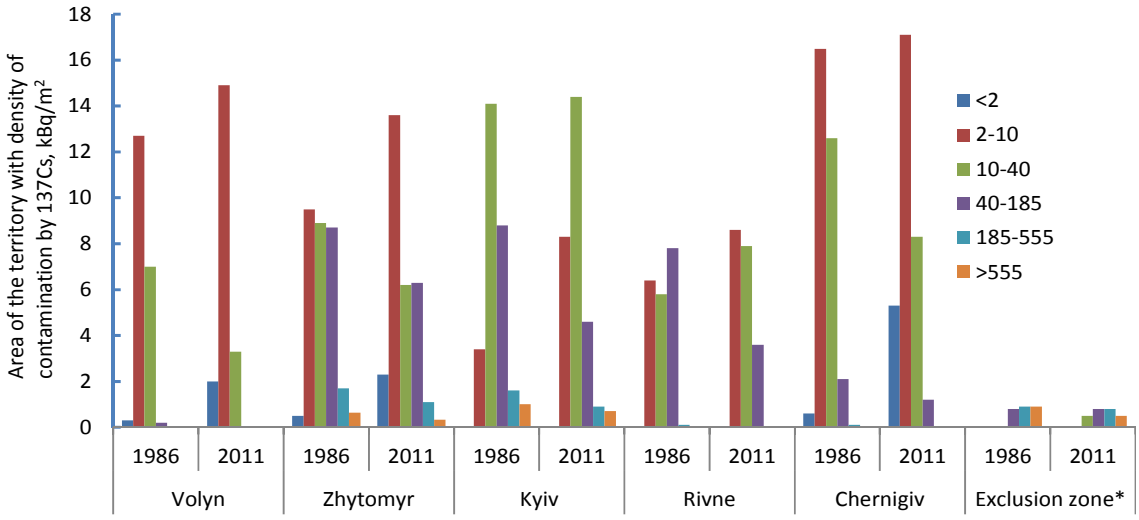


Fig. 1. Area of contamination with ^{137}Cs on the territory of Ukrainian Polissia in 1986 and 2011 (Romanchuck, 2015):
* – the area of the territory of the exclusion zone and the zone of unconditional mandatory resettlement, which is located on the territory of Kyiv region: in the tables in the first line the area of pollution was as of May 10, 1986, and in the second as of April 26, 2011

Studies on the distribution of radionuclides in the soil profile of all types of soils found that the main amount of radiocaesium in the long-term period after the disaster at the Chernobyl NPP is still concentrated in the arable soil layer (Michel et al., 2015). That is, the

main part of radionuclides is located in the root layer, and therefore, in the near future, one should not hope for their rapid movement into deeper horizons, and, consequently, for reduction of their penetration into plant products, and then intoanimals and human organisms.

The main region of contamination by radionuclides from the disaster at the Chernobyl NPP is located in Polissia region, which has granulometrically light soddy podzolic soils with low humus content, exchange bases and acidic pH. These conditions favour more intensive migration of ^{137}Cs into the "soil-plant" chain, which leads to its higher accumulation in plant and livestock products (Prister et al., 1992).

Many studies and observations have shown that the intensity of vertical migration is determined by the mechanical, physical and chemical properties of the soil, as well as the chemical nature of radionuclides (Ivanov et al., 1997). At the same time, the migration of radioactive substances along the profile of the soil may be the consequence both of the mechanical transfer of the particles from precipitation or soil particles with sorbent radionuclides, and the movement of free ions or their complexes with organic matter as a result of diffusion, convective transport with streams of water, formation of volatile compounds (Romanchuck et al., 2017).

As many studies show, 85–90% of radionuclide fallouts are accumulated in the upper layer of natural land or an arable layer of land, from where they are actively involved in trophic chains through root plant systems. Thus, in spite of sorption processes, redistribution of radionuclides on the soil profile, they remain within the zone of enhanced plant assimilation (Romanchuck et al., 2017).

The accumulation of radionuclides by various species and varieties of agricultural crops is determined by the peculiarity of mineral nutriation, the duration of the vegetative period, the nature of the distribution of root systems in the soil, different productivity and other biological characteristics. Leguminous cultures, as a rule, absorb most radionuclides more intensively than cereals (Prister et al., 1992).

Grain crops, tubers, root and vegetable crops have very low values of the transition coefficient of radionuclides from the soil. In addition, these cultures are traditionally grown on more fertile soil types, and more often using fertilizers. Therefore, in the long-term period after the disaster, radiocaesium content in these plant products did not exceed DR-2006 in almost all of the territory. However, when the local inhabitants grow vegetables, mainly potatoes, on black earth and soddy podzolic sandy and sandy loam soils, the specific activity of ^{137}Cs in products can reach the level of DR-2006, and sometimes exceed it. An example is the excess over the permitted content of ^{137}Cs in vegetables and potatoes grown on peat soils in recent years. The density of soil contamination with ^{137}Cs about 100 kBq/m^2 has a specific activity of radiocaesium in vegetables and potatoes that exceeds DR-2006 (Matson et al., 2000; Maringer et al., 2017).

An important factor that greatly changes the radiation situation in contaminated areas is the immobilization of radionuclides by the soil-harvesting complex. Moreover, the periods of half-decrease of the coefficients of radionuclide accumulation by plants owing to this process for ^{137}Cs are much smaller than periods of half-life of radionuclides, indicating more than decay, the contribution of immobilization processes to improving the radiation situation (Prister et al., 1992; Handl et al., 2003).

In recent years, due to the difficult economic situation in the country, there are cases of excess over DR-2006 content of radionuclides in agricultural products produced in the public sector in radioactive contaminated regions. This caused the necessity of carrying out a total monitoring of the quality of food consumed by the population in the northern districts of Zhytomyr region.

To assess the accumulation of ^{137}Cs in plant products, the activity of these radionuclides in potatoes, vegetable crops, root crops and grains was investigated, and coefficients of its transition from the soil to the products were calculated, which made it possible to estimate the intensity and volume of radionuclide accumulation at the completion of the half-life period of ^{137}Cs and the actual assessment of the radiation situation in the northern regions of Polissia.

Materials and methods

In the long-term period after the accident, the situation in the contaminated territories has improved and became predictable due to the natural processes of regeneration (physical decay of radionuclides, their redistribution and fixation in the soil profile) and implemention of countermeasures on the basis of monitoring. However, until today regions of Ukrainian Polissia produce agricultural products which do not meet the requirements of government regulations concerning the content of radionuclides in food and appear to be a danger to consumers exposure. The object of the research was the processes of migration of ^{137}Cs in the trophic chains, which lead to contamination of agricultural products and exposure of the population in the long-term period after the accident.

Materials of the research were samples of soil and plant products, selected on the plots of the residents of contaminated areas. Experimental studies on determining the radiation evaluation of soils and plant products were conducted in personal subsidiary farms of the residents of Zhytomyr Polissia (Table).

Table
Scheme of selecting samples
of agricultural products in residential places

Districts	Density of contamination, kBq/m^2	
	>555, zone 2	185–555, zone 3
Narodychi	small town Narodychi, villages Khrystynivka, Loznytsia, Selets, Rozsokhivske	village Radcha
Korosten	village Obykhody	town Korosten, villages Berestovets, Nemyrivka, Grozyne, Voroneve, Bekhy
Ovruch	villages Rudnia and Vystupovychi	Villages Mozhari, Novi Velidnyky, Slovechne, Lystvyn

The subject of the research is the concentration of ^{137}Cs in food products of vegetable origin in territories with different densities of radioactive contamination. The selection of soil samples for determining ^{137}Cs was conducted in accordance with state standard of Ukraine 4287:2004 "Soil quality. Sampling" and in accordance with "Methods of integrated radiation inspection of territories contaminated as a result of the Chernobyl disaster (except for the territory of the exclusion zone)". Before sampling, the gamma radiation dose (gamma background) in the air (expositional, absorbed or equivalent dose) was measured at the study site.

For this purpose, a checkered dosimeter DRG-01 T was used. Gamma shooting was conducted at a height of 1 m from the soil surface at five points. Measurements were made at least three times in each of the five points. The results of measurements were recorded in the logbook. Based on the obtained results, the average gamma dose rate was calculated. In the case when the maximum deviations did not differ from the average value by more than 30%, the site was considered to be homogeneously contaminated. When the maximum deviations differed from the average gamma dose rate by more than 30%, the plot was considered to be contaminated heterogeneously.

During the conducting of radiological control in a rural settlement, all its territory was taken as the surveyed area. In the natural landscape outside the settlement, an area of about 5 hectares was taken as the surveyed area.

Spot samples were taken with a sampler (a coring tube). To form a combined soil sample, 5 point samples were used. All sampling was carried out in 4 replications.

Preparation of soil samples for spectrometric studies was performed directly under laboratory conditions. The soil samples were dried at room temperature to air-dry state and ground on a grinding machine. After that, the soil was poured into Marinelli vessels, weighed on scales and a sample for measurements was placed into the device. The selection of plant products for determining ^{137}Cs was carried out in accordance with the guidelines "Sampling, initial processing and determination of ^{90}Sr and ^{137}Cs content in food products". In accordance with the requirements of the Law of Ukraine "On protection of

human rights against the effect of ionizing radiation" (15/98-BP), the content of radionuclides in food products, raw food materials and drinking water should not exceed the approved levels in the established order. Spot samples of plant products (corn cobs, green mass, tomatoes, beans, etc.) were collected from random plots of inhabitants by random sampling in 5–10 places. The mass of the average sample was not less than 1 kg.

Determination of ^{137}Cs in the soil and agricultural products was carried out in the Laboratory of Ecological Safety of Land, Environment and Quality of Products, at the Zhytomyr branch of the state institution "Institute for Soil Protection of Ukraine" with the help of the spectrometric method on a universal spectrometric complex "Gamma Plus" using a scintillation gamma spectrometer. The relative error of specific activity of radionuclides was 10–25%. Identifying specific activity of ^{137}Cs in plants and soil samples over the duration of investigations was carried out by the same methods and the same device, thus ensuring comparability of results throughout the entire period of the experiment.

Minimum specific activity when measuring in the geometry of a Marinelli vessel in standard protection for 1 hour with an error of measurement amounting to 25% was 3 Bq/kg. The energy range of γ-radiation is 0.05–3.00 MeV. As a parameter characterizing the migration of radionuclides in the soil-plant system, we used a transition coefficient (CT) equal to the ratio of the specific activity of the radionuclide in samples taken from plant products (Bq/kg) to the density of soil contamination (kBq/m^2).

The statistical processing of the material was carried out using the Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA) software packages. The methods of checking for the normality of the data distribution and the corresponding methods of correlation analysis were used. The graphs show the average data and the mean square deviation (SD).

Results

Density of soil contamination with ^{137}Cs in northern districts of Zhytomyr region. The density of soil contamination with ^{137}Cs and its specific activity in plant products grown on private plots were studied in three districts of Zhytomyr region: Narodychi, Korosten and Ovruch. Investigation of density of soil contamination with ^{137}Cs in Narodychi district, where five out of six investigated settlements belong to the zone of unconditional (obligatory) resettlement (small town Narodychi, villages Rozsokhivske, Selets, Loznytsia, Khrystynivka) and only one to the zone of guaranteed voluntary resettlement (Rudnia village), showed that the content of this radionuclide in these places is within the limits of 555 kBq/m^2 (Fig. 2).

The highest value of density of soil contamination was recorded in zone II within the villages Loznytsia – 417.2 kBq/m^2 and Khrystynivka – 401.8 kBq/m^2. The lowest indicator was noted in the village Rozscokhivske – 158.8 kBq/m^2. From the data of the figure it can be seen that the density of soil contamination on the plots of land in the village Radcha, which belongs to the third zone of radioactive contamination, amounted to 169.8 kBq/m^2, which in comparison with the adjoining areas of the second zone of the Narodychi district: small town Narodychi, villages Selets, Loznytsia and Khrystynivka, is respectively less – by 30.7%, 69.7%, 245.7% and 236.6%. It is worth noting that in the area adjacent to the village Rozskochivske (zone II) the density of soil pollution was less than in the village Radcha by 11 kBq/m^2 or 6.5%.

Consequently, the average density of contamination of plots in inhabited sites with ^{137}Cs was 271.5 kBq/m^2. This indicates that according to the level of soil contamination with ^{137}Cs and the Law of Ukraine "On the legal regime of the territory that was exposed to radioactive contamination as a result of the Chernobyl disaster", the territories under human settlement should still be allocated to the zone of unconditional (mandatory) resettlement. A similar situation also occurred in residential sites in Ovruch district. There 2 residential sites which are a part of the zone of unconditional (compulsory) resettlement (village Rudnia and village Vystupovychi) and 5 settlements of the guaranteed voluntary resettlement zone (town Ovruch, villages Slovechne, Mozhari, Lystvyn and Novi Velidnyky) were selected for investigation (Fig. 3).

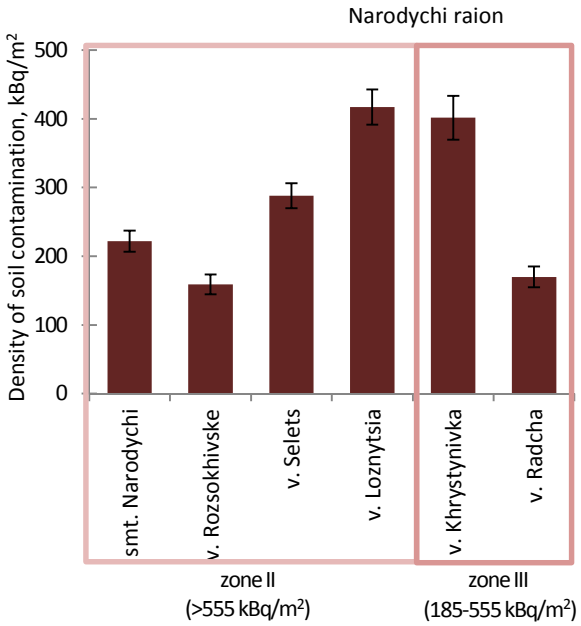


Fig. 2. Density of soil contamination with ^{137}Cs in six settlements of Narodychi district: vertical columns – average values, vertical bars – standard deviation, n = 20 for each group

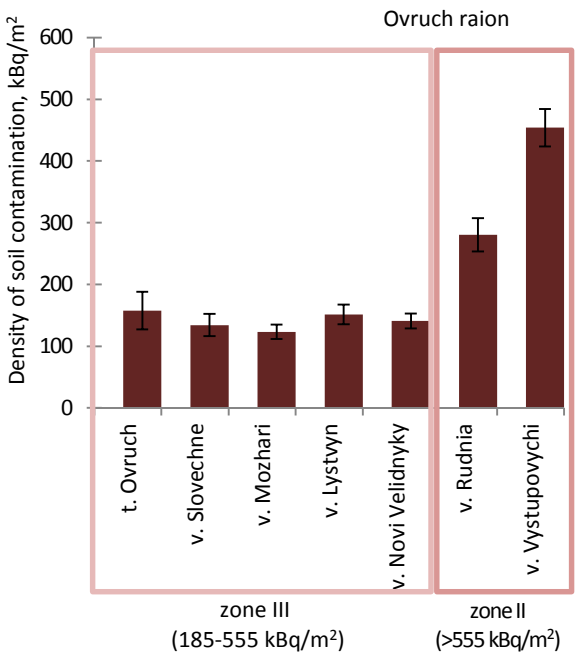


Fig. 3. Density of soil contamination with ^{137}Cs in settlements in Ovruch district: see Fig. 2

Investigation of activity of radionuclides of ^{137}Cs on the household plots of inhabitants of Ovruch district (II zone) showed that levels of contamination of plots of land were high. The highest value of density of soil contamination was recorded in zone II in the village Vystupovychi, where this indicator reached 454.0 kBq/m^2, which is 173.5 kBq/m^2, or 61.8% more than in the village Rudnia. In another populated area of zone II, Rudnia village indexes of soil pollution with ^{137}Cs were much lower – 280.5 kBq/m^2. Within zone III, the density of soil contamination with ^{137}Cs was 2–3 times lower compared with zone II. There, the density of soil contamination in all settlements was approximately on the same level and varied from

123.3 to 157.6 kBq/m^2. The level of contamination with ^{137}Cs of soils of private household plots in Ovruch district (III zone) was from 123.3, in Mozhari village and it amounted to 157.6 kBq/m^2, in Ovruch town. On average, the density of contamination with ^{137}Cs of plots in residential sites was 141.4 kBq/m^2. This indicates that according to the level of soil contamination with ^{137}Cs and the Law of Ukraine "On the legal regime of the territory that was exposed to radioactive contamination as a result of the Chernobyl disaster", the territory of human settlements still currently belongs to the zone of guaranteed (voluntary) resettlement.

In general, in Ovruch district, the density of soil contamination with ^{137}Cs was on average 367.3 kBq/m^2. This indicates that according to the level of soil contamination with ^{137}Cs and the Law of Ukraine "On the legal regime of the territory that was exposed to radioactive contamination as a result of the Chernobyl disaster", the territory of human settlements still currently belongs to the zone of unconditional (mandatory) resettlement; this is the territory that was subjected to intense pollution with long-lived radionuclides, with a density of soil contamination with isotherm caesium above the pre-accident level, which is from 15.0 Cu/km^2 and above, where the estimated effective equivalent dose of human radiation taking into account radionuclide migration in plants and other factors may exceed 5,0 mSv (0.5 rem) per year above the dose it received in the pre accident period.

There is another situation in the Korosten district. Seven residential sites were selected for research there, six of which belong to the zone of guaranteed voluntary resettlement (the town Korosten, the villages Grozyne, Voroneve, Berestovets, Bekhy and Nemyrivka) and one to the zone of unconditional (compulsory) resettlement (Obykhody village).

Studies on the activity of radionuclides in the soils of Korosten distrct (zone 3) showed that soil contamination of plots with ^{137}Cs was high and ranged from 153.8 in the village Berestovets to 239.7 kBq/m^2 in the village Bekhy, on average it was 193.6 kBq/m^2. The density of soil pollution in the residential sites can be divided into 2 groups: 1 – density of contamination up to 200 kBq/m^2 (the village Berestovets – 153.8, Grozyno – 170.2, Korosten town – 186.6 kBq/m^2), which was respectively 20.5%, 12.1% and 3.6% lower than the average in settlements, and group 2 – the contamination density was more than 200 kBq/m^2 (the villages Nemyrivka – 203.4, Voroneve – 207.7, Bekhy – 239.7 kBq/m^2), which is respectively 5.1%, 7.3% and 23.8% more than the average (Fig. 4).

