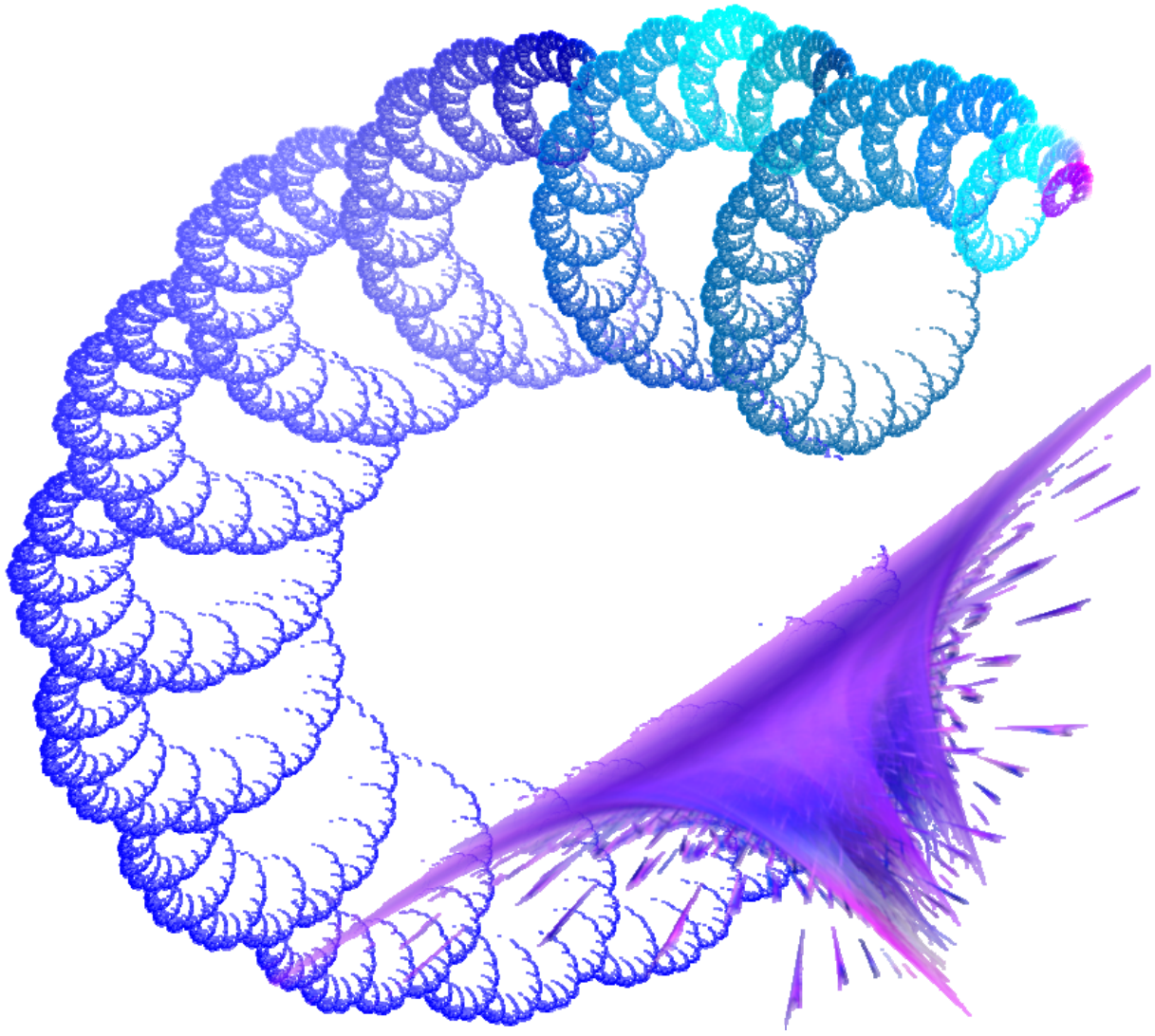
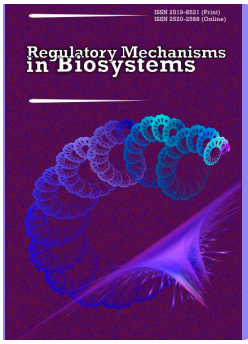
ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Regulatory Mechanisms in Biosystems



Volume 8(4)



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;

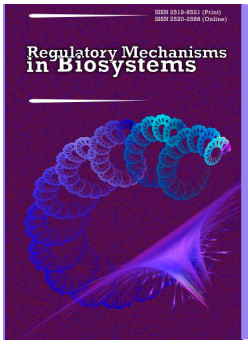
Prof., D. Sc., *A. I. Vinnikov*, Department of Microbiology, Virology and Biotechnology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

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 Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 469–475
doi: 10.15421/021772

Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) on agar media and plant substrates

O. B. Mykchaylova*, N. A. Bisko*, M. M. Sukhomlyn**, M. L. Lomberg*,
M. V. Pasaylyuk***, Y. V. Petrichuk***, A. P. Gryganskyi****

**M. G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*
***Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine*
****Hutsulshchyna National Nature Park, Kosiv, Ukraine*
*****LF Lambert Spawn Co., Coatesville, USA*

Article info

Received 07.09.2017
Received in revised form 20.10.2017
Accepted 23.10.2017

M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshenkivska Str., 2, Kyiv, 01601, Ukraine.
E-mail: mikhajlova.ok@gmail.com

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine. Volodymyrs'ka Str., 64, Kyiv, 01033, Ukraine.
E-mail: marsuh@i.ua

Hutsulshchyna National Nature Park, Kosiv, Ukraine.
E-mail: masha.pasajlyuk@gmail.com

LF Lambert Spawn Co., 1507 Valley Rd, Coatesville, PA 19320, USA.
E-mail: andrii.gryganskyi@gmail.com

Mykchaylova, O. B., Bisko, N. A., Sukhomlyn, M. M., Lomberg, M. L., Pasaylyuk, M. V., Petrichuk, Y. V., & Gryganskyi, A. P. (2017). Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom Fomitopsis officinalis (Fomitopsidaceae, Polyporales) on agar media and plant substrates. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 469–475. doi:10.15421/021772

Fomitopsis officinalis (Vill.) Bondartsev & Singer is a rare and endangered medicinal mushroom, known in medical practice as agarikon. Strain 5004 of *F. officinalis* from the IBK Mushroom Culture Collection of M. G. Kholodny Institute of Botany was verified using morphological and molecular genetic techniques. DNA analysis shows 99% identity of the investigated strain to other *F. officinalis* sequences deposited in NCBI databases. The results of the study of the biological characteristics of *F. officinalis* 5004 on agar nutrient media and plant substrates of various compositions are presented. We observed the microstructures of *F. officinalis* culture using light and scanning electron microscopy. The hyphae have regular unilateral clamp connections of two types: without a slit and rare medallion-type clamps, some anastomoses and mycelial cords as well as blastoconidia after prolonged cultivation (more than 30 days). The incrustation of the hyphae in the form of thin villi is revealed for the first time. The morphology of the mycelial colonies of *F. officinalis* depended on the composition of the nutrient medium. According to the radial growth rate the culture of investigated species belongs to the fungi growing very slowly within 0.4–1.9 mm/day. The fastest growth of *F. officinalis* 5004 was observed on malt agar with the addition of larch sawdust: 1.8 ± 0.1 mm/day. The critical temperature for mycelial growth was 41 ± 0.1 ºC. We tried three variants of plant substrates for fructification: sunflower husk, larch sawdust and larch chips. The substrate composition influenced the vegetative growth and the formation of teleomorph stage. The sunflower husk was the most favorable substrate for the growth of vegetative mycelium. The mycelium had completely colonized this substrate by the 30th day, in contrast to the larch chips, which were only partially colonized (ca. 50%) on 30–40th days of experiment. The fungus developed fruit bodies on both substrates: the sunflower husk and larch chips. The least suitable substrate for vegetative growth of this species was the larch sawdust. After two months of incubation, the mycelium covered only 27% of the visible surface of substrate blocks, with no primordia and fruiting bodies forming. Thus, the obtained mycelium growth parameters on nutrient media, micro- and macromorphological characteristics can be used as additional taxonomic characteristics of *F. officinalis* culture in the vegetative stage of growth. The strain IBK 5004 may become a potential producer for new fungal biotechnologies in Ukraine in the near future.

Keywords: scanning electron microscopy; mycelial colony; radial growth rate; critical temperature; fruiting

Біологічні особливості рідкісного лікарського гриба *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) на агаризованих живильних середовищах і рослинних субстратах

О. Б. Михайлова*, Н. А. Бісько*, М. М. Сухомлин**, М. Л. Ломберг*,
М. В. Пасайлюк***, Ю. В. Петричук***, А. П. Григанський****

**Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна*
***Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна*
****Національний природний парк «Гуцульщина», Косів, Україна*
*****Компанія «LF Lambert Spawn», Коатсвіль, США*

Проведено верифікацію штаму *Fomitopsis officinalis* 5004 з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) із застосуванням молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних методів дослідження. За результатами ДНК-типування рівень гомології штаму становив 99%. Наведено результати дослідження біологічних особливостей штаму на агаризованих живильних середовищах і рослинних субстратах різного складу. Вивчено мікроструктури вегетативного міцелію методами оптичної та сканувальної електронної мікроскопії. У культури *F. officinalis* 5004 спостерігали гіфи з регулярними однобічними пряжками без зазору, дуже рідко пряжки медальйонного типу, незначну кількість анастомозів і міцеліальних тяжів, після тривалого культивування (понад 30 діб) формувались бластоконідії. Вперше для виду *F. officinalis* виявлено інкрустацію гіф у вигляді тонких ворсинок. За показником радіальної швидкості росту досліджену культуру віднесено до групи грибів, що ростуть дуже повільно. Найсприятливішим для вегетативного росту виявився солодовий агар із додаванням тирси модрини з максимальною швидкістю росту 1,8 мм/добу. З'ясовано критичну температуру для росту вегетативного міцелію штаму *F. officinalis* 5004 – 41 ± 0,1 ºС. Протестовано рослинні субстрати різного складу для культивування та отримання плодових тіл дослідженого виду у штучних умовах. Найсприятливішим субстратом виявилося лушпиння соняшника, повне обростання якого відбувалося на 30-ту добу експерименту, а формування зачатків плодових тіл починалося з 20-ї доби культивування.

Ключові слова: сканувальна електронна мікроскопія; гіфи; міцеліальна колонія; радіальна швидкість росту; критична температура; плодоношення

Вступ

Fomitopsis officinalis (Vill.) Bondartsev & Singer – рідкісний лікарський гриб, відомий у медичній практиці як «модринова губка». У «Червоній книзі України» *F. officinalis* наводиться під різними назвами: *Boletus officinalis* Vill., *Fomes officinalis* (Vill) Neum., *Laricifomes officinalis* (Vill.) Kotl. & Pouzar тощо та має природоохоронний статус – «зниклий» (Diduh, 2009). *F. officinalis* – паразит, який розвивається на стовбурах модрини (*Larix sibirica* Ledb., *L. sukaczewii* Dyl., *L. gmelinii* (Rupr) Rupr., *L. kamchatica* (Rupr) Carr.) і деяких інших видів хвойних, викликаючи буру кубічну серцевинну гниль. Трапляється у Євразії та Північній Америці. Найбільше його поширення спостерігається у хвойних лісах Красноярського краю, Бурятії, Туви. В Україні ще у першій половині XX століття вид знаходили на території Карпатських і західноукраїнських лісів, проте останнім часом повідомлення про його знахідки відсутні (Diduh, 2009).

Модринова губка – цінний лікарський гриб, який має тривалу історію використання (Wasser, 2010; Chang and Wasser, 2012; Hwang et al., 2013; Grienke et al., 2014; Wasser, 2014; Gabriel, 2016). Сучасні дослідження довели, що модринову губку можна вважати не лише цінною природною сировиною, а і перспективним продуцентом для отримання фармакологічних речовин широкого спектра дії. Із плодових тіл та міцелію *F. officinalis* виділено каротиноїди, стерини, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, глюкозаміни, агарицинову кислоту, біофлавоноїди, вітаміни групи B, E, A, ефірні олії, цитокініни (Oorzhak, 2006; Kovaleva, 2009; Wasser et al., 2011; Cukanova and Belikov, 2013; Vedenicheva et al., 2016). Водні та вуглекислотні екстракти, отримані з плодових тіл *F. officinalis*, мають протимікробну активність до умовно-патогенних бактерій, а також до патогенної бактерії *Mycobacterium tuberculosis* (Ayrapetova et al., 2009; Chang et al., 2013; Gregori et al., 2013). Діюча речовина, яка забезпечує фармакологічний ефект, – агарицинова кислота (Gavrilin et al., 2006). Водні екстракти, отримані з міцелію модринової губки, проявляють онкостатичну активність відносно клітин асцитної карциноми Ерліха (АКЕ) (Kovaleva, 2009) та активні стосовно вірусу грипу різних субтипів (H_5N_1 1N = 3,00 ± 0,11 lg, H_3N_2 IN = 1,50 ± 0,25 lg) (Tepljakova et al., 2014).

Збирання плодових тіл цього гриба разом із неконтрольованим вирубуванням лісів викликали різке скорочення чисельності локалітетів виду (Gregori et al., 2013). Тому сьогодні *F. officinalis* включений до Червоних списків шести європейських країн у категоріях рідкісний (rare), критично рідкісний (extremely rare) чи зникаючий (declining species) та 13 регіонів Російської Федерації (Chlebicki et al., 2003).

Зважаючи на фармакологічну цінність *F. officinalis* та його природоохоронний статус, збереження цього виду – пріоритетне завдання науковців (Hawksworth, 2004; Piętka and Grzywacz, 2005; Gregori et al., 2013). Оскільки на території України у природних умовах вид тривалий час не реєстрували, практичний бік охорони *F. officinalis* нині реалізується шляхом підтримання штамів цього виду в Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (об'єкт національного надбання України) та внесена до міжнародної бази даних Всесвітньої федерації колекцій культур – WFCC (код доступу 1152; www.wfcc.info) (Lomberg et al., 2015; Bisko et al., 2016).

Загалом у базі даних WFCC представлено дев'ять штамів цього виду (http://gcm.wfcc.info). Три з них зберігаються в Колекції культур Ботанічного інституту РАН (LE BIN), чотири зазначені в Колекції культур CBS (Тіроль, Австрія), один – у Колекції MUT (Пьемонт, Італія).

Відомості щодо культурально-морфологічних характеристик *F. officinalis* до останнього часу залишалися досить обмеженими. Переважна більшість опублікованих праць присвячена поширенню, екології та охоронному статусу цього виду у природі або дослідженню біохімічного складу та кількісної ідентифікації основних груп біологічно активних речовин у плодових тілах, зібраних у природних умовах. Проте біологічні властивості губки модринової у культурі досліджені фрагментарно. Таким чином, мета цієї статті – встановити культурально-морфологічні особливості штаму *F. officinalis* 5004 на щільних живильних середовищах і рослинних субстратах різного складу. Таке дослідження – важливий етап із погляду збереження цього виду в культурі, відновлення у природному середовищі, пошуку та розроблення біотехнології отримання біологічно активних речовин різноманітного призначення.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – чиста культура *F. officinalis* 5004, яка зберігається у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (ІВК) (Bisko et al., 2016). Видову приналежність культур визначали культурально-морфологічними та молекулярно-генетичними методами. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на базі Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного (Київ, Україна) та компанії L. F. Lambert Spawn Co. (Коатсвіль, США). Згідно з усталеною практикою, джерелом ДНК у мікологічних дослідженнях виступала чиста аксенічна культура (Kumar and Shukla, 2005). У нашому дослідженні використали 20-добовий вегетативний міцелій штаму *F. officinalis* 5004.

Екстракцію ДНК дослідженої культури здійснювали за модифікованою експрес-методикою, запропонованою Dörnte et al. (2013). Міцеліальну масу вагою 30–50 мг стерильно переносили до пластикової пробірки-епендорфа для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 200 мкл, у яку попередньо вносили 50 мкл стерильного буферного розчину. При цьому намагались уникнути переносу до пробірки агаризованого середовища, тому що його присутність у пробі пригнічує ПЛР. Для приготування буферного розчину в мірну колбу об'ємом 100 мл вносили 10 мл розчину А і 2 мл розчину Б (розчин А: TRIS 1,21 г розчиняли в 10 мл дистильованої води; розчин Б: EDTA 1,46 г розчиняли в 10 мл дистильованої води), доводили до мітки та автоклавували при 0,75 атм. pH розчину становить 8,0.

Готові епендорфи з міцелієм щільно закривали, після чого переносили в мікрохвильову піч на 1 хв за потужності мікрохвилі 1,2 кВт, та нагрівали двічі з перервою в 1,5 хв, щоб

запобігти тепловій деформації пробірок. При цьому ДНК потрапляла у буфер, який, відповідно, являв собою готовий екстракт тотальної ДНК, одержаної з даного зразка. За допомогою піпетки-дозатора 25 мкл надосадової рідини переносили у двох повторах до стерильних 50 мкл пробірок для PCR. Готовий продукт зберігали за температури –20 °С до подальшого використання. Надалі заморожені зразки транспортували до молекулярної лабораторії L. F. Lambert Spawn Co. (Коатсвіль, Пенсильванія, США), де були проведені всі подальші молекулярні дослідження.

ПЦР здійснювали в ампліфікаторі T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США), використовуючи стандартний протокол для ділянок внутрішнього транскрибувального спейсера (ITS) у грибів (Kumar and Shukla, 2005). Для підтвердження успішності ампліфікації здійснювали гель-електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в 1% агарозному гелі на основі буферу 1xSB (борат натрію, Faster Better Media LLC, Хант Велей, США) за напруги 120 В у PowerPac TM Basic (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Візуалізацію продуктів ПЛР проводили в транс-ілюмінаторі Universal Hood 75S (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Ампліфікований продукт PCR очищали від залишків полімеразної суміші за допомогою креветкової лужної фосфатази (GE Healthcare, Прінстон, США) – 0,1 одиниці, та екзонуклеази I (New England Biolabs, Іпсвіч, США) – 0,.23 одиниці на один зразок відповідно. Для визначення нуклеотидних послідовностей досліджуваного фрагмента геному очищені продукти ПЛР секвенували методом Сенгера з використанням праймера ITS4 у PrimBio Research Institute (Екстон, США). Послідовності відредаговані та вирівняні з використанням програмного пакета Geneious v. 8.1.8 (Biomatters LTD, Окленд, Нова Зеландія).

Верифікацію штаму 5004 проводили на основі нуклеотидної послідовності генів рДНК (ITS1-5,8S-ITS2), аналізуючи отримані дані в програмі MEGA 6. Для пошуку близько споріднених послідовностей використовували евристичний алгоритм на сервері BLAST (http://www.ncbi.n/m.nih.gov/blast), який дозволяє визначати гомологічні послідовності у доступній міжнародній базі даних нуклеїнових кислот (NCBI) Національного Центру біотехнологічної інформації Національного інституту Здоров'я США GenBank (http://www.ncbi.n/m.nih.gov/Genbank).

Морфологію та зростання культури досліджували на стандартних і модифікованих агаризованих живильних середовищах різного складу: 1) мальц екстракт агар (MEA); 2) солодовий агар (8° по Балінгу) з додаванням 1% тирси модрини (CAM); 3) солодовий агар (8° за Балінгом) з додаванням 1% тирси вишні (CAB); 4) картопляно-декстрозний агар (DIFCO) (КДА); 5) глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 5,0; дріжджовий екстракт – 3,0; агар-агар – 20, pH 5,5. Як посівний матеріал використані 14-добові культури, вирощені на CAM. Диски міцелію діаметром 5 мм вирізали стерильною стальною трубкою по краю (до 10 мм) активно ростучої колонії, переносили їх у центр чашки Петрі із зазначеними вище середовищами та інкубували в термостаті за 26 ± 0,1 °С. Визначення впливу екстремальних значень температури на життєздатність дослідженої культури *F. officinalis* проводили у пробірках зі скошеним середовищем CAM за температур 30–42 °С із кроком 1 ± 0.1 °С. Після третьої доби інкубації враховували наявність чи відсутність росту міцелію. Пробірки, на яких ріст міцелію не спостерігали, далі інкубували за температури 26 ± 0.1 °С. Поновлення росту або втрату життєздатності міцелію культури фіксували після 10 діб інкубації. Радіальну швидкість росту розраховували за методикою (Solomko et al., 2000; Lomberg and Solomko, 2012). Мікро- та макроморфологічні особливості міцелію визначали на чотиритижневих колоніях за стандартними методиками, запропонованими П. Сталперсом (Stalpers, 1978). Макроморфологічна характеристика колонії включала в себе опис текстури міцеліальної колонії та її колір, запах міцелію, колір реверзуму, мікроморфологічна – опис характерних особливостей гіфальної системи, наявність на міцелії пряжок і анаморф. Мікроструктури вегетативного міцелію досліджували у світловому мікроскопі марки МБІ-6 та сканувальному електронному мікроскопі JSM-35C (Японія), використовуючи модифікований метод Е. Квательбаума і Г. Карнера (Buhalo et al., 2011).

Динаміку росту вегетативного міцелію *F. officinalis* на рослинних субстратах різного складу досліджували в лабораторії екологічного моніторингу НПП «Гуцульщина». Використано такі субстрати: 1) модринова стружка; 2) модринова тирса; 3) лушпиння соняшника. Модринову стружку отримували у процесі стругання здорової модринової деревини, розміри дерев'яних частинок складали 10 × 10–40 × 1 мм. Модринову тирсу отримували під час розпилювання здорової модринової деревини, розміри дерев'яних частинок 1–2 мм (надання модринового матеріалу для досліджень погоджено Науково-технічною радою НПП «Гуцульщина» від 23.12.2015 р.).

Усі субстрати зволожували до 60% вологості та розкладали в 1 л колби. Кожна колба містила 40 ± 1,5 г зволоженого субстрату. Ємності з усіма варіантами субстратів автоклавували 90 хв за двох атмосфер.

Колби із субстратами стерильно інокулювали посівним міцелієм 25-денного віку, вирощеним на CAM при 26 ± 0.1 °С. У кожну колбу вносили 1/4 частини колонії міцелію з чашки Петрі, діаметром 90 мм. Посіви інкубували за температури 26 ± 0,1 °С. Щодня візуально контролювали та реєстрували ступінь обростання субстрату міцелієм культури. Для цього лінійкою вимірювали висоту субстрату, який обріс міцелієм із чотирьох взаємно перпендикулярних боків ємності. Обчислювали середні значення та визначали (у %) висоту оброслого міцелієм субстрату.

Всі досліди проводили у трьох біологічних повторностях. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Результати

Штам *F. officinalis* 5004 зберігається у Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) понад 35 років (Bisko et al., 2016). Підтвердження його таксономічного статусу необхідне для проведення подальших досліджень цієї культури. Підтвердження видової приналежності *F. officinalis* 5004 проведено із застосуванням молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних методів дослідження.