In general, it should be noted that the most polluted were the settlements of Naryodychi and Ovruch districts, which belong to the zone of unconditional (mandatory) resettlement: the villages Vystupovychi, Loznytsia and Khrystynivka, where the density of pollution ranged from 454.0–401.8 kBq/m^2. Within the zone of guaranteed voluntary resettlement, the most polluted soils were in Korosten district, where the density of pollution sometimes reached 239.7 kBq/m^2 (village Bekhy).

Analysis of the density of soil pollution by ^{137}Cs isotopes in the northern part of Zhytomyr region in the post-accident period shows that even 30 years after the tragedy, large areas of arable land under certain conditions are potentially dangerous because of contamination of plant products.

Specific activity of ^{137}Cs in plant products grown on the plots of the inhabitants of the northern districts of Zhytomyr region

We studied the specific activity of ^{137}Cs in plant products grown on the plots of the inhabitants in the same residential sites where soil contamination was observed. We have compiled a list of food products that form the basis of the diets of residents of the northern districts of Zhytomyr region. In particular, the list of crops that were investigated included: potato tubers, white cabbage, fresh tomatoes, table beets, carrots, onions, beans, oat grains, corn grains.

The results of the research showed that the specific activity of ^{137}Cs in all plant products was lower than the permitted levels in Narodychi district within the settlements of zone III (village Radcha) (Fig. 5).

A slightly different situation occurred in human settlements places that belong to the second zone. In general, the specific activity of ^{137}Cs in plant products there dynamically varied from the minimum value of 4.1 (fresh tomatoes, village Rozskhivske) to the maximum – 82.4 Bq/kg (beans, village Loznytsia), depending on the type of plants. In particular, exceedance of the permissible level of specific activity of ^{137}Cs was observed in table beets in the settlements Loznytsia and Khrystynivka – 51.3 and 48.6 Bq/kg respectively, and table carrots in the settlement Loznytsia – 45 Bq/kg, in village Khrystynivka the content of ^{137}Cs in carrots practically approached the limit of the permissible level of 38.7 Bq/kg, while DR is 40 Bq/kg.

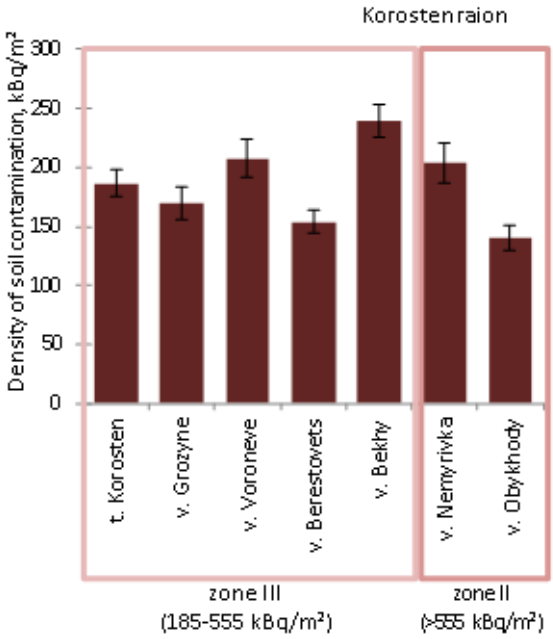


Fig. 4. Density of soil contamination with ^{137}Cs in settlements in Korosten district: see Fig. 2

It was discovered that the most critical product, where the highest specific activity of ^{137}Cs was recorded, was beans. Excess of the maximum permissible level of specific activity of ^{137}Cs in beans was fixed in 4 settlements: in village Loznytsia – 82.6 Bq/kg, which is 1.64 DR, village Khrystynivka – 77.4 Bq/kg, which is 1,54 DR, village Selets – 61.1 Bq/kg, which is 1.22 DR and the small town Narodychi – 54.2 Bq/kg, which is 1.1 DR – 2006.

In all other products, the specific activity of ^{137}Cs was low. In particular, the lowest values were recorded for onions, where, even in the most polluted settlements (villages Loznytsia and Khrystynivka), they varied within the range of 14.6–15.2 Bq/kg, while in other settlements of the Narodychi district they did not even exceed the limits of 10 Bq/kg (5.0–9.8 Bq/kg).

A similar situation was noted for fresh tomatoes and white cabbage. For tomatoes, the highest index of specific activity was recorded in the village Loznytsia – 17 Bq/kg and the village Khrystynivka – 15.8 Bq/kg, which is slightly less than half of DR-2006 (40 Bq/kg). For cabbage it was noted in the village Khrystynivka – 21.1 Bq/kg and the village Loznytsia – 20 Bq/kg. In other residential places, the specific activity of ^{137}Cs in tomatoes and cabbage was even lower and ranged from 4.1 to 12.7 Bq/kg and from 6.0 to 15.4 Bq/kg, respectively.

As is well known, a significant proportion of the diet of residents of the northern raions of Zhytomyr region is potatoes. Therefore, the data on the specific activity of ^{137}Cs in this product was of considerable interest. As a result of the research, no excess of DR-2006 was recorded in any of the settlements. The maximum recorded value of specific activity of ^{137}Cs was noted in the village Khrystynivka – 35.4 Bq/kg and in the village Loznytsia – 33.6 Bq/kg. In other settlements of the Narodychi district, the specific activity of ^{137}Cs in potato tubers was even lower and was noted at the level of 10.5–21.3 Bq/kg, which is about 1/3–1/6 of DR-2006 (60 Bq/kg). A slight specific activity of ^{137}Cs was observed in grain crops. In particular, oat grains and corn grains were checked. Specific activity in

the grains of both crops was approximately the same. The highest values recorded were recorded in the village Loznytsia – 28 Bq/kg in corn grains and the village Khrystynivka – 26.7 Bq/kg in oat grains and 27.3 Bq/kg in corn grains. Even lower rates were recorded in other settlements, where the specific activity of ^{137}Cs in oat grains varied from 11 to 20.2 Bq/kg and corn grains – from 11.5 to 21.6 Bq/kg, which is significantly lower than DR-2006 (50 Bq/kg). The coefficients of transition of ^{137}Cs in the settlements of zone 3 of Narodychi district (village Radcha) into plant products varied from 0.05 (fresh tomatoes) to 0.18 (beans). Depending on the type of plants, the highest CT values were characteristic for beans – 0.18 and table beets – 0.11. The lowest CT values were for onions and fresh tomatoes – 0.05. The situation was considerably better in the Korosten district, where, despite the rather high indicators of density of soil contamination with ^{137}Cs, plant products collected from the private plots of the inhabitants were "clean" (Fig. 6).

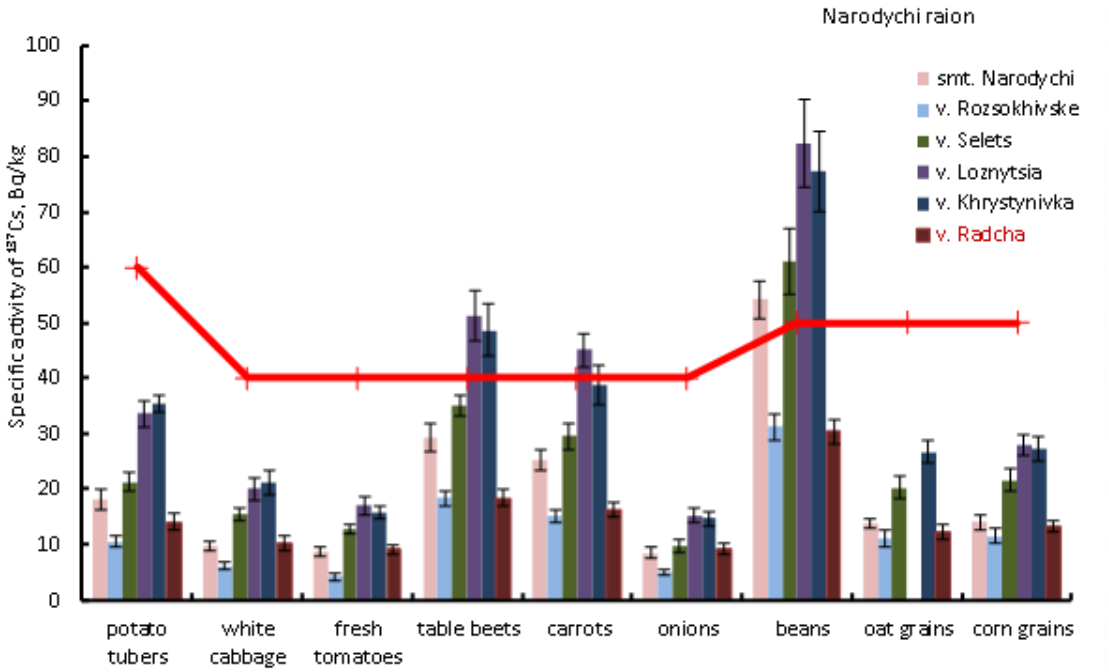


Fig. 5. Specific activity of ^{137}Cs in plant products grown on private plots of citizens in Narodychi district: the red line indicates the maximum permitted levels of ^{137}Cs radionuclide content in foodstuffs in accordance with the State Hygiene Standards of the Ministry of Health of Ukraine (dopustymi rivni vmistu radionuklidiv ^{137}Cs ta ^{90}Sr u kharchovykh produktakh ta pytniy vodi, DR-2006 [Acceptable levels of radionuclide ^{137}Cs and ^{90}Sr in food and drinking water, DR-2006]), in the legend, in red are identified the areas belonging to the zone III of radioactive contamination (guaranteed voluntary resettlement), the black zone – to zone II of radioactive contamination (unconditional (obligatory) resettlement); vertical columns – average values, vertical bars – standard deviation, n = 10 for each group

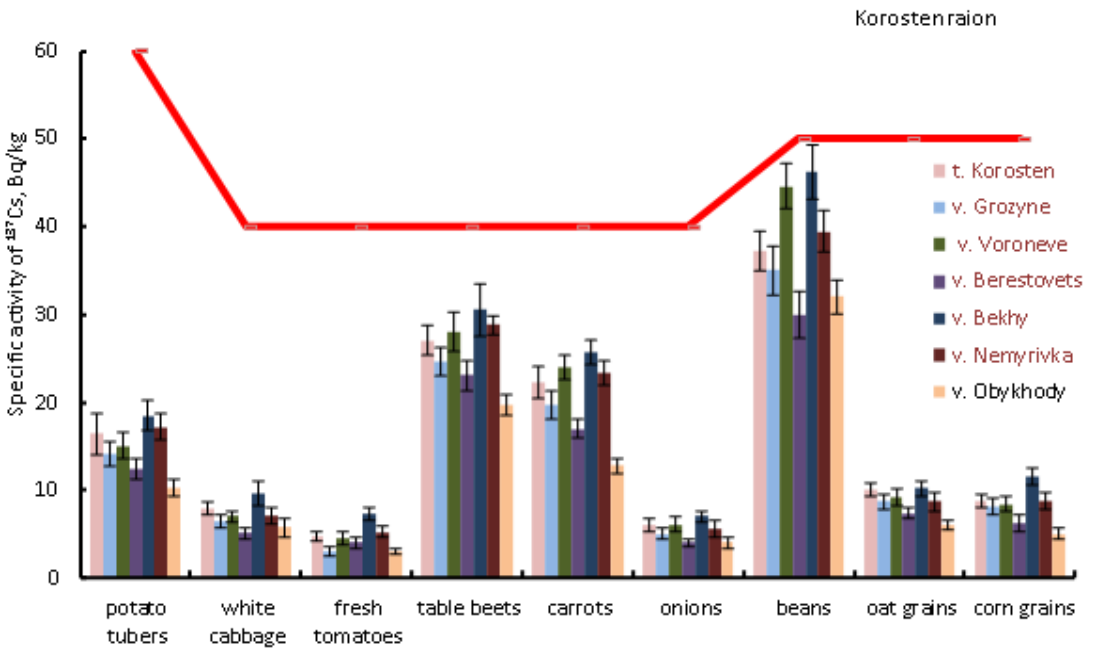


Fig. 6. Specific activity of ^{137}Cs in plant products grown on private plots of inhabitants of Korosten district: see Fig. 5

As in Narodychi district, the most critical products were beans, table beets and carrots. The highest values of specific activity of beans were recorded in village Bekhy – 46.3 Bq/kg and village Voroneve – 44.6 Bq/kg at DR-2006 – 50 Bq/kg, where previously the highest density of soil pollution with ^{137}Cs was noticed. In other settlements, the specific activity of ^{137}Cs in beans was roughly the same and in

zones II and III, there it varied within 30.0–39.4 Bq/kg. In table beet, the specific activity of ^{137}Cs did not exceed the DR-2006 in general, and it was the highest in village Bekhy – 30.5 Bq/kg, village Nemyrivka – 28.8 Bq/kg and village Voroneve – 28.1 Bq/kg, in other residential places the specific activity of ^{137}Cs in beets was even lower and ranged from 19.7 to 27 Bq/kg. A similar trend was noted for carrots, the maximum indicators of specific activity were recorded in the same settlements as for table beets. In general, the specific activity of ^{137}Cs for carrots in the district was recorded in the range from 12.8 to 25.7 Bq/kg, which is 1/3–1/2 ofthe established DR.

As in the previous district, the "cleanest" were onions and tomatoes. In these products, the specific activity of ^{137}Cs was 6–10 times lower than the established DR. For onions there was no significant fluctuation of values between the settlements, and in general, the indicators fluctuated within 4.0–7.0 Bq/kg, for tomatoes – 3.0–7.3 Bq/kg.

A similar trend was observed for white cabbage, in particular, the specific activity of ^{137}Cs in this product was 4–8 times lower than the established DR. Significant fluctuations of indicators in the context of settlements were also not noted and in general, the specific activity of ^{137}Cs in cabbage ranged from 5.1 to 9.7 Bq/kg. The specific activity of ^{137}Cs in potatoes was also not significant. In general, this value varied from 10.3 to 18.5 Bq/kg in the settlements of Korosten district, which did not exceed a third of the established DR-2006.

A slight specific activity of ^{137}Cs was observed in grain crops. Specific activity of ^{137}Cs in the grain of both crops was approximately the same. The highest rates were recorded in village Bekhy – 11.6 Bq/kg in corn and 10.2 Bq/kg in oats. Lower rates were noted in other settlements, where the specific activity of ^{137}Cs in oat grains varied from 6.0 to 10.1 Bq/kg and in corn grains from 5.0 to 11.6 Bq/kg, which is 5–10 times lower than DR-2006 (50 Bq/kg).

If we rank the crops according to the specific activity of ^{137}Cs, we obtain the following ranking: beans – 32, table beets – 19.7, carrots – 12.8, potato tubers – 10.3, white cabbage – 5.7, oat grains – 6.0, corn grains – 5.0, onions – 4.0 and fresh tomatoes – 3.0 Bq/kg.

One of the most critical was Ovruch district, in particular the village Vystupovychi, which belongs to zone II. In this settlement, a rather high level of soil pollution was noted – 454 kBq/m^2, this settlement proved to be the most critical out of all investigated settlements, and, accordingly, the highest values of the specific activity of ^{137}Cs were recorded in the products grown there (Fig. 7).

The activity of ^{137}Cs in general in the district varies widely enough – from 5.0 for onions (village Rudnia, density of soil contamination is 280.5 kBq/m^2) to table beets – 109.2 Bq/kg (village Vystupovychi, density of soil contamination 454.0 kBq/m^2).

As in the previous two districts, beans were the most critical product. Excess of DR-2006 for this type of product was recorded only in village Vystupovychi, where its specific activity reached 109 Bq/kg, which is 2 times more than the established DR-2006, in other settlements, the excess of DR was not recorded. Within zone III, the values of specific activity of ^{137}Cs in beans varied from 19.2 to 30.0 Bq/kg, while in village Rudnia which belongs to zone II as well as village Vystupovychi, the specific activity of ^{137}Cs in beans was 36.3 Bq/kg.

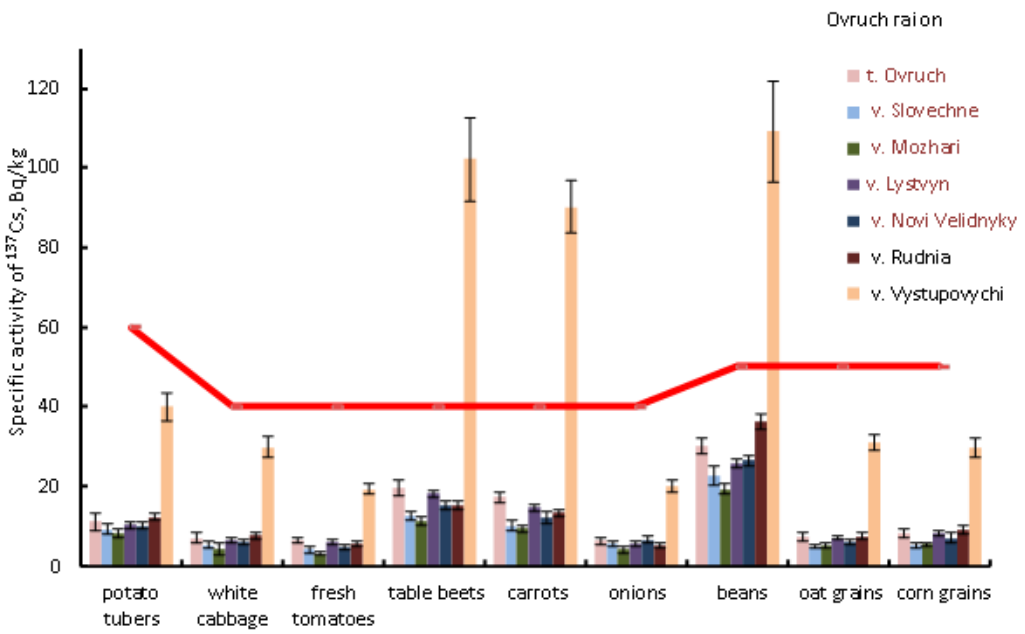


Fig. 7. Specific activity of ^{137}Cs in plant products grown on private plots of inhabitants of Ovruch district: see Fig. 5

Significant excess of DR-2006 in village Vystupovychi was also noted for table beets and carrots, the specific activity of ^{137}Cs in which was noted at 102.2 and 90.2 Bq/kg, which is 2.5 DR and 2.2 DR, respectively. In other residential places of the Ovruch district, excess of DR-2006 in products of table beets and carrots was not observed, and the values of specific activity were recorded at 11.2–19.4 Bq/kg for table beets and 9.4–17.2 Bq/kg for carrots.

Potato tubers accumulated ^{137}Cs slightly, that is, the trend noted in the Narodychi and Korosten districts was observed here as well. Exceedance of DR-2006 was not observed. In general, this value in the context of settlements of the Ovruch district ranged from 8.1 to 12.3 Bq/kg, which did not exceed one fifth of the established DR-2006. However, the highest index of specific activity of ^{137}Cs in potatoes, similar to other agricultural crops, was recorded in village Vystupovychi – 40 Bq/kg. Such cultures as white cabbage, tomatoes and onions were not polluted in this area. The highest indicators of specific activity for these products were recorded in village Vystupovychi – 29.7 Bq/kg for white cabbage, 20.1 Bq/kg for onions and up to 19.3 Bq/kg for tomatoes. In other settlements there were no significant variations in the indicators. For white cabbage the value varied from 4.3 to 7.5 Bq/kg, which is 5–9 times less than the DR-2006. For tomatoes, the variation of the indicators was within the range of 3.0–6.3 Bq/kg, which is 6–13 times less than the DR-2006. For onions – 4.0–6.6 Bq/kg, which is 6–10 times less than the DR-2006.

Insignificant specific activity of ^{137}Cs was noted in grain crops, as in other studied areas. Specific activity of ^{137}Cs in the grain of both crops was approximately the same. The highest rates were recorded in village Vystupovychi – 29.6 Bq/kg in corn and 30.8 Bq/kg in oats. Lower indexes were noted in other settlements, where the specific activity of ^{137}Cs in oat grains varied from 4.8 to 7.4 Bq/kg and in corn grains – from 5 to 9 Bq/kg, which is 5–10 times lower than DR-2006 (50 Bq/kg). Average specific activity of ^{137}Cs in the private plots in village Vystupovychi was 58.9 Bq/kg, and in village Rudnia it was 13.9 Bq/kg, which is by 45.0 Bq/kg, or by 76.4% lower.

The activity of ^{137}Cs in fresh tomatoes was 5.6 times lower than that of beans, for white cabbage – 3.7 times, for potatoes – 2.7, for carrots – 1.21 times lower than beans. It should be emphasized that the higher the density of soil contamination, the greater the SA of ^{137}Cs in plant products.

Consequently, according to the results of the research it is evident that the most critical settlements were located in the second zone – village Vystupovychi of Ovruch district and villages Loznytsia and Khrystynivka of Narodychi district. In these settlements, the excess of DR-2006 in plant products was observed, despite the fact that the excess of the maximum permissible level of density of soil pollution was not noted. Beans, table beets and carrots turned out to be the most critical in all areas of research.

Coefficients of transition of ^{137}Cs from the soil into plant products in the northern districts of Zhytomyr region

Analysis of literary sources has shown that the accumulation of ^{137}Cs in agricultural crops varies widely enough, depending on the content of humus, the reaction of the medium, the content of exchangeable forms of potassium, calcium in the soil, varietal features of plants. In previous investigations, we conducted monitoring research on agricultural land and in private farms of the most radioactively contaminated areas of Zhytomyr region.

The research covered various types of plant products, which significantly differed in the parameters of migration of Cs in the "soil – plant" system. Also, during the experiment, we determined the transition coefficients of ^{137}Cs in 9 types of agricultural crops. These cultures are known to form the basis of the diet of the population of radioactively contaminated territories, and due to the consumption of these products, a dose of internal radiation of the population is received.

The received transition coefficients characterize the current state of migration of ^{137}Cs from the soil to plant products in the private plots of inhabitants of residential places of Narodychi district. Investigating the activity of ^{137}Cs in plant products has shown that their content depends on the level of soil contamination by these radionuclides. The results of the research make it clear that the content of ^{137}Cs in plant products is directly proportional to the density of soil contamination by these radionuclides.

The results of the research in Narodychi district showed that the highest coefficients of transition of ^{137}Cs are characteristic for beans. During the study of all settlements in this area, the transition coefficients here approached the value of 0.2, and in the small town Narodychi and village Selets CT of ^{137}Cs in bean plants is even higher – 0.24 and 0.21, respectively. In other settlements, the transition coefficients were approximately the same – 0.18–0.20 (Fig. 8).

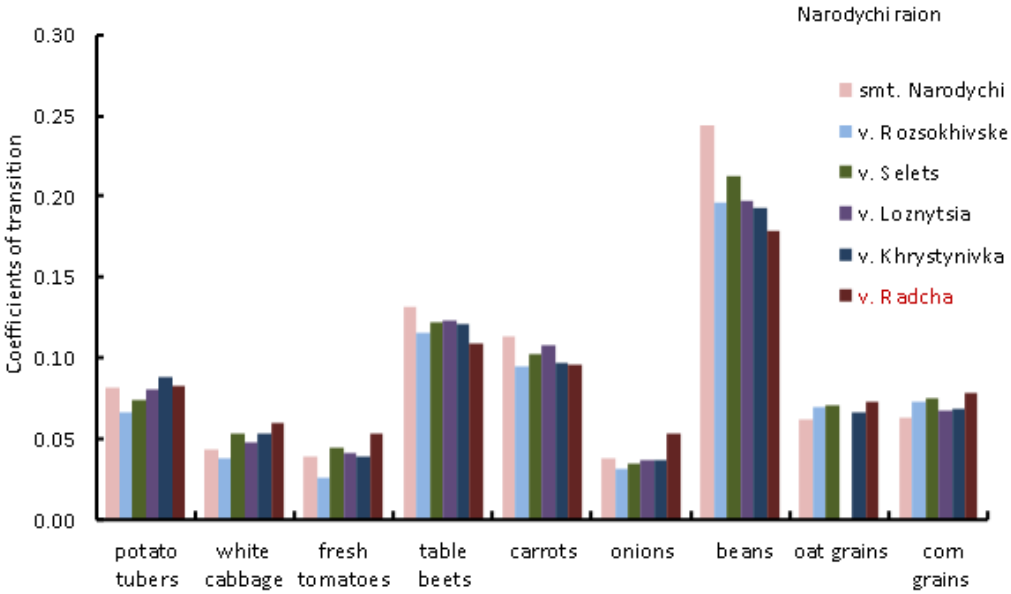


Fig. 8. Coefficients of transition of ^{137}Cs from the soil into plant products in Narodychi district: in the legend, in red are identified the areas belonging to the zone III of radioactive contamination (guaranteed voluntary resettlement), the black zone – to zone II of radioactive contamination (unconditional (obligatory) resettlement)

Somewhat lower coefficients of transition are characteristic of crops, table beets and carrots, in which excess of DR-2006 was recorded in the most polluted settlements – village Loznytsia and village Khrystynivka. For both of these cultures, the highest coefficients of transition of ^{137}Cs were also noted in the small town Narodychi – 0.13 for table beets and 0.11 for carrots. In other settlements, the coefficients of transition were recorded at almost one level – 0.12, except for the village Radcha, where this value was 0.11. For carrots, CT in the context of settlements varied in the range of 0.09–0.11.

Even lower coefficients of transition are characteristic for potato tubers. In particular, the highest CT was calculated for the village Khrystynivka – 0.09, in other settlements it was 0.07–0.08.

Approximately in the same quantities ^{137}Cs passes into the studied grain crops – oat and corn grains. For both of these crops, CT was calculated at 0.07, only in the small town Narodychi was CT lower – 0.06. We associate this fact with a variety of soil conditions in the area under research.

The lowest CT was recorded for white cabbage, onions and tomatoes. For white cabbage the maximum CT was calculated at the level of 0.06 in village Radcha, the minimum 0.04 – in the small town Narodychi and village Rozsokhivske. For onions and tomatoes, maximum CT was also calculated in village Radcha – 0.05 for both cultures, the minimum – 0.03 in village Rozsokhivske.

Thus, according to the results of research, it is clear that in order of decreasing value of CT of ^{137}Cs, the crops are ranked as follows: beans (0.24), table beets (0.12), carrots (0.11), potato tubers (0.08), corn grains (0.07), oat grains (0.06), white cabbage (0.05) and onions (0.04). From the data it is clear that ^{137}Cs in grain crops is mostly carried out from soil with vegetative weight of plants, namely corn grown for grain and has a CT of 0.07. Grain crops can also be arranged in a descending order: corn grain – oats grain.

Plant products grown on private plots in settlements of Korosten district (zone II) according to GN 6.6.1.1-130-2006 "Acceptable levels of ^{137}Cs in food and drinking water" meet the criteria for radiation safety. The coefficients of transition of ^{137}Cs to plant products differ from each other by 8.69 times.

Similarly to the data obtained in Narodychi district, the highest coefficients of transition of ^{137}Cs were characteristic of beans. The range of CT values was similar to that obtained in Narodychi district. Almost all the values of CT of ^{137}Cs in beans were close to

0.20 and in village Obykhody it was even higher – 0.23. In other settlements, the transition coefficients were approximately the same – 0.19–0.21 (Fig. 9).

Higher CT of ^{137}Cs for table beets and carrots were obtained in Korosten district in comparison with CT of ^{137}Cs for similar crops in Narodychi district. The highest CT of ^{137}Cs for table beets was calculated in village Berestovets – 0.15, in other settlements CT of ^{137}Cs was 0.13–0.14. The coefficients of transition of ^{137}Cs for carrots were at the same level for practically all settlements – 0.11–0.12, only in village Obykhody was the CT of ^{137}Cs lower – 0.09.

The highest CT of ^{137}Cs for potato tubers was recorded in the town Korosten – 0.09. The lower coefficients were calculated for other settlements 0.07–0.08, which again confirms the data obtained in Narodychi district. If compared to Narodychi district, received CT of ^{137}Cs for grain crops, oat and corn grains were lower. For both of these crops CT was calculated at the level of 0.04–0.05.

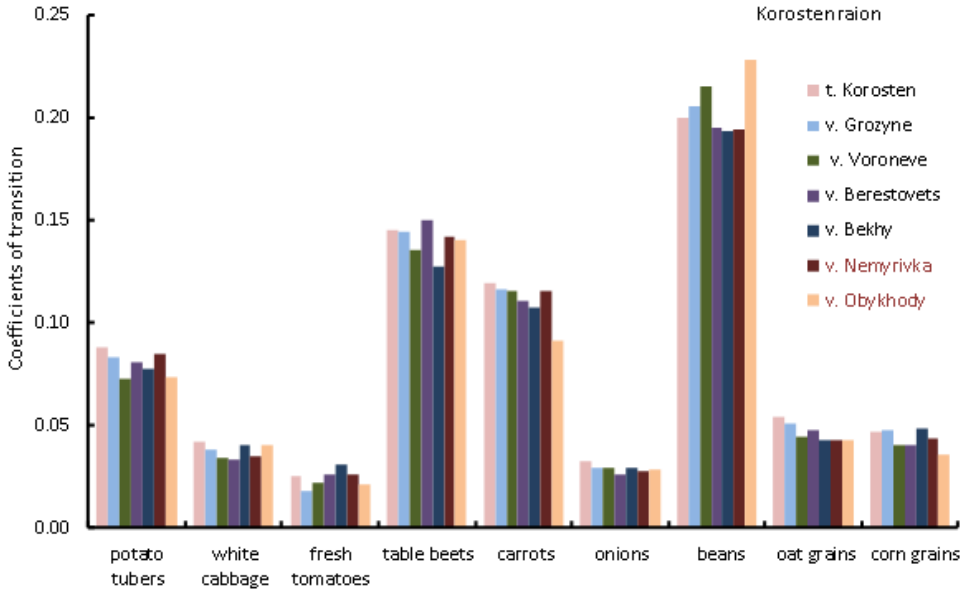


Fig. 9. Coefficients of transition of ^{137}Cs from the soil into plant products in Korosten district: see Fig. 9

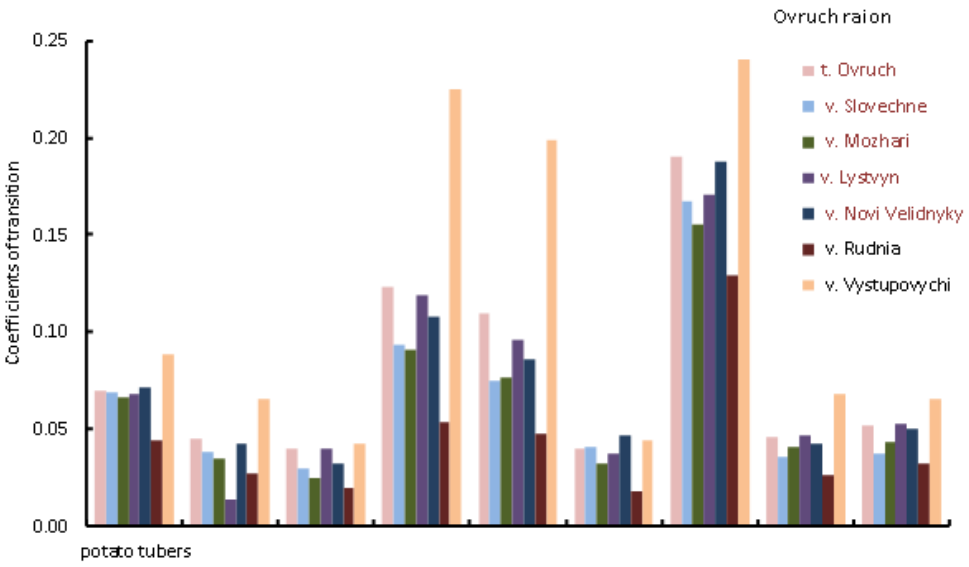


Fig. 10. Coefficients of transition of ^{137}Cs from the soil into plant products in Ovruch district: see Fig. 8

The lowest CT of ^{137}Cs was characteristic of white cabbage, onions and tomatoes. For white cabbage, CT of ^{137}Cs appeared to be lower than in Narodychi district and varied in the range of 0.03–0.04. For onions and tomatoes CT of ^{137}Cs for both cultures varied within the range of 0.02–0.03, which is also lower than in Narodychi distict.

According to the results of research in Ovruch district, the highest coefficients of transition of ^{137}Cs were observed for beans, similar to the data obtained in Narodychi and Korosten districts. However, CT of ^{137}Cs varied in a wider range of values than in the previous two districts. The highest CT of ^{137}Cs was recorded in village Vystupovychi, where the density of soil contamination with ^{137}Cs was the highest among all selected samples – 454 kBq/m^2. CT of ^{137}Cs in bean plants calculated for other settlements of Ovruch district varied from 0.16 to 0.19. Only in village Rudnia was CT of ^{137}Cs calculated at the level of 0.13 (Fig. 10).

The highest CT of ^{137}Cs in table beets and carrots was obtained from the calculations of data obtained in village Vystupovychi. Here they amounted to 0.23 for table beets and 0.20 for carrots. These CT values of ^{137}Cs were the highest among all of the studied districts. The lowest CT of ^{137}Cs was obtained in village Rudnia, there CT of ^{137}Cs for table beets and for carrots was 0.05. In other settlements of the district, the value of CT of ^{137}Cs varied for beets in the range from 0.09 to 0.12, and for carrots – from 0.7 to 0.12, which practically confirms the data obtained earlier in Narodychi and Korosten districts.

The highest CT of ^{137}Cs in potato tubers were also obtained in village Vystupovychi – 0.09, however, for this culture there was no

significant difference in coefficients in comparison with other settlements (CT of ^{137}Cs = 0.07), which completely corresponds to the data obtained in the other districts researched. The lowest CT of ^{137}Cs in potato tubers was obtained in village Rudnia, there it was 0.04.

Similar data for CT of ^{137}Cs in grain crops were obtained in all three districts researched. In particular, calculated CT of ^{137}Cs for oat and corn grains in Ovruch district varied within 0.04–0.05. The highest value was obtained in village Vystupovychi, where CT of ^{137}Cs was at the level of 0.07, the lowest in village Radcha – 0.03 for both cultures.

Similarly to data obtained in other districts, ^{137}Cs accumulated in white cabbage, tomatoes and onions. In particular, for white cabbage CT of ^{137}Cs was 0.03–0.04. The highest CT of ^{137}Cs was received in village Vystupovychi – 0.07. The lowest CT of ^{137}Cs was recorded in village Lystvyn – 0.01. We associate this difference with the difference in the soil conditions of these settlements. For tomatoes, obtained CT of ^{137}Cs repeated the data from other districts researched. Here, CT of ^{137}Cs varied slightly – 0.02–0.04. A similar trend is also characteristic for CT of ^{137}Cs in onions (0.02–0.05).

In general, the analysis of calculated CT of ^{137}Cs according to the data obtained in the three northern districts of Zhytomyr region showed that regarding the accumulation of ^{137}Cs, the most critical products were beans, table beets and carrots. The highest CT of ^{137}Cs was obtained in all three districts – village Obykhody in Korosten district, village Vystupovychi in Ovruch district and the small town Narodychi. The average CT of ^{137}Cs in beans was recorded at 0.20 (Fig. 11).

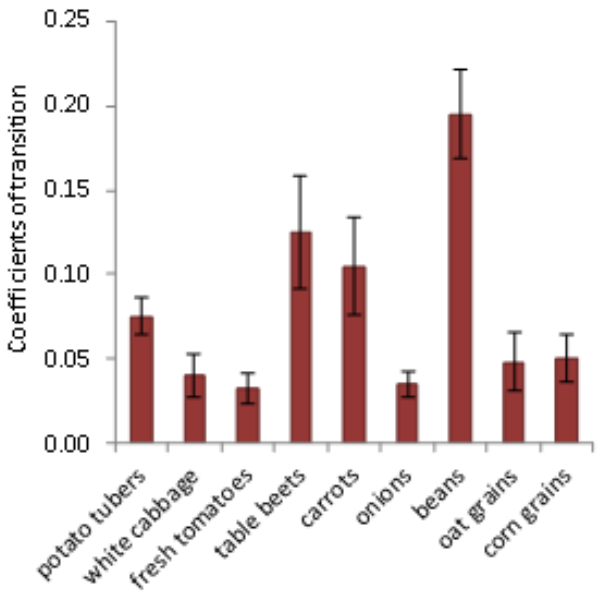


Fig. 11. Average coefficients of transition of ^{137}Cs from the soil into plant products in the northern districts of Zhytomyr region: vertical columns – average values, vertical bars – standard deviation, n = 20 for each group

For table beets, the average value of CT of ^{137}Cs was 0.13. However, the maximum value was 0.23 in village Vystupovychi of Narodychi district. The average value of CT of ^{137}Cs for carrots was calculated at the level of 0.11. Lower CT of ^{137}Cs was detected in the analysis of data on the accumulation of ^{137}Cs in potato tubers, where CT of ^{137}Cs was marked at 0.08.