Для штаму *F. officinalis* 5004 проведене повне визначення нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрипційного спейсера: ITS1, 5.8S та ITS2 регіонів рРНК, а також часткове визначення 18S та 28S послідовностей, що оточують ITS. У результаті пошуку в генбанку депоновані там послідовності зразків *F. officinalis* показали 99% ідентичності з отриманими нами послідовностями, підтвердивши тим самим вид дослідженого штаму. Найближчий штам із бази даних NCBI до досліджуваної нами культури *F. officinalis* 5004 (код доступу MF952886) – ізолят ОКМ-8050 *Fomitopsis officinalis* (код доступу KC585355.1).

Додаткову верифікацію штаму *F. officinalis* 5004 проведено класичними морфолого-культуральними ознаками: досліджено мікро- та макроморфологію вегетативного міцелію за сукупністю ознак на стандартному живильному середовищі за традиційною класифікацією Stalpers (1978), ростові показники (радіальна швидкість росту), відношення до температури, наявність генеративної стадії на певних живильних середовищах.

У результаті проведеного дослідження мікроморфології за допомогою світлового та сканувального електронного мікроскопів установлено, що вегетативний міцелій *F. officinalis* 5004 складається переважно з тонкостінних, помірно розгалужених, регулярно септованих, незабарвлених генеративних гіф діаметром 1,2–3,5 мкм. На гіфах утворювались численні, поодинокі пряжки без зазору (рис. 1), дуже рідко пряжки медальйонного типу, незначна кількість анастомозів та міцеліальних тяжів.

Крім того, вперше для *F. officinalis* спостерігали інкрустацію гіф у вигляді тонких ворсинок. Після тривалого культивування понад 30 діб на вегетативному міцелії формувались товстостінні бластоконідії еліпсоїдної форми.

У результаті проведених досліджень на агаризованих живильних середовищах різного складу виявлено мінливість морфологічних ознак міцеліальних колоній *F. officinalis* залежно від складу середовищ. Формувались два основні типи колоній.

1. Колонії дуже щільні, непрозорі, повстисті, рідше оксамитові, білого кольору зі значною кількістю коротких повітряних гіф. Край колонії нерівний, злегка піднятий над субстратом, запах відсутній або слабо фруктовий. Колір реверзуму збігається із кольором середовища.

2. Колонії розріджені, шерстисті або борошнисті, край нерівний, злегка піднятий над субстратом, запах відсутній. Забарвлення реверзуму не спостерігали.

Висота та щільність колоній варіювали залежно від складу живильного середовища. Найсприятливішим для росту виявилось середовище САМ, до складу якого входила тирса модрини. На ньому формувались колонії першого типу (рис. 2*а*). На середовищі ГПДА хоча і спостерігали колонії першого типу, проте їх розміри навіть на 30-ту добу культивування не перевищували 30 мм у діаметрі (рис. 2*б*). Колонії другого типу формувались на МЕА та КДА (рис. 3*а*). На всіх використаних середовищах із віком з'являлись краплі ексудату та пігментація коричневого кольору (рис. 3*б*).

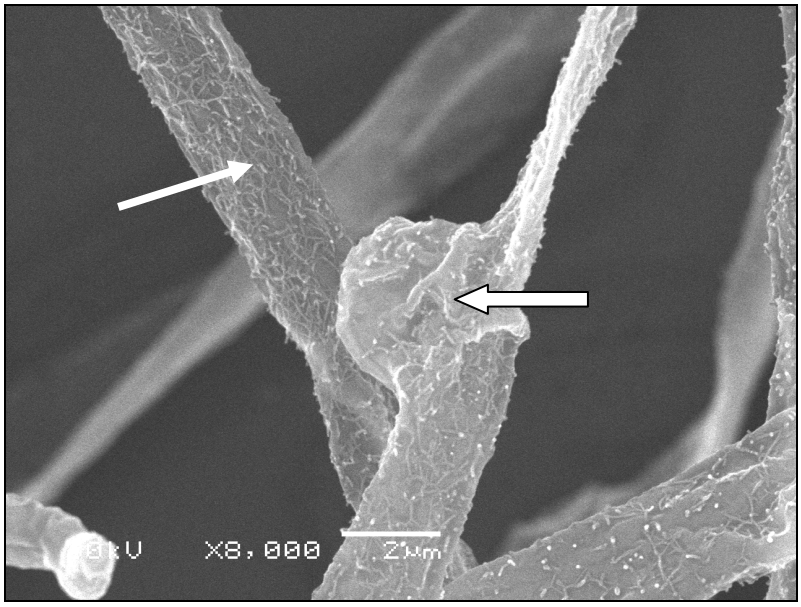


Рис. 1. *Fomitopsis officinalis* 5004: пряжка на гіфі без зазору, інкрустація гіф

Визначено швидкість радіального росту на агаризованих живильних середовищах різного складу, встановлено залежність цього показника від складу поживних речовин (рис. 4).

Культура *F. officinalis* 5004 характеризується низькою швидкістю радіального росту та вимогливістю до складу живильних середовищ. Для дослідженого штаму максимальну швидкість росту забезпечував солодовий екстракт із додаванням тирси модрини (1,9 мм/добу). На решті живильних середовищ швидкість радіального росту реєстрували в межах 0,4–1,0 мм/добу. За швидкістю радіальної росту *F. officinalis* можна віднести до групи грибів, які ростуть дуже повільно (менше 2 мм/добу).

Досліджено вплив критичних температур на ріст і життєздатність вегетативного міцелію. Культура *F. officinalis* 5004 за підвищення температури інкубації до 37 ± 0,1 °С не росла, проте не втрачала своєї життєздатності та відновлювала ріст під час перенесення її за умов 26 ± 0,1 °С протягом тижня. Температура 41 ± 0,1 °С з експозицією три доби виявилась критичною для росту вегетативного міцелію.

Вплив складу субстратів на ріст вегетативного міцелію та формування стадії телеоморфи досліджували на трьох варіантах рослинних субстратів: лушпиння соняшника, модринова тирса та модринова стружка.

Аналіз отриманих результатів дав змогу встановити певні показники та визначити специфіку росту культури *F. officinalis* 5004 на субстратах різного складу. Найсприятливішим субстратом для росту вегетативного міцелію виявилось лушпиння соняшника, на 30-ту добу експерименту спостерігали повне обростання субстрату, на відміну від модринової тирси та модринової стружки, які повністю не заростали. Відсоток обростання модринової стружки міцелієм *F. officinalis* на 30–40-ву добу експерименту складав 50%. Найнижчий відсоток обростання (27%) характерний для модринової тирси: показники виходили на плато на 20-ту добу експерименту та залишалися такими навіть на 60-ту добу від дати внесення міцелію у субстрат (рис. 5).

Формування зачатків плодових тіл спостерігали лише на двох субстратах – лушпинні соняшника та модриновій стружці. На лушпинні соняшника примордії формувалися після 20-ї доби культивування, вони були молочно-кремового кольору, покривали субстрат щільним товстим шаром (рис. 6).

На модриновій стружці поодинокі зачатки плодових тіл починали формуватись на 30-ту добу культивування. На противагу плодовим тілам, сформованим на лушпинні соняшника, плодові тіла, сформовані на модриновій стружці, були сніжно-білими, їх краї мали зірчастоподібний вигляд (рис. 7). Таким чином, формування зачатків плодових тіл спостерігали лише на лушпинні соняшника та модриновій стружці. Модринова тирса – малопридатний субстрат для обростання міцелієм *F. officinalis* 5004 та непридатна для формування зачатків плодових тіл гриба.

Обговорення

Під час роботи з культурами макроміцетів необхідно постійно контролювати їх чистоту за встановленими мікро- та макроморфологічними ознаками певного виду (Nobles, 1971). Одна з найважливіших таксономічних ознак під час ідентифікації базидієвих макроміцетів у культурі – наявність унікальної структури – пряжок, які утворюються на міцелії багатьох представників цієї групи грибів (Stalpers, 1978). Різні види характеризуються певними відмінностями в розташуванні пряжок на міцелії, частоті їх утворення, розмірах тощо (Buchalo et al., 2011; Volz and Nevo, 2009). Для даного виду встановлено два типи пряжок: класичні та медальйонні.

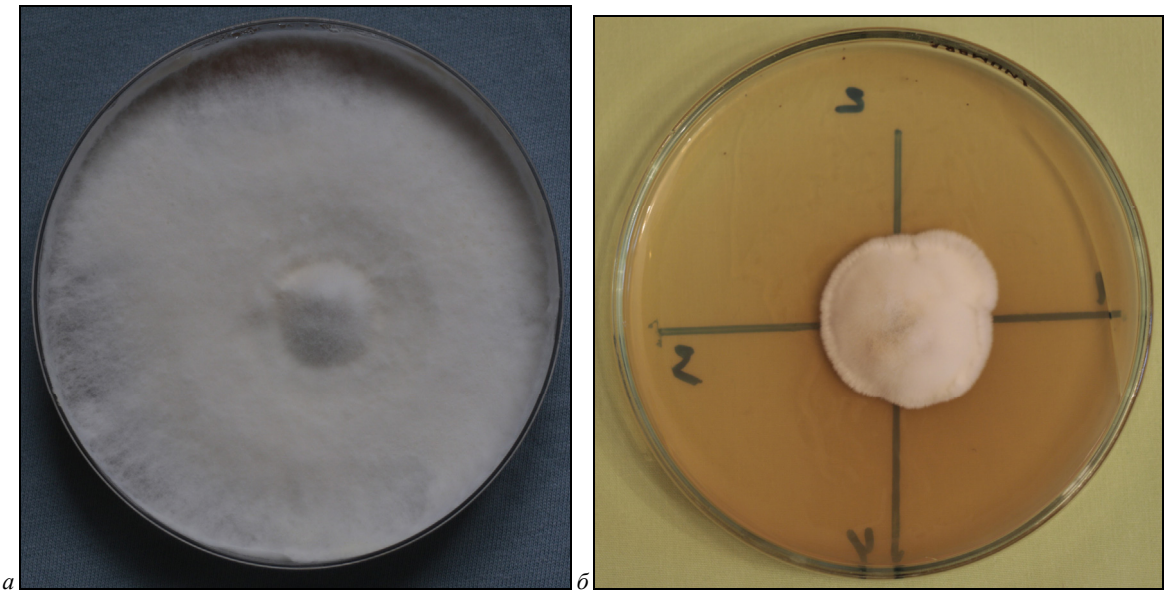


Рис. 2. Міцеліальні колонії *Fomitopsis officinalis* 5004 на агаризованому живильному середовищі САМ (*а*) і ГПДА (*б*) за температури інкубації 26 ± 0,1 °С (30-та доба культивування)

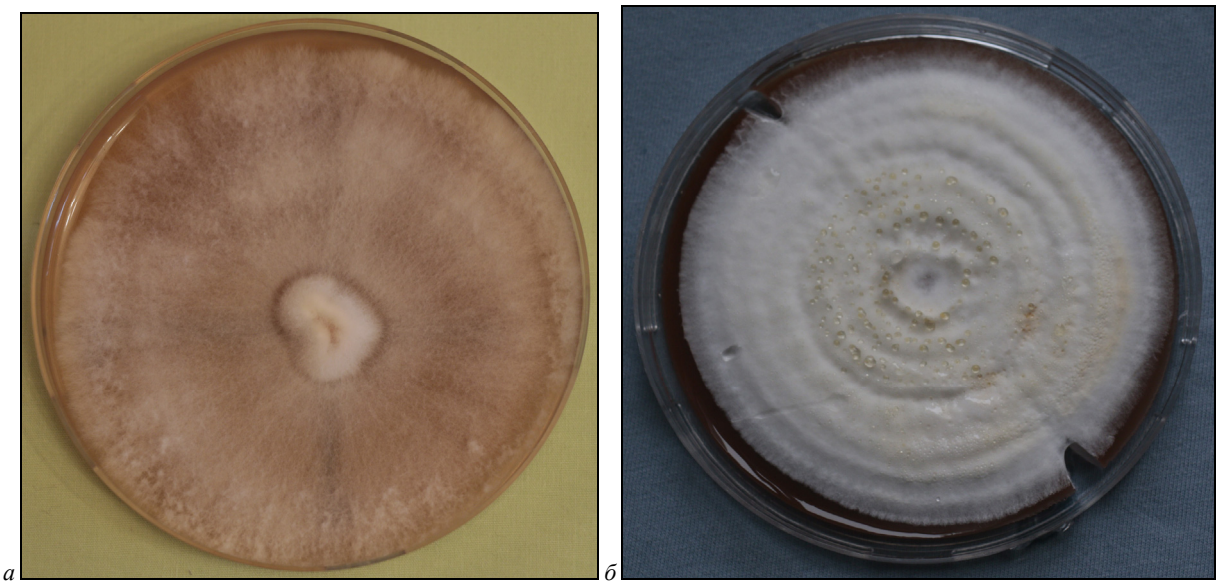


Рис. 3. Міцеліальні колонії *Fomitopsis officinalis* 5004: *а* – на агаризованому живильному середовищі МЕА (30-та доба культивування); *б* – на агаризованому живильному середовищі САМ (60-та доба культивування); температура інкубації 26 ± 0,1 °С

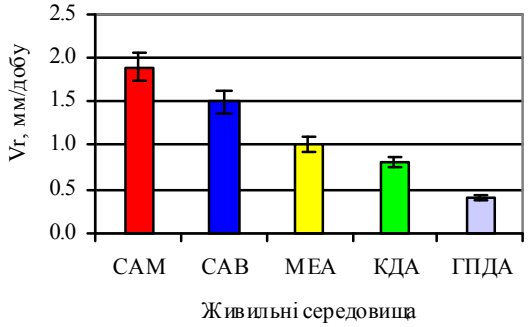


Рис. 4. Радіальна швидкість росту колоній *F. officinalis* 5004 на агаризованих живильних середовищах різного складу за температури 26 ± 0,1 °С

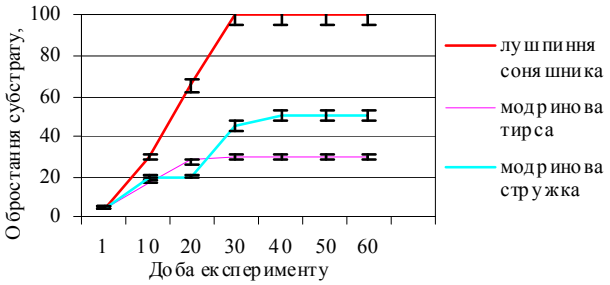


Рис. 5. Динаміка обростання міцелієм *F. officinalis* 5004 субстратів різного складу

Рис. 6. Зачатки плодових тіл *Fomitopsis officinalis* 5004 на лушпинні соняшника, 20-та доба експерименту

Рис. 7. Зачатки плодових тіл *Fomitopsis officinalis* 5004 на модриновій стружці, 30-та доба експерименту

У літературі наводяться дані (Kovaleva, 2009), що модринова губка після 30 діб культивування здатна утворювати незначну кількість бластоконідій. Отримані нами мікроморфологічні характеристики *F. officinalis* 5004 важливі для ідентифікації та контролю чистоти культури під час збереження штаму в умовах колекції. Всі досліджені живильні середовища придатні для росту міцелію гриба, проте додавання тирси модрини позитивно впливало на ростові показники культури. Наші результати повністю узгоджуються з даними, наведеними іншими дослідниками. Kovaleva (2009) наводить дані щодо значень середньодобової швидкості росту ізолятів *F. officinalis* у межах від 0,75 до 0,96 мм/добу та значенням ростового коефіцієнта в межах 24,5–25,6 на сусло-агарі та сусло-агарі з додаванням 1–3% тирси модрини. Автор пропонує культивувати штами *F. officinalis* на сусло-агарі з додаванням 1% тирси модрини.

Нині ще не розроблено ефективної технології штучного отримання плодових тіл *F. officinalis*. Одна з причин відсутності технології – недосконале знання біологічних особливостей цього виду, тому проведення досліджень у напрямку наукового обґрунтування основних етапів культивування доцільне. Використання модринової тирси та модринової стружки як субстратів для нарощування посівного інокуляту *F. officinalis* видається доцільним з огляду на субстратну приуроченість гриба. Однак їх використання виявилося менш успішним, ніж лушпиння соняшника, яке повністю обростало міцелієм гриба на 30-ту добу експерименту, тоді як відсоток обростання модринової стружки та тирси не перевищував 50% і 27% відповідно. Очевидно, що тирса та стружка модрини – бідні за вмістом поживних речовин середовища, на відміну від соняшникового лушпиння. З огляду на отримані результати, під час подальших експериментів із використанням тирси та стружки модрини доцільно додавати до цих субстратів різні домішки. Результати дослідження Kovaleva (2009) свідчать про необхідність для росту модринової губки у рослинному субстраті 60% лігніну, 20% деревної зелені ялиці та 20% кори ялиці.

Зважаючи на те, що в Україні цінний лікарський гриб *F. officinalis* вважається зниклим, отримані нами дані (склад живильних середовищ і рослинних субстратів, параметри росту міцелію, критична температура інкубації) створюють наукові засади технології культивування цього виду, а також у подальшому можуть бути використані для реінтродукції його в природні умови.

Висновки

Проведено верифікацію штаму *F. officinalis* 5004 із застосуванням молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних методів дослідження. Видова належність штаму, визначена за морфологічними ознаками, повністю збіглася з результатами ДНК-типування, ідентичність до послідовностей інших ізолятів та колекційних зразків *F. officinalis* становить 99%. Отримано дані про ріст і морфологію міцеліальних колоній *F. officinalis* 5004 на живильних агаризованих середовищах і рослинних субстратах різного складу. За швидкістю росту досліджену культуру *F. officinalis* 5004 віднесено до групи грибів, що ростуть дуже повільно (0,4−1,9 мм/добу). Підібрано

склад середовища (солодовий агар із додаванням тирси модрини) для культивування та збереження штамів у належному фізіологічному стані в умовах колекції. Встановлено критичну для життєздатності міцелію *F. officinalis* температуру – 41 ± 0,1 °C. Визначено мікро- та макроморфологічні характеристики міцелію на певних середовищах, ростові показники, які можна використовувати як додаткові таксономічні характеристики культур *F. officinalis* у вегетативній стадії росту. Проведено випробування рослинних субстратів різного складу для культивування міцелію та отримання плодових тіл *F. officinalis* у штучних умовах. Найсприятливішим субстратом для росту вегетативного міцелію та формування зачатків плодових тіл *F. officinalis* 5004 виявилось лушпиння соняшника.

Автори щиро вдячні В. І. Сапсаю за проведені дослідження мікроструктур вегетативного міцелію під сканувальним електронним мікроскопом.

References

Bisko, N. A., Lomberg, M. L., Mytropolska, N. Y., & Mykchaylova, O. B. (2016). The IBK mushroom culture collection. Alterpres, Kyiv.

Buchalo, A. S., Wasser, S. P., Mykchaylova, O. B., Bilay, V. T., & Lomberg, M. L. (2011). Taxonomical significance of microstructures in pure cultures of macromycetes. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 10, 50–57.

Chang, H., Birgit, J., Larry, K., McAlpine, L. D., Napolitano, J., Fryling, J., Franzblau, N., Sang, S. C., Stamets, H., Wang, P., & Guido, Y. P. (2013). Chlorinated coumarins from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Natural Products, 76(10), 1–13.

Chang, S. T., & Wasser, S. P. (2012). The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. International Journal of Medicinal Mushrooms, 95(1), 95–134.

Chlebicki, A., Mukhin, V., & Ushakova, N. (2003). *Fomitopsis officinalis* on Siberian Larc in the Urals. Mycologist, 17(3), 1–6.

Cukanova, P. A., & Belikov, V. G. (2013). Issledovanie himicheskogo sostava i standartizacija syr'ja listvennichnoj gubki [Investigation of the chemical composition and standardization of raw larch sponge]. Razrabotka, Isledovanie i Marketing Novoj Farmacevticheskoj Produkcii, 68, 130–132 (in Russian).

Diduh, J. P. (Ed.). (2009). Chervona knyga Ukrai'ny. Roslynnyj svit [Red Data Book of Ukraine. Vegetable Kingdom]. Globalkonsaltyng, Kyiv (in Ukrainian).

Dörnte, B., & Kües, U. (2013). Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of Agaricomycetes for PCR amplification. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 7(4), 825–836.

Gabriel, J. (Ed.). (2016). Macromycetes: Medicinal properties and biological peculiarities. [Makromicety: Lekarstvennye svojstva i biologicheskie osobennosti]. Vol. 2. Nash Format, Kyiv (in Russian).

Gavrilin, M. V., Belikov, V. G., Ajrapetova, A. J., & Cukatova, P. A. (2006). Identifikacija agaricinovoj kisloty metodom infrakrasnoj spektroskopi [Identification of agaric acid by infrared spectroscopy]. Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Serija: Himija, Biologija, Farmacija, 2, 231–232 (in Russian).

Grienke, U., Zöll, M., Peintner, U., & Rollinger, J. M. (2014). European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. Journal of Ethnoharmacology, 154(3), 564–583.

Hawksworth, D. L. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. Studies in Mycology, 50, 9–18.

Hwang, C. H., Jaki, B. U., Klein, L. L., Lankin, D. C., McAlpine, J. B., & Napolitano, J. G. (2013). Chlorinated coumarins from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of National Products, 76(10), 1916–1923.

Kovaleva, G. K. (2009). Biologicheskie osobennosti i biohimicheskij sostav ksilotrofnyh bazidiomicetov *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. i *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat. [Biological features and biochemical composition of xylotrophic basidiomycetes *Fomitopsis officinalis* (Vill .: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. and *Trametes versicolor* (L .: Fr.)]. Moscow (in Russian).

Kumar, M., & Shukla, P. K. (2005). Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. Journal of Clinical Microbiology, 43(2), 662–668.

Lomberg, M. L., & Solomko, E. F. (2012). Rost kul'tur makromicetov na agarizovannyh pitatel'nyh sredah i plotnyh substratah [Growth of the macromycetes cultures on agar nutrient media and solid substrates]. In: Wasser, S. P. (ed.), Biological features of medicinal macromycetes in culture. Vol. 2. Alterpres, Kyiv, 345–371 (in Russian).

Lomberg, M. L., Mykchaylova, O. B., & Bisko, N. A. (2015). Kolekcija kul'tur shapynkovyh grybiv (IBK) jak ob'jekt nacional'nogo nadbannja [Mushroom culture collection (IBK) as a subject of national heritage of Ukraine]. Ukrainian Botany Magazine, 72(1), 22–28 (in Ukrainian).

Nobles, M. K. (1971). Cultural characters as a guide to the taxonomy of Polyporaceae. International Symposium Evolution in Higher Basidiomycetes. University of Tennessee Press, Knoxville.

Oorzhak, U. S. (2006). Nauchno-prakticheskie aspekty racional'nogo ispol'zovanija plodovyh tel *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing. [Scientific and practical aspects of the rational use of fruit bodies of *Fomitopsis officinalis*]. Krasnojarsk (in Russian).

Piętka, J., & Grzywacz, A. (2005). *In situ* inoculation of larch with the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis officinalis* (Basidiomycota) experimental studies. Polish Botanical Journal, 50(2), 225–231.