Significantly lower average values of CT of ^{137}Cs were calculated for oat and corn grains – 0.05, white cabbage and onions – 0.04, and fresh tomatoes – 0.03. Thus, according to the results of the research, it is clear that in order of decreasing value of CT of ^{137}Cs, the crops are ranked as follows: beans > table beets > carrots > potato tubers > corn grains > oat grains > white cabbage > onions > fresh tomatoes. The results of the studies indicate that there is a direct proportional relationship between activity of ^{137}Cs in vegetable crops and the density of soil contamination.

According to GN 6.6.1.1-130-2006 "Permissible levels of radionuclide content of ^{137}Cs in food and drinking water", the activity of ^{137}Cs in potatoes should not exceed 60 Bq/kg, in fresh vegetables and legume crops – 40 Bq/kg. Therefore, vegetable products grown on private plots in Ovruch district do not all meet the criteria for radiation safety.

Discussion

The Chernobyl disaster led to the pollution of agricultural lands with a mixture of nuclear fission products, plutonium radionuclides and other transuranium elements. The radiation effects of the Chernobyl emissions are determined at present and for the long-term period by biologically significant radionuclides.

Over the period of the development of nuclear energy at enterprises of the nuclear fuel cycle, more than 450 radiation accidents with various consequences for the environment and different amounts of radionuclides that entered the biosphere have occurred. The disaster at the Chernobyl NPP was the largest of them. The most dangerous artificial radionuclides that contaminated the environment were ^{131}I, ^{137}Cs and ^{90}Sr. Among the paths of radionuclide entry into the human body, the main one is oral. Long after the accident, long-lived radionuclides ^{137}Cs and ^{90}Sr, which form the dose of internal radiation, were entering the human body through food products.

As has been previously mentioned, the main ecological consequence of the Chernobyl disaster is the pollution of soils and agricultural products with long-lived, biologically significant radionuclide ^{137}Cs. The analysis of our experimental data once again confirmed the results of a number of studies obtained in various traces of the fallout from the Chernobyl NPP; it showed that the dynamics of the transition of radionuclides from the soil to plants significantly depends on the physical and chemical properties of soils, the properties of radionuclides as isotopes of specific chemical elements and relations of different components of fallout in various traces of emission (Handl et al., 2003).

Outside the exclusion zone, the primary role in dosage formation, as in previous years (Prister et al., 1992; Handl et al., 2003; Hinton et al., 2007), belongs to ^{137}Cs. In most areas outside the 30 km zone, the radionuclide composition of precipitation is now presented by ^{137}Cs, which accumulated in a condensation form. This form is practically completely soluble and the mobility of ^{137}Cs is determined by its interaction with the soil and the transformation of the forms of connection with it. Soils are among the main objects where ^{137}Cs radionuclides are concentrated to this day. They migrate intensively from the soil and accumulate in plant and animal products, and subsequently enter the human body.

Radionuclides of caesium and strontium are rather tightly bound to the soil. The main part of them – 90–97% is concentrated as in previous experimental periods in the upper 20–25-centimeter layer of meadow soils and in the arable layers of soils of all types (Prister et al., 1992).

The most polluted residential places identified in our study were situated in Narodychi and Ovruch districts, and belong to the zone of unconditional (mandatory) resettlement. Within the zone of guaranteed voluntary resettlement, the most polluted soil was in the Korosten district. That is, despite the fact that the half-life of the radonuclide has practically been completed, the soils of the investigated areas still remain contaminated.

The analysis of the calculated CT of ^{137}Cs, according to the data obtained in the three northern districts of Zhytomyr region showed that beans, table beets and carrots were the most critical regarding the accumulation of ^{137}Cs. This is somewhat contradictory to the data obtained earlier, since the CT obtained for table beet and carrot exceeds the data obtained by previous researchers (Prister et al., 1992, Handl et al., 2003). The highest CT of ^{137}Cs was obtained in all three districts, these were the villages Obykhody in Korosten district, Vystupovychi in Ovruch district and the small town Narodychi. The average CT of ^{137}Cs in beans was recorded at 0.20, which completely coincides with and confirms the data obtained earlier (Strand et al., 1996, Hinton et al., 2007). Thus, the research conducted shows that different types of plant

products absorb and accumulate ^{137}Cs with different intensities, which can be explained by the peculiarity of their mineral nutrition. For the population living on radioactively contaminated territories, plant products grown on private plots have been and still remain the main source of ^{137}Cs radionuclides entering the body.

Sources from the literature indicate that on the basis of long-term research, scientists have established a linear relationship between the content of ^{137}Cs in agricultural crops and the density of soil contamination and the plant species concerned when accumulating these radionuclides. This is also confirmed by the results of our research. Thus, the radiation situation in the contaminated areas is first of all determined by the intensity of the inclusion of radionuclides in the trophic chain, which depends on the type of soil and technological and environmental conditions of production.

Under new conditions, the bulk of products, at least 90%, are produced by farmers and land owners. It is necessary to provide each one of them with accurate information on levels of pollution and ecological properties of soils. New landowners should take the initiative and collect information on the density of soil contamination, products of plant and animal origin from the state authorities and previous landowners. Such information should be obtained and summarized annually.

Conclusions

Soils of agricultural landscapes are one of the main objects where radionuclides of ^{137}Cs are concentrated. They are intensively transferred from the soil into biogenic migration through trophic chains and are accumulated in products of plant and animal origin and subsequently enter the human body. Settlements within Narodychi and Ovruch districts, which belong to the zone of unconditional (mandatory) resettlement, turned out to be the most polluted; these are the villages Vystupovychi, Loznytsia and Khrystynivka, where the density of pollution varied in the range 454.0–401.8 kBq/m^2. Within the zone of guaranteed voluntary resettlement, the most polluted soil was in Korosten district, where the density of pollution sometimes reached 239.7 kBq/m^2 (village Bekhy). It was found that the most critical product, which recorded the highest specific activity of ^{137}Cs, was beans. Excess of the maximum permissible level of specific activity of ^{137}Cs in beans was registered in 4 settlements, which belong to the second zone: in the villages Loznytsia – 82.6 Bq/kg, which is 1.64 DR, Khrystynivka – 77.4 Bq/kg, which is 1.54 DR, Selets – 61.1 Bq/kg, which is 1.22 DR and the small town Narodychi – 54.2 Bq/kg, which is 1.1 DR – 2006. The analysis of calculated CT of ^{137}Cs according to the data obtained in the three northern districts of Zhytomyr region showed that beans, table beets and carrots were the most critical products regarding the accumulation of ^{137}Cs. The highest CT of ^{137}Cs was obtained in all three districts – the villages Obykhody in Korosten district, the village Vystupovychi in Ovruch district and the small town Narodychi. The average CT of ^{137}Cs in beans was recorded at the level 0.20.

References

Dancause, K. N., Yevtushok, L., Lapchenko, S., Shumlyansky, I., Shevchenko, G., Wertelecki, W., & Garruto, R. M. (2010). Chronic radiation exposure in the Rivne – Polissia region of Ukraine: Implications for birth defects. American Journal of Human Biology, 22(5), 667–674.

Evangeliou, N., Hamburger, T., Talerko, N., Zibtsev, S., Bondar, Y., Stohl, A., Balkanski, Y., Mousseau, T. A., & Møller, A. P. (2016). Reconstructing the Chernobyl Nuclear Power Plant (CNPP) accident 30 years after. A unique database of air concentration and deposition measurements over Europe. Environmental Pollution, 216, 408–418.

Goulko, G. M., Chepurny, N. I., Jacob, P., Kairo, I. A., Likhtarev, I. A., Pröhl, G., & Sobolev, B. G. (1998). Thyroid dose and thyroid cancer incidence after the Chernobyl accident: Assessments for the Zhytomyr region (Ukraine). Radiation and Environmental Biophysics, 36(4), 261–273.

Handl, J., Beltz, D., Botsch, W., Harb, S., Jakob, D., Michel, R., & Romantschuk, L. D. (2003). Evaluation of radioactive exposure from ^{137}Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. Health Physics, 84(4), 502–517.

Hinton, T. G., Alexakhin, R., Balonov, M., Gentner, N., Hendry, J., Prister, B., Strand, P., & Woodhead, D. (2007). Radiation-induced effects on plants and animals: Findings of the United Nations Chernobyl Forum. Health Physics, 93(5), 427–440.

Ivanov, Y. A., Lewyckyj, N., Levchuk, S. E., Prister, B. S., Firsakova, S. K., Arkhipov, N. P., Arkhipov, A. N., Sandallsg, J., & Askbrant, S. (1997). Migration of ^{137}Cs and ^{90}Sr from Chernobyl fallout in Ukrainian, Belarussian and Russian soils. Journal of Environmental Radioactivity, 35(1), 1–21.

Jacob, P., Fesenko, S., Bogdevitch, I., Kashparov, V., Sanzharova, N., Grebenshikova, N., Isamov, N., Lazarev, N., Panov, A., Ulanovsky, A., Zhuchenko, Y., & Zhurba, M. (2009). Rural areas affected by the Chernobyl accident: Radiation exposure and remediation strategies. Science of the Total Environment, 408(1), 14–25.

Maringer, F. J., Ackerl, C., Baumgartner, A., Burger-Scheidlin, C., Kocadag, M., Sterba, J. H., Stietka, M., & Welch, J. M. (2017). Long-term environmental radioactive contamination of Europe due to the Chernobyl accident-Results of the Joint Danube Survey 2013. Applied Radiation and Isotopes, 126, 100–105.

Michel, R., Daraoui, A., Gorny, M., Jakob, D., Sachse, R., Romantschuk, L. D., Alfimov, V., & Synal, H. A. (2015). Retrospective dosimetry of Iodine-131 exposures using Iodine-129 and Caesium-137 inventories in soils – A critical evaluation of the consequences of the Chernobyl accident in parts of Northern Ukraine. Journal of Environmental Radioactivity, 150, 20–35.

Michel, R., Handl, J., Ernst, T., Botsch, W., Szidat, S., Schmidt, A., Jakob, D., Beltz, D., Romantschuk, L., Synal, H.-A., Schnabel, C., & López-Gutiérrez, J. (2005). Iodine-129 in soils from Northern Ukraine and the retrospective dosimetry of the iodine-131 exposure after the Chernobyl accident. Science of the Total Environment, 340(1), 35–55.

Prister, B. S. (2007). Vedennya sil's'kohospodars'koho vyrobnytstva na terytoriyakh, zabrudnenykh vnaslidok Chornobyl's'koyi katastrofy, u viddalenyy period. Metodychni rekomendatsiyi [Agricultural production in areas contaminated by the Chernobyl disaster in the remote period. Guidelines]. Atika-N, Kyiv (in Ukrainian).

Prister, B., Loshchilov, N., Perepelyatnikova, L., Perepelyatnikov, G., & Bondar, P. (1992). Efficiency of measures aimed at decreasing the contamination of agricultural products in areas contaminated by the Chernobyl NPP accident. Science of the Total Environment, 112(1), 79–87.

Romanchuck, L. D., Fedonyuk, T. P., & Fedonyuk, R. G. (2017). The model of landscape vegetation influence on the mass transfer processes. Biosystems Diversity, 25(3), 203–209.

Romanchuk, L. D. (2015). Radioekologichna ocinka formuvannya dozovogo navantazhennya u meshkantciv sil's"kykh terytorij Polissya Ukrajiny [Radioecological assessment of the formation of the dose load of the inhabitants of rural areas of Polissia of Ukraine], Polissya, Zhytomyr (in Ukrainian).

Strand, P., Balonov, M., Skuterud, L., Hove, K., Howard, B., Prister, B. S., Tmvnikova, I., & Ratnikov, A. (1996). Exposures from consumption of agricultural and semi-natural products. The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident, 16544, 261–269.

Zablotska, L. B. (2016). 30 years after the Chernobyl Nuclear Accident: Time for reflection and re-evaluation of current disaster preparedness plans. Journal of Urban Health, 93(3), 407–413.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 455–460
doi: 10.15421/021770

Prospects of using algae in biofuel production

Y. I. Maltsev, T. V. Konovalenko, I. A. Barantsova, I. A. Maltseva, K. I. Maltseva

Bogdan Khmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, Melitopol, Ukraine

Article info

Received 08.07.2017
Received in revised form 11.08.2017
Accepted 14.08.2017

Bogdan Khmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, Getmanska Str., 20, Melitopol, 72312, Ukraine. Tel.: +38-096-548-34-36. E-mail: mz_5@ukr.net

Maltsev, Y. I., Konovalenko, T. V., Barantsova, I. A., Maltseva, I. A., & Maltseva, K. I. (2017). Prospects of using algae in biofuel production. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 455–460. doi: 10.15421/021770

The development of industry, agriculture and the transport sector is associated with the use of various energy sources. Renewable energy sources, including biofuels, are highly promising in this respect. As shown by a number of scientific studies, a promising source for biofuel production that would meet modern requirements may be algal biomass. After activation of the third generation biodiesel production it was assumed that the algae would become the most advantageous source, because it is not only able to accumulate significant amounts of lipids, but could reduce the of agricultural land involved in biofuel production and improve air quality by sequestering CO_2. However, a major problem is presented by the cost of algae biomass cultivation and its processing compared to the production of biodiesel from agricultural crops. In this regard, there are several directions of increasing the efficiency of biodiesel production from algae biomass. The first direction is to increase lipid content in algae cells by means of genetic engineering. The second direction is connected with the stimulation of increased accumulation of lipids by stressing algae. The third direction involves the search for new, promising strains of algae that will be characterized by faster biomass accumulation rate, higher content of TAG and the optimal proportions of accumulated saturated and unsaturated fatty acids compared to the already known strains. Recently, a new approach in the search for biotechnologically valuable strains of algae has been formed on the basis of predictions of capacity for sufficient accumulation of lipids by clarifying the evolutionary relationships within the major taxonomic groups of algae. The outcome of these studies is the rapid cost reduction of biofuel production based on algae biomass. All this emphasizes the priority of any research aimed at both improving the process of production of biofuels from algae, and the search for new sources for biofuel production.

Keywords: bioenergy; biodiesel; algae; algal biomass; biofuels from algae

Introduction

The development of industry, agriculture and the transport industry is inevitably connected with the use of various energy sources. Currently, traditional resources are as follows: oil, gas and coal, as well as alternative ones: solar radiation, wind, energy from the sea tides and rivers, the heat of the Earth's interior, nuclear or atomic energy. At the same time, the reduction of mineral resources, primarily fuel and energy, is increasingly stimulating the use of their analogues. Nowadays countries with developed and developing economies are considering renewable energy sources (RES) as the most promising direction. Thus, the share of renewable energy in primary energy consumption in the EU countries reached 12.5% as early as 2010. According to EU Directive 2009/28, the share of renewable energy sources should reach 20% by 2020. This strategy implies an emphasis on overcoming the shortage of energy resources by the development of bioenergy.

One of the important characteristics of all energy sources is their environmental safety. Taking into account the current level of scientific achievements and the requirements of society for sustainable development of the economy in a manner which does not endanger the health of the population, considerable attention is being paid to those energy sources which are characterized by the safest production and use (Dubrovin and Dragnev, 2006; Skoruk et al., 2011; Breuer et al., 2012; Chen et al., 2012; Moheimani et al., 2015; Johnson et al., 2016; Unkefer et al., 2017). One such resource is fuel of biological origin. Obtaining energy from bio resources is one of the directions of environmental biotechnology related to the effective use of photosynthetic energy. It is with the help of bioenergy that it is planned, on the one hand, to step up the transition to environmentally friendly and resource-saving energy, and on the other, to increase the energy efficiency of the world economy (Unkefer et al., 2017).

The use of biomass as fuel is one of the few real mechanisms to reduce the greenhouse effect, since plant waste is neutral with respect to the balance of carbon dioxide in the atmosphere: when it is burned, the same amount of CO_2 is released, which was absorbed during the growth of plants. Compared to fossil fuels, biomass combustion significantly reduces CO_2 and CO_2 emissions, and significantly reduces the amount of ash after combustion (Borowitzka and Moheimani, 2013).

One of the most important tasks of bioenergy is the search for sources suitable to obtain fuel from. A significant number of studies and technologies proposed are based on obtaining fuel from vegetable sources: oilseeds, cereals and sugar crops (biofuel of the first generation) (Dubrovin, 2006; Skoruk et al., 2011). Another source for production could be fat-containing waste of agricultural production, processed by methods of pyrolysis of biomass using BTL technology "Biomass to liquid" (biofuel of the second generation) (Skoruk et al., 2011). As shown by a number of scientific studies, a promising source for biofuel production that would meet modern requirements may be algal biomass (biofuel of the third generation) (Grinyuk, 2009; Ruffing and Trahan, 2014; Piligaev et al. 2015; Newby, et al., 2016; Unkefer et al., 2017).

Despite the fact that the production of bioethanol and biodiesel plays an important role in the transition from a traditional economy

based on the use of non-renewable resources to an ecologically safe economy, the active use of biofuels in many countries of the world could lead to a number of problems. The main deterrent effect in the production biofuel of the first generation is the employment of vast areas of fertile land – after all, instead of cultivation of crops on valuable agricultural lands, these lands are used to grow raw materials for biofuel production – rape, soybean, sugar cane, etc. (Bozhydarnyk et al., 2014).

It is the technology of biofuel production from algae that can solve the problems of shortage of sources and reduction in the amount of land used for biofuel production. The efficiency of obtaining oil suitable for biofuel production from corn is 172 liters per hectare per year, palm oil – 5,950 liters per hectare, and from the biomass of algae to 95,000 liters per hectare per year, provided that it is grown in open water (Skoruk et al., 2011; Unkefer et al., 2017). Algae can grow even in very harsh conditions: in salt lakes and deserts, where cultivation of plants is not practiced and even impossible (Round, 1984; Ramanan et al., 2016). In addition, algae play an important role in the accumulation of excess carbon dioxide from the air, produce a number of useful by-products that can be used as feed additives in fish farms and livestock farms or can be considered as promising source of fucoxanthin (Petrushkina et al., 2017), carotenoids (Maltseva et al., 2017). The aim of this article work is discussion of the features and problems of using algae biomass to produce biodiesel.