Solomko, E. F., Lomberg, M. L., & Mytropolska, N. J. (2000). Rist okremyh vydiv likars'kyh makromicetiv na zhyvyl'nyh seredovyshhah riznogo skladu [Growth of some species of medicinal macromycetes on nutrient media of different composition]. Ukrainian Botany Magazine, 57(2), 119–126 (in Ukrainian).

Stalpers, J. A. (1978). Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Studies in Mycology, 16, 1–248.

Tepljakova, T. V., Kosogova, T. A., Anan'ko, G. G., Bardasheva, A. V., & Il'icheva, T. N. (2014). Protivovirusnaja aktivnost' bazidial'nyh gribov. Obzor literatury [Antiviral activity of basidiomycetes. Review of literature]. Problemy Medicinskoj Mikologii, 16(2), 15–25 (in Russian).

Vedenicheva, N. P., Al-Maali, G. A., Mytropolska, N. Y., Mykchaylova, O. B., Bisko, N. A., & Kosakivska, I. V. (2016). Endogenous cytokinins in medicinal Basidiomycetes mycelia biomass. Biotechnologia Acta, 9(1), 55–63.

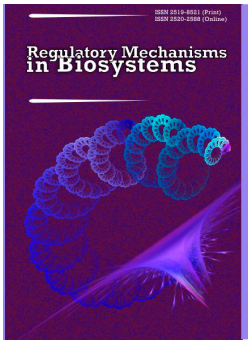
Volz, P. A., & Nevo, E. (Eds.). (2009). Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure cultures. Alterpress, Kyiv.

Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. International Journal of Medicinal Mushrooms, 12, 1–16.

Wasser, S. P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. Biomedical Journal, 37(6), 345–356.

Wasser, S. P. (Ed.). (2011). Biologicheskie osobennosti lekarstvennyh makromicetov v kul'ture [Biological features of medicinal macromycetes in culture]. Vol. 1. Alterpres, Kyiv (in Russian).

Wasser, S. P. (Ed.). (2012). Biologicheskie osobennosti lekarstvennyh makromicetov v kul'ture [Biological features of medicinal macromycetes in culture]. Vol. 2. Alterpres, Kyiv (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 476–481
doi: 10.15421/021773

The reaction of immunophysiological parameters of carp yearlings (*Cyprinus carpio*) to intraperitoneal administration of Arochlore

T. B. Lapirova

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia

Article info

Received 04.09.2017
Received in revised form 20.10.2017
Accepted 25.10.2017

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, 152742, Yaroslavl Oblast, Russia.
Tel.: +748-547-24-042
E-mail: ltb@ibiw.yaroslavl.ru

Lapirova, T. B. (2017). The reaction of immunophysiological parameters of carp yearlings (Cyprinus carpio) to intraperitoneal administration of Arochlore. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 476–481. doi:10.15421/021773

Over 14 days we investigated the effect of a single intraperitoneal administration of Aroclor 1254, one of the most widespread mixtures of polychlorinated biphenyls, on the indexes of the spleen and liver, the level of hemoglobin and the total protein, glucose and circulating immune complexes of the blood serum of carp yearlings (*Cyprinus carpio* L.). The toxicant was dissolved in vegetable oil, to assess the effect of which the data of a separate group of fish were analyzed in addition to the intact control. It was shown that in both groups of fish injected, both with just oil and with Aroclor dissolved in oil, at the initial stages of the experiment, phase fluctuations of the majority of the investigated parameters were observed, as well as the growth of the individual variability of the indices in comparison with intact individuals. Analysis of the dynamics of change in the obtained data suggests that they are due to the administration of oil which can cause an inflammatory response (handling stress was minimized by anesthesia with MS-222 tricaine methanesulfonate). These changes are generally consistent with the pattern of total nonspecific stress reaction, the manifestations of which are smoothed out by the middle of the exposure. In the experimental group of fish, over these periods pronounced shifts of all indices were again recorded. This phenomenon suggests that during this period the concentration of toxic metabolites formed in the process of transformation of Aroclor reaches values that could significantly shift the homeostasis. This assumption is confirmed by the sharp increase on the 7-th day of the experiment of the content of immune complexes in the bloodstream. Changes by the end of exposure of all biochemical parameters, namely: an increase in the level of glycemia and decrease in the concentration of hemoglobin, serum protein and circulation of immune complexes, were statistically significant. The revealed changes indicate deviations in protein and carbohydrate metabolism and decrease in adaptive potential of fish caused by the toxicant. At the same time, the observed changes are most likely not irreversible and in the absence of further contact with the xenobiotic, the indices can return to normal.

Keywords: polychlorinated biphenyls; hemoglobin; serum; protein; glucose; the immune complexes

Реакция иммунофизиологических показателей годовиков карпа (*Cyprinus carpio*) на внутрибрюшинное введение Арохлора

Т. Б. Лапирова

Институт биологии внутренних вод имени И. Д. Папанина РАН, Борок, Россия

В течение 14 суток исследовали влияние однократного внутрибрюшинного введения Арохлора 1254, представляющего собой одну из наиболее широко распространенных смесей полихлорированных бифенилов, на индексы селезенки и печени, уровень гемоглобина и содержание общего белка, глюкозы и циркулирующих иммунных комплексов сыворотки крови годовиков карпа (*Cyprinus carpio* L.). Токсикант растворяли в растительном масле, для оценки влияния которого анализировали данные отдельной группы рыб помимо интактного контроля. У обеих групп рыб, получивших инъекцию, как отдельно масла, так и растворенного в нем Арохлора, на начальных этапах эксперимента наблюдали фазовые колебания большинства исследуемых параметров, а также рост индивидуальной изменчивости показателей по сравнению с интактными особями. Анализ динамики изменений полученных данных позволяет заключить, что они обусловлены введением масла, способного вызывать воспалительную реакцию (манипуляционный стресс минимизировали при помощи анестезии трикаинметансульфонатом MS-222). Эти изменения в целом соответствуют картине общей неспецифической стрессовой реакции, проявления которой сглаживаются к середине экспозиции. В опытной группе рыб в эти сроки вновь зафиксированы выраженные сдвиги всех показателей. Данное явление позволяет предположить, что в этот период концентрация токсичных метаболитов, образующихся в процессе трансформации Арохлора, достигает величин, способных заметно сдвинуть гомеостаз. Подтверждает это предположение и резкое увеличение на 7-е сутки эксперимента содержания в кровотоке иммунных комплексов. Изменения к концу экспозиции всех биохимических показателей (рост уровня гликемии и достоверное снижение концентрации гемоглобина, сывороточного

белка и циркулирующих иммунных комплексов) были статистически значимы. Выявленные сдвиги указывают на отклонения в белковом и углеводном обмене и снижение адаптационного потенциала рыб, вызванные токсикантом. В то же время, обнаруженные изменения, скорее всего, не являются необратимыми и в случае отсутствия дальнейшего контакта с ксенобиотиком показатели могут вернуться к норме.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы; гемоглобин; сыворотка крови; белок; глюкоза; иммунные комплексы

Введение

Проблема антропогенного загрязнения окружающей среды не теряет своей актуальности на протяжении многих десятилетий. Наиболее устойчивые и высокотоксичные для организмов соединения объединены в группу стойких органических загрязнителей (СОЗ). В ряду прочих СОЗ полихлорированнные бифенилы (ПХБ) занимают особое место, так как являются одними из самых распространенных и устойчивых (Gorbunova et al., 2011). Широкое применение ПХБ имели в качестве диэлектриков в трансформаторах и конденсаторах, входили в состав пластификаторов, красок, лаков, смазочных масел и пр. (Fedorov, 1993; Safe, 1994; Rodenburg et al., 2010). В 2001 году принята Стокгольмская конвенция, согласно которой предполагалось сокращение поступления в окружающую среду СОЗ, тем не менее, снижения уровня загрязнения пока не происходит.

В водные объекты ПХБ поступают в результате утечек из различных технических установок, прямого сброса с кораблей гидравлических жидкостей и смазок, а также вместе с пестицидами, содержащими ПХБ в качестве наполнителей (Moiseenko, 2009). Попав в водоем, эти соединения вызывают серьезные изменения в водных биоценозах, способны накапливаться в пищевой цепи (Quabius et al., 2002). Некоторые исследователи считают, что полициклические ароматические углеводороды и ПХБ присутствуют в природных водоемах повсеместно (Arruda et al., 2003).

В исследованиях по влиянию экотоксикантов на водные организмы особое место среди всех гидробионтов занимают рыбы. Это вызвано тем, что они являются вершиной пищевой цепи в водных экосистемах и при этом, по сравнению с высшими позвоночными, более чувствительны к изменениям среды, сдвиги показателей, например, неспецифического иммунитета, у них более быстрые и заметные (Alexander and Ingram, 1992). ПХБ способны вызывать значительные патологии тканей печени и селезенки рыб (Khan, 2003), нарушения репродуктивной системы (Barnthouse et al., 2009), оказывать иммуномодулирующий эффект и вызывать снижение общей резистентности (Arkoosh et al., 2001; Iwanowicz et al., 2009). Несмотря на то, что токсичность ПХБ и продуктов их трансформации исследуется уже в течение почти 50 лет, единого мнения относительно воздействия этих ксенобиотиков на рыб до сих пор нет (Henry, 2015), недостаточно данных по влиянию ПХБ на физиолого-биохимические показатели крови рыб.

Каждый из обычно применяемых в экспериментах способов введения в организм токсикантов имеет свои достоинства и недостатки. К преимуществам внутрибрюшинных инъекций относят возможность наиболее точно контролировать полученную животным дозу вещества: этот способ нередко используется в ихтиотоксикологии (O'Neil and Johnson, 2013).

Цель статьи – оценить влияние однократного внутрибрюшинного введения Арохлора 1254 на иммунофизиологические показатели крови карпа. В задачи исследования входило определение индексов селезенки и печени, анализ концентрации гемоглобина в периферической крови, а также общего белка, уровня гликемии и содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке в течение 14 суток.

Материал и методы исследований

Эксперимент проводили на годовиках карпа обыкновенного (*Cyprinus carpio* L.), выращенного на стационаре экспериментальных полевых работ «Сунога» ИБВВ РАН. Во время акклимации (21 сут.) и далее в течение эксперимента (14 сут.) подопытные рыбы находились в проточных аэрируемых аквариумах объемом 150 л, ежедневно получая корм. В качестве токсического агента использовали промышленный препарат Arochlor 1254 (Monsanto Company, США). Химический состав серии Arochlor обозначается четырехзначным кодом, в котором первые две цифры относятся к числу атомов углерода фенильных колец, а последующие две указывают процент содержания хлора по массе (Pääkkönen et al., 2005). Препарат растворяли в прокаленном растительном масле.

Подопытные животные поделены на три группы: I – контрольная группа (интактные особи), II – контроль растворителя (рыбам вводили внутрибрюшинно 1 мл масла), III – опытная группа (рыбы получили инъекцию арохлора, растворенного в 1 мл масла, в дозе 200 мг/кг массы тела). Пробы отбирали у интактного контроля через 1, 7 и 14 суток; у рыб II и III групп – через 1, 3, 7, 10 и 14 суток с начала эксперимента, в двух повторностях. При проведении инъекций применяли трикаинметансульфонат (MS-222) для анестезии. На точку отбирали по 5 рыб, средние длина и масса подопытных животных составили 178,7 ± 18,8 мм и 149,6 ± 42,8 г соответственно.

Индексы рассчитывали как отношение массы селезенки и печени к массе тела без внутренних органов (%). Кровь отбирали после каудэктомии, часть ее стабилизировали гепарином и использовали для определения гемоглобина, из оставшейся получали сыворотку. Концентрацию гемоглобина анализировали на гемоглобинометре ГФП-01 МиниГЕМ+ гемихромным методом, глюкозы – глюкозооксидазным. Содержание общего белка сыворотки определяли по Bradford (1976), уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – стандартным методом путем осаждения с полиэтиленгликолем (Grinevich and Alferov, 1981), выражали в условных единицах.

Статистически значимыми считали отличия при $P < 0,05$ (использовали t-критерий Стьюдента после предварительной оценки нормальности распределения). На графиках представлены средние значения и стандартные ошибки ($x \pm SE$).

Результаты

Индексы органов. За период наблюдений отмечены значительные колебания относительных масс органов у рыб, получивших инъекцию (рис. 1). Это, видимо, не позволило выявить статистически значимых отклонений от контроля. Однако можно проследить некоторые тенденции в динамике изменений параметра. Наиболее выраженные колебания показателя и рост ошибки средней вызвала инъекция масла.

У опытных рыб сразу после поступления токсиканта отмечен небольшой рост индексов селезенки, на 10-е сутки значения снизились и к концу эксперимента были минимальными относительно всех групп рыб за всю экспозицию. Гепатосоматические индексы снизились к концу опыта по сравнению с контролем как после инъекции масла, так и у опытных рыб. При этом у последних колебания показателя в течение эксперимента были более сильными, что свидетельствует об отклонениях в функциональном состоянии печени под действием арохлора.

Общий белок сыворотки крови. Наибольшие колебания уровня общего белка на начальном этапе наблюдений вызвала также инъекция масла, превышение значений показателя у рыб II группы на 3–10-е сутки было статистически значимым (рис. 2). Изменения данного параметра у опытных рыб в эти сроки были не такими резкими, однако к концу эксперимента концентрация сывороточного белка достоверно снизилась относительно контроля.

Гемоглобин. Резких колебаний концентрации гемоглобина, в отличие от других показателей, после инъекции масла не отмечено (рис. 3). У опытных рыб динамика изменений показателя

была более выраженной: постепенный подъем, достижение максимума на 10-е сут и достоверное снижение к концу опыта.

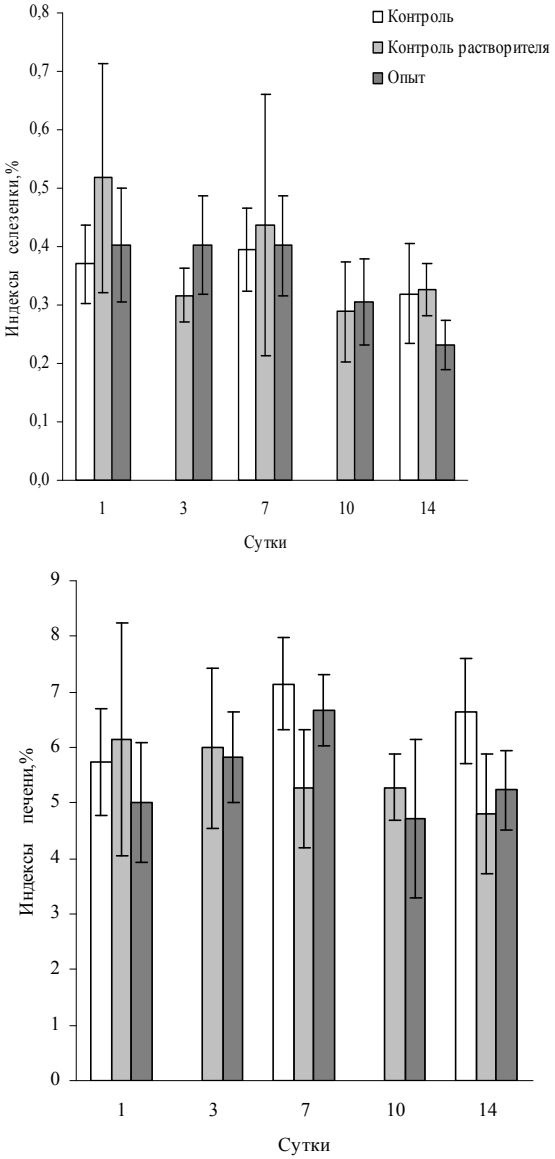


Рис. 1. Индексы органов карпа: x ± SE, n = 10

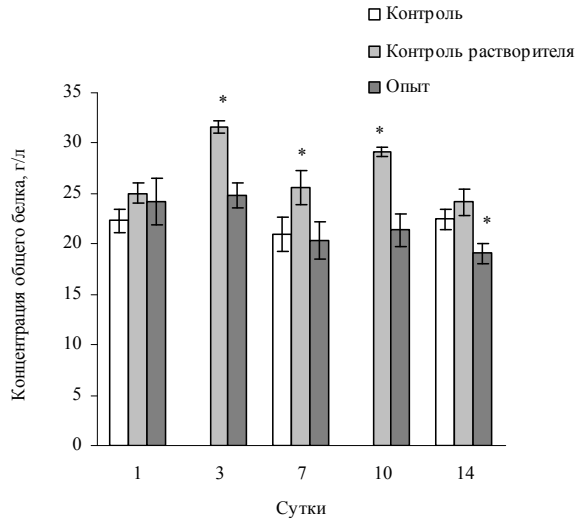


Рис. 2. Концентрация общего белка сыворотки крови карпа: x ± SE, n = 10; * – значения, достоверно отличающиеся от контроля при P < 0,05

Циркулирующие иммунные комплексы. Довольно низкие значения показателя у всех подопытных рыб в нашем эксперименте объясняются, видимо, тем, что в период акклимации они находились при низком уровне антигенной нагрузки. В начале опыта уровень ЦИК у рыб II и III групп достоверно снизился (рис. 4), начиная с 7-х суток можно говорить о реакции именно на арохлор: у опытных рыб происходит резкий рост и затем снижение показателя, ставшее к концу опыта статистически достоверным.

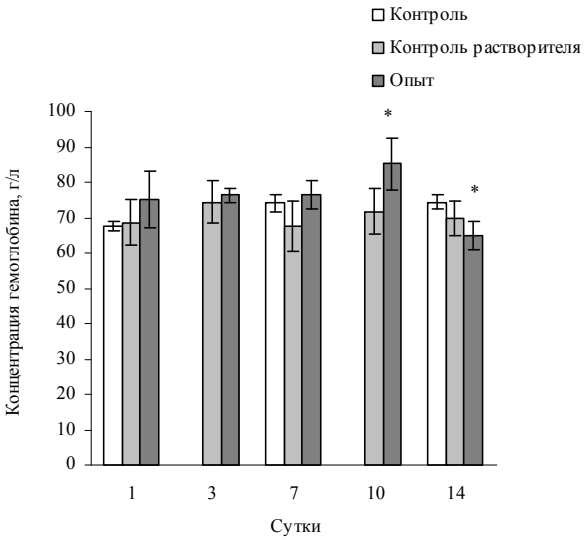


Рис. 3. Концентрация гемоглобина крови карпа: обозначения см. рис. 2

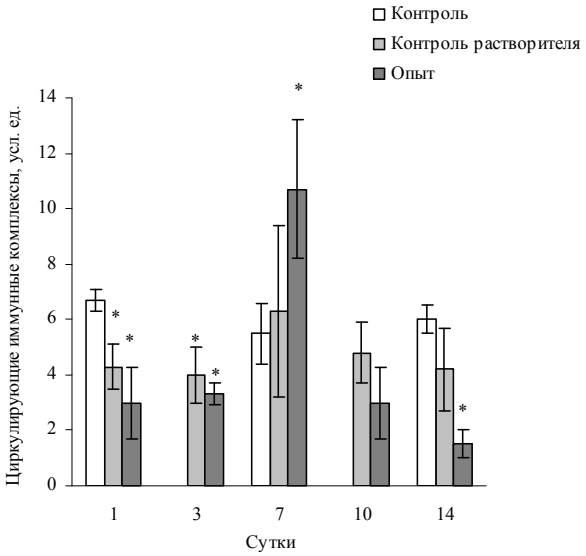


Рис. 4. Содержание ЦИК в сыворотке крови карпа: обозначения см. рис. 2

Глюкоза. В первый срок отбора у рыб II и III групп выявлен статистически значимый рост уровня гликемии (рис. 5). Далее содержание глюкозы нормализуется, однако у рыб опытной группы на 14-е сут показатель вновь значительно вырос.

Обсуждение

При анализе полученных данных обращает на себя внимание тот факт, что по большинству исследуемых показателей отмечали сдвиги на начальных этапах эксперимента как у опытных рыб, так и рыб II группы. Поскольку манипуляционный стресс в значительной степени был снят анестезией, можно заключить, что введение масла является возмущающим фактором, вызывающим развитие неспецифической стрессовой реакции.

Динамика изменений индексов селезенки указывает на то, что в ответ на стрессовое воздействие, а именно инъекцию (рыбы II и III групп), происходит усиление кровенаполнения органа с последующей активизацией выхода эритроцитов в кровяное русло. Это необходимо для доставки дополнительного кислорода к тканям и органам, работающим в условиях повышенной нагрузки. У рыб II группы далее наступает фаза адаптации, и показатель возвращается на уровень, близкий к контрольному.

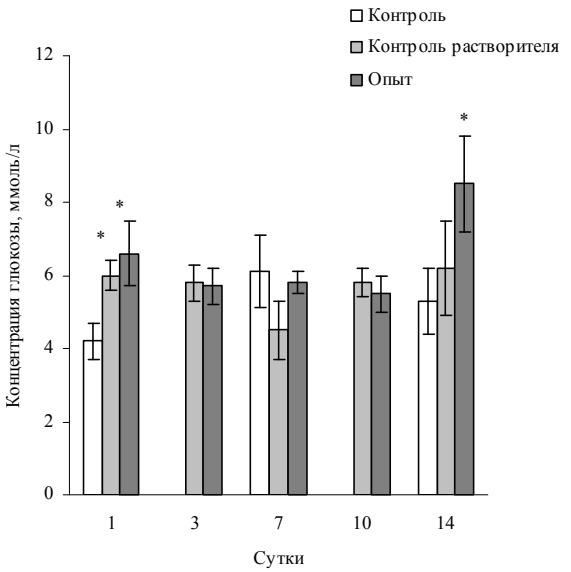


Рис. 5. Концентрация глюкозы крови карпа: обозначения см. рис. 2

У опытных рыб потребность в переносе повышенного количества кислорода для обеспечения процессов нейтрализации и выведения метаболитов Арохлора и, соответственно, в большем поступлении эритроцитов в кровоток, сохраняется. Токсическое действие, которое вызывают ПХБ на многие внутренние органы, и в том числе на селезенку (Monosson, 1999), способно нарушить функции органа, в том числе вызвать угнетение гемопоэза. Селезенка не в состоянии вырабатывать достаточного количества эритроцитов для компенсации вышедших из депо клеток, что приводит к снижению относительной массы органа у опытных рыб к концу эксперимента.

Данное положение подтверждается динамикой изменений уровня гемоглобина. Инъекция сама по себе, как стрессовый фактор, не оказала заметного влияния на показатель в первые 7 суток. Однако к 10-м суткам у опытных рыб концентрация гемоглобина статистически значимо превысила контрольный уровень, что является результатом усиленного выхода депонированных в селезенке эритроцитов. Далее, к концу эксперимента, за счет снижения количества эритроцитов, поступающих в кровяное русло, содержание гемоглобина снижается.

Аналогичная динамика изменений показателя выявлена при действии на рыб широкого ряда токсикантов (Kori-Siakpere et al., 2005, 2007; Saglam, 2008; Moiseenko, 2009). Достоверное снижение уровня гемоглобина является признаком анемии, причиной которой могут быть разрушение эритроцитов или снижение их выработки, гемодилюция и т. д. (Sawhney and Johal, 2000; Patnaik and Patra, 2006). Кроме анемии, нарушения синтеза гемоглобина у рыб под воздействием ПХБ и ряда других антропогенных загрязнений, возможно также излишнее отложение гемосидерина (Khan and Nag, 1993), что свидетельствует о нарушениях в системе крови.