Advantages of using algae biomass for biofuel production

Any biological source suitable for the production of biodiesel is evaluated by the amount and composition of triglycerides of higher fatty acids and free fatty acids, which are the starting materials for the esterification reaction in the technological process and the sources of methyl esters of fatty acids (components of the finished biodiesel). However, the quality of the fuel produced will directly depend on the qualitative and quantitative composition of the triglycerides. Thus, saturated fatty acids increase the octane number and biodiesel resistance to degradation, while unsaturated fatty acids reduce the pour point and gelling temperature of the fuel at low temperatures (Talebi et al., 2013). At the same time, the accompanying components of vegetable oil, such as insoluble impurities, fat soluble substances and water, impair the quality and even can adversely affect the production and yield of biodiesel. Therefore, one of the primary tasks in the production of biodiesel of the third generation is the search for such strains of algae in which the composition of produced lipids would ensure maximum economic profitability.

Compared to crops and sources from animal origin, the prospects of using algae as a source of lipids for the production of biofuels, human and animal nutrition are largely determined by their high productivity and broad environmental sustainability (Chisti, 2007; Bona et al., 2014; Fields et al., 2014). The productivity of obtaining oil from the biomass of algae per unit of the area involved is many times more efficient than the most popular sources for biofuel of the first generation – soybean (201 times) and palm oil (33.5 times) (Skoruk et al., 2011). At the same time, different groups of algae can solve various biotechnological problems. So green algae can be successfully used for biodiesel production because of rapid growth in photoautotrophic conditions, high content of saturated and monounsaturated fatty acids, ability to produce a large amount of triglycerides (TAG) (Goncalves et al., 2016). Diatom algae can serve as an industrial source of lipids due to their good growth under culture conditions, as well as the highly productive accumulation of chrysolaminarin, lipids (including TAG) in conditions of nutrient deficiency (Chen et al., 2012; Hildebrand et al., 2012; Scholz and Liebezeit, 2013). Yellow-green and eustigmatophytes algae, for which the possibility of accumulating lipids is more than 50% of the dry weight, have also been identified as potential biotechnological objects (Eltgroth et al., 2005; Chen et al., 2009).

The use of various biological approaches to detect promising strains of algae for biotech or increase their productivity continues to grow. However, the unambiguous understanding of the differences between algal taxa is one of the most significant steps in the selection of commercially valuable strains, since it is the interspecific differences that will determine the needs for the composition of the culture medium, the growth rate, the quantitative and qualitative composition of the lipids and other cellular inclusions (Chisti, 2007). So, Fields and Kociolek (2015), using the example of literary and their own data on diatom algae, showed that under conditions of nutrient deficiency in the medium, the lipid composition is a partially inherited evolutionary feature and, consequently, the evolutionary-phylogenetic approach can be used to facilitate selection of species by identifying differences in the content of lipids inside and between phylogenetic clades. Therefore, simultaneous use of morphological, phylogenetic, comparative genetic, genetic engineering and biochemical methods will ensure the greatest effectiveness of search and testing of biotechnologically promising strains of algae for the production of biodiesel.

Despite convincing indicators in the productivity of lipid accumulation by algae, work is also underway to enhance their ability to accumulate valuable compounds, primarily by changing the intensity of illumination or the composition of nutrient media during cultivation. It has been shown that representatives of different taxonomic groups of algae react differently to depletion of nutrients. For example, for the green alga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, nitrogen starvation leads to an increase in the content of monounsaturated oleic acid (18:1ω9), in diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin it increases the content of monounsaturated palmitoleic acid (16:1ω7) (Breuer et al., 2012). In the cells of *Neochloris oleabundans* S. Chantanachat & Bold, nitrogen starvation increased the percentage of oleic and palmitic (16:0) fatty acids and reduced the percentage of stearic acid (18:0) (Sun et al., 2014). Khozin-Goldberg and Cohen (2006) showed that the percentage of saturated fatty acids (mainly stearic acid) in the cells of the yellow-green alga *Monodus subterranea* J. B. Petersen during phosphorus starvation increased from 24.4% to 32.8%, while the percentage of polyunsaturated eicosapentaenoic acid (20:5) decreases.

The main advantages of using algal biomass for biofuel production are given below (Berchmans and Hirata, 2008; Abou-Shanab et al., 2011; Skoruk et al., 2011):

1) the use of algal biomass for the production of fuels does not pose a threat to food security;

2) algae grow 20–30 times faster than terrestrial plants (some species can double biomass several times a day);

3) 15–100 times more oil per hectare is produced than in alternative canola, soybean, maize, jatropha or palm oil;

4) the absence of a solid cell wall and the almost complete absence of lignin in a number of algae species makes their processing into liquid fuels more simple and effective than the processing of biomass from any sources of higher plants;

5) the production and use of biodiesel of the third generation does not require a change in legislation, as is the case with ethanol;

6) algae grow in fresh, salt water or industrial wastewater, where they can also be used for cleaning them;

7) algae can be grown industrially in bioreactors or photobioreactors illuminated by an artificial light source, or in open reservoirs and lakes on lands unfit for agriculture, including deserts;

8) photobioreactors are integrated into the technological lines of existing industrial enterprises (thermal electric power station, petrochemical plants, cement plants);

9) algae reduce the emission of carbon dioxide – absorb up to 90% of CO_2 with the release of oxygen;

10) compared with oils obtained from soy and rapeseed, the oil produced by algae has a higher content of saturated fatty acids (palmitic, stearic, etc.), which increase the octane number of biodiesel.

Obtaining algae biomass for biodiesel production

At the present moment, various approaches have been developed for the cultivation and production of algae biomass, which can be used for biodiesel production. First of all, it should be taken into account that algae biomass can be obtained with their mass growth in open water during their blooming. Collecting such algae biomass

helps to clear water bodies. However, the species composition of algae biomass cannot always guarantee its high value for biodiesel production. At the same time, it allows one to solve the problem of removing algae sprouts during the blooming of water bodies and to use biomass, for example, for the production of biogas. The biomass of cyanobacteria, which grows intensively in the reservoirs of the Dnieper, can be used in plants for the production of biogas by methods developed by the scientists of Kremenchuk Mikhailo Ostrogradskyi National University (Yelizarov and Yelizarov, 2011). The heat-generating capacity of the gas obtained from algae biomass is compatible with household gas.

An enormous amount of seaweed biomass, which is formed on the coast of Japan, is also used to produce methane in special plants (Titlova, 2015).

However, for the production of algae biomass with a high content of oil and suitable for biofuel production, it is necessary to cultivate the algae of certain types or strains characterized by the highest efficiency. In this case, open water bodies or special biotechnological constructions – bioreactors (photobioreactors) are used. Cultivation of algae in open water is the least costly and most acceptable in countries where climatic conditions allow algae to grow throughout the year (Titlova, 2015). An essential disadvantage of this method of obtaining biomass is other microorganisms (microalgae, fungi, bacteria) getting into the captive reservoir, which can change the qualitative and quantitative indices of the biomass and interfere with the yield of oil to produce biodiesel. Photobioreactors, which are closed systems, allow the possibility of growing biomass of algae irrespective of climatic conditions, have a high degree of protection against the occurrence of unwanted organisms and allow the use of various methods for increasing the rate of growth and productivity of algae. Such plants are usually costly, therefore, their modern development is aimed at both reducing the cost of biomass and expanding their functionality. For example, on the one hand, they clear the emissions of various productions when used in photobioreactors and, on the other hand, they produce an additional effect on the saturation of these emissions with carbon dioxide, their temperature indices, and so on. This makes it expedient to place such photobioreactors near various productions, where large amounts of carbon dioxide are formed from combustion or, for example, fermentation carried out by yeast.

The details of design decisions for photobioreactors are presented in the works by Zolotaryova et al. (2008), Borowitzka and Moheimani (2013). Various variants of flat, tubular photobioreactors have been developed. To improve productivity, a spectral luminous stream is achieved by fiber optic systems, GSC technologies that allow the use of sunlight without loss, PBRs – providing a deep penetration of light flux into a culture, growing algae on membranes with subsequent flushing to yield crops, but at the same time minimizing water costs and harvesting costs, etc. The system developers present promising strategies for obtaining algae biomass which are based on a combination of open water growing algae and photobioreactors (Borowitzka and Moheimani, 2013). Protection against possible contamination of algae biomass in ponds is ensure by the high rate of algae formation (several days). In the pilot project , the average annual productivity of such combined systems reached 38 tons per hectare.

Nevertheless, the predominant global practice at the present time in the growing of algae for commercial purposes is cultivation in open water – about 20,000 tons per year, compared with only a few hundred tons in closed photobioreactors. The creation of the most productive plants for the cultivation of microalgae continues in different countries, including Ukraine (Chernov and Ivko, 2010; Fedotkina-Ginczgejmer and Fedotkin, 2011).

Equipment for the production of algae biomass for the purpose of obtaining biofuel is offered on the Ukrainian market, for example, by the company Biodiesel Dnipro (c. Dnipro). The introduction of technologies of renewable biotechnoenergetics in the domestic market is undertaken by a number of companies and enterprises, detailed information on which can be found in the review work of Gamkalo and Maksishko (2017). According to the data of Skoruk et al. (2011) considerable success in the development of design documentation for the production of biofuels from algae was achieved by the staff of the Scientific and Production Corporation "Kiev Institute of Automation". Thus, Ukraine has sufficient potential for the development of this direction of production and for market saturation by biodiesel obtained as a result of processing of algae biomass, considering that according to forecasts, biofuel will account for 20% of the total amount of fuel consumption in Ukraine by 2020 (Bozhydarnyk et al., 2014). The importance of research in this field was emphasized by the approval of the Targeted Complex Programs of Scientific Research of the National Academy of Sciences of Ukraine: "Biomass as Fuel Raw Materials" ("Biofuels") for 2007–2012, "Biological Resources and Latest Technologies of Bioenergy Cavitation" for 2013–2017 (Decision, 2010; Tselevaya, 2012). As part of the program, a collection of microalgae strains (16 species, 32 promising lipid-producing strains) was created, their molecular genetic analysis was performed and the conditions of cultivation were chosen (Decision, 2010; Blume et al., 2014, Buntov, 2017).

The main directions of increasing the efficiency of biodiesel production from algal biomass

After activation of the third generation biodiesel production it was assumed that the algae would become a most advantageous energy source, because they are not only able to accumulate significant amounts of lipids, but also have the potential to reduce the area of agricultural land used for biofuel production, and could also improve air quality by sequestering CO_2. However, a major problem is presented by be the cost of algae biomass cultivation and its processing compared to the production of biodiesel from agricultural crops. In this regard, there are several directions of increasing efficiency of biodiesel production from algae biomass.

The first direction is to increase lipid content in algae cells by means of genetic engineering and is concerned with the modification of genes DGAT2b, DGAT2c, CeDGAT1, Wrinkled1 (wri1) encoding enzymes responsible for synthesis of triglycerides (TAG), and is directed to stimulation of extra-expression of these genes (Xu et al., 2008; Taylor et al., 2009; Li et al., 2012; Yoon et al., 2012). It is shown that manipulation of the gene of DGAT can increase the lipid content in the cell by 11–28% (Jako et al., 2001). Work is also being carried out on the transplantation of the same plant genes into other model objects (bacteria, yeast) with the aim of obtaining greater concentration of TAG than in the source organism (Guo et al., 2017). Transplantation of the analogue gene DGAT from green algae (CeDGAT1) of *Chlorella ellipsoidea* Gerneck into the yeast genome caused a 142% increase of lipid content (Guo et al., 2017).

The second direction is connected with the stimulation of increased accumulation of lipids by stressing algae. The most common factors used to enhance the production of lipids, are change of intensity and duration of lighting, limitation of nutrient content (primarily nitrogen and phosphorus). It was found that the yellow-green alga *Monodus subterraneus* J. B. Petersen accumulates 0.1 pg/cell TAG in the conditions of normal nutrient content, and phosphate starvation increases the content TAG to 1.7 pg/cell, which amounts 39.3% of total lipids content (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006). Besides, in phosphate-deficient conditions the total lipid content of *Monodus subterraneus* increased from 1.66 pg/cell to 4.3 pg/cell (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006). On the other hand, the green alga *Rhopalosolen saccatus* (Filarsky) Fott had the highest biomass and lipid content when grown in standard nutrient conditions, and the restriction of phosphorus resources did not lead to a significant increase of either biomass or lipid content (Challagulla et al., 2015). Phosphate starvation of the green alga *Scenedesmus* sp. caused an increase of lipid content from 20% to 50% of dry weight, in contrast to nitrogen starvation, which increased the lipid content from 25% only to 30% of dry weight (Xin et al., 2010). It was also found that nitrogen starvation can induce in the green alga *Dunaliella parva* W. Lerche expression of a gene Wrinkled1 (wri1), which is an important transcription factor of many genes involved in the regulation of fatty acid biosynthesis (Shang et al., 2016).

The main drawback of the first two directions is that all studies are based on a narrow set of well-known strains of algae: *Nannochloropsis oceanica* Suda & Miyashita (Jia et al., 2015), *Chlorella ellipsoidea* (Yang et al., 2011; Guo et al., 2017), *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. But (Scranton et al., 2015), *Dunaliella parva* (Shang et al., 2016), and only few works are devoted to testing new, previously non-studied strains (Fujii et al., 2014).

The third direction involves the search for new, prospective strains of algae that will be characterized by faster biomass accumulation rate, higher content of TAG and the optimal proportions of accumulated saturated and unsaturated fatty acids compared to the already known strains. Lately the perspective of use of a number of strains belonging to the genera of green algae *Desmodesmus* (Chodat) S. S. An, T. Friedl & E. Hegewald, *Coelastrum* Nägeli and *Scenedesmus* Meyen (Valdez-Ojeda et al., 2015), Cyanoprokaryota *Anabaena* Bory ex Bornet & Flahault (Johnson et al., 2016), diatom *Halamphora* (Cleve) Levkov (Stepanek et al., 2016), Eustigmatophyta *Vischeria* Pascher (Gao et al., 2015) and *Eustigmatos* D. J. Hibberd (Zhang et al., 2015) has been shown to be highly promising. The testing of new strains showed that at different stages of growth, the algae biomass significantly differs in content of fatty acids, e.g., in the exponential phase, the content of linoleic acid (18:2) in *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] is 9.5% of dry weight, *Scenedesmus obliquus* is 3.9% and in *Botryococcus* sp. is 13.1%; and in stationary phase, these figures increased almost two times, up to 21.5%, 6.9% and 20.2%, respectively (Piligaev et al., 2015).

Recently a new approach in the search for biotechnologically valuable strains of algae has been formed on the basis of predicting their capacity for sufficient accumulation of lipids with the help of clarifying the evolutionary relationships within the major taxonomic groups of algae (Fields and Kociolek, 2015). The prospects of testing the possibility of using the strains of diatoms from the orders Thalassiosirales, Chaetocerotales and Bacillariales (Fields and Kociolek, 2015) for biodiesel production have been shown. The value of this approach is projected to increase due to the constant enlargement of of nucleotide sequences of not only diatom, but also other groups of algae available for analysis and the possibility of filtering out less promising strains while avoiding expensive biochemical experiments.

In international scientific practice, research on finding new strains for biodiesel production is very widespread, as evidenced by the abundance of publications in such specialized scientific journals as Algal Research, Photosynthesis Research, International Journal of Hydrogen Energy, Journal of Applied Phycology, etc. Meanwhile, many publications reflect only a few results, ase there are not so many experienced research groups.

The group of C. Wu Zhang and S. Xia and colleagues (Jinan University, China) are exploring the peculiarities of fatty acid composition in different representatives of eustigmatophyceae algae: *Vischeria stellata* (Chodat) Pascher (Gao et al., 2015), *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Pitschmann) D. J. Hibberd (Zhang et al., 2013), and its changes under the stressing conditions of cultivation.

The group of T. J. Johnson, S. Halfmann, R. Zhou, and W. R. Gibbons (South Dakota State University, USA) are developing the mechanisms for obtaining the sufficient amount of Cyanoprokaryota biomass for the third generation biofuels production (Johnson et al., 2016).

K. Fujii (Yamaguchi University, Japan) is studying the diversity of algae of Yamaguchi Prefecture with the testing of green algae individual strains of the genera *Chlorella* Beyerinck [Beijerinck], *Scenedesmus*, *Coccomyxa* Schmidle, *Macrochloris* Korshikov and *Oogamochlamys* Pröschold, B. Marin, U. W. Schlösser & Melkonian as raw materials for biofuel production and cultivation in aquaculture conditions (Fujii et al., 2014).

D. V. Subba Rao (Raymond G. Murphy VA Medical Center, USA) is working on the search for biotechnologically promising strains of algae in natural and anthropogenic ecosystems by combining biochemical studies with molecular-phylogenetic ones (Subba Rao et al., 2005; Durvasula et al., 2015). The studies are conducted with the representatives of different genera of algae: *Chlamydomonas* Ehrenberg, *Dunaliella* Teodoresco, *Scenedesmus* (green) and *Nitzschia* Hassall (diatom).

J. E. W. Polle and P. Neofotis (The Graduate Center of the City University of New York, USA) are working on the search for highly productive microalgae for the production of biofuels and bioproducts among the representatives of the green algae genera *Ankistrodesmus* Corda, *Acutodesmus* (Hegewald) Tsarenko, *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Dunaliella* (Moheimani et al., 2015; Slocombe et al., 2016).

In Ukraine, scientists are studying the problems of increasing the efficiency of lipid accumulation by means of genetic engineering methods, searching for highly effective algae strains and selecting cultivation conditions (Zolotaryova et al., 2008; Blume et al., 2014; Korkhovoy and Blume, 2014).

At the present stage on the commercial level, the following directions are being implemented: the Israeli company "Seambiotic" is developinge technologies that allow the industrial cultivation of algae by using carbon dioxide, which is released in emissions of power plants. The corporation "GreenFuel Technologies" (USA) suggested the technology Emissions-to-Biofuels that allows growth of algae by using emissions of thermal power plants. The Japanese company "Tokyo Gas" and "NEDO" are creating a system of algae biomass fermentation by using bacteria for producing methane, which can be used in gas engines. They have already developed mechanisms which can process up to 1 ton of algae per day with the formation of 20 thousand cubic meters of methane (Skoruk et al., 2011).

The outcome of the studies is the rapid cost reduction of biofuel production based on algae biomass. If in the middle of the first decade of the 21st century the cost of obtaining 1 ton of algae biomass was about $4,300, by 2011 it had dropped to $1,279, and in 2016 mechanisms to reduce the cost to $430/t were already being proposed (Skoruk et al., 2011; Dutta et al., 2016). There is a significant reduction in the cost of fuels – in 2011 the minimum price was about $2.32/l, then by 2016, it had decreased to $0.96/l (Dutta et al., 2016). All this emphasizes the priority of any research aimed at both improving the process of production of biofuels from algae, and the search for new sources for biofuel production.

Conclusion

Undoubtedly, research on the possibility of using algae as sources for the production of biodiesel fuel and improvement of specific technological features has changed significantly over the last 30 years. If the first analysis and recommendations were based on the analysis of morphology, physiology and biochemistry of individual strains, modern approaches are increasingly shifting towards deep screening, comparative genetics and genetic engineering. Taking into account the fact that none of the existing terrestrial plants is able to compete with algae both on the effectiveness of photosynthesis underlying the yield, and on the oil content and the energy stored in it, then, of course, the screening of biotechnologically promising algal strains for biodiesel production remains urgent more than ever.

The development of algae in culture neutralizes the influence of climatic and seasonal growth factors, and understanding of species specificity and productivity makes it possible to obtain biomass all year round. Leaders in this area are the Netherlands, Germany, South Africa, as well as the USA and Australia. An active search is also being conducted by specialists from China and Japan. Scientists are working on optimizing the parameters of biocultivators and bioreactors for actively growing the biomass of algae and processing sources, searching for productive species and strains of algae. Ukraine has all the necessary scientific and production potential for the development of algotechnoenergetics. This is proved by the development of technological solutions to improve the efficiency of production and the processing of microalgae biomass, as well as the creation of collections of microalgae and their strains.

Obviously, further searches for new strains of algae that can be used for the production of biodiesel must differ from the research on individual single strains, but should rather concentrate on the creation and implementation of a screening system that would consist of scientifically sound and economically viable stages and would allow the stage-by-stage testing of a large sample of strains of algae, excluding at each stage the less promising strains.

References

Abou-Shanab, R. A. I., Matter, I. A., Kim, S.-N., Oh, Y.-K., Choi, J., & Jeon, B.-H. (2011). Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. Biomass and Bioenergy, 35(7), 3079–3085.

Berchmans, H. J., & Hirata, S. (2008). Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. Bioresource Technology, 99(6), 1716–1721.

Blyum, Y. B., Levchuk, O. M., Raxmetov, D. B., & Raxmetov, S. D. (2014). Biologichni resursy i texnologiyi dlya vyrobnycztva riznyx vydiv biopalyv [Biological resources and technologies for the production of various biofuels]. Visnyk NAN Ukrayiny, 11, 64–72 (in Ukrainian).

Bona, F., Capuzzo, A., Franchino, M., & Maffei, M. E. (2014). Semicontinuous nitrogen limitation as convenient operation strategy to maximize fatty acid production in *Neochloris oleoabundans*. Algal Research, 5, 1–6.

Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Algae for biofuels and energy. Springer Netherlands.

Bozhydarnyk, T. V., Tkachuk, V. V., & Rechun, O. U. (ed.) (2014). Problemy i perspektyvy formuvannya ta rozvytku rynku biopalyv v Ukrayini [Problems and perspectives of formation and development of a biofuel market in Ukraine]. Ekonomichnyj Chasopys – XXI, 11–12, 45–48 (in Ukrainian).

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. Bioresource Technology, 124, 217–226.

Buntov, I. Y. (2014). Perspektyvy rozvytku doslidzhen zi stvorennya biopalyva v Ukrayini [Perspectives of developing research on biofuel production in Ukraine]. Biznes Inform, 12, 267–275 (in Ukrainian).

Challagulla, V., Fabbro, L., & Nayar, S. (2015). Biomass, lipid productivity and fatty acid composition of fresh water microalga *Rhopalosolen saccatus* cultivated under phosphorous limited conditions. Algal Research, 8, 69–75.

Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., & Wang, J. (2012). Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. Bioresource Technology, 111, 208–214.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. Journal of Microbiological Methods, 77(1), 41–47.

Chernov, P. Y., & Ivko, S. G. (2010). Ustanovka dlya viroschuvannya ta pererobki mikrovodorostey [A plant for growing and processing microalgae]. Patent, 89314 (in Russian).

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25, 294–306.

Dubrovin, V. A., & Dragnev, S. V. (2006). Tehnologii i tehnicheskie sredstva proizvodstva biodizelnogo topliva iz rastitelnyih masel [Technologies and technical means of production of biodiesel fuel from vegetable oils]. Agrarna Texnika ta Obladnannya, 1(2), 67–73 (in Russian).

Durvasula, R., Hurwitz, I., Fieck, A., & Rao, D. V. S. (2015). Culture, growth, pigments and lipid content of *Scenedesmus species*, an extremophile microalga from Soda Dam, New Mexico in wastewater. Algal Research, 10, 128–133.

Dutta, S., Neto, F., & Coelho, M. C. (2016). Microalgae biofuels: A comparative study on techno-economic analysis and life-cycle assessment. Algal Research, 20, 44–52.

Eltgroth, M. L., Watwood, R. L., & Wolfe, G. V. (2005). Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi1*. Journal of Phycology, 41(5), 1000–1009.

Fedotkina-Ginczgejmer, N. G., & Fedotkin, I. M. (2011). Fotobioreaktorna ustanovka dlya vyroshhuvannya mikrovodorostej [Photobioreactor plant for growing microalgae]. Patent, 63746 (in Ukrainian).

Fields, F. J., & Kociolek, J. P. (2015). An evolutionary perspective on selecting high-lipid-content diatoms (Bacillariophyta). Journal of Applied Phycology, 27(6), 2209–2220.

Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B. M., Characklis, G. W., & Gerlach, R. (2014). Sources and resources: Importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. Applied Microbiology Biotechnology, 98, 4805–4816.

Fujii, K., Matsunobu, S., & Takahashi, Y. (2014). Characterization of the new microalgal strains, *Oogamochlamys* spp., and their potential for biofuel production. Algal Research, 5, 164–170.

Gamkalo, Z. G., & Maksishko, M. (2017). Biotehnoenergetika v Ukraine: sostoyanie, problemyi i perspektivyi pererabotki othodov selskohozyaystvennogo proizvodstva [Biotechnoenergetics in Ukraine: State, problems and perspectives of agricultural waste processing]. Vestnik IrGSHA, 79, 152–157 (in Russian).

Gao, B., Yang, J., Lei, X., Xia, S., Li, A., & Zhang, C. (2015). Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. Journal of Applied Phycology, 28(2), 821–830.

Goncalves, E. C., Wilkie, A. C., Kirst, M., & Rathinasabapathi, B. (2016). Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: Identification of potential targets for engineering to improve oil yield. Plant Biotechnology Journal, 14, 1649–1660.

Grinyuk, I. (2009). Biopalyvo z vodorostej [Biofuels from algae]. Agrosektor, 36(6), 26–27 (in Ukrainian).

Guo, X., Fan, C., Chen, Y., Wang, J., Yin, W., Wang, R. R. C., & Hu, Z. (2017). Identification and characterization of an efficient acyl-CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from the microalga *Chlorella ellipsoidea*. BMC Plant Biology, 17(1), 48.

Hildebrand, M., Davis, A. K., Smith, S. R., Traller, J. C., & Abbriano, R. (2012). The place of diatoms in the biofuels industry. Biofuels, 3(2), 221–240.

Jako, C. (2001). Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. Plant Physiology, 126(2), 861–874.

Jia, J., Han, D., Gerken, H. G., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., & Xu, J. (2015). Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. Algal Research, 7, 66–77.

Johnson, T. J., Jahandideh, A., Johnson, M. D., Fields, K. H., Richardson, J. W., Muthukumarappan, K., Gibbons, W. R. (2016). Producing next-generation biofuels from filamentous cyanobacteria: An economic feasibility analysis. Algal Research, 20, 218–228.

Khozingoldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. Phytochemistry, 67(7), 696–701.

Korkhovoy, V. I., & Blume, Y. B. (2013). Biodiesel from microalgae: Ways for increasing the effectiveness of lipid accumulation by genetic engineering methods. Cytology and Genetics, 47(6), 349–358.

Li, Y., Fei, X., & Deng, X. (2012). Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. Biomass and Bioenergy, 42, 199–211.

Maltseva, I. A., Maltsev, E. I., & Solonenko, A. N. (2017). Vodorosli pochv dubrav stepnoy zonyi Ukrainyi [Algae of the soils of groves in the Ukrainian steppe zone]. Algologia, 27(3), 323–336 (in Russian).

Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., & Bahri, P. A. (Eds.). (2015). Biomass and biofuels from microalgae. In: Biofuel and biorefinery technologies. Springer-Verlag GmbH.

Newby, D. T., Mathews, T. J., Pate, R. C., Huesemann, M. H., Lane, T. W., Wahlen, B. D., Engler, R. K., Feris, K. P., & Shurin, J. B. (2016). Assessing the potential of polyculture to accelerate algal biofuel production. Algal Research, 19, 264–277.

Petrushkina, M., Gusev, E., Sorokin, B., Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Yampolsky, I., Guglya, E., Vinokurov, V., Namsaraev, Z., & Kuzmin, D. (2017). Fucoxanthin production by heterokont microalgae. Algal Research, 24, 387–393.

Piligaev, A. V., Sorokina, K. N., Bryanskaya, A. V., Peltek, S. E., Kolchanov, N. A., & Parmon, V. N. (2015). Isolation of prospective microalgal strains with high saturated fatty acid content for biofuel production. Algal Research, 12, 368–376.

Presidium of the National Academy of Sciences of Ukraine (2010). Decision "On realization of targeted complex program of scientific research of the National Academy of Sciences of Ukraine: "Biomass as Fuel Raw Materials" ("Biofuels")".

Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. Biotechnology Advances, 34(1), 14–29.

Ruffing, A. M., & Trahan, C. A. (2014). Biofuel toxicity and mechanisms of biofuel tolerance in three model cyanobacteria. Algal Research, 5, 121–132.

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., & Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. BioEnergy Research, 1(1), 20–43.

Scholz, B., & Liebezeit, G. (2013). Biochemical characterization and fatty acid profiles of 25 benthic marine diatoms isolated from the Solthorn tidal flat (southern North Sea). Journal of Applied Phycology, 25(2), 453–465.

Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. The Plant Journal, 82(3), 523–531.

Shang, C., Bi, G., Yuan, Z., Wang, Z., Alam, M. A., & Xie, J. (2016). Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*. Algal Research, 13, 318–326.

Slocombe, S., & Benemann, J. (Eds.). (2016). Microalgal production for biomass and high-value products. CRC Press.

Stepanek, J. G., Fields, F. J., & Kociolek, J. P. (2016). A comparison of lipid content metrics using six species from the genus *Halamphora* (Bacillariophyta). Biofuels, 7(5), 521–528.

Subba Rao, D. V., Pan, Y., & Al-Yamani, F. (2005). Growth and photosynthetic rates of *Chlamydomonas plethora* and *Nitzschia frustula* cultures isolated from Kuwait Bay, Arabian Gulf, and their potential as live algal food for tropical mariculture. Marine Ecology, 26(1), 63–71.

Sun, X., Cao, Y., Xu, H., Liu, Y., Sun, J., Qiao, D., & Cao, Y. (2014). Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. Bioresource Technology, 155, 204–212.

Talebi, A. F., Mohtashami, S. K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H. H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S. M., & Bakhtiari, S. (2013). Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. Algal Research, 2, 258–267.

Taylor, D. C., Zhang, Y., Kumar, A., Francis, T., Giblin, E. M., Barton, D. L., Ferrie, J. R., Laroche, A., Shah, S., Zhu, W., Snyder, C. L., Hall, L., Rakow, G., Harwood, J. L., & Weselakee, R. J. (2009). Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions. Botany, 87, 533–543.

Titlova, O. A. (2015). Vodorosti yak alternatyvne dzherelo energiyiyi [Algae as the alternative source of energy]. Xolodylna texnika ta texnologiya, 51(5) (in Ukrainian).

Unkefer, C. J., Sayre, R. T., Magnuson, J. K., Anderson, D. B., Blaby, I. K., Brown, J. K., Carleto, M., Cattolico, R. A., Dale, T., Devarenne, T. P., Downes, C. M., Dutcher, S. K., Fox, D. T., Goodenough, U., Jaworski, J., Holladay, J. E., Kramer, D. M., Koppisch, A. T., Lipton, M. S., Marrone, B. L., McCormick, M., Molnár, I., Mott, J. B., Ogden, K. L., Panisko, E. A., Pellegrini, M., Polle, J., Richardson, J. W., Sabarskyo, M., Starkenburg, S. R., Stormo, G. D., Teshima, M., Twary, S. N., Unkefer, P. J., Yuan, J. S., & Olivares, J. A. (2017). Review of the algal biology program within the National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts. Algal Research, 22, 187–215.

Valdez-Ojeda, R., González-Muñoz, M., Us-Vázquez, R., Narváez-Zapata, J., Chavarria-Hernandez, J. C., López-Adrián, S., Barahona-Pérez, F., Toledano-Thompson, T., Garduño-Solórzano, G., & Escobedo-Gracia Medrano, R. M. (2015). Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production. Algal Research, 7, 33–44.

Xu, J., Francis, T., Mietkiewska, E., Giblin, E. M., Barton, D. L., Zhang, Y., Zhang, M., & Taylor, D. C. (2008). Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content. Plant Biotechnology Journal, 6(8), 799–818.

Yelizarov, O. I., & Yelizarov, M. O. (2011). Ekologichni j energetychni aspekty shtuchnogo vyluchennya cianobakterij z akvatoriyi dniprovskyx vodoshovyshh [Environmental and energy aspects of artificial isolation of cyanobacteria from the aquatorium of the Dnipro reservoirs]. Transactions of Kremenchuk Mykhailo Ostrohradskyi National University, 67(2), 140–142 (in Ukrainian).

Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Phospholipid: Diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Cell, 24(9), 3708–3724.

Zhang, J. J., Wan, L. L., Xia, S., Li, A. F., & Zhang, C. W. (2013). Morphological and spectrometric analyses of lipids accumulation in a novel oleaginous microalga, *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Eustigmatophyceae). Bioprocess and Biosystems Engineering, 36(8), 1125–1130.

Zolotaryova, O. K., Shnyukova, E. I., Sivash, O. O., Mihaylenko, N. F., & Zolotaryova, O. K. (2008). Perspektivyi ispolzovaniya mikrovodorosley v biotehnologii [Perspectives of microalgae use in biotechnology]. Alterpress, Kyiv (in Russian).

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3), 461–466
doi: 10.15421/021771

Molecular mechanisms of aluminium ions neurotoxicity in brain cells of fish from various pelagic areas

E. V. Sukharenko*, I. V. Samoylova*, V. S. Nedzvetsky*, **

**Bingöl University, Bingöl, Turkey*
***Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine*

Article info

Received 29.06.2017
Received in revised form 20.07.2017
Accepted 27.07.2017

Bingol University, Selahaddin-i Eyyubi Mah. Aydınlık Cad., 12000, Bingöl, Turkey, E-mail: helenasuhar@gmail.com, samoylovairina2014@gmail.com

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine. Tel.: +38-056-760-84-38. E-mail: nedzvetskyvictor@gmail.com

Sukharenko, E. V., Samoylova, I. V., & Nedzvetsky, V. S. (2017). Molecular mechanisms of aluminium ions neurotoxicity in brain cells of fish from various pelagic areas. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 461–466. doi: 10.15421/021771

Neurotoxic effects of aluminum chloride in higher than usual environment concentration (10 mg/L) were studied in brains of fishes from various pelagic areas, especially in sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque, 1819), roach (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758), crucian carp (*Carasius carasius* Linnaeus, 1758), goby (*Neogobius fluviatilis* Pallas, 1811). The intensity of oxidative stress and the content of both cytoskeleton protein GFAP and cytosol Ca-binding protein S100β were determined. The differences in oxidative stress data were observed in the liver and brain of fish during 45 days of treatment with aluminum chloride. The data indicated that in the modeling of aluminum intoxication in mature adult fishes the level of oxidative stress was noticeably higher in the brain than in the liver. This index was lower by1.5–2.0 times on average in the liver cells than in the brain. The obtained data evidently demonstrate high sensitivity to aluminum ions in neural tissue cells of fish from various pelagic areas. Chronic intoxication with aluminum ions induced intense astrogliosis in the fish brain. Astrogliosis was determined as result of overexpression of both cytoskeleton and cytosole markers of astrocytes – GFAP and protein S100β (on 75–112% and 67–105% accordingly). Moreover, it was shown that the neurotixic effect of aluminum ions is closely related to metabolism of astroglial intermediate filaments. The results of western blotting showed a considerable increase in the content of the lysis protein products of GFAP with a range of molecular weight from 40–49 kDa. A similar metabolic disturbance was determined for the upregulation protein S100β expression and particularly in the increase in the content of polypeptide fragments of this protein with molecular weight 24–37 kDa. Thus, the obtained results allow one to presume that aluminum ions activate in the fish brain intracellular proteases which have a capacity to destroy the proteins of intermediate filaments. The data presented display the pronounced neurotoxic effect of mobile forms of aluminum on both expression level and the metabolism of molecular markers of astrocytes GFAP and protein S100β. Aluminum ions induce integrated changes, the more important of which are a significant increase in final LPO products, an increase in antioxidant enzyme activity, a reactivation of glial cells in the brain. Integrated determination of the content and polypeptide fragments of specific astrocyte proteins in fishes brains coupled with oxidative stress data may be used as valid biomarkers of toxic pollutant effects in aquatic environments.