Наиболее чувствительным к химическому загрязнению органом является печень, что обусловлено ее исключительно важной ролью в метаболических и детоксикационных процессах (Ayas, 2007). Гепатосоматический индекс является одним из показателей состояния обмена веществ у рыб. Его увеличение обычно связывают с усиленной детоксикационной активностью в ответ на поступление токсических соединений (Pereira and Kuch, 2005). Однако приводятся сведения о том, что снижение данного параметра также является показателем наличия химического стресса (Kopecka et al., 2006). Поскольку у рыб печень является и основным органом синтеза сывороточных белков, любое токсическое воздействие, нарушая нормальное функционирование органа, не может не влиять на уровень этого важнейшего показателя.

Полученная нами картина изменений содержания общего белка сыворотки крови является неспецифической и отмечается при действии токсических факторов различной природы (Borges et al., 2003; Lapirova and Mikryakov, 2005; Öner et al., 2008). Некоторый рост уровня показателя в начале воздействия часто вызван усилением синтеза защитных факторов белковой природы в ответ на стресс, что и наблюдается у рыб II и III групп, получивших инъекцию. Дальнейшее снижение содержания сывороточного белка у опытных рыб может быть обусловлено влиянием токсиканта или продуктов его трансформации на печень и почки, что вызывает нарушение белкового обмена, а также усиленным образованием липопротеинов, необходимых для восстановления поврежденных клеточных и тканевых органелл, что было выявлено и при действии ряда других ксенобиотиков (Ghosh and Chatterjee, 1989; Al-Akel et al., 2010).

У низших позвоночных, в том числе рыб, вследствие более слабого развития специфического (приобретенного) иммунитета, приоритетная роль принадлежит факторам неспецифического (врожденного) иммунитета (Magnadottir, 2006). Огромное значение в обеспечении иммунного гомеостаза организма имеет противомикробная активность сыворотки крови, которая обусловлена наличием в ней комплемента, интерферона, трансферрина, лизоцима и других соединений (Bayne and Gerwick, 2001; Ellis, 2001; Saurabh and Sahoo, 2008). В основном эти вещества имеют белковую природу, поэтому некоторые исследователи относят уровень сывороточного белка к элементам неспецифической иммунной системы (Jeney et al., 1997). Снижение показателя, выявленное в конце экспозиции у опытных рыб, позволяет предположить ослабление гуморального звена неспецифического иммунитета под действием токсиканта, и, соответственно, снижение общей резистентности. В целом при оценке физиологического статуса животных снижение концентрации сывороточного белка ниже референсных значений относят к неблагоприятным признакам.

В сыворотке крови человека и животных также постоянно присутствуют иммунные комплексы (комплексы «антиген – антитело»), являющиеся важной составляющей механизма поддержания иммунного гомеостаза. Уровень показателя определяется условиями существования рыб, элиминация образовавшихся ЦИК производится клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) (Levinsky, 1981).

Достоверное снижение уровня ЦИК у рыб II и III групп в начале опыта является, скорее всего, результатом мобилизации ресурсов неспецифической защиты в ответ на инъекцию и активизацией механизмов выведения чужеродного материала. Можно предположить, что к 7-м суткам в процессе трансформации Арохлора образуется максимальное количество метаболитов, которые связываются антителами с последующим выведением образовавшихся ЦИК из кровяного русла. Резкое снижение ЦИК в конце опыта может быть обусловлено либо ускоренным выведением ЦИК из циркуляции вследствие работы РЭС в форсированном режиме, либо недостаточным поступлением антител из-за сбоев в функционировании механизмов неспецифической защиты, вызванных токсикантом.

Глюкоза входит в число основных характеристик физиологического состояния животных. Объясняется это тем, что она играет важнейшую роль в обеспечении организма энергией (Polakof et al., 2012). С другой стороны, содержание глюкозы в крови может быть индикатором воздействия неблагоприятных

факторов любой природы. Как и у высших позвоночных, у рыб стресс инициирует выброс глюкокортикоидов и катехоламинов (Hontela et al., 1996; Ricard et al., 1998). Эти гормоны могут вызывать усиление процессов гликогенолиза, повышение активности глюкозо-6-фосфатазы в печени (Vijayram et al., 1989; Iwama, 1999; Almeida et al., 2001), а также инициировать глюконеогенез (Sastry and Shukla, 1994; Mini, 2015). В результате на начальных этапах воздействия, в том числе токсического, у рыб, как правило, отмечают рост уровня гликемии (Cicik and Engin, 2005; Sepici-Dinçel et al., 2009; Authman et al., 2015). Результаты нашего эксперимента подтверждают это положение, у рыб, получивших инъекцию, в первые сутки значения содержание глюкозы достоверно превышено. Затем наступает фаза адаптации именно к этому воздействию и показатель у всех подопытных рыб выравнивается. Но, как и в случае остальных исследованных биохимических параметров, к концу эксперимента уровень гликемии резко повышается, что может указывать на активизацию процессов детоксикации Арохлора или его метаболитов и, соответственно, возрастание энергетических затрат организма. Для компенсации этих затрат вновь включаются механизмы высвобождения глюкозы как наиболее легко доступного энергетического ресурса.

Заключение

Внутрибрюшинное введение масла вне зависимости от того, содержит оно токсикант или нет, оказывает раздражающее действие, вызывая у рыб на начальных этапах экспозиции развитие общей неспецифической стрессовой реакции. Инициировать ее могут неблагоприятные факторы различной природы, характерными признаками являются фазовые колебания показателей, а также рост их индивидуальной изменчивости, что и наблюдалось у рыб II и III групп по сравнению с интактными особями.

Далее реакция на стресс выходит на стадию адаптации, и у рыб II группы значения исследуемых показателей до конца эксперимента не значительно отличаются от контрольных. Резкое повышение уровня ЦИК на 7-е сутки у опытных рыб свидетельствует о росте антигенной нагрузки, картина динамики всех биохимических показателей указывает на то, что на 10–14-е сутки наиболее активно происходят процессы детоксикации и выведения Арохлора и продуктов его трансформации, которые требуют повышенных затрат кислорода и энергии. Но, поскольку нормальное функционирование внутренних органов (почки, селезенка, печень) нарушено вследствие токсического действия Арохлора, происходят сдвиги в процессах гемопоэза, белковом и углеводном обмене. В условиях повышенной нагрузки функционируют клетки РЭС, ответственные за элиминацию чужеродного материала.

Учитывая разовое поступление токсиканта и степень отклонения исследованных показателей, можно предположить, что в результате адаптационных процессов далее возможен выход всех параметров на уровень, близкий к контрольным значениям.

Автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН Г. М. Чуйко и сотрудникам Е. А. Заботкиной, В. В. Юрченко и другим за помощь в получении материала для исследования.

References

Al-Akel, A. S., Alkahem-Al-Balawi, H. F., Al-Misned, F., Mahboob, S., Ahmad, Z., & Suliman, E. M. (2010). Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth, and hematological parameters in *Cyprinus carpio*. Toxicological and Environmental Chemistry, 92, 1865–1878.

Alexander, J. B., & Ingram, J. A. (1992). Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. Annual Review of Fish Diseases, 2, 249–279.

Almeida, J. A., Novelli, E. L. B., Dal-Pai Silva, M., & Alves-Junior, R. (2001). Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Environmental Pollution, 114, 169–175.

Arkoosh, M. R., Clemons, E., Huffman, P., Kagley, A. N., Casillas, E., & Adams, N. (2011). Increased susceptibility of juvenile Chinook salmon to vibriosis after exposure to chlorinated and aromatic compounds found in contaminated urban estuaries. Journal of Aquatic Animal Health, 13, 257–268.

Arruda, A. F., Goicoechea, H. C., Santos, M. C., & Olivieri, A. C. (2003). Solid-liquid extraction room temperature phosphorimetry and pattern recognition for screening polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in water samples. Environmental Science and Technology, 37(7), 1385–1391.

Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., & Yerli, S. V. (2007). Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23(2), 242–249.

Barnthouse, L. W., Glaser, D., & DeSantis, L. (2009). Polychlorinated biphenyls and Hudson River white perch: Implications for population-level ecological risk assessment and risk management. Integrated Environmental Assessment and Management, 5(3), 435–444.

Bayne, C. J., & Gerwick, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. Developmental and Comparative Immunology, 25, 725–743.

Borges, A., Scotti, L. V., Siqueira, D. R., Zanini, R., Amaral, F. D., Jurinitz, D. F., & Wassermann, G. F. (2007). Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá Rhamdia quelen due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. Chemosphere, 69, 920–926.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254.

Cicik, B., & Engin, K. (2005). The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences, 29, 113–117.

Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanism of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 25, 827–839.

Fedorov, L. A. (1993). Dioksiny kak ehkologicheskaya opasnost': Retrospektiva i perspektivy [Dioxins as ecological hazard: Retrospective and prospects]. Nauka, Moscow (in Russian).

Ghosh, T. K., & Chatterjee, S. K. (1989). Influence of nuvan on the organic reserves of Indian freshwater murrel *Channa punctatus*. Journal of Environmental Biology, 10, 93–99.

Gorbunova, T. I., Pervova, M. G., Zabelina, O. N., Saloutin, V. I., & Chupahin, O. N. (2011). Polihlorbifenily: Problemy ehkologii, analiza i himicheskoj utilizacii [Polychlorinated biphenyls: Environmental issues, analysis, and chemical disposal], Krasand, Moscow; UrO RAN, Ekaterinburg (in Russian).

Grinevich, Y. A., & Alferov, A. N. (1981). Opredelenie immunnyh kompleksov v krovi onkologicheskih bol'nyh [Determination of immune complexes in the blood of cancer patients]. Laboratornoe Delo, 8, 493–496 (in Russian).

Henry, T. B. (2015). Ecotoxicology of polychlorinated biphenyls in fish – A critical review. Critical Reviews in Toxicology, 45(8), 643–661.

Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B., & Ackerman, P. A. (1999). Heat shock proteins and physiological in fish. American Zoologyst, 39, 901–909.

Iwanowicz, L. R., Blazer, V. S., McCormick, S. D., Vanveld, P. A., & Ottinger, C. A. (2009). Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. Aquatic Toxicology, 93, 70–82.

Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., & Anderson, D. P. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154, 1–15.

Khan, R. A. (2003). Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 44(4), 485–492.

Khan, R. A., & Nag, K. (1993). Estimation of hemosiderosis in seabirds and fish exposed to petroleum. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 51, 125–131.

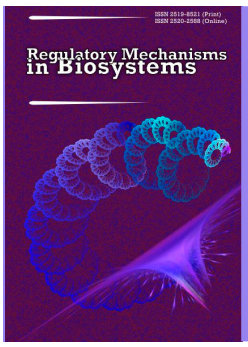
Kopecka, J., Lehtonen, K., Barsiene, J., Broeg, K., Vuorinen, P., Gercken, J., & Pempkowiak, J. (2006). Overview of biomarker responses in fish (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus trossulus*) from the Gdansk Bay. Marine Pollution Bulletin, 53, 406–421.

Kori-Siakpere, O., Adamu, K. M., & Madukelum, I. T. (2007). Acute haematological effects of sublethal levels of paraquat on the African Catfish, *Clarias gariepinus* (Osteichthyes: Clariidae). Research Journal of Environmental Sciences, 1, 331–335.

Kori-Siakpere, O., Ake, J. E. G., & Avworo, U. M. (2005). Sublethal effects of cadmium on some selected haematological parameters of heteroclarias (a hybrid of *Heterobranchus bidorsalis* and *Clarias gariepinus*). International Journal of Zoological Research, 2, 77–83.

Lapirova, T. B., & Mikryakov, V. R. (2005). Vliyanie nekotoryh stress-faktorov na funkcional'noe sostoyanie gumoral'nogo zvena nespecificheskogo immuniteta molodi karpa [Influence of some stress factors on the functional

state of a humoral link of nonspecific immunity of juvenile fish carp]. Voprosy Rybolovstva, 6(4), 771–780 (in Russian).
Levinsky, R. (1981). Role of circulating immune complexes in renal diseases. Journal of Clinical Pathology, 34, 1214–1222.
Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20, 137–151.
Moiseenko, T. I. (2009). Vodnaya ehkotoksikologiya: Teoreticheskie i prikladnye aspekty [Aquatic ecotoxicology: Theoretical and applied aspects]. Nauka, Moscow (in Russian).
Monosson, E. (1999). Reproductive and developmental effects of PCBs in fish: Summary of laboratory and field studies. Reviews of Toxicology, 3, 25–75.
O'Neil, J. A., & Johnson, T. B. (2013). Validation of rapid assimilation of PCBs following IP dosing in the Round Goby (*Neogobius melanostomus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 91, 135–140.
Öner, M., Atli, G., & Canli, M. (2008). Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 360–366.
Pääkkönen, J.-P. J., Rantalainen, A.-L., Karels, A., Nikkilä, A., & Karjalainen, J. (2005). Bioaccumulation of PCBs in burbot (*Lota lota* L.) after delivery in natural food. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 49(2), 223–231.
Patnaik, L., & Patra, A. K. (2006). Haematopoietic alterations induced by carbaryl in *Clarias batrachus* (Linn.). Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 10, 5–7.
Pereira, M. S., & Kuch, B. (2005). Heavy metals, PCDD/F and PCB in sewage sludge samples from two wastewater treatment facilities in Rio de Janeiro State, Brazil. Chemosphere, 60(7), 844–853.
Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. Journal of Comparative Physiology B, 182, 1015–1045.
Quabius, E., Nolan, D., Segner, H., & Bonga, S. E. W. (2002). Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after dietary exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Fish Physiology and Biochemistry, 25, 109–119.
Rodenburg, L. A., Du, S., Fennell, D. E., & Cavallo, G. J. (2010). Evidence for widespread dechlorination of polychlorinated biphenyls in groundwater, landfills, and wastewater collection systems. Environmental Science and Technology, 44, 7534–7540.
Safe, S. H. (1994). Polychlorinated biphenils (PBCs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. Critical Reviews in Toxicology, 24, 87–149.
Saglam, N. (2009). Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Onchorhynchus myriss*, Walbaum, 1792). Aquaculture Research, 40(4), 395–404.
Sawhney, A. K., & Johal, M. S. (2000). Erythrocyte alterations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 64, 398–405.
Sepici-Dinçel, A., Benli, A. Ç. K., Selvi, M., Sarıkaya, R., Sahin, D., Özkul, I. A., & Erkoç, F. (2009). Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 1433–1439.
Winkaler, E. U., Santosh, T. R. M., Machdo-Neto, J. G., & Martinez, C. B. R. (2007). Acute lethal and sub-lethal effects of neem leaf extracts on neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, 145, 236–244.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 482–488
doi: 10.15421/021774

Parasites of unionid molluscs (Bivalvia, Unionidae) and their effect on the body of molluscs

O. V. Pavluchenko, T. V. Yermoshyna

Zhytomir State University named after Ivan Franko, Zhytomir, Ukraine

Article info

Received 29.09.2017
Received in revised form 20.10.2017
Accepted 25.10.2017

Zhytomir State University named after Ivan Franko, V. Berdychivska st, 40, Zhytomir, 10008, Ukraine.
Tel.: +38-096-035-82-38
E-mail: pavluchenkolessia@gmail.com

Pavluchenko, O. V., & Yermoshyna, T. V. (2017). Parasites of unionid molluscs (Bivalvia, Unionidae) and their effect on the body of molluscs. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 482–488. doi:10.15421/021774

Among the molluscs of the family Unionidae extensivity of infestation by the helminth *Aspidogaster conchicola* (Trematoda, Aspidogastridae) is the highest in *Unio tumidus* and *Anodonta anatina*, and the lowest – in *U. pictorum*. The mites of the genus *Unionicola* (Arachnida, Unionicolidae) occur more often in species of the genus *Anodonta* and *Pseudanodonta complanata* than in species of *Unio*. The larvae of trematodes *Bucephalus polymorphus* (Trematoda, Bucephalidae) are more often identified in species of the genus *Anodonta*. The intensity of invasion of molluscs by the helminth *A. conchicola* was 1.0–5.6 ind./ind. (*Unio* – 1.0–3.3, *Pseudanodonta* – 3.0–5.6, *Anodonta* – 1.3–4.0 ind.), by the water mites *Unionicola* – 1–69 ind./ind. (*Unio*, *Pseudanodonta* – 1–11, *Anodonta* – 1–69). Due to the influence of aspidogastreans, the cytoplasmic vacuolization and hypertrophy of the cells of the pericardial epithelium and the layer of connective tissue was observed, which leads to a shrinkage of the upper side of the pericardium. Often, there was a nuclear pyknosis and, with deeper violations, their karyorrhexis and karyolysis. In the layer of connective tissue of pericardium of *A. anatina* encapsulated larvae of aspidogastereans were found. An increase in the cardiac index was observed in molluscs infested by aspidogastreans: the change in the index was the smallest in *U. crassus* (at 11.5%) and the largest in *U. tumidus* (at 54.1–61.0%). Smaller cardiac indexes are typical for molluscs with a lower intensity of infestation by aspidogastreans. Moderate intensity of infestation by this helminth (6–10 ind./ind.) caused an increase in the heart rate in molluscs (18.6–29.6%), high intensity (>10 ind./ind.) caused the decreasing of this indicator (14.5–24.0%). At low intensity of the mite (up to 20 individuals) and invasion of the trematode *B. polymorphus* (minor infections; part of the reproductive glands, populated by parasites, is less than 50%) the acceleration of ciliary beating and increasing of the duration of ciliary beating of the ciliated epithelium (1.4–2.6 times) were observed in species *Anodonta* and *U. pictorum*, at high intensity of invasion the inhibition of beating and reduction of the duration of ciliary beating of the ciliated epithelium in these species (45.9–57.4%) was observed. In the case of the general pathological process in the body of molluscs , the influence of parasites can cause the elimination of individuals with high intensity of infestation , which affects the absolute number and population density of molluscs.

Keywords: *Aspidogaster*; *Unionicola*; extensiveness of invasion; intensity of invasion

Паразити перлівницевих (Bivalvia, Unionidae) та їх вплив на організм молюсків

О. В. Павлюченко, Т. В. Єрмошина

Житомирський державний університет імені Івана Франка, Житомир, Україна

Серед молюсків родини Unoinidae екстенсивність інвазії гельмінтом *Aspidogaster conchicola* (Trematoda, Aspidogastridae) найбільша в *Unio tumidus* і *Anodonta anatina*, кліщами роду *Unionicola* (Arachnida, Unionicolidae) – у видів роду *Anodonta* та *Pseudanodonta complanata*, личинками трематоди *Bucephalus polymorphus* (Trematoda, Bucephalidae) – у видів роду *Anodonta*. Внаслідок впливу аспідогастрів спостерігається цитоплазматична вакуолізація та гіпертрофія клітин перикардіального епітелію та шару сполучної тканини, що спричиняє зморщування поверхні навколосерцевої сумки. В інвазованих аспідогастрами перлівницевих спостерігається збільшення серцевих індексів: в *U. crassus* зміна індексів найменша (на 11,5%), в *U. tumidus* – найбільша (на 54,1–61,0%). Помірна інтенсивність інвазії цим паразитом (6–10 ос./ос.) викликає у молюсків прискорення серцебиття на 18,6–29,6%, висока (понад 10 ос./ос.) – зниження цього показника на 14,5–24,0%. За низької інтенсивності кліщової (до 20 ос.) та трематодної інвазії *B. polymorphus* (дрібні вогнища ураження; частина статевої залози, заселеної паразитами, менше 50,0%) у видів роду *Anodonta* та *U. pictorum* виявлено прискорення биття та збільшення тривалості биття війок миготливого епітелію (у 1,4–2,6 раза), за високої – пригнічення биття та скорочення тривалості роботи війок миготливого епітелію (на 45,9–57,4%).

Ключові слова: аспідогастри; *Unionicola*; екстенсивність інвазії; інтенсивність інвазії

Вступ

Перлівницеві відіграють помітну роль у прісноводних екосистемах, створюючи у водоймах значну біомасу. Їх взаємовідносини з іншими організмами цих екосистем різноманітні, проявляються у вигляді трофічних, топічних і, рідше, форичних зв'язків. Також молюски родини Unionidae беруть участь у створенні паразитарних зв'язків. Паразити та молюски – філогенетично давня система «паразит – хазяїн». Вони досить добре пристосовані один до одного. Організм хазяїна – середовище існування та джерело живлення паразита. Фізіологічні процеси, які відбуваються в ньому, чинять певний вплив на організм паразита. Значна інтенсивність зараження молюсків паразитами – обтяжувальний чинник, який послаблює їх захисно-пристосувальні можливості.

Перлівницеві – облігатні проміжні хазяї трематоди *Bucephalus polymorphus* Baer, 1827 (Trematoda, Bucephalidae) (Zdun, 1961; Chernogorenko, 1983; Yurishinets, 2010) і дефінітивні – гельмінта *Aspidogaster conchicola* Baer, 1827 (Trematoda, Aspidogastridae). Також у них паразитують кліщі роду *Unionicola* Haldeman, 1842 (Arachnida, Unionicolidae). Питання екстенсивності, інтенсивності інвазії та впливу цих паразитів на організм молюсків висвітлені як у зарубіжній, так і у вітчизняній літературі, зокрема, надано відомості щодо *A. conchicola* (Pauley and Becker, 1968; Yuryshynets and Krasutska, 2009; Marszewska and Cichy, 2015; Zhan et al., 2017), кліщів роду *Unionicola* (Baker, 1976; Baker, 1977; Cichy et al., 2016; McElwain, 2016) та щодо інвазії іншими видами трематод родини Bucephalidae (Jokela et al., 1993; Marszewska and Cichy, 2015; Müller et al., 2015; Cichy et al., 2016). Мета нашого дослідження – виявити морфометричні, морфологічні та фізіологічні порушення в інвазованих молюсків і залежності цих порушень від інтенсивності інвазії перлівницевих паразитами.

Матеріал і методи досліджень

Матеріал дослідження – перлівницеві, зібрані вручну в 2001–2015 рр. із річок басейну Середнього Дніпра, що розташовані в географічних межах Центрального Полісся (р. Уж, м. Коростень, с. Ушомир, с. Бараші; р. Уборть, м. Олевськ; р. Тетерів, м. Житомир, с. Тетерівка; р. Коденка, с. Пряжів; р. Лісова, с. Бондарці; р. Лісова Кам'янка, м. Житомир; р. Гнилоп'ять, м. Бердичів, с. Райки, с. Хажин, с. Тетерівка; р. Гуйва, смт Гуйва; р. Случ, м. Новоград-Волинський).

Визначення видової належності молюсків виконано згідно зі вживаною у Західній Європі класифікацією молюсків (Glöer and Meier-Brook, 1998). Для виявлення аспідогастрів відпрепаровували перикардій і боянусів орган, визначали кількість паразитів і особливості їх розташування. Для виявлення кліщів оглядали внутрішню та зовнішню поверхні мантії кожної особини, півзябри, поверхню нутряного мішка, проксимальну частину ноги. Для виявлення партеніт і личинок трематоди *B. polymorphus* розтинали статеву залозу та гепатопанкреас молюска та робили з них тимчасові препарати (Zdun, 1961; Chernogorenko, 1983).

Серцеві індекси розраховували як відношення маси серця до загальної маси тіла (C_1) і до маси м'якого тіла (C_2). Через те, що маса серця дуже мала, серцеві індекси виражали у проміле (‰), як пропонує це робити Alyakrinskaya (1989). Виготовлено понад 600 гістологічних зрізів перикардія неінвазованих та інвазованих аспідогастрами молюсків. Війки миготливого епітелію ізольовані на препаратах епітелію зябер і переднього краю ноги молюсків. За допомогою мікроскопа Биолам Р-15 (×203, ×450) установлювали час повного припинення активності війок миготливого епітелію (показник тривалості життя війок) і кількість ударів війок за 1 хв (показник частоти биття війок). Ритм серцевих скорочень вивчали у 501 особини неінвазованих і 209 особин інвазованих аспідогастрами молюсків методом, запропонованим Zhadin (1926). Дані обробляли методами варіаційної статистики із застосуванням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA).

Результати

Паразиту перлівницевих *A. conchicola* притаманна широка гостальна специфічність. Його виявлено у 6 видів родини Unionidae (*Unio crassus* Philipsson, 1788, *U. pictorum* Linnaeus, 1758, *U. tumidus* Philipsson, 1788, *Anodonta cygnea* Linnaeus, 1758, *A. anatina* Linnaeus, 1758, *Pseudanodonta complanata* Rossmaessler, 1835). Інтенсивність інвазії двостулкових молюсків роду *Unio* становить 1,0–3,3 ос./ос., роду *Pseudanodonta* – 3,0–5,6, роду *Anodonta* – 1,3–4,0 ос./ос. Екстенсивність інвазії різних видів молюсків аспідогастрами варіює від 1,6% до 47,3%. Високі показники зараженості характерні для *U. tumidus* і *A. anatina* та становлять 26,0–47,3%. Менші значення екстенсивності відмічено в інших досліджених видів (1,6–14,8%).

Показники інвазії уніонід гельмінтом *A. conchicola* збільшуються з віком молюсків. Максимальні значення зареєстровані, як правило, в особин 7–8 років (рис. 1). Це свідчить про певне накопичення аспідогастрів у тілі перлівницевих. Водночас цілком імовірне додаткове зараження хазяїнів у природних популяціях. Зниження екстенсивності інвазії в особин старших вікових категорій, напевно, пов'язане з підвищеною смертністю інтенсивно заражених молюсків, що викликає їх зникнення із складу популяції.

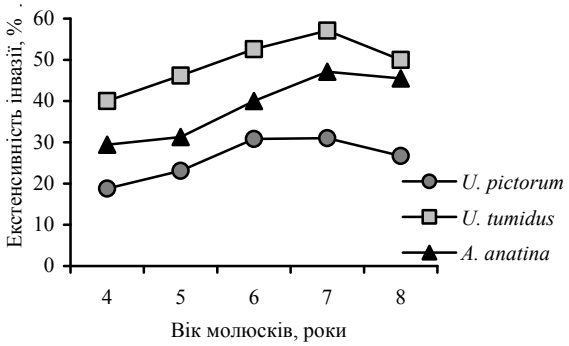


Рис. 1. Залежність екстенсивності інвазії (%) різних видів Unionidae гельмінтом *A. conchicola* від віку молюсків (р. Гнилоп'ять, м. Бердичів)

Щільність поселення молюсків також визначає рівень їх інвазії гельмінтом. У всіх досліджених видів перлівницевих значення екстенсивності та інтенсивності зараження *A. conchicola* поступово збільшуються і досягають найвищих рівнів саме за високої щільності поселення молюсків (табл. 1). Очевидно за таких умов імовірність потрапляння яєць паразитів у організм нових хазяїнів зростає.

Таблиця 1

Залежність зараженості гельмінтом *A. conchicola* від щільності поселення перлівницевих: екстенсивність (E, %) та інтенсивність (I, ос./ос.) інвазії; р. Гнилоп'ять, с. Хажин

Молюск	Щільність поселення молюсків					
	низька		середня		висока	
	E	I	E	I	E	I
U. pictorum	16,7 ± 8,8	1,3 ± 0,3	27,3 ± 12,9	1,5 ± 0,2	34,5 ± 8,8	1,7 ± 0,3
U. tumidus	26,7 ± 11,4	2,0 ± 0,4	37,5 ± 10,1	2,4 ± 0,3	61,3 ± 8,0	3,5 ± 0,2
A. anatina	27,3 ± 13,4	1,7 ± 0,3	30,8 ± 12,8	2,3 ± 0,6	41,2 ± 11,9	3,0 ± 0,3

Примітка: прийнято таку градацію щільності поселення молюсків: низька – до 6 ос./м^2, середня – 7–25, висока – понад 25 ос./м^2.

Для показників зараженості характерна сезонна мінливість. Починаючи з ранньої весни їх значення поступово зростають (рис. 2). Саме у березні – квітні з'являються перші личинки аспідогастрів, кількість яких поступово зростає влітку. Найвищі значення екстенсивності та інтенсивності інвазії молюсків відмічено у липні – серпні.

A. conchicola має вузьку топічну специфічність, тому що ці тварини локалізуються лише у перикардії та нирках молюсків.

За нашими спостереженнями, звичайне місце локалізації аспідогастрів – перикардій перлівницевих, зрідка вони трапляються у нирках (частота трапляння в навколосерцевій сумці у 2,2–11,0 раза більша, ніж у боянусовому органі). У нирці паразити переважно бувають розміщені в її зовнішньому коліні. Вкрай рідко трапляються випадки локалізації аспідогастрів у її залозистому відділі.

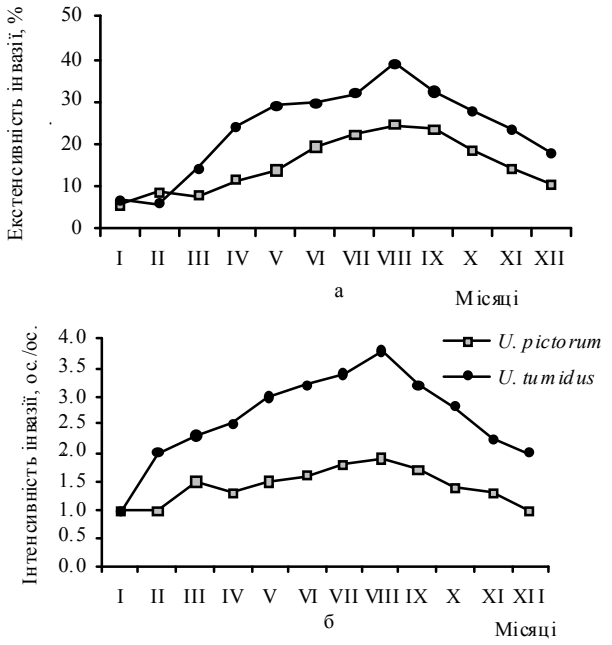


Рис. 2. Сезонні зміни екстенсивності інвазії (%) (*а*) та інтенсивності інвазії (ос./ос.) (*б*) перлівницевих гельмінтом *A. conchicola* (р. Тетерів, м. Житомир)

Навколосерцева сумка молюсків заселена паразитами інтенсивніше, ніж нирки. Найбільша кількість гельмінтів, виявлених нами у порожнині перикардія, становить 27 особин, у нирках – 6. У переважної кількості досліджених інвазованих молюсків різних видів родини Unionidae аспідогастрів виявлено лише у перикардії (від 62,5% до 100,0% особин). У нирках вони траплялися значно рідше: у 4,2–15,0% особин перлівницевих *A. conchicola* оселився тільки в нирках, у 8,3–25,0% особин паразити перебували одночасно у навколосерцевій порожнині та нирках. У представників *U. pictorum*, *A. cygnea*, *A. anatina*, *P. complanata* гельмінта виявлено лише у перикардії.

Аспідогастри уникають контакту з активно працюючим шлуночком серця молюсків. У 40% випадків особини *A. conchicola* обирають місця стикання передсердь зі стінками навколосерцевої сумки, у верхній частині перикардія паразити розташовуються у 25% випадків, у протилежних до рено-перикардіальних отворів задніх кутах навколосерцевої сумки – у 20%, поруч із рено-перикардіальними отворами – у 15% випадків.

Паразитування *A. conchicola* викликає різні патологічні макро- та мікроскопічні зміни навколосерцевої сумки перлівницевих. Перикардій інвазованих і неінвазованих тварин помітно відрізняється (рис. 3). У заражених молюсків стінка навколосерцевої сумки зазвичай дещо товстіша, а її поверхня складчаста або ж бугриста. Крім того, змінюється забарвлення уражених ділянок перикардія: якщо у незаражених тварин він блідо-жовтого кольору, то у заражених – рожевувато-жовтого. Аспідогастри викликають також гістологічні зміни перикардія. У місцях безпосереднього розташування аспідогастрів виявлені атрофічні зміни целотелія. Внаслідок механічного впливу (тиснення) диску Бера на епітеліоцити внутрішнього шару відбувається деформація целотелія: висота його клітин зменшується, у той час як ширина їх зростає (співвідношення висоти та ширини клітин становить 0,6–0,8 до 1) порівняно з нормою (співвідношення 1 до 1). Нерідко тиск, який здійснює паразит на клітину, настільки значний, що стається розрив клітинної мембрани епітеліоцита, що неминуче спричинює його знищення. Інколи схожі некробіотичні зміни відбуваються й у сполучній тканині, де спостерігається розрив волокнистих структур і руйнування фіброцитів. На окремих гістопрепаратах наявні уривки перикардія, в яких є як цілі клітини, так і клітинний детрит. Це, найімовірніше, – наслідок живлення аспідогастрів, які за допомогою ротової присоски руйнують тканини навколосерцевої сумки, «відкушуючи» шматочок за шматочком тканини її стінки.

За значного зараження на окремих ділянках перикардіальної сумки (вільних від аспідогастрів) спостерігається гіпертрофія клітин перикардіального епітелію – різке збільшення розмірів у 1,5–2,0 раза. Гіпертрофія епітеліоцитів спричиняє потовщення внутрішнього епітеліального шару і, як наслідок, зморщування поверхні навколосерцевої сумки (рис. 3*б*). У таких випадках клітини целотелія мають зазвичай неоднакові розміри та дуже різноманітну форму (поверхня перикардія нерівна, бугриста або нерівномірно складчаста), а тому не утворюють суцільної гладенької поверхні епітеліального шару, яка характерна для неінвазованих перлівницевих. Змінена структура внутрішньої поверхні навколосерцевої сумки перешкоджає нормальному биттю серця цих тварин у порожнині перикардія. Поряд із цим унаслідок гіперплазії епітелію останнього, яка спричиняє розвиток його складчастості, частина клітин целотелія занурюється у шар сполучної тканини.

У заражених молюсків на більшості ділянок перикардія розвивається цитоплазматична вакуолізація клітин перикардіального епітелію (рис 3*в*), ступінь якої залежить від інтенсивності інвазії. За низької інвазії має місце, як правило, незначне розпушування цитоплазми. У таких випадках у ній наявні лише декілька невеликих вакуолей (2–5). За високої інвазії, спочатку кількість їх збільшується удвчі–втричі, а потім вони зливаються між собою, утворюючи одну дуже велику вакуолю, яка виповнює собою більшу частину клітини (рідше таких вакуоль дві). Це – вакуольна дистрофія, патогенний процес, зумовлений відокремленням води від білка, збільшенням кількості води у клітинах, що супроводжується посиленим розпушуванням цитоплазми. Поява у клітинах целотелія таких вакуоль викликає зміну розташування ядер: зазвичай вони посунуті до базальної частини клітин. Часто спостерігається пікноз ядер, а за більш глибоких порушень – їх каріорексис і каріолізис. Ці дистрофічні зміни – наслідок голодування клітин, викликаного стисканням їх паразитами, які щільно прилягають до внутрішніх стінок перикардія. Окрім того, у таких ділянках за впливу слизу маргінальних органів диска Бера часом відбувається розчинення міжклітинного цементу, клітини роз'єднуються.

Паразитування *A. conchicola* викликає зміни гістоархітектоніки сполучнотканинного шару навколосерцевої сумки. В інвазованих молюсків спостерігається гіпертрофія перикардія, яка полягає у значному потовщенні його середнього шару (рис. 3*г*). За помірної інтенсивності інвазії (6–10 ос./ос.) шар сполучної тканини перикардіальної сумки в 1,2–1,6 раза товстіший, ніж у незаражених тварин, а в разі високої інтенсивності інвазії (понад 10 ос./ос.) – у 2,3–2,8 раза.

У рідкісних випадках аспідогастри (зазвичай порожнинні паразити) виступають як паразити тканинні. Нами зареєстровано випадок незвичної локалізації *A. conchicola* у представників *A. anatina*: гельмінтів виявлено безпосередньо у тканинах навколосерцевої сумки. На мікрофотографіях поперечного розрізу через стінку навколосерцевої сумки видно (рис. 4) молодих аспідогастрів (личинки IV стадії), зосереджених у сполучнотканинному прошарку перикардія. Навколо кожного паразита чітко виражена сполучнотканинна капсула. У формуванні її беруть участь клітини гемолімфи молюсків (гемоцити), які вільно циркулюють. За таких умов у беззубки спостерігається значне потовщення стінок навколосерцевої сумки, викликане досить великими за розмірами паразитами. Таке потовщення перикардія також викликає появу негативних патологічних порушень у роботі серця перлівницевих.

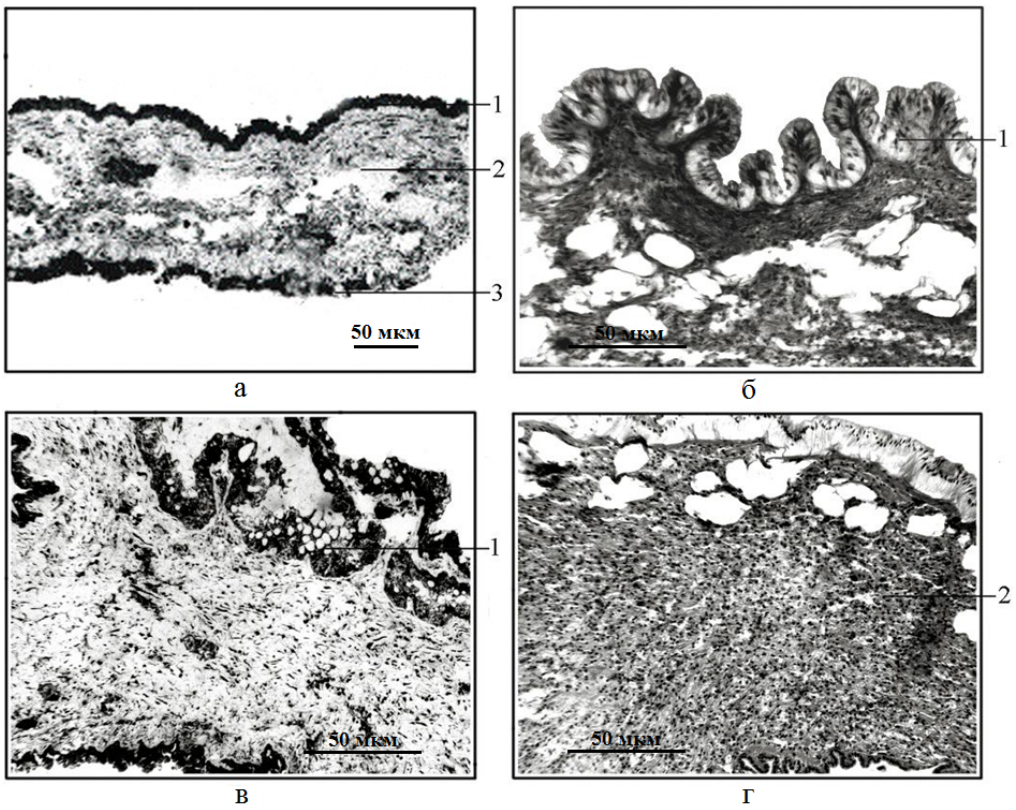


Рис. 3. Поперечний розтин стінки навколосерцевої сумки *A. anatina*: *а* – у нормі, *б* – гіпертрофія та гіперплазія перикардіального епітелію, *в* – вакуолізація перикардіального епітелію, *г* – гіпертрофія шару сполучної тканини перикардіальної сумки; *1* – внутрішній перикардіальний епітелій, *2* – сполучнотканинний шар, в якому розміщені міоцити, *3* – зовнішній плоский епітелій

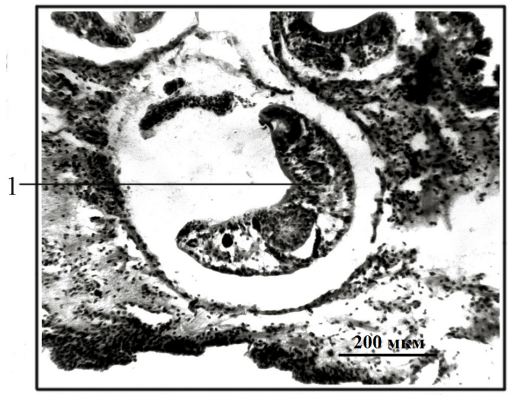


Рис. 4. Гельмінт *A. conchicola* (*1*) у сполучнотканинному шарі перикардія *A. anatina* (р. Гнилоп'ять, с. Райки)

Як показники фізіологічного стану організму перлівницевих використовують різні морфометричні індекси, які дозволяють оцінити вплив чинників як зовнішнього, так і внутрішнього середовища на організм молюсків за сукупністю непрямих ознак, зокрема, за відносною масою серця. Для молюсків доречно застосовувати два індекси – відношення відносної маси серця до загальної маси тіла (C_1) та до маси м'якого тіла (C_2). Другий індекс – більш показовий, оскільки виключає вплив мінливої ваги черепашки, яка залежить від багатьох чинників. Неінвазовані особини різних видів перлівницевих характеризуються неоднаковими значеннями серцевого індексу C_1 (табл. 2). Однак усі значення серцевих індексів у двостулкових молюсків украй низькі: це доказ низького рівня метаболізму в цих молюсків. Проаналізувати причини різної величини серцевого індексу в молюсків важко, тому що ці тварини суттєво не відрізняються між собою швидкістю пересування та рівнем рухливості. Можливо, це пов'язано з анатомічними особливостями різних видів, зокрема відносними розмірами серця.

Таблиця 2

Серцеві індекси (x ± SE) перлівницевих у нормі та за інвазії *A. conchicola*

Вид	n	C_1		Відхилення середнього значення від норми, ‰	C_2		Відхилення середнього значення від норми, ‰
		неінвазовані	інвазовані		неінвазовані	інвазовані	
U. crassus	40	0,36 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,04	0,84 ± 0,04	0,92 ± 0,05	0,08
U. pictorum	99	0,55 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,15	1,85 ± 0,05	2,48 ± 0,05	0,63
U. tumidus	69	0,48 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,29	0,99 ± 0,03	1,52 ± 0,04	0,53
A. cygnea	53	0,97 ± 0,02	1,26 ± 0,02	0,29	1,30 ± 0,03	1,68 ± 0,02	0,38
A. anatina	59	0,72 ± 0,02	0,91 ± 0,03	0,19	0,95 ± 0,03	1,25 ± 0,03	0,30
P. complanata	51	0,59 ± 0,02	0,81 ± 0,04	0,22	0,86 ± 0,03	1,20 ± 0,05	0,34

Примітка: C_1 і C_2 – виражене у проміле (‰) відношення маси шлуночка серця до загальної маси тіла та маси м'якого тіла відповідно.

У більшості досліджених молюсків, інвазованих аспідогастрами, спостерігається статистично вірогідне збільшення обох серцевих індексів. Не виявили змін значень індексу C_1 лише у *U. crassus*, напевно, через низьку інтенсивність інвазії паразитом цієї перлівниці. В інших досліджених видів перлівницевих збільшення серцевих індексів відбувається по-різному. В *U. crassus* зареєстроване незначне збільшення C_2, яке становить 11,5%. На нашу думку, це пов'язано з відносно низькою інтенсивністю інвазії (до 6 ос./ос.) досліджуваних тварин аспідогастрами та, відповідно, з незначним впливом гель-

мінтів на їх організм. У більшості молюсків родини Unionidae спостерігається помірне збільшення серцевих індексів: у представників *Anodonta* – на 25,9–31,3%, у *P. complanata* – на 37,7–39,3% ($P < 0.01$). В *U. pictorum* має місце збільшення C_1 і C_2 на 27,3–34,1%. Найбільші зміни значень серцевих індексів *A. conchicola* викликає в *U. tumidus*: індекс C_1 у них зростає на 61,0%; C_2 – на 54,1%.

Збільшення маси серця та, відповідно, зростання індексів серця у заражених аспідогастрами перлівницевих, – наслідок зростання навантаження на цей життєво важливий орган. Компенсаторною реакцією стає гіпертрофія шлуночка серця. Це один із проявів неспецифічної захисно-пристосувальної реакції молюсків на шкідливий вплив паразитів.

Патолого-морфологічні зміни серця перлівницевих, викликані паразитуванням аспідогастрів, спричиняють також порушення його роботи. Згідно з результатами здійснених нами експериментів (за температури 18–23 °С, вміст кисню у воді – 8,6–8,9 мг/л, pH – 7,2–7,5), ритм серцебиття у фістульних неінвазованих перлівницевих варіює у межах від 9,11 ± 0,11 (*U. crassus*) до 14,03 ± 0,03 уд./хв (*A. cygnea*).

В особин усіх досліджених видів перлівницевих, заражених *A. conchicola*, ритм серцебиття залежить від інтенсивності інвазії. За слабкої інтенсивності інвазії (до 6 ос./ос.) статистично достовірних змін роботи серця не зареєстровано. Шкода, якої завдають гельмінти своїм хазяям, обмежується у цьому випадку розвитком локального гістопатологічного процесу у перикардії з незначною площею вогнища ураження. Помірна інтенсивність інвазії (6–10 ос./ос.) викликає в молюсків усіх досліджених видів перлівницевих статистично вірогідне ($P < 0.03$) підвищення частоти серцевих скорочень. В *A. cygnea* ритм серцебиття зростає на 18,6%, в *U. pictorum* і *U. tumidus* – на 20,9% і 21,7% відповідно. У *P. complanata* значення цього показника підвищуються на 28,6%, в *A. anatina* та *U. crassus* – на 29,1–29,6%. Такий рівень зараження молюсків аспідогастрами супроводжується розвитком у них загального патологічного процесу, який, зазвичай, успішно блокується неспецифічними захисно-пристосувальними механізмами, спрямованими на компенсацію патогенної дії паразитів. Це, насамперед, підвищення рівня загального обміну речовин, прояв якого – компенсаторна тахікардія.