Keywords: aquatic organisms; oxidative stress; neurospecific proteins; glial fibrillary acidic protein; GFAP; protein S100β

Introduction

Aluminum is the most common metal in nature. The number of minerals which consist of aluminum is more than 250, including aluminum silicates – compounds that make up about 82% of the earth's crust. Being one of the most common elements in the Earth's crust, aluminum is found in almost all natural water resources (Gostomski, 1990). It enters into these water areas by various ways: with partial dissolution of clays and aluminosilicates, with atmospheric precipitation, sewage, and industrial wastes (Walton et al., 2010; Liu et al., 2014; Aksu, 2015). Aluminum toxicity is a universal problem for all forms of organism. Since last decades of the XX century, ecologically significant concentrations of Al are have been intensively studied for natural water resources. The content of soluble forms of Al increases exponentially with decrease in pH. However, the concentration of mobile organic forms of Al relates to concentration of organic acids in the water solution rather than pH (Driscoll, 1985; Sivakumar et al., 2012). At the same time, it has been hypothesized that Al is potentially toxic to aquatic organisms. A number of studies have confirmed the toxicity of aluminum ions for various aquatic species. Moreover, the US Environmental Protection Agency in August 1988 published a document on ambient water quality criteria, especially the toxicity of aluminum. Established criteria recommend that the one-hour average concentration of aluminum should not exceed 750 µg/l and four-day average concentration should not exceed 87 µg/l. These criteria were developed by an acute toxicity study for 20 species of freshwater aquatic organisms. Two fish species, namely striped bass and brook trout, were determined to be the most sensitive to the toxic effects of aluminum among the species of North America (Gostomski, 1990). Without doubt, the toxicity of aluminum ions in the aquatic environment is extremely complex. Biological effects of aluminum are determined for a number of water quality characteristics, especially pH, content of organic carbon and hardness (Trenfield et al., 2012; Cardwell et al., 2017).

One important factor for aluminum toxicity is mobility of Al^{3+} ions. It has been shown that in marine diatoms dissolved aluminum has a differences in toxic effect compared with precipitated aluminum forms. Aluminum toxicity is multifaceted. The genotoxic potential of

aluminum ions has been demonstrated for embryonic zebrafish cells ZF_4. A few hours exposure induced double strand breaks of DNA (Pereira et al., 2013). Modern toxicology considers the increased concentrations of aluminum ions to be the most dangerous among the "hidden" adverse environmental factors. The toxic effect of aluminum is associated with its antagonism with respect to calcium, magnesium, zinc, copper, and its ability to accumulate in animal tissues due to easy integration into the structure of proteins. The degree of aluminum accumulation in living organisms is limited by the insolubility of some of its natural compounds in water. However, due to the fact that insoluble aluminum compounds are solubilized in the acidic environment of the vertebrate stomach, the Al^{3+} content in the body rises. Higher than normal concentrations of aluminum ions in the organism provoke the development of various pathologies, caused mainly by a disorder of the oxidation-reduction balance of tissues (Nedzvetskii et al., 2006; Fernandez-Davila et al., 2012). With excessive concentrations of aluminum in the body of aquatic organisms, the target organs are kidneys, bones, and the central nervous system as usual. The reactions of the nervous system to aluminum intoxication are quite diverse. Neurotoxicity of aluminum may be accompanied by impaired glucose metabolism, cytoskeleton changes and modulation of signal transduction mechanisms (Singla et al., 2015). The studies *in vivo* and *in vitro* have shown that aluminum affects the formation of inositol phosphate. Some components of the inositol phosphate signal system, including proteins (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, protein kinase C and G protein) are extremely sensitive to the content of aluminum ions, which inhibit hydrolysis of phosphoinositol, resulting in the decreased level of inositol triphosphate (IP_3) and release of Ca^{2+} ions from intracellular membrane storages (Sun et al., 2008). The specific toxicity of aluminum is associated with the ability of fish to secrete mucus intensively and accumulate ions of this metal in the gills. In this case, the effect of aluminum on the function of the gills of fish juveniles and fry is differentiated. The highest sensitivity was found in salmon fry; this fact may be explained by the insufficiently high antioxidant protection activity of fish in the early ontogenesis period (Grassie et al., 2013; Skilbrei et al., 2013). Despite the abundance of aluminum in the aquatic environment, the effects of aluminum intoxication on aquatic organisms have not been adequately studied. Neurotoxic effects of Al^{3+} have been studied *in vivo* in terrestrial animals; however, this neurotoxicity was not displayed for aquatic organisms in view of the vast scale of modern environmental pollution. In addition, anthropogenic pollution of water resources with aluminum compounds, inducing the decreased acidity of the environment, creates favorable conditions for the chronic growth of the aluminum content. Thus, the study of the biological effects of aluminum ions on the population of aquatic organisms is of current concern, primarily for industrial regions with developed electrical, aviation, chemical, and petroleum industries. Fish, as the last link in the trophic chain in water bodies, is a reliable and adequate indicator for the extent of anthropogenic pressure on aquatic ecosystems. This is due to their high sensitivity, wide distribution, and accessibility for studying the reactions of their organisms to various external affects.

Glial cell reactivity is one of the widest used biomarkers of neural tissue disorders (Tykhomyrov et al., 2016). The upregulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in astrocytes is an obligatory molecular event that accompanies cell response in neural tissue against toxic chemicals and different damages (Nedzvetskii et al., 2012). This phenomenon is termed astroglisis and occurs in the brains of all kind of vertebrates. Several kinds of fish could be more sensitive to aluminium ions toxicity. Thus, the study of astrogliosis can elucidate common molecular mechanisms of cell reactivity and individual characteristics of fishes from various pelagic areas.

Materials and methods

In accordance with the generally accepted research methods, sunfish, goby, crucian carp and roach fish specimens were taken from a conditionally clean area. The water area of the Vorskla River was chosen from within an existing ichthyological sanctuary, which is practically not subject to technogenic impact. The chronic effect of aluminum ions on the four fish species was studied over 45 days of their treatment with 10 mg/l of aluminum chloride. The stable concentration of aluminum ions was maintained by replacement 35% water containing 10 mg/l of aluminum chloride. Every group of fish species included 20 individuals from various pelagic areas: sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque, 1819), roach (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758), crucian carp (*Carasius carasius* Linnaeus, 1758), goby (*Neogobius fluviatilis* Pallas, 1811). Adult fishes (3–5 years old, n = 20) were randomly divided into similar groups (control and experimental ones). The experimental groups of fish were kept in similar aquariums with 180 liters capacity. Control groups of all fish species were kept in aquariums with purified tap water. Every fish individual was phenotypically analyzed. The phenotype of fish was visually observed and the morphological exterior and interior characteristics were analyzed. The proportion of fish with different morphological and physiological aberrations was calculated. In order to sample the biological material, decapitation was applied in conformity with the technique used for treating small animals. After decapitation, the fish brain was homogenized (in the cold) in a 10-fold volume of 50 mM Tris buffer pH 7.8 containing 2 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 5 mM soybean trypsin inhibitor. The homogenate was centrifuged for 50 min at 60,000 g. After centrifugation, a fraction of the water-soluble proteins with supernatant was taken. To extract cytoskeletal proteins, a 4-fold volume of Tris buffer pH 7.8 containing 4 M urea was added to the pellet and resuspended to homogenate. Resuspended samples were incubated at +4 ºC for 60 min for extraction of cytoskeleton proteins. After extraction of insoluble proteins, the samples were centrifuged for 60 min at 60,000 g and a fraction of the water-insoluble proteins was taken. The samples of both soluble and insoluble proteins were separated by electrophoresis in a gradient of a polyacrylamide gel (7–18%) with 0.1% sodium dodecyl sulfate (Nedzvetskiy et al., 2011). The content and polypeptide composition of glial intermediate filaments and S100β were assessed by immunoblotting using a polyclonal monospecific antiserums anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, USA, cat. no. sc-33673, dilution of 1 : 2000) and anti-S100β (Thermo Scientific, USA, cat. no. PA5-16257, dilution of 1 : 1000). The relative intensity of the colour densities of the polypeptide zones was detected by computer processing of the scanned immunoblotting results. Quantitative GFAP analysis was carried out by comparing the intensity of the colour of the relevant polypeptide zones between the experimental and control samples referred to the amount of total protein in the fractions. The content of total protein was estimated by Lowry's method in Miller's modification (Miller, 1959). The level of lipid peroxidation was measured using a LPO-586 test kit (Oxis, Int. Inc., USA) by a method based on the reaction of N-methyl-2-phenylindole with malonic dialdehyde and 4-hydroxyalkenes (Ohkawa, 1979). The obtained data were processed using mathematical statistics for small number of samples. The relative content of GFAP was expressed as the mean ± standard error of the mean, a significant difference between the groups was assessed using the Student's t-test ($P < 0.05$) after testing the hypotheses of the normal distribution and the difference between the general variances.

Results and discussion

All fish individuals were subject to complete biological analysis. Despite the fact that the anatomical and morphological analysis of the experimental and control groups of fish showed no abnormalities and deviations from healthy growth, while studying the intensity of oxidative stress in the liver and brain of gobies, crucian carp and roach from the experimental groups, it was established that the content of TBA-reactive products significantly increased. The number of TBA active products in the liver of individuals of the experimental groups was higher by 22–69% as compared with the groups of fish kept in the purified tap water (Table 1).

The increase in amount of the final products of lipid peroxidation in the liver of the mature adults under conditions of the aluminum

contamination was significantly lower than the increase in the similar indicators in the brain of these individuals where the content of lipid degradation significantly exceeded the control values by 41–58% (Table 2).

Table 1
Content of TBA-active products in the liver of mature adult individuals under conditions of chronic contamination with aluminum ions (nmol/mg material)

Groups of fishes from various pelagic areas	Control group	Experimental group
Sunfish	1.53 ± 0.10	1.93 ± 0.12*
Crucian carp	1.32 ± 0.11	1.78 ± 0.13*
Goby	1.78 ± 0.12	2.18 ± 0.14*
Roach	1.34 ± 0.09	2.27 ± 0.14**

Note: significance of the difference in comparison with the control * – P < 0.05, ** – P < 0.01.

Table 2
Content of TBA-active products in the brain of mature adult individuals under conditions of chronic contamination with aluminum ions (nmol/mg material)

Groups of fishes from various pelagic areas	Control group	Experimental group
Sunfish	2.32 ± 0.13	3.27 ± 0.19**
Crucian carp	1.92 ± 0.11	2.89 ± 0.20**
Goby	2.81 ± 0.12	3.95 ± 0.18**
Roach	1.89 ± 0.16	2.98 ± 0.23**

Note: see Table 1.

The maximum increase in the content of the LPO end products in the brain of mature adults with chronic exposure to Al^{3+} ions was found in the brain of the roach group (on an average 58.0% higher than the control values), slightly lower oxidative stress indices were observed in the brains of mature adults of experimental carp groups (51%), sun fish (an average of 41%), and goby (an average of 41%). In the liver of mature adults of the experimental groups of crucian carp, goby, sun fish, the generation of oxidative stress relative to the control groups of fish was less intense compared to the brain, respecttively an average of 35%, 22%, and 26% (P < 0.05).

An exception was formed by individuals of the experimental group of common roach, in which the intensity of oxidative processes in the liver increased by an average of 69% (P < 0.01), and it was comparable to the intensity of these processes in the brain of the experimental animals. The activity of the antioxidant system enzyme – superoxide dismutase (SOD) is one of earliest responses to oxidative stress in the cells. The increase of SOD activity was determined in all fish species treated with aluminum ions. Exposure to aluminum ions induced the same increase of SOD activity in the brains of all studied fish species (Fig. 1).

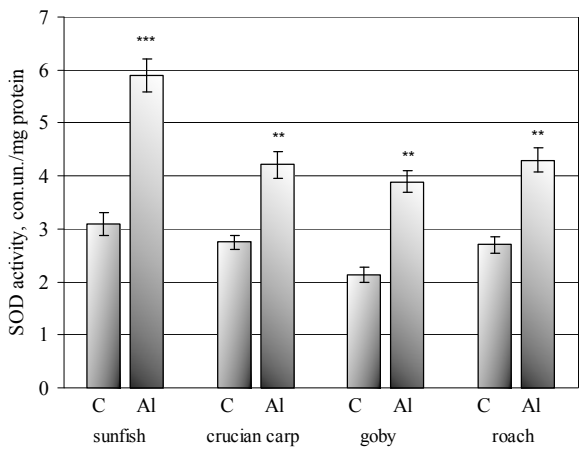


Fig. 1. SOD activity in the liver of sunfish, crucian carp, goby and roach groups treated with aluminum ions (Al) compared to control groups of fish (C): ** – P < 0.01, *** – P < 0.001 significance of differences in comparison with the control

SOD activity in the samples of sunfish liver was found to be almost 2.0 times greater than in the control group. Therefore, the increase in SOD activity of about 1.6 times in the samples from crucian carp wasn't so meaningful but this difference was still significant P < 0.01 (Fig. 2). More intensive growth of SOD activity in the liver tissue could relate to higher level of antioxidant protection of the liver cells compared to brain cells. The results of the research make it possible to assert that it is the nervous tissue of fish, due to the significant content of polyunsaturated fatty acids and high level of oxygen utilization (about 1/5 of total consumption), that is most susceptible to oxidative action. Therefore, oxidative damage of this type of tissue can be considered as the most probable mechanism of realization of toxic effects of aluminum ions.

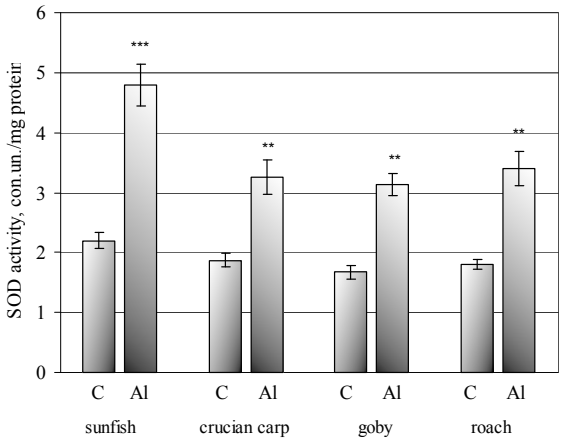


Fig. 2. SOD activity in the brain of sunfish, crucian carp, goby and roach groups treated with aluminum ions (Al) in compared to control groups of fish (C): see Fig. 1

The analysis of glial fibrillary acid protein (GFAP) content in the brain of sunfish, goby, crucian carp and roach fish individuals exposed to 10 mg/l Al^{3+} displayed a significant increase in the expression of this astroglial marker in fish of all groups (Fig. 3).

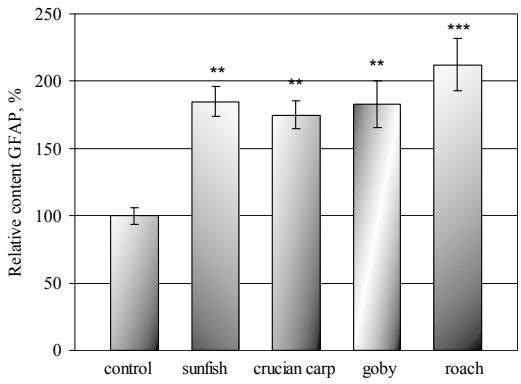


Fig. 3. Relative GFAP content in the brain of sunfish, crucian carp, goby and roach groups treated with aluminum ions (Al) in comparison with the control groups of fish (C): see Fig. 1

The treatment of all studied fish groups induced similar changes in GFAP expression. In the experimental groups of sunfish, crucian carp, goby and roach this was higher than the control values (P < 0.01) by 185%, 175%, 183% and 212%, respectively. In the group of goby and crucian carp, aluminum ions induced a more meaningful increase in the content of GFAP compared with sunfish and roach. Such an increase in protein expression indicates the species-specific features of astroglial reactivation in response to the action of aluminum ions. These differences may be caused by various trophic and mobile activities of the investigated species of fishes. The increase in the expression of the protein of intermediate glial filaments is accompanied by the appearance of degraded polypeptide fragments of GFAP. Such

derivatives can be identified by immunoblotting provided that their antigenic determinants are preserved in the native state. A comparative analysis of the polypeptide fragments composition of the GFAP showed a significant increase in the content of products of proteolytic degradation of the 49 kDa intact subunit in all fish species groups.

The detected differences imply the induction of intensive processes of reorganization of the cytoskeleton of nervous tissue astrocytes in the sunfishes from all the age groups by the ions of aluminum. Growth of the expression of an astroglial marker (GFAP) under the influence of higher than normal Al^{3+} concentrations was also detected in adults of mature fish of all studied species (sunfish, goby, crucian carp, roach). It was established that the chronic effect of aluminum ions induced a significant ($P < 0.01$) increase in the content of GFAP in the brain of mature adults of the experimental groups of crucian carp, goby, sunfish and roach in comparison with the control group on average by 75%, 83%, 85% and 112% respectively. The increase in the expression of GFAP is accompanied by the appearance of degraded polypeptide fragments of this protein. The most distinctive results of immunoblotting observed for cytoskeleton fractions of fish brain proteins extracted from the control and experimental groups are shown in Figure 4.

Fig. 4. Western blot results of the cytoskeletal fractions of the brain proteins from sunfish, crucian carp, goby, roach inhabiting water with chronic aluminum exposure (Al): C – control groups of fish

Comparative study of the water-soluble and cytoskeletal GPAP fractions from the experimental and control groups showed that the insoluble subunits of this protein, being the part of the cytoskeletal structures, are subject to proteolytic degradation to a greater extent. Thus, Al^{3+} ions induce not only the typical reactive response in astrocytes to metabolic disturbances, but also activate the degradation of the cytoskeleton molecular components in the nervous tissue of all the above-mentioned species of various age groups.

A number of cell processes, including migration of GFAP-positive cells, largely depends on the Ca^{2+} intake into the cell. At the same time, the regulation of Ca^{2+} intracellular concentration is carried out by means of calcium-binding proteins universal for all cell types. One type of such proteins is the neurospecific protein S100β, synthesized predominantly by neuroglia cells. It was found that prolonged exposure to aluminum chloride induces a significant increase in the cytosolic protein S100β content in the fish brain. A comparative analysis of the immunoblotting results, which allows one to evaluate the differences in the content of the S100β protein in the brains of mature adults of the sunfish and crucian carp in experimental and control groups, suggests a significant increase in the content of polypeptides with a molecular weight range from 24 to 37 kDa (Fig. 5).