За високої інтенсивності інвазії *A. conchicola* (понад 10 ос./ос.) в молюсків усіх досліджених видів перлівницевих зареєстровано статистично достовірне ($P < 0,38$) зниження частоти серцебиття. Так, в *A. cygnea* ритм серцебиття зменшується на 14,5%. У *P. complanata* значення цього показника скорочуються на 16,3%, у молюсків роду *Unio* – на 17,6–24,0%. В *A. anatina* відзначено зниження частоти скорочень серця на 24,0%. Такий рівень зрушень у роботі серця яскраво свідчить про важкий патологічний процес в інвазованих молюсків, викликаний дією паразитарного чинника, за якого захисно-пристосувальні можливості організму безумовно пригнічуються. Розвиток брадикардії свідчить як про загальне зниження рівня обміну речовин у цих тварин, так і про зниження їх життєздатності.

Шкідливого впливу паразитування аспідогастрів на інші органи перлівницевих не виявлено. Ниркові, печінкові, мантійні, зяброві індекси досліджуваних тварин за інвазії їх *A. conchicola* не змінюються. На нашу думку, це частково пов'язано з особливостями локалізації цих гельмінтів, адже паразити не оселяються ні у печінці, ні у зябрах, ні в мантії перлівницевих, і можна було б очікувати лише опосередкованого їх впливу на ці органи (токсичної дії на хазяїна їх продуктів обміну). На підтвердження цього з'ясовано, що гельмінт, незалежно від кількості його в організмі хазяїна, зазвичай не впливає на функціонування війок миготливого епітелію зябер і ноги перлівницевих. У наших матеріалах виявлено лише два випадки змін активності війок за високої інтенсивності інвазії цим паразитом. За наявності 26 і 32 особин гельмінта, локалізованого у перикардії перлівниць роду *Unio*, спостерігали скорочення тривалості життя війок миготливого епітелію на 31,7–47,4%.

Кліщів роду *Unionicola* зареєстровано у п'яти видів перлівницевих (*U. pictorum*, *U. tumidus*, *A. cygnea*, *A. anatina*, *P. complanata*). Виявлено вибірковість заселення молюсків цими паразитами: найчастіше вони трапляються у представників роду *Anodonta* та у *P. complanata*. Представники *U. crassus* виявилися вільними від *Unionicola* sp. Найвища екстенсивність інвазії зафіксована для *P. complanata* (70–82%), найнижча – для видів роду *Unio* (1,5–12,5%). Інтенсивність інвазії Unionidae кліщами коливається у межах 1–69 ос./особину (*Unio*, *Pseudanodonta* – 1–11, *Anodonta* – 1–69). Висока екстенсивність інвазії псевданадонт може бути пов'язана зі спорадичністю їх поширення, тому що більшість цих молюсків зібрано з річки Уж (м. Коростень).

Кліщі у тілі хазяїна розташовуються на мантії, зовнішніх та внутрішніх півзябрах, на поверхні вісцерального мішка та проксимальної частини ноги. Деяких особин виявлено усередині півзябер, де вони розміщуються між філаментами. За низької інтенсивності інвазії кліщі, як правило, розташовуються між внутрішніми та зовнішніми півзябрами (щільність поселення – 0,04–0,35 ос./см^2). За значного ураження ними хазяїв, ці тварини рівномірно оселяються на мантії та зябрах (щільність поселення – 0,22–0,54 ос./см^2). Кліщі найчастіше зустрічаються на зябрах (частота трапляння становить 80,0–100,0%), рідше – на мантії (5,9–77,7%), ще рідше – на вісцеральному мішку (3,7–27,8%) і рідко – на проксимальній частині ноги (4,3–20,0%).

Кліщі присмоктуються до тіла на ділянках, укритих миготливим епітелієм, заважаючи, внаслідок компресії, нормальному функціонуванню його війок. Інколи ці паразити вкривають суцільним щільним шаром такі ділянки та поступово руйнують клітини миготливого епітелію. Більше того, розвиток личинок кліщів у мантії та нозі спричиняє глибокі морфологічні зміни (аж до повного руйнування) у сполучній тканині перлівницевих, яка підстилає шар миготливого епітелію. Через це, за високої інтенсивності інвазії кліщі впливають на рівень загального обміну речовин перлівницевих.

Трематоду *B. polymorphus* знайдено у п'яти видів перлівницевих (*U. pictorum*, *U. tumidus*, *A. cygnea*, *A. anatina*, *P. Complanata*). У видів *Anodonta* личинки трематоди трапляються частіше (0,7–15,2%), ніж у видів *Unio* (0,9–1,9%) та *P. complanata* (1,7–1,9%). Тобто екстенсивність інвазії молюсків цим паразитом становить 0,7–15,2%.

У досліджених молюсків партеніти та личинки трематоди *B. polymorphus* виявлені винятково у статевій залозі, факту зараження гепатопанкреаса цим паразитом не виявлено. Інвазію зареєстровано тільки у статевозрілих особин, починаючи з трирічного віку. Приблизно у 15–20% інвазованих молюсків трематода викликала повну паразитарну руйнацію гонади. Партеніти *B. polymorphus*, які локалізуються в міжацинарній сполучній тканині гонади, на початку паразитарного ураження здійснюють механічний вплив на клітини сполучної тканини, а у подальшому починають тиснути на клітини стінок ацинусів гонади, що викликає дегенерацію клітин зародкового епітелію. Тому за високої інтенсивності інвазії відбувається більш або менш значна деструкція статевої залози, що спричиняє втрати молюсками здатності розмножуватись.

Помічено зміни роботи війок миготливого епітелію зябер і ноги деяких видів перлівницевих за умов зараження водяними кліщами роду *Unionicola* та поєднання кліщової інвазії з іншими біотичними чинниками (паразитування трематоди *B. polymorphus*, наявність личинок гірчака). За наявності кліщів в *U. tumidus*, *U. pictorum*, *P. complanata* статистично вірогідних змін у функціонуванні війок миготливого епітелію (на ділянках, позбавлених паразитів) не виявлено. Натомість заселеність цими паразитами *A. cygnea* (до 21 особини) викликає у нього збільшення тривалості життя війок миготливого епітелію зябер і ноги в 1,4–1,7 раза ($P < 0,02$). За сумісного слабоінтенсивного заселення *A. anatina* кліщами (інтенсивність інвазії – до 10 особин) та личинками гірчака (до 15 особин) спостерігається прискорення життя війок миготливого епітелію на 5,3–

6,5% ($P < 0,01$). Висока інтенсивність інвазії кліщами (20–50 ос.) спричиняє статистично вірогідне скорочення тривалості роботи війок миготливого епітелію зябер у видів роду *Anodonta* на 45,9–57,4% ($P < 0,03$). Така саме кількість цих паразитів викликає в *A. anatina* пригнічення биття війок миготливого епітелію на 6,3–7,3% ($P < 0,02$). Одночасне ураження *A. anatina* трематодою *B. polymorphus* (тотальне ураження гонади спороцистами та церкаріями) та кліщами *Unionicola* (інтенсивність інвазії – до 32 особин) викликає ще більше зниження частоти биття війок миготливого епітелію на 9,6–10,7% ($P < 0,001$). Аналогічне пригнічення биття війок (на 8,5–8,8%) спостерігається за наявності в організмі хазяїна кліщів (до 15 особин) і личинок гірчака (30–40 особин) ($P < 0,01$).

Партеніти *B. polymorphus* не здійснюють безпосереднього впливу на миготливий епітелій перлівницевих, будучи просторово від нього відокремленими. Тому за слабкої інвазії цією трематодою не помічено статистично вірогідних відмінностей функціонування миготливого епітелію. В *U. pictorum* зафіксоване навіть зростання тривалості биття його війок (для зябер – у 2,6, для ноги – в 1,5 раза) ($P < 0,02$). Це свідчить про мобілізацію за цих обставин захисно-пристосувальних можливостей молюсків, що виявляється у підвищенні протидії їх організму наявним у них паразитам. За інтенсивної інвазії партенітами та церкаріями *B. polymorphus* в *U. pictorum*, *A. cygnea* та *A. anatina* спостерігається пригнічення биття війок миготливого епітелію зябер і ноги. В *U. pictorum* воно становить 4,8–6,2% і 4,1–5,7% відповідно ($P < 0,03$). В *A. cygnea* зниження частоти биття війок для миготливого епітелію зябер відбувається на 5,7, для ноги – на 6,3% ($P < 0,03$).

Обговорення

У літературних джерелах наведено уривчасті відомості щодо екстенсивності та інтенсивності інвазії *A. conchicola*. Екстенсивність інвазії перлівниці *Sinanodonta woodiana* Lea, 1834 варіювала від 5% до 30%, а інтенсивність становила 1–2 ос./ос. (Yuryshynets and Krasutska, 2009). В уніонід з озер у Польщі екстенсивність інвазії аспідогастрами становила 13% (Marszewska and Cichy, 2015). Наші відомості щодо локалізації аспідогастрів у перикардіальній порожнині та нирках підтверджуються іншими дослідженнями. Переважне паразитування гельмінтів відбувається саме у перикардії, і лише іноді вони зустрічаються в нирках прісноводних двостулкових молюсків. Типова реакція хазяїна на перебування аспідогастрів у нирках – ниркова метаплазія (Pauley and Becker, 1968; Zhan et al., 2017). Молюски можуть переживати інвазію без значних порушень власного обміну речовин. Особливо це важливо за постійного повторного інфікування паразитами (Zhan et al., 2017).

У переважної більшості досліджених нами інвазованих молюсків спостерігали справжню гіпертрофію стінок навколосерцевої сумки – потовщення відбувається за рахунок збільшення розміру специфічних клітин (міоцитів). За високої інтенсивності інвазії особин одночасно має місце також несправжня гіпертрофія (за рахунок значного розростання сполучної тканини). Потовщення сполучнотканинного шару навколосерцевої сумки – очевидно, наслідок захисно-пристосувального процесу – компенсаторної гіпертрофії, викликаної посиленою роботою серця у перлівницевих, інвазованих *A. conchicola*.

Деякі дослідники виявляли паразита, інкапсульованого в різні тканини тулуба та ноги, де він викликав помітну гемоцитарну інфільтрацію в навколишні тканини (Pauley and Becker, 1968). У наших зразках інкапсульовані личинки виявлено лише у стінці навколосерцевої сумки. Подібну локалізацію паразита помічено перед перикардієм (Huehner and Etges, 1981), де інкапсульовані черви оточені внутрішніми фібробластичними та зовнішніми фіброцитарними стінками, зі сполучними тканинами стисненого хазяїна, що випадково прилягали. Внутрішня стінка такої капсули містила кислі муцини та фосфоліпіди, у той час як зовнішня стінка мала волокна ретикулума, нейтральні муцини та фосфоліпіди. Всередині капсул зустрічались живі або помираючі дорослі паразити, життєздатні яйця або порожні яєчні оболонки. Також спостерігали яйця аспідогастрів, індивідуально інкапсульовані гемоцитами в гематологічному просторі. Більшість інкапсульованих червів (понад 60%) помирали через реакцію хазяїна, що сприяла загибелі паразита (Huehner and Etges, 1981).

Інкапсуляція гельмінтів – прояв продуктивно-запальних процесів у молюсків, викликаних аспідогастрами, і є однією з основних реакцій клітинного імунітету хазяїна. Вона спрямована, у першу чергу, на зменшення патогенного впливу гельмінтів. Як і багато безхребетних, двостулкові молюски мають значний набір імунних клітин, генів та білків, а кістяк імунної системи формують гемоцити. Однак тканини слизових оболонок на межі з навколишнім середовищем відіграють вирішальну роль у захисті хазяїнів (Allam and Raftos, 2015).

Через обмежену зону ураження паразитами органів перлівницевих можна очікувати лише опосередкованого їх впливу на інші органи, а саме токсичної дії на хазяїна продуктів їх обміну речовин. У такому разі як показники фізіологічного стану організму перлівницевих можна використовувати різні морфометричні індекси, які дозволяють оцінити вплив чинників як зовнішнього, так і внутрішнього середовища на організм молюсків за сукупністю непрямих ознак, зокрема, за відносною масою серця (Giese et al., 1967). Проте необхідно враховувати, що значення серцевих індексів у двостулкових молюсків дуже низькі. Навіть у черевоногих серцеві індекси показники на порядок вищі (Alyakrinskaya, 1989).

Кліщі роду *Unionicola* живуть як паразити у зябрах перлівницевих. Вони прикріплюються до зябер хазяїна за допомогою педипальп, які викликають зсув, розриви та ерозію зябрового епітелію. Педипальпи глибоко занурені у сполучну тканину зябер і викликають лейкоцитарну інфільтрацію у пошкоджену область із наступним набряком зябрової тканини (Baker, 1976). Німфи та дорослі особини *Unionicola intermedia* Koenike, 1882 живляться головним чином гемоцитами та слизом хазяїна. Гемоцити присутні у великій кількості нижче місця прикріплення кліщів, їх присутність – відповідь хазяїна у вигляді запального процесу, а кліщ живиться продуктами цієї реакції (Baker, 1977). Частота трапляння, визначена дослідниками для *U. Ypsilophora* Bonz, 1783, становить 3,5% Інвазовані молюски знайдені винятково у водоймах, що використовуються для розведення риби і не виявлені в озерах із підвищеною температурою води (Cichy et al., 2016).

Кліщі роду *Unionicola* не здійснюють значного впливу на організм хазяїна та гістологічну картину його тканин, навіть за високої інтенсивності інвазії. Патологія, викликана яйцями та личинками кліщів, звичайно проявляється у вигляді локалізованого розтягнення ураженої ділянки. Личинки кліщів, занурені у сполучні тканини, як правило, інкапсульовані. Також дослідники виявляють інкапсульовані рештки кліщів у мантії, тканині зябер, кишечника, нозі, серці, перикардії (McElwain et al., 2016). Напевно, таким чином організм молюсків звільняється від деяких інвазій.

У літературі є фрагментарні відомості про вплив трематод родини Bucephalidae на фізіологію (Jokela et al., 1993), ріст (Taskinen, 1998) та репродуктивну здатність (Taskinen and Valtonen, 1995) їх двостулкових хазяїнів. Інвазовані молюски не містять запаси глікогену, але мають більші запаси жиру, ніж неінвазовані. Відтворення паразитів відбувається одночасно з розвитком потомства в неінвазованих молюсків. Під час відтворення паразити використовують енергію, яка в іншому випадку була б спрямована на розмноження хазяїна, не заважаючи підтриманню його інших проявів життєдіяльності. Використання винятково репродуктивної енергії хазяїна – ефективний засіб для тривалого співіснування з ним, не створюючи підвищеного ризику смертності (Jokela et al., 1993). Екстенсивність інвазії *Rhipidocotyle campanula* Dujardin, 1845, визначена дослідниками, становить 1,0–5,7%. Трематода виявлена тільки в молюсків, зібраних з озер із підвищеною температурою водного середовища (Taskinen et al., 1994; Cichy et al., 2016). Екс-

тенсивність інвазії *R. fennica* Gibson, Valtonen et Taskinen, 1992 в *Anodonta piscinalis* становила 32,3–33,2% (Taskinen et al., 1994; Taskinen and Valtonen, 1995). Експеримент, проведений із буцефалідною трематодою *R. fennica*, виявив, що різка зміна температури протягом однієї години з 17 °C до 20 °C спричиняє збільшення виходу церкарій цього паразита, і, навпаки, зниження температури з 17 °C до 14 °C – зменшення виходу (Choo and Taskinen, 2015).

Помічено вплив трематод *R. fennica* та *R. campanula* на зниження росту прісноводного молюска *Anodonta piscinalis* у польових умовах. Зменшення росту корелювало з кількістю паразита у статевій залозі. Найбільше затримувався ріст молюсків із подвійним зараженням (двома видами трематод одночасно) та з важким зараженням одним видом трематоди (Taskinen, 1998). Як і в нашому матеріалі, заражені тільки статевозрілі молюски (старше 3–4 років). Екстенсивність інвазії була вищою у старих, ніж у молодих молюсків. Кількість спороцист збільшувалась із віком хазяїна. Також виявлено зв'язок між ростом молюсків і наявністю трематодної інвазії: молюски, які росли швидше, частіше заражались. Поширеність інвазії вища серед самок, ніж серед самців (інвазовані понад 50% статевозрілих самок). Також підраховано, що кількість особин, які містили глохідії, скоротилась на 31% через зараження трематодою (Taskinen and Valtonen, 1995; Müller et al., 2015). Ми не виявили сезонної мінливості показників інтенсивності та екстенсивності інвазії перлівницевих трематодою родини Bucephalidae, що підтверджується даними інших науковців: життєздатні спороцисти з ранніми стадіями розвитку церкаріїв виявляються протягом року (Taskinen et al., 1994). Зараження *R. campanula* трапляється рідше, але руйнування гонади в середньому становить 90% її тканини. Трематода *R. fennica* трапляється частіше та викликає в середньому 30% руйнування гонади. Зрештою, обидва види викликають безпліддя хазяїна (Taskinen et al., 1994; Müller et al., 2015), що виявлено нами у шостої частини молюсків із буцефалідною інвазією. У стресових умовах (аноксія, голодування) трематода *R. campanula* викликає вищу смертність хазяїв, ніж *R. fennica*. Тому різкі зміни навколишнього середовища можуть вплинути на елімінацію заражених *R. campanula* особин із природної популяції молюсків. Але повторне їх зараження від риби запобігає вимиранню популяції паразита. Висока смертність хазяїна, викликана *R. campanula*, може бути поясненням для нижчої екстенсивності інвазії *R. campanula* порівняно з *R. fennica* (Jokela et al., 2005).

Висновки

Один і той самий вид паразита може мати неоднакову патогенність для різних видів своїх хазяїнів. Прояв патогенності паразита для хазяїна залежить від тих взаємовідносин, які формуються між ними у процесі онто- та філогенезу. Інтенсивність патологічного процесу в хазяїна залежить не тільки від безпосереднього впливу паразита на нього, а й від характеру його реакцій на присутність паразита. У досліджених таксоценозах уніонід головні хазяї аспідогастрів – *U. tumidus* і *A. anatina*, інші види – допоміжні або рідкісні хазяї. У видів *Anodonta* трапляються частіше кліщі роду *Unionicola* та личинки трематоди *B. polymorphus* порівняно з видами роду *Unio*. Молюски *U. crassus* найменше уражені *A. conchicola* та виявились вільними від кліщів та трематоди *B. polymorphus*. Отримані результати вказують на необхідність подальших досліджень, зокрема вивчення біохімічних особливостей різних видів уніонід.

У результаті зв'язків у системі «паразит – хазяїн» у перлівницевих змінюються фізіологічні показники лише у разі інтенсивного їх зараження одним або декількома видами паразитів. За цих обставин резистентність молюсків виявляється недостатньою для протистояння негативному впливу паразитів, а захисно-пристосувальних можливостей тварин не вистачає для відновлення та підтримання гомеостазу. У перлівницевих розвивається загальний патологічний процес, який проявляється у численних порушеннях функціонування організму. У таких випадках паразит може впливати як на абсолютну чисельність популяцій представників родини Unionidae, так і на щільність їх населення через смертність особин із високою інтенсивністю інвазії.

References

Allam, B., & Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. Journal of Invertebrate Pathology, 131, 121–136.

Alyakrinskaya, I. O. (1989). O serdechnom indekse nekotoryh Gastropoda (Mollusca) [Heart index in some Gastropoda (Mollusca)]. Jekologija, 1, 79–82 (in Russian).

Baker, R. A. (1976). Tissue damage and leukocytic infiltration following attachment of the mite *Unionicola intermedia* to the gills of the bivalve mollusc *Anodonta anatina*. Journal of Invertebrate Pathology, 27(3), 371–376.

Baker, R. A. (1977). Nutrition of the mite *Unionicola intermedia*, Koenike and its relationship to the inflammatory response induced in its molluscan host *Anodonta anatina*, L. Parasitology, 75(3), 301–308.

Chernogorenko, M. I. (1983) Lichinki trematod v mollyuskah Dnepra i ego vodohranilishch (fauna, biologiya, zakonomernosti formirovaniya) [The trematode larvae of mollusks of Dnipro River and its reservoirs (fauna, biology, regularities of formation)]. Naukova Dumka, Kyiv (in Russian).

Choo, J., & Taskinen, J. (2015). Effect of short-term temperature change on cercarial release by *Rhipidocotyle fennica* (Trematoda, Bucephalidae) from the freshwater bivalve host, *Anodonta anatina*. Ecological Parasitology and Immunology, 4, art235932.

Cichy, A., Urbańska, M., Marszewska, A., Andrzejewski, W., & Żbikowska, E. (2016). The invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) as a host for native symbionts in European waters. Journal of Limnology, 75(2), 288–296.

Giese, A. C., Hart, M. A., Smith, A. M., & Cheung, M. A. (1967). Seasolal changes in body component indices and chemical composition in the pismo clam *Tivela stultorum*. Comparative Biochemistry and Physiology, 22(2), 549–561.

Glöer, P., & Meier-Brook, C. (1998). Süsswassermollusken. DJN, Hamburg.

Huehner, M. K., & Etges, F. J. (1981). Encapsulation of *Aspidogaster conchicola* (Trematoda: Aspidogastrea) by unionid mussels. Journal of Invertebrate Pathology, 37(2), 123–128.

Jokela, J., Taskinen, J., Mutikainen, P., & Kopp, K. (2005). Virulence of parasites in hosts under environmental stress: Experiments with anoxia and starvation. Oikos, 108, 156–164.

Jokela, J., Uotila, L., & Taskinen, J. (1993). Effect of the castrating trematode parasite *Rhipidocotyle fennica* on energy allocation of fresh-water clam *Anodonta piscinalis*. Functional Ecology, 7(3), 332–338.

Marszewska, A., & Cichy, A. (2015). Unionid clams and the zebra mussels on their shells (Bivalvia: Unionidae, Dreissenidae) as hosts for trematodes in lakes of the Polish lowland. Folia Malacologica, 23, 149–154.

McElwain, A., Fleming, R., Lajoie, M., Maney, C., Springall, B., & Bullard, S. A. (2016). Pathological changes associated with eggs and larvae of *Unionicola* sp. (Acari: Unionicolidae) infecting *Strophitus connasaugaensis* (Bivalvia: Unionidae) from Alabama Creeks. Journal of Parasitology, 102(1), 75–86.

Müller, T., Czarnoleski, M., Labecka, A. M., Cichy, A., Zając, K., & Dragosz-Kluska, D. (2015). Factors affecting trematode infection rates in freshwater mussels. Hydrobiologia, 742(1), 59–70.

Pauley, G. B., & Becker, C. D. (1968). Aspidogaster conchicola in Mollusks of the columbia river system with comments on the host's pathological response. Journal of Parasitology, 54(5), 917–920.

Taskinen, J. (1998). Influence of trematode parasitism on the growth of a bivalve host in the field. International Journal for Parasitology, 28(4), 599–602.

Taskinen, J., & Valtonen, E. T. (1995). Age-, size-, and sex-specific infection of *Anodonta piscinalis* (Bivalvia: Unionidae) with *Rhipidocotyle fennica* (Digenea: Bucephalidae) and its influence on host reproduction. Canadian Journal of Zoology, 73(5), 887–897.