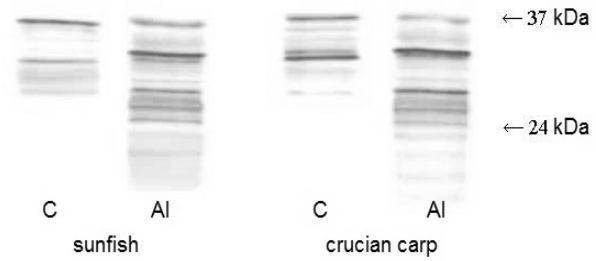


Fig. 5. Western blot results of cytosolic fractions of brain proteins of sunfish and crucian carp treated with aluminum ions (Al): C – control groups of fish

The content of this protein significantly increased in the fish brain of the experimental groups, namely: the sunfish (on average 105%, $P < 0.05$) and crucian carp (67% on average, $P < 0.01$) with respect to similar indices concerning the fish brain of the same control group species. The results of our study prove that intoxication with aluminum ions causes the response of molecular transformations in astroglial cells of the neural tissue. In the process of such changes an increase in the synthesis of the cytoskeletal GFAP is accompanied by a significant increase in the content of the cytosolic calcium-binding protein S100β and its derivatives with Mr = 24–37 кDa. These findings showing toxicity of aluminum ions for nervous tissue cells of fishes are completely consistent with current ideas about its potential neurotoxicity for a wide range of organisms (Gostomski, 1990). Our study shows that oxidative stress is closely associated with the development of reactive astrogliosis in the nervous tissue of fish from various pelagic zones. Aluminum ions induce the upregulation of both GFAP and protein S100β expression and also stimulate the proliferation and differentiation of astrocytes in the brains of various fish species. The most intensive astroglial reactivation was detected in the brains of mature fishes. At the same time, an increase in the content of LPO final products in the brains of individuals from this experimental group was lower than in other age groups. The research results indicate the important role of astrocytes in protecting nervous tissue during intoxication. The age-related differences in the intensity of astrogliosis indicate that young adults have the highest level of adaptive potential and the more pronounced ability of astrocytes to proliferate in the brains of fishes in the first half of ontogeny.

Data on the neurotoxic effect of aluminum are very limited. Exposure of salmon to Al in an acidic environment induced an elevation of plasma cortisol and glucose levels, which is a sign of physiological stress. The expression of $NeuroD_1$ transcript level was reduced as well as neural plasticity. Together these disturbances may impair the ability to adapt in various environments (Grassie et al., 2013). Al-induced toxicity was evaluated with 0.1 mg/l which accords to the maximum concentration allowed in order to protect aquatic organisms. Despite the low dose oxidative stress characteristics were determined such as LPO increase and moduation of SOD activity as well as neurotoxicity – rising of dopamine and adrenaline levels (Fernandez-Davila et al., 2012).

These results are in accord with the data obtained while using other fish species. The treatment of carp (*Cyprinus carpio*) with various aluminum doses displayed genotoxic and cytotoxic effects on the lymphocytes. Moreover, the authors found significant increase in the amount of DNA damage which is related to Al^{3+} ions concentration and duration of the exposure. The modification of DNA was accompanied with a growth of oxidized DNA level as well as cell cycle disturbances and activation of apoptosis (García-Medina et al., 2011).

The results of our studies allow us to conclude that the effect of aluminum ions on the nervous tissue of fish from various pelagic zones induces the occurrence of oxidative stress. As a result of oxidative disorders in the neural tissue, a cellular response is realized, namely the reactivation of astrocytes, which is accompanied by molecular transformations resulting in an increase in the expression of such astrocyte-specific proteins as GFAP and S100β protein. The increase in the synthesis of the cytoskeletal GFAP is closely associated with a significant increase in the content of the cytosolic calcium-binding protein S100β and its derivatives. The complex evaluation of astrogliosis indices (content of GFAP and S100β) and oxidative stress under the conditions of effect of aluminum ions can be used as valid biomarkers to assess the state of fish from various

pelagic zones during ontogenesis. The results obtained demonstrate significant polypeptide heterogeneity of GFAP. The most representative spectrum of degraded polypeptide fragments is found in the brains of fish treated with aluminum ions. Such heterogeneity is most likely to be the consequence of the destabilization of filament structures due to intensive rearrangement of intermediate filaments. Synthesized *de novo*, soluble polypeptides of GFAP can be actively included in such cytoskeletal rearrangements. Balance between synthesis of new subunits of GFAP and proteolysis of pre-existent cytoskeleton fibrils is extremely important for essential cellular functions, especially proliferation, migration, and regulation of cell reactivity (Tykhomyrov et al., 2016).

Earlier, it was demonstrated that the dynamic properties of intermediate filaments is associated with the exchange of subunits between pools of the soluble fraction and polymerized fibrils. Modern ideas demonstrate another way of restructuring filaments, i.e. through the limited proteolysis of their proteins under the influence of damaging factors. Proteolysis of filament proteins can be caused by an increase in the degree of their phosphorylation and an increase in the concentration of Ca^{2+} ions. Excessive phosphorylation of GFAP induces the destruction of the glial filament network during mitosis (Eng et al., 2000). With an increase in the concentration of calcium ions in the cell, degradation of the polypeptides of GFAP in situ can affect the Ca^{2+}-dependent calpain II proteinase, while the native protein is split into a series of polypeptides with a molecular weight in the range of 28–47 kDa (Nedzvetsky et al., 1991).

The nature of the glial response depends largely on both the nature of the damaging factors and the duration of the exposure: mechanical damage to the central nervous system induces rapidly increasing astrogliosis (Suzuki et al., 2012), and processed by-products of oil and aluminum ions cause a slower astroglial reaction (Nedzvetskii et al., 2006; Sukharenko et al., 2017). At the same time, various factors can cause similar astroglial reactivity. The maximum intensity of the astroglial response to critical damage coincides in time with the intensive death of cells in the nervous system (Ben Haim et al., 2015).

The brain forms a huge number of afferent and efferent pathways, connecting the central nervous system with peripheral organs. Nerve cells are considered to be a sensitive indicator of fish responses to the combined effects of toxins. This is due to the fact that the brain takes an active part in the formation of reflex reactions of fish with changing environmental conditions. The excitation that occurs during such reactions spreads rapidly throughout the body and can lead to loss or deterioration of the reflexes of balance, decreased muscle tone, deterioration of locomotor and many other physiological processes. The state of intermediate filaments of astrocytes is one of the reliable indicators of the plasticity of the properties of the nervous system. Astrocytes show the highest ability to react to the influence of unfavorable environmental factors, protect neurons and ensure their viability.

In many cases of neurodegenerative pathologies, biochemical signs of oxidative stress are present simultaneously with functional and structural disorders of proteins. Oxidative stress is one of the most common and main inducers of structural and functional disorders in the nervous tissue under the conditions of unfavourable factors of physical and chemical nature as well as metabolic disorders.

The results show that research on the effect of anthropogenic pollution substances with diverse chemical nature on the fishery value of water bodies cannot be performed only by studying common used oxidative stress data. Moreover, the state of the cytoskeleton of glial cells reflects a toxic anthropogenic affect and indicates the long-term benefits of using GFAP as a molecular marker of the toxic affect of environmental factors. The effects of modern environmental pollutants require complex study, which should combine the characteristics of both biochemical and molecular biomarkers. Integrated data on the biomarkers could be fruitful in detecting abnormal changes at the late stages of intoxication, at the level of irreversible changes. To recognize them earlier, it is necessary to use biochemical methods, since metabolic processes and molecular rearrangements form the basis of adaptive reactions of the organism.

Conclusions

The conparative analysis of results of research on the effects of aluminum ions on astrocyte reactivity, generation of oxidative stress in both the brain and liver of fishes from various pelagic areas permits one to observe the similar characters of both neuro- and hepatotoxicity of aluminum ions. Accordingly the data obtained on the content of POL final, show that aluminum ions induce more intense oxidative damage in neural tissue (in 1.5–2.0 times) in comparison with liver samples of fishes.

The chronic effect of aluminum chloride (10 mg/L) induces increase in expression of intermediate filament protein of astrocytes GFAP (on 75–112%) and cytosole calcium-bind protein S100β (by 67–112%). The growth of the synthesis of these markers is an index of astrocyte reactivity as a response to the neurotoxic effect of aluminum.

The neurotoxic effect of aluminum is associated with the increase of the content of proteolytic degradation products of both GFAP and protein S100β, which was determined in a range of molecular mass 40–49 and 24–37 kDa, respectively.

The proliferation and the migration of astrocytes are one of key mechanisms which provide the neural system function in conditions of stress induced by toxicants. The integrated measurement of the indexes of astrogliosis (GFAP, S100β content) coupled with the index of oxidative stress under the effect of aluminum ions could be used as valid biomarker to assess the state of fishes from various pelagic areas polluted with industrial waste.

References

Aksu, A. J. (2015). Sources of metal pollution in the urban atmosphere (A case study: Tuzla, Istabul). Journal of Environmental Health Science and Engineering, 13, 79.

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. Frontiers in Cellular Neuroscience, 9, 278.

Cardwell, A. S., Adams, W. J., Gensemer, R. W., Nordheim, E., Santore, R. C., Ryan, A. C., & Stubblefield, W. A. (2017). Chronic toxicity of aluminum, at a pH of 6, to freshwater organisms: Empirical data for the development of international regulatory standards/criteria. Environmental Toxicology and Chemistry, in print.

Driscoll, C. T. (1985). Aluminum in acidic surface waters: Chemistry, transport, and effects. Environmental Health Perspectives, 63, 93–104.

Eng, L. F, Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). Neurochemical Research, 25(9–10), 1439–1451.

Fernandez-Davila, M. L., Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Gomez-Olivan, L. M., Pinon-Lopez, M. J., Ibarra, R. G., & Galar-Martinez, M. (2012). Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae – *Ctenopharingodon idella*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 76(2), 87–92.

Garcia-Medina, S., Razo-Estrada, C., Galar-Martinez, M., Cortez-Barberena, E., Gomez-Olivan, L. M., Alvarez-Gonzalez, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2011). Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology, 153(1), 113–118.

Gillmore, M. L., Golding, L. A., Angel, B. M., Adams, M. S., & Jolley, D. F. (2016). Toxicity of dissolved and precipitated aluminium to marine diatoms. Aquatic Toxicology, 174, 82–91.

Gostomski, F. (1990). The toxicity of aluminum to aquatic species in the US. Environ Chemistry Health, 12(1–2), 51–54.

Grassie, C., Braithwaite, V. A., Nilsson, J., Nilsen, T. O., Teien, H. C., Handeland, S. O., Stefansson, S. O., Tronci, V., Gorissen, M., Flik, G., & Ebbesson, L. O. (2013). Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Experimental Biology, 216(16), 3148–3155.

Grassie, C., Braithwaite, V. A., Nilsson, J., Nilsen, T. O., Teien, H. C., Handeland, S. O., Stefansson, S. O., Tronci, V., Gorissen, M., Flik, G., & Ebbesson, L. O. (2013). Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Experimental Biology, 216(16), 3148–3155.

Liu, S., Noth, E. M, Dixon-Ernst, C., Eisen, E. A, Cullen, M. R, & Hammond, S. K. (2014). Particle size distribution in aluminum manufacturing facilities. Environmental Pollution, 4(3), 79–88.

Miller, G. L. (1959). Protein determination for large numbers of samples, Analytical Chemistry, 31(5), 964–966.

Nedzvetskii, V. S., Kirichenko, S. V., Baydas, G., & Nerush, O. P. (2012). Effects of melatonin on memory and learning deficits induced by exposure to thinner. Neurophysiology/Neirofiziologiya, 44(1), 42–48.

Nedzvetskii, V. S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A. A., & Baydas, G. (2006). Effects of vitamin E against aluminum neurotoxisity in rats. Biochemistry (Moscow), 71(3), 239–244.

Nedzvetskiy, V. S., & Nerush, P. O. (2011). Hyperthyreosis effects on the learning, memory and glial intermediate filaments of a rat brain. Physiology and Pathophysiology, 2, 269–278.

Nedzvetsky, V. S., Ushakova, G. A., Busigina, S. G., Berezin, V. A., & Dvoretsky, A. I. (1991). Effect of low-level radiation on intermediate filaments and Ca-activated proteolysis in rat brain. Radiobiology (Moscow), 31(3), 333–339.

Ohkawa, H. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95(2), 351–358.

Pereira, S., Cavalie, I., Camilleri, V., Gilbin, R., & Adam-Guillermin, C. (2013). Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. Mutation Research, 750(1–2), 19–26.

Singla, N., & Dhawan, D. K. (2015). Modulation of (14) C-labeled glucose metabolism by zinc during aluminium induced neurodegeneration. Neuroscience Research, 93(9), 1434–1441.

Sivakumar, S., Khatiwada, C. P., & Sivasubramanian, J. (2012). Bioaccumulations of aluminum and the effects of chelating agents on different organs of *Cirrhinus mrigala*. Environtal Toxicology and Pharmacology, 34(3), 791–800.

Skilbrei, O. T., Finstad, B., Urdal, K., Bakke, G., Kroglund, F., & Strand, R. (2013). Impact of early salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, infestation and differences in survival and marine growth of sea-ranched Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolts 1997–2009. Fish Diseases, 36(3), 249–260.

Sukharenko, E. V., Nedzvetsky, V. S., & Kyrychenko, S. V. (2017). Biomarkers of metabolism disturbance in bivalve molluscs induced by environmental pollution with processed by-products of oil. Biosystems Diversity, 25(2), 113–118.

Sun, J. J., Liu, Y., & Ye, Z. R. (2008). Effects of P_2Y_1 receptor on glial fibrillary acidic protein and glial cell line-derived neurotrophic factor production of astrocytes under ischemic condition and the related signaling pathways. Neuroscience Bulletin, 24(4), 231–243.

Suzuki, T., Sakata, H., Kato, C., Connor, J. A., & Morita, M. (2012). Astrocyte activation and wound healing in intact-skull mouse after focal brain injury. European Journal of Neuroscience, 36(12), 3653–3664.

Trenfield, M. A., Markich, S. J., Ng, J. C., Noller, B., & van Dam, R. A. (2012). Dissolved organic carbon reduces the toxicity of aluminum to three tropical freshwater organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 31(2), 427–436.

Tykhomyrov, A. A., Pavlova, A. S., & Nedzvetsky, V. S. (2016). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): On the 45th anniversary of discovery. Neurophysiology (Springer), 48(1), 54–71.

Walton, R. C., McCrohan, C. R., Livens, F., & White, K. N. (2010). Trophic transfer of aluminium through an aquatic grazer-omnivore food chain. Aquatic Toxicology, 99(1), 93–99.

Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(3)

Table of Contents

Stepanskyi, D. O., Kremenchutskyi, G. M., & Koshova, I. P. Experimental study of action of autostrains *Aerococcus viridans* on the model *Pseudomonas* infection 313
Kuryata, V. G., Poprotska, I. V., & Rogach, T. I. The impact of growth stimulators and retardants on the utilization of reserve lipids by sunflower seedlings 317
Gavrilin, P. N., Gavrilina, O. G., Brygadyrenko, V. V., & Rahmoun, D. E. Structural and functional units of parenchyma of lymph nodes of dromedaries (*Camelus dromedarius*) 323
Popel', S. L., Bylous, O. T., & Bylous, I. V. Features of structure of motor nerve endings in the tongue of normal and dehydrated rats 333
Derkach, K. V., Satarova, T. M., Borysova, V. V., Cherchel, V. Y., & Dzyubeckiy, B. V. Grouping and clustering of maize Lancaster germplasm inbreds according to the results of SNP-analysis 343
Lapirov, A. G., Belyakov, E. A., & Lebedeva, O. A. Biomorphology and rhythm of seasonal development of the relic species *Lobelia dortmanna* in oligotrophic lakes of Tver region 349
Liashevych, A. M., Tubaltseva, I. I., Reshetnik, Y. M., Bondarenko, O. V., Veselsky, S. P., & Makarchuk, M. Y. Bile lipids in rats under chronic social stress 356
Gan, R. Z., & Popel', S. L. Morphological and biochemical mechanisms of changes in buccal epithelocytes and erythrocytes in children suffering psycho-emotional stress 363
Lukashiv, O. Y., & Grubinko, V. V. The influence of a selenium-chromium-lipid complex obtained from *Chlorella vulgaris* on the energy metabolism in rats with experimental diabetes 369
Reshetniak, D. Y., Pakhomov, O. Y., & Brygadyrenko, V. V. Possibility of identifying plant components of the diet of *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) by visual evaluation 377
Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine 384
Andreieva, I. A., & Tokarenko, O. I. Left ventricular diastolic function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome and obesity 389
Luchynskyi, M., Luchinskyi, V., Shcherba, V., Demkovych, A., & Luchinska, Y. Mechanism of changes of peripheral neuromuscular endings of the tongues of rats with experimental streptozotocyn diabetes mellitus 397
Miroshnichenko, I. M., Makoveychuk, T. I., Mykhalska, L. M., & Schwartau, V. V. Changes in the elemental composition of winter wheat plants caused by the action of Megafol and retardants 403
Masiuk, D. M., Sosnitsky, O. I., Nedzvetsky, V. S., Kokarev, A. V., & Koliada, S. G. Endemic course of epidemic diarrhea of pigs in the stabilized focus of infection 410
Sobolev, A., Gutyj, B., Grynevych, N., Bilkevych, V., & Mashkin, Y. Enrichment of meat products with selenium by its introduction to mixed feed compounds for birds 417
Bondarenko, S. E., Akonjom, M., Filipenko, V. A., Morozenko, D. V., Badnaoui, A., & Gliebova, K. V. Dynamics of biochemical and immunological blood markers in patients with pseudoarthrosis of the femoral neck after total hip arthroplasty 423
Gutyj, B., Leskiv, K., Shcherbatyy, A., Pritsak, V., Fedorovych, V., Fedorovych, O., Rusyn, V., & Kolomiiets, I. The influence of Metisevit on biochemical and morphological indicators of blood of piglets under nitrate loading 427
Al-Hijazeen, M., & Al-Rabadi, G. Dietary energy source affecting fat deposition mechanism, muscle fiber metabolic and overall meat quality 433
Gutyj, B., Grymak, Y., Drach, M., Bilyk, O., Matsjuk, O., Magrelo, N., Zmiya, M., & Katsaraba, O. The impact of endogenous intoxication on biochemical indicators of blood of pregnant cows 438
Romanchuk, L. D., Fedonuk, T. P., & Khant, G. O. Radiomonitoring of plant products and soils of Polissia during the long-term period after the disaster at the Chornobyl Nuclear Power Plant 444
Maltsev, Y. I., Konovalenko, T. V., Barantsova, I. A., Maltseva, I. A., & Maltseva, K. I. Prospects of using algae in biofuel production 455
Sukharenko, E. V., Samoylova, I. V., & Nedzvetsky, V. S. Molecular mechanisms of aluminium ions neurotoxicity in brain cells of fish from various pelagic areas 461