Taskinen, J., Valtonen, E. T., & Mäkelä, T. (1994). Quantity of sporocysts and seasonality of two *Rhipidocotyle species* (Digenea: Bucephalidae) in *Anodonta piscinalis* (Mollusca: Bivalvia). International Journal for Parasitology, 24, 877–886.

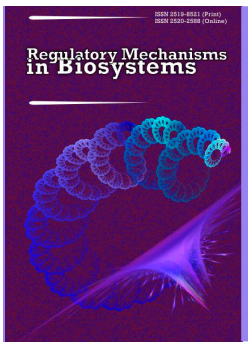
Yurishinets, V. I. (2010). Symbiotic organisms of some alien species of freshwater fishes and mollusks of water bodies of the Danube River and Dnieper River basins. Russian Journal of Biological Invasions, 1(2), 149–152.

Yuryshynets, V., & Krasutska, N. (2009). Records of the parasitic worm *Aspidogaster conchicola* (Baer 1827) in the Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea 1834) in Poland and Ukraine. Aquatic Invasions, 4, 491–494.

Zdun, V. I. (1961). Lychynky trematod v prisnovodnyh molyuskah Ukrayiny [Trematod larvae in freshwater mollusks of Ukraine]. AN URSR, Kyiv (in Ukrainian).

Zhadin, V. I. (1926). Nashi presnovodnye mollyuski [Our freshwater mollusks]. Izdatel'stvovo Okskoj Biologicheskoj Stancii, Murom (in Russian).

Zhan, X., Li, C., & Wu, H. (2017). Trematode Aspidogastrea found in the freshwater mussels in the Yangtze River basin. Nutricion Hospitalaria, 34, 460–462.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 489–496
doi: 10.15421/021775

Influence of mineral substances on the synthesis of volatile organic compounds by *Pleurotus ostreatus* in the process of solid phase cultivation

E. N. Vlasenko, O. V. Kuznetcova, J. V. Stepnevskaya

Ukrainian State University of Chemical Technology, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 27.09.2017
Received in revised form 03.11.2017
Accepted 08.11.2017

Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Ave., 8, Dnipro, 49005, Ukraine.
Tel.: +38-097-954-78-85
E-mail: ekaterina.udhtu@gmail.com

Vlasenko, E. N., Stepnevskaya, J. V., & Kuznetcova, O. V. (2017). Influence of mineral substances on the synthesis of volatile organic compounds by Pleurotus ostreatus in the process of solid phase cultivation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 489–496. doi:10.15421/021775

Mineral substances play an important role in ensuring high-grade growth and high organoleptic quality of the fruit bodies of basidiomycetes. In the process of solid-phase cultivation of the mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. the lignocellulosic substrates were enriched with mineral additives of calcium, iron and selenium. Their influence on the synthesis of volatile aroma compounds was investigated by the methods of sensory profile analysis and ultraviolet spectroscopy. Mineral additives in the form of $CaCl_2$, $FeSO_2$•$7H_2O$ and Na_2SeO_3 salts were added to the substrate (sunflower husk, barley straw) before sterilization in concentrations that correspond to the physiological needs of the mushrooms. When carrying out a sensory profile analysis of dried fruit bodies, the following attributes of the flavor were determined: mushroom, woody, sweet, herbaceous, fish, meat, floral, earthy, acidic, putrescent. The conducted profile analysis showed an unequal dependence of the effect of mineral additives for each of the *P. ostreatus* strains. For IBK-549 and IBK-1535, an increase in the intensity of mushroom notes of aroma was observed with the addition of calcium and selenium to the husks, and for IBK-551, this was observed with the addition of iron and selenium to both substrates. The volatile aroma compounds were extracted with hexane at boiling point for 30 minutes. Absorption spectra were recorded in the wavelength range 200–330 nm. The examined extracts had light absorption maxima at 200–210 and 260–300 nm, which is typical for solutions of unsaturated compounds that have non-conjugated double bonds, saturated and unsaturated aldehydes and ketones. Additions of iron to the substrates increased the intensity of light absorption in comparison with the control. Additions of selenium selectively influenced different strains, and calcium ions did not significantly affect the change in the intensity of light absorption, and therefore the synthesis of volatile compounds by mushrooms. The level of synthesis of aroma-forming substances was higher when cultivating fungi on sunflower husks than on barley straw. This was confirmed both by the obtained aroma profiles and by the recorded absorption spectra of all examined strains. The study showed the possibility of influencing the organoleptic qualities of *P. ostreatus* fruiting bodies during solid-phase cultivation by supplementing the composition of lignocellulosic substrates with various mineral additives.

Keywords: aroma compounds; sensory analysis; UV spectroscopy; iron; calcium; selenium

Вплив мінеральних речовин на синтез летких органічних сполук грибами *Pleurotus ostreatus* у процесі твердофазного культивування

К. М. Власенко, О. В. Кузнецова, Я. В. Степневська

Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпро, Україна

Мінеральні речовини відіграють важливу роль у забезпеченні повноцінного росту та високої органолептичної якості плодових тіл базидіоміцетів. У процесі твердофазного культивування грибів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. лігноцелюлозні субстрати збагачували мінеральними добавками кальцію, заліза та селену. Вивчено їх вплив на синтез летких запашних сполук методами сенсорного профільного аналізу та ультрафіолетової спектроскопії. Мінеральні добавки у вигляді солей $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ та Na_2SeO_3 додавали до субстрату (соняшникове лушпиння, солома ячменю) перед стерилізацією у концентраціях, які відповідають фізіологічним потребам гриба. Сенсорний профільний аналіз висушених плодових тіл показав неоднакову залежність впливу мінеральних добавок для кожного зі штамів гриба *P. ostreatus*. Для штамів ІВК-549 та ІВК-1535 відмічено підвищення інтенсивності грибних нот запаху під час додавання кальцію та селену. А для ІВК-551 спостерігалося підвищення характерних грибних нот на обох субстратах із добавками заліза та селену. Екстрагували леткі запашні сполуки гексаном за температури кипіння протягом 30 хвилин. Досліджені екстракти мали максимуми світлопоглинання у діапазоні 200–210 нм та за 260–300 нм, що характерно для розчинів ненасичених сполук, які мають подвійні зв'язки, насичених і ненасичених альдегідів і кетонів. Добавки заліза до субстратів підвищували інтенсивність світлопоглинання екстрактів порівняно з контролем. Добавки селену мали вибірковий вплив на різні штами, а іони кальцію суттєво не впливали на синтез летких сполук грибами.

Ключові слова: запашні сполуки; сенсорний аналіз; УФ-спектроскопія; залізо; кальцій; селен

Вступ

Гриби *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. можна культивувати на різних субстратах, включаючи більшість сільськогосподарських відходів (Curvetto et al., 2002). Але за інтенсивного процесу вирощування цих грибів існує проблема відсутності грибного аромату міцелію та зниження ароматичних властивостей плодових тіл порівняно з тими, які отримані у природних умовах (Buhalo, 1988).

Як правило, лігноцелюлозні матеріали, які використовують як субстрати для культивування грибів, мають низький вміст мінералів і потребують добавок для забезпечення їх повноцінного росту. Іони металів відіграють важливу роль у фізіології живлення грибів, що зумовлено високим біологічним значенням ферментних систем, які їх містять. Мікроелементи беруть участь у численних біохімічних процесах, пов'язаних із різними катаболічними та анаболічними реакціями (Al-Maali, 2015).

Мінеральні речовини, такі як фосфор, сульфур, магній, кальцій, залізо, калій, купрум, цинк, манган і кобальт, використовують у культуральних середовищах для вирощування грибів (Bellettini et al., 2016). Кальцій – життєво необхідний елемент для росту грибів (Pitt and Ugalde, 1984), підтримання цілісності клітинних мембран та регуляції проникності мембран для багатьох іонів (El Habbasha and Faten, 2015). Він бере участь у багатьох клітинних процесах, таких як утворення апресорій, розгалуження гіф та цитоплазматичний рух (Regalado, 1998). Градієнт іонів Ca^{2+} відіграє регуляторну роль у процесах верхівкового росту гіф грибів (Jackson and Heath, 1993). Нерідко кальцій слугує нейтралізатором надлишку органічних кислот, які утворюються у процесах обміну багатьох грибів. Він – кофермент низки гідролаз, наприклад, α-амілази та деяких гідролаз циклічних полісахаридів (Bekker, 1988).

Залізо необхідне для росту всіх грибів, а також для утворення комплексів різних сполук із ним, які відіграють важливу роль у живленні грибів, детоксикації проміжних метаболітів та багатьох інших процесах (Velychko and Berykashvyly, 2008). Залізо як кофактор активує ферменти та відіграє роль у формуванні просторової структури білків, які беруть участь у більшості важливих біохімічних реакцій у клітині. Fe-залежні ферменти задіяні майже в усіх основних процесах, що відбуваються у клітинах: у циклі трикарбонових кислот, диханні, трансляції, реплікації та репарації ДНК, метаболізмі ксенобіотиків, транспорті оксигену, синтезі антибіотиків та інших малих молекул. Вони необхідні для синтезу основних компонентів клітини: ліпідів (оксистиролів, ненасичених жирних кислот, гідроксильованих сфінголіпідів), протеїнів, нуклеїнових кислот (Philpott et al., 2012).

Залізо (II) входить до складу ферментів ліпоксигеназ – родини негемових залізовмісних діоксигеназ, які каталізують окиснення ненасичених жирних кислот з утворенням їх гідропероксидів (Golovanov et al., 2008). Ця реакція – ключовий етап ліпоксигеназного шляху утворення летких запашних сполук, таких як 1-октен-3-ол, грибами (Combet et al., 2006).

Селен – мікроелемент, хімічно подібний до сульфуру та телуру. В організмі він зв'язується з білковими молекулами, утворюючи селенопротеїни (Savic et al., 2009). Селен входить до складу селенометіоніну та селеноцистеїну (Werner and Beelman, 2002), які мають каталітичну та антиоксидантну активність. Він – кофактор ферменту глутатіонпероксидази, яка захищає організм від негативного впливу перекису водню та гідропероксидів жирних кислот, які утворюються у ліпоксигеназному та циклооксигеназному метаболічних шляхах (Nunes et al., 2012; Ostadalova, 2012).

Мета цього дослідження – визначити вплив мінеральних речовин (солей кальцію, заліза та селену) на синтез летких запашних сполук штамами гриба *P. ostreatus* у процесі твердофазного культивування за допомогою сенсорного профільного аналізу та ультрафіолетової спектроскопії.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкти досліджень – три штами їстівного гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.: IBK-549, IBK-551 та IBK-1535, отримані з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Гриб належить до родини Pleurotaceae, порядку Agaricales, класу Agaricomycetes, відділу Basidiomycota, царства Fungi.

Субстрати для отримання плодових тіл – відходи сільського господарства: соняшникове лушпиння та солома ячменю.

Мінеральні добавки використовували у вигляді водних розчинів солей $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ та Na_2SeO_3. Розчини додавали до субстрату перед стерилізацією у перерахунку на вміст досліджуваних мінеральних речовин у концентраціях: Ca – 10^{-2}% та 10^{-3}%, Fe – 10^{-3}% та 10^{-4}%, Se – 10^{-5}% та 10^{-6}%. Під час вибору концентрацій мінеральних добавок враховували потреби *P. ostreatus* у них та їх потенційну токсичність. Контроль – субстрати без добавок.

Підготовку та стерилізацію субстратів проводили загальноприйнятими методами (Buhalo et al., 2004). Охолоджений субстрат інокулювали посівним міцелієм *P. ostreatus*. Посівний міцелій отримували на основі зерна ячменю. Культивування проводили за температури 26 ± 1 °C та вологості 70–80% до повного заростання субстрату міцелієм, потім ємності з субстратом переносили у ростове приміщення з температурою 15–16 °C, вологістю 80–90% і освітленням протягом 8 годин на добу. Збирали врожай I та II хвиль плодоносіння. Гриби висушували за температури 40–45 °C у сухожаровій шафі протягом 24–48 годин.

У процесі культивування визначали такі параметри росту міцелію *P. ostreatus*: термін появи примордіїв та I хвилі плодоносіння, кількість утворених зростків, врожай I та II хвиль плодоносіння.

Сенсорний профіль аромату зразків висушених грибів визначали за загальноприйнятими методиками (Vlasenko and Kuznecova, 2016). Експертна дегустаційна комісія складалась із п'яти осіб, підготовлених для проведення органолептичного аналізу. Спочатку визначено характерні атрибути запаху, а потім ступінь інтенсивності кожного з них за 5-бальною шкалою: 0 – ознака відсутня, 1 – ознака лише упізнається або відчувається, 2 – слабка інтенсивність, 3 – помірна інтенсивність, 4 – сильна інтенсивність, 5 – дуже сильна інтенсивність прояву ознаки. Досліджувані зразки оцінювали тричі.

Для проведення спектрофотометричного дослідження висушені плодові тіла першої хвилі плодоносіння подрібнювали на електричному млині до порошкоподібного стану. Наважку сировини масою 1 г поміщали в екстрактор, додавали розчинник у кількості 100 $см^3$ (гідромодуль складав 1 : 100). Як розчинник використовували гексан. Екстракцію проводили за температури кипіння протягом 30 хвилин. Екстракти охолоджували у витяжній шафі, фільтрували через паперовий фільтр на воронці Бюхнера, кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 $см^3$ і доводили об'єм розчинником до позначки. Розчин 1-октен-3-олу готували розчиненням у гексані концентрацією 1 $г/дм^3$. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-2000 у діапазоні 200–330 нм. Як розчин порівняння використовували розчинник. Математичну обробку даних здійснювали методом однофакторного дисперсійного аналізу.

Результати та їх обговорення

Культурально-морфологічні характеристики росту грибів. Термін появи примордіїв варіював залежно від штаму гриба від 15 до 26 діб на соняшниковому лушпинні та від 17 до 28 діб на соломі ячменю. Додавання Ca^{2+} до соняшникового лушпиння скорочувало термін появи примордіїв на 2–4 доби. За морфологічними ознаками міцелій *P. ostreatus* усіх досліджених штамів білий, пухнастий, щільніший на соняшниковому лушпинні.

Таблиця 1

Параметри росту *Pleurotus ostreatus* ІВК-549, ІВК-551 та ІВК-1535 на різних варіантах субстрату (x ± SE, n = 3)

Мінеральна добавка	Термін появи примордіїв, доба	Перша хвиля плодоносіння, доба	Кількість зростків на одиницю об'єму, шт.	Врожай першої хвилі плодоносіння, г	Врожай другої хвилі плодоносіння, г	Термін появи примордіїв, доба	Перша хвиля плодоносіння, доба	Кількість зростків на одиницю об'єму, шт.	Врожай першої хвилі плодоносіння, г	Врожай другої хвилі плодоносіння, г
	Соняшникове лушпиння					Солома ячменю				
	P. ostreatus ІВК-549									
$Ca10^{-2}$%	16–17	25	35,7 ± 1,08*	17,2 ± 0,80	6,1 ± 0,38*	25	36	12,3 ± 0,41	14,4 ± 0,57	3,8 ± 0,33
$Ca10^{-3}$%	16	25–27	36,0 ± 1,41*	14,9 ± 0,23	4,8 ± 0,61	23	32	11,3 ± 0,82	15,3 ± 0,39	3,9 ± 0,50
$Fe10^{-3}$%	18	32	18,7 ± 1,78	15,5 ± 0,51	4,6 ± 0,68	21–22	29–31	11,0 ± 2,55	16,0 ± 2,48	4,3 ± 0,69
$Fe10^{-4}$%	19–20	33	15,7 ± 0,41	13,7 ± 0,40	4,3 ± 0,22	18–19	33	15,0 ± 1,87	12,3 ± 0,47	4,7 ± 0,37
$Se10^{-5}$%	19–21	28–29	23,7 ± 3,19	16,2 ± 0,47	4,4 ± 0,42	17	25	17,3 ± 0,82	22,1 ± 0,67	5,6 ± 0,28
$Se10^{-6}$%	20–22	29–32	23,3 ± 1,47	15,5 ± 0,63	4,3 ± 0,49	17	25	16,3 ± 0,41	19,3 ± 1,03	4,7 ± 0,20
Контроль	18–20	26–32	18,7 ± 1,08	17,1 ± 1,40	3,4 ± 0,34	17–20	26–32	14,0 ± 1,87	15,5 ± 3,25	4,4 ± 1,55
	P. ostreatus ІВК-551									
$Ca10^{-2}$%	16	29–32	19,3 ± 1,08	14,0 ± 0,47	4,5 ± 0,61	28	42	5,7 ± 1,08	11,2 ± 0,42	4,9 ± 0,35
$Ca10^{-3}$%	15–16	28	17,7 ± 1,47	15,2 ± 0,43	4,4 ± 0,74	26–27	38–40	7,3 ± 1,08	13,4 ± 0,70	4,3 ± 0,33
$Fe10^{-3}$%	23	34–35	19,7 ± 2,86	15,4 ± 1,65	4,8 ± 0,35	24	32	13,0 ± 0,71*	13,1 ± 0,13	8,6 ± 0,45
$Fe10^{-4}$%	18–20	33–35	20,7 ± 1,47	13,6 ± 0,41	4,2 ± 0,32	20–22	33	12,7 ± 0,82*	12,1 ± 0,49	4,7 ± 0,49
$Se10^{-5}$%	18	28	17,7 ± 1,47	14,2 ± 0,71	5,3 ± 0,78	20	29	14,3 ± 1,78	14,5 ± 1,04	8,2 ± 1,06
$Se10^{-6}$%	18–22	32	16,3 ± 1,47	14,5 ± 0,82	6,1 ± 1,46	20	32–35	14,0 ± 1,87	13,3 ± 0,81	5,0 ± 0,69
Контроль	20–24	30–36	18,7 ± 1,47	13,9 ± 0,60	4,0 ± 0,55	20–24	30–35	8,7 ± 1,08	12,4 ± 1,55	5,9 ± 1,12
	P. ostreatus ІВК-1535									
$Ca10^{-2}$%	17–19	34–36	37,7 ± 0,41*	16,0 ± 1,30	6,3 ± 0,87	25–27	40–42	12,7 ± 3,56	18,3 ± 1,51*	5,8 ± 0,69
$Ca10^{-3}$%	16–17	32	30,0 ± 0,71*	13,4 ± 0,43	5,1 ± 0,19	27–28	40	16,3 ± 1,47	18,8 ± 1,93*	5,0 ± 0,24
$Fe10^{-3}$%	21	39	29,0 ± 1,87	14,3 ± 0,31	6,4 ± 0,63	22–24	37	26,0 ± 3,94*	12,7 ± 0,16	6,7 ± 0,81
$Fe10^{-4}$%	19–20	39–42	25,0 ± 0,71	12,4 ± 0,42	4,3 ± 0,33	20–22	34–38	17,3 ± 0,41*	11,0 ± 0,36	4,7 ± 0,28
$Se10^{-5}$%	17–18	28–29	36,0 ± 2,83*	15,9 ± 0,84*	5,4 ± 0,35	20–21	31–35	13,3 ± 1,08	12,7 ± 0,49	6,4 ± 0,67
$Se10^{-6}$%	18–19	28–32	41,3 ± 1,08*	15,0 ± 0,78	7,7 ± 1,27	21	35–37	17,7 ± 0,41*	12,8 ± 0,41	10,5 ± 0,58*
Контроль	22–26	32–36	25,0 ± 1,41	12,7 ± 0,71	5,9 ± 0,73	22–24	34–40	10,3 ± 2,04	12,5 ± 0,61	5,4 ± 0,40

Примітка: * – різниця статистично достовірна за P < 0,05 порівняно з контролем.

Варіювання строків І хвилі плодоносіння спостерігали для різних штамів у діапазоні 25–39 діб на лушпинні та 26–42 доби на соломі. Досліджувані мінеральні добавки суттєво не впливали на терміни плодоносіння.

Особливої різниці у морфології отриманих плодових тіл різних штамів грибів на субстратах із мінеральними добавками не відмічено. Зразки отриманих плодових тіл *P. ostreatus* різних штамів показані на рисунках 1–3.

Під час культивування на соняшниковому лушпинні спостерігали збільшення кількості грибних зростків за додавання у середовище солей кальцію для штаму ІВК-549, кальцію та селену для штаму ІВК-1535. Під час вирощування на соломі ячменю достовірне збільшення кількості зростків відмічене за додавання до основного субстрату заліза в обох концентраціях (штами ІВК-551 та ІВК-1535) та селену (ІВК-1535).

Досліджені мінеральні добавки суттєво не вплинули на врожайність грибів під час культивування на соняшниковому лушпинні. На соломі ячменю за додавання іонів кальцію врожайність збільшилася в 1,5 раза (штам ІВК-1535). Деякі дослідники також відмічають вплив мінеральних речовин на врожайність базидіоміцетів. У дослідженнях Yokota et al., (2016) додавання заліза у концентрації 30–60 мг/кг до цукрового очерету підвищувало біологічну ефективність на 15%, але суттєво не впливало на терміни плодоносіння *P. ostreatus*. Додавання селену (1 та 10 мг/л) до мальц-агару під час культивування у чашках Петрі стимулювало ріст *P. ostreatus* НК-35 (Savic et al., 2009). Під час твердофазного культивування *P. ostreatus* на кавовому лушпинні збагачення селеном впливало на морфологію плодових тіл. За концентрації понад 12,8 мг/кг утворювалися плодові тіла з видовженими ніжками та меншими шапками, збільшувалися терміни плодоносіння.

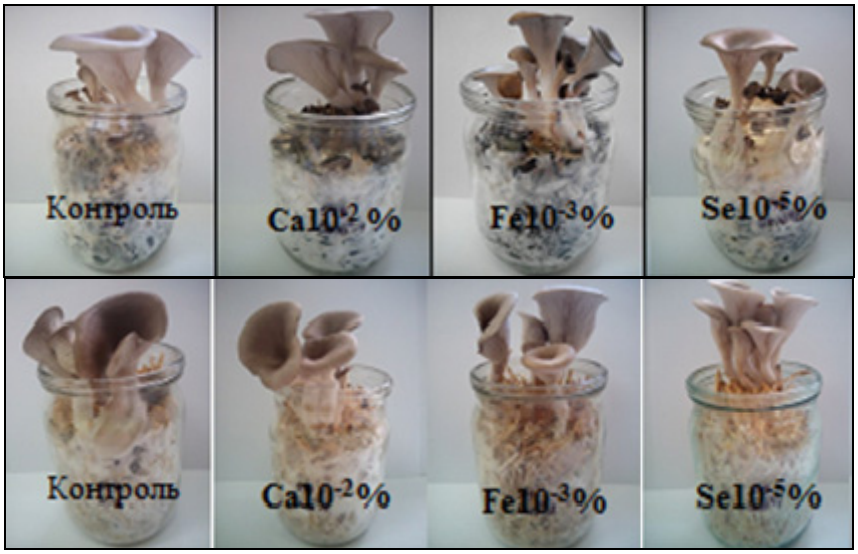


Рис. 1. Зразки плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. ІВК-549: верхній ряд – субстрат – соняшникове лушпиння, нижній – солома ячменю

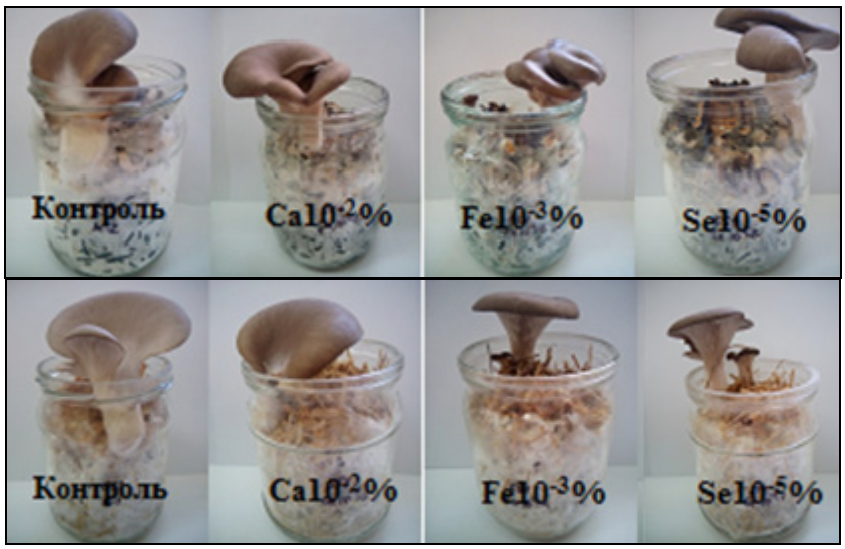


Рис. 2. Зразки плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. ІВК-551: верхній ряд – субстрат – соняшникове лушпиння, нижній – солома ячменю

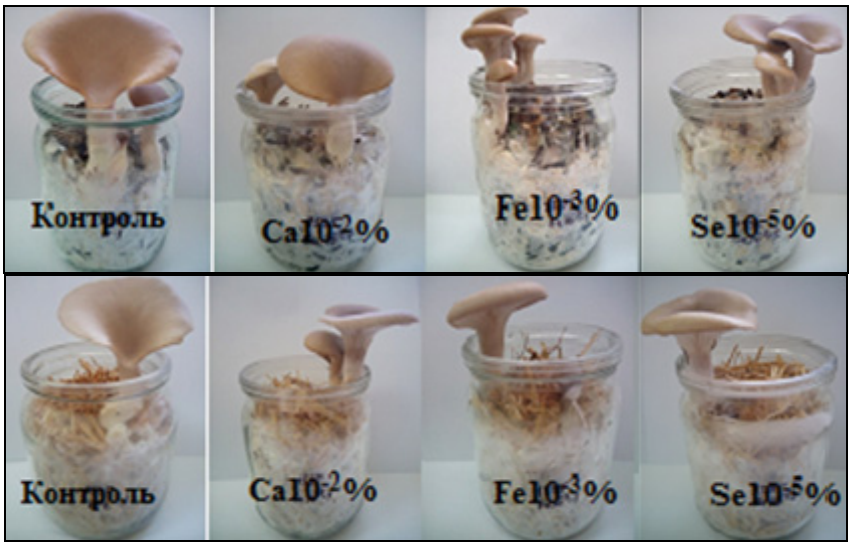


Рис. 3. Зразки плодових тіл *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. ІВК-1535: верхній ряд – субстрат – соняшникове лушпиння, нижній – солома ячменю

Селен у концентрації 3–20 мг/кг проявляв стимулювальні властивості стосовно врожаю плодових тіл (Silva et al., 2012). Під час проведення даного дослідження також установлено вплив мінеральних домішок у зазначених концентраціях на культурально-морфологічні характеристики штамів *P. ostreatus* на різних субстратах.

Профільний аналіз аромату грибів. Під час проведення сенсорного аналізу комісія експертів визначила такі атрибути аромату висушених зразків грибів: грибний, солодкий, деревний, трав'янистий, кислий, рибний, м'ясний, земляний, квітковий, гнильний (рис. 4). Органолептичне оцінювання висушених грибів різних штамів, зібраних на однакових стадіях дозрівання, проводили у спеціально підготовлених, добре вентильованих приміщеннях на кафедрі біотехнології ДВНЗ УДХТУ.

Під час аналізу сенсорних профілів зразків грибів спостерігали неоднаковий вплив мінеральних добавок на аромат кожного зі штамів гриба *P. ostreatus*. Для штамів ІВК-549 та ІВК-1535 відмічене підвищення інтенсивності грибних нот запаху за додавання до соняшникового лушпиння кальцію та селену. Для ІВК-551 спостерігали підвищення характерних грибних нот на обох субстратах із добавками заліза та селену.

Що стосується м'ясних нот як характерної складової запаху *P. ostreatus*, додавання до соломи ячменю Ca 10^{-2}% (штами ІВК-549 та ІВК-551), Fe 10^{-4}% (ІВК-549), Fe 10^{-3}% та Se 10^{-5}% (ІВК-1535) сприяло підвищенню їх інтенсивності. Під час культивування на соняшниковому лушпинні позитивний вплив на м'ясну складову запаху відмічений на субстраті із добавками кальцію та селену.

Добавки селену до соломи за культивування штамів ІВК-549 та ІВК-551 позитивно впливали на солодкі, трав'янисті та квіткові складові аромату. Залізо, додане до соломи, на якій вирощували *P. ostreatus* ІВК-549 та ІВК-1535, сприяло підвищенню рибних нот запаху.

Гнильні та кислі складові запаху виражені слабо в усіх зразках грибів. Також із наведених даних видно, що профіль аромату зразків грибів відрізнявся залежно від субстрату, на якому їх культивували.

Порівняння профілів аромату зразків грибів, отриманих на різних субстратах, показало їх характерне зміщення у бік грибних, м'ясних і деревних нот для соняшникового лушпиння, та у бік солодких, квіткових і трав'янистих – для соломи ячменю. Інтенсивність характерного грибного аромату вища для всіх штамів, культивованих на соняшниковому лушпинні. Аналогічна залежність уже відмічена нами у попередніх дослідах.

У таблиці 2 наведено результати бального оцінювання інтенсивності прояву кожного з дескрипторів для всіх зразків висушених грибів. За методикою сенсорного аналізу, стандартне відхилення характеризує узгодженість оцінок експертів (Rodina, 2004). Як видно з таблиці 2, відхилення не перевищує ± 1 бал, що свідчить про статистичну однорідність сукупності оцінок експертів.

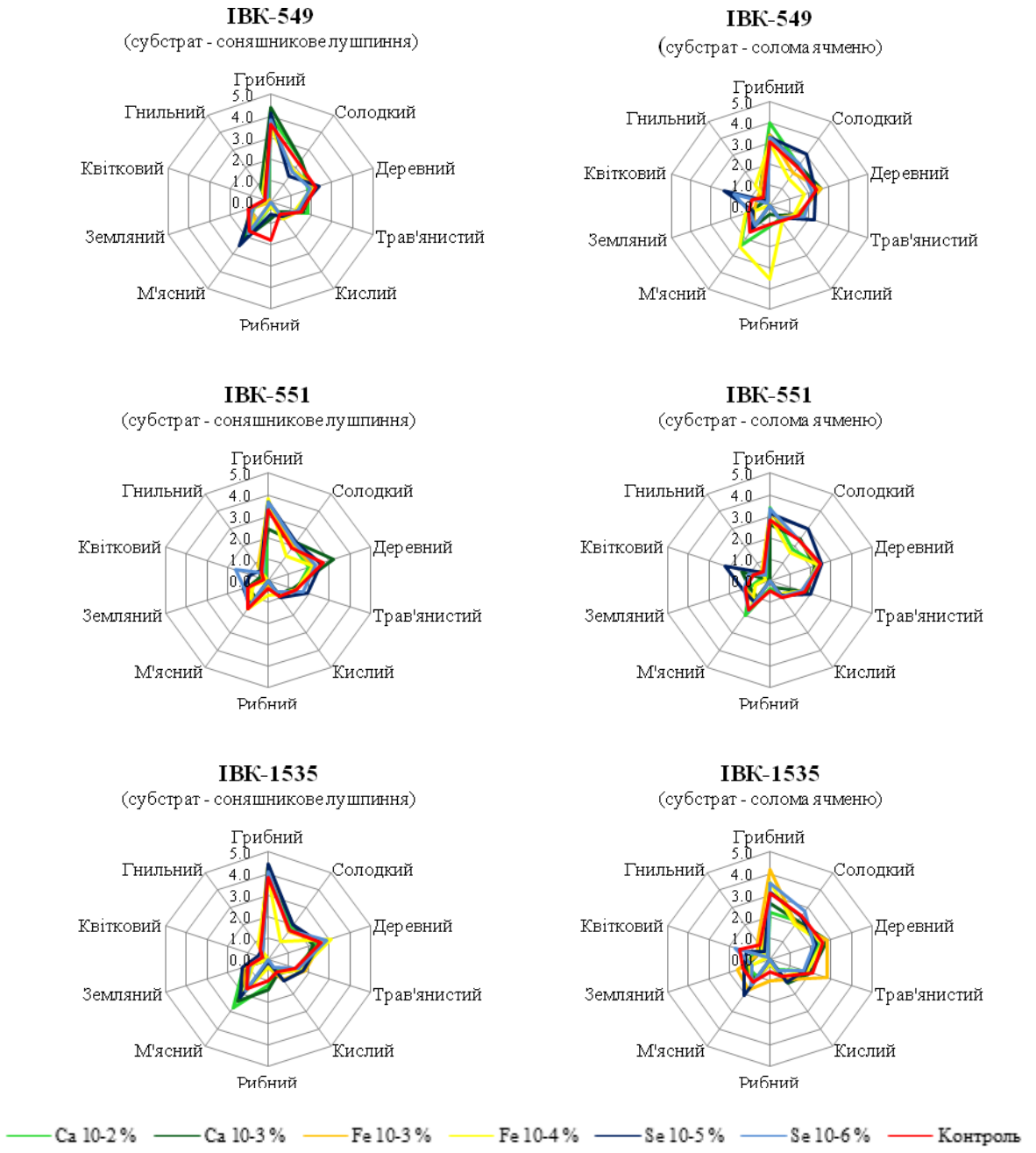


Рис. 4. Сенсорний профіль аромату зразків висушених грибів штамів *P. ostreatus*

Ультрафіолетова спектроскопія. Досліджені гексанові екстракти висушених зразків плодових тіл *P. ostreatus* мали максимуми світлопоглинання у діапазоні 200–210 і 260–300 нм (рис. 5, 6). Такі спектральні властивості характерні для розчинів ненасичених сполук, які мають непов'язані подвійні зв'язки, насиченим і ненасиченим альдегідам і кетонам (Sil'verstejn et al., 1977).

1-Октен-3-ол ($C_8H_{16}O$) – ненасичений спирт, основний компонент (рис. 7) комплексу летких органічних сполук, які зумовлюють характерний аромат грибів роду *Pleurotus* (Zawirska-Wojtasiak et al., 2009). Має виражений грибний аромат. Його концентрація в екстрактах *P. ostreatus* складає до 60–70% (Nyegue et al., 2003). 1-Октен-3-ол має максимум світлопоглинання за 205 нм. Цей максимум характерний для отриманих екстрактів *P. ostreatus*.

Під час культивування на соняшниковому лушпинні додавання заліза сприяло підвищенню утворення летких запашних сполук, що підтверджується збільшенням інтенсивності світлопоглинання отриманих грибних екстрактів (рис. 5). У дослідженнях Yokota et al. (2016) встановлено, що додавання сульфату заліза до цукрової тростини під час культивування сприяло підвищенню ароматичних властивостей *P. ostreatus*. Посилювалися сірчані, умамі, гіркі та металеві ноти аромату, що пов'язують зі збільшенням вмісту білка та золи.

Додавання селену мало позитивний результат лише для штаму ІВК-549. Для штаму ІВК-1535 не відмічено суттєвої зміни інтенсивності світлопоглинання за додавання мінеральних добавок до субстрату (соняшникового лушпиння) під час твердофазного культивування.

Добавки заліза та селену також мають позитивний вплив на синтез летких органічних сполук штамами гриба *P. ostreatus*, вирощеними на соломі ячменю. Це видно зі збільшення інтенсивності поглинання світла як у діапазоні 205–210 нм, так і 260–300 нм (рис. 6). Додавання під час культивування іонів кальцію майже не впливає на утворення ненасичених сполук (205–210 нм) усіма штамами під час культивування на соломі ячменю та несуттєво підвищує утворення карбонільних сполук (260–300 нм) штамами ІВК-551 та ІВК-1535.

Таблиця 2

Інтенсивність прояву атрибутів аромату штамів гриба *Pleurotus ostreatus* (x ± SD, n = 15)

Варіант субстрату / мінеральна добавка		Інтенсивність атрибутів аромату, бали									
		грибний	солодкий	деревний	трав'янистий	кислий	рибний	м'ясний	земляний	квітковий	гнильний
Соняшникове лушпиння						*P. ostreatus* ІВК-549					
	$Ca10^{-2}$%	4,0 ± 0,65	2,4 ± 0,51	1,8 ± 0,41*	1,8 ± 0,41	0,6 ± 0,51	0,2 ± 0,41*	2,0 ± 0,65	0,8 ± 0,41	0,2 ± 0,41	0,2 ± 0,41
	$Ca10^{-3}$%	4,4 ± 0,51*	2,4 ± 0,51	2,0 ± 0,00	1,6 ± 0,51	0,6 ± 0,51	0,8 ± 0,41*	2,2 ± 0,41*	1,0 ± 0,00	0,2 ± 0,41	0,8 ± 0,41*
	$Fe10^{-3}$%	3,6 ± 0,51	1,8 ± 0,41	2,2 ± 0,41	1,4 ± 0,51	1,0 ± 0,00*	0,0 ± 0,00*	1,2 ± 0,41*	1,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00*	0,3 ± 0,49
	$Fe10^{-4}$%	3,4 ± 0,51	1,8 ± 0,41	2,0 ± 0,00	1,2 ± 0,41	1,0 ± 0,00*	0,2 ± 0,41*	1,4 ± 0,51	1,0 ± 0,00	0,2 ± 0,41	0,6 ± 0,51
	$Se10^{-5}$%	4,1 ± 0,35*	1,5 ± 0,52*	2,4 ± 0,51	1,3 ± 0,49	0,9 ± 0,35	0,6 ± 0,51*	2,5 ± 0,52*	0,9 ± 0,35	0,3 ± 0,46	0,5 ± 0,52
	$Se10^{-6}$%	3,8 ± 0,41	1,7 ± 0,46	1,9 ± 0,59	1,3 ± 0,49	0,7 ± 0,46	0,0 ± 0,00*	1,8 ± 0,77	0,9 ± 0,35	0,3 ± 0,49	0,3 ± 0,46
	Контроль	3,6 ± 0,51	2,2 ± 0,41	2,2 ± 0,41	1,5 ± 0,52	0,7 ± 0,49	1,8 ± 0,77	1,7 ± 0,46	1,1 ± 0,52	0,3 ± 0,46	0,4 ± 0,51
						P. ostreatus ІВК-551					
	$Ca10^{-2}$%	3,4 ± 0,51	2,0 ± 0,00	2,0 ± 0,00*	1,4 ± 0,51	0,8 ± 0,41	0,4 ± 0,51	1,6 ± 0,51	1,0 ± 0,00	0,4 ± 0,51	0,2 ± 0,41
	$Ca10^{-3}$%	2,4 ± 0,51*	2,2 ± 0,77	3,2 ± 0,41*	1,2 ± 0,41	0,8 ± 0,41	0,0 ± 0,00*	1,0 ± 0,00*	1,0 ± 0,00	0,4 ± 0,51	0,6 ± 0,51
	$Fe10^{-3}$%	3,6 ± 0,51	2,0 ± 0,65	2,2 ± 0,41*	1,4 ± 0,51	0,9 ± 0,59	0,2 ± 0,41	1,2 ± 0,41*	0,9 ± 0,35	0,2 ± 0,41	0,8 ± 0,41
	$Fe10^{-4}$%	3,8 ± 0,41*	1,4 ± 0,51*	2,2 ± 0,41*	1,4 ± 0,51	0,8 ± 0,41	0,7 ± 0,49	1,6 ± 0,51	0,7 ± 0,46	0,0 ± 0,00	0,7 ± 0,49
	$Se10^{-5}$%	3,7 ± 0,49	2,2 ± 0,77	2,6 ± 0,83	1,9 ± 0,59*	1,0 ± 0,65	0,0 ± 0,00*	1,5 ± 0,52	1,2 ± 0,41	0,9 ± 0,74*	0,6 ± 0,51
	$Se10^{-6}$%	3,7 ± 0,49	2,1 ± 0,74	2,3 ± 0,49*	1,7 ± 0,70	0,7 ± 0,49	0,0 ± 0,00*	1,5 ± 0,52	1,1 ± 0,35	1,6 ± 0,63*	0,5 ± 0,52
	Контроль	3,3 ± 0,62	1,9 ± 0,59	2,7 ± 0,46	1,4 ± 0,74	0,9 ± 0,74	0,4 ± 0,51	1,6 ± 0,51	1,0 ± 0,65	0,2 ± 0,41	0,5 ± 0,52
						P. ostreatus ІВК-1535					
	$Ca10^{-2}$%	4,4 ± 0,51*	1,8 ± 0,41	2,4 ± 0,51	1,4 ± 0,51	0,6 ± 0,51	1,2 ± 0,41	2,8 ± 0,41*	1,2 ± 0,41	0,0 ± 0,00*	0,6 ± 0,51
	$Ca10^{-3}$%	4,2 ± 0,41	2,0 ± 0,65	2,2 ± 0,41*	1,6 ± 0,51	0,8 ± 0,77	1,4 ± 0,51	2,4 ± 0,51*	1,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00*	0,4 ± 0,51
	$Fe10^{-3}$%	4,4 ± 0,51*	1,6 ± 0,51	2,6 ± 0,51	1,8 ± 0,41*	1,2 ± 0,41*	0,4 ± 0,51*	1,8 ± 0,41	1,2 ± 0,41	0,0 ± 0,00*	0,7 ± 0,46
	$Fe10^{-4}$%	3,8 ± 0,41	1,0 ± 0,65*	3,1 ± 0,70*	1,6 ± 0,51	0,8 ± 0,41	0,4 ± 0,51*	1,9 ± 0,59	0,7 ± 0,46	0,0 ± 0,00*	0,8 ± 0,41
	$Se10^{-5}$%	4,5 ± 0,52*	2,0 ± 0,76	2,5 ± 0,52	1,7 ± 0,46*	1,3 ± 0,46*	0,1 ± 0,35*	2,2 ± 0,68*	1,3 ± 0,46	0,5 ± 0,52	0,5 ± 0,52
	$Se10^{-6}$%	4,1 ± 0,59	1,7 ± 0,49	2,9 ± 0,64	1,5 ± 0,52	0,5 ± 0,52	0,0 ± 0,00*	1,8 ± 0,68	0,9 ± 0,35	0,3 ± 0,49	0,5 ± 0,52
	Контроль	3,8 ± 0,68	1,7 ± 0,80	2,6 ± 0,51	1,3 ± 0,49	0,7 ± 0,49	1,0 ± 0,65	1,7 ± 0,49	1,0 ± 0,65	0,3 ± 0,46	0,6 ± 0,63
Солома ячменю						*P. ostreatus* ІВК-549					
	$Ca10^{-2}$%	4,0 ± 0,65*	2,4 ± 0,51	2,4 ± 0,51	1,6 ± 0,51	0,8 ± 0,41	1,0 ± 0,93	2,4 ± 0,51*	1,2 ± 0,41	0,4 ± 0,51*	0,8 ± 0,41
	$Ca10^{-3}$%	3,4 ± 0,51	2,4 ± 0,51	2,6 ± 0,51	1,4 ± 0,51	0,6 ± 0,51	0,4 ± 0,51*	1,2 ± 0,41*	1,0 ± 0,00	0,4 ± 0,51*	0,8 ± 0,41
	$Fe10^{-3}$%	3,4 ± 0,51	1,9 ± 0,70	2,6 ± 0,51	1,4 ± 0,51	0,7 ± 0,46	0,0 ± 0,00*	1,3 ± 0,46	0,8 ± 0,41	0,7 ± 0,62	0,8 ± 0,41
	$Fe10^{-4}$%	3,0 ± 0,53	1,6 ± 0,51*	1,7 ± 0,46*	1,3 ± 0,46	1,0 ± 0,76	3,5 ± 0,52*	2,5 ± 0,52*	1,3 ± 0,46	0,0 ± 0,00*	1,2 ± 0,41*
	$Se10^{-5}$%	3,3 ± 0,46	3,1 ± 0,59	2,3 ± 0,49	2,3 ± 0,80*	0,7 ± 0,46	0,0 ± 0,00*	1,5 ± 0,52	0,9 ± 0,35	2,3 ± 0,49*	0,3 ± 0,46
	$Se10^{-6}$%	3,3 ± 0,46	2,5 ± 0,52	2,1 ± 0,35	1,7 ± 0,70	0,7 ± 0,46	0,0 ± 0,00*	1,2 ± 0,41*	1,0 ± 0,00	1,8 ± 0,77*	0,1 ± 0,35
	Контроль	3,1 ± 0,59	2,3 ± 0,59	2,4 ± 0,51	1,5 ± 0,52	0,9 ± 0,52	0,9 ± 0,70	1,6 ± 0,51	1,1 ± 0,59	0,9 ± 0,35	0,5 ± 0,52
						P. ostreatus ІВК-551					
	$Ca10^{-2}$%	3,4 ± 0,83	1,8 ± 0,41*	2,4 ± 0,51	1,6 ± 0,51	0,8 ± 0,41	0,4 ± 0,51	2,0 ± 0,93	1,0 ± 0,00	0,4 ± 0,51*	0,2 ± 0,41
	$Ca10^{-3}$%	2,6 ± 0,83	2,4 ± 0,93	2,2 ± 0,41	1,8 ± 0,41	0,4 ± 0,51*	0,0 ± 0,00*	1,0 ± 0,65*	1,0 ± 0,00	1,4 ± 0,51*	0,0 ± 0,00*
	$Fe10^{-3}$%	3,2 ± 0,41	2,3 ± 0,72	2,4 ± 0,63	1,6 ± 0,51	0,8 ± 0,41	0,0 ± 0,00*	1,2 ± 0,41*	1,2 ± 0,41	0,9 ± 0,59	0,6 ± 0,51
	$Fe10^{-4}$%	3,0 ± 0,65	1,6 ± 0,51*	2,4 ± 0,51	1,6 ± 0,51	0,8 ± 0,41	0,0 ± 0,00*	1,4 ± 0,51	0,7 ± 0,46	0,2 ± 0,41*	0,6 ± 0,51
	$Se10^{-5}$%	3,1 ± 0,35	3,0 ± 0,65*	2,5 ± 0,64	2,0 ± 0,76	0,9 ± 0,74	0,0 ± 0,00*	1,3 ± 0,46*	1,3 ± 0,49	2,2 ± 0,68*	0,5 ± 0,52
	$Se10^{-6}$%	3,3 ± 0,49*	2,3 ± 0,72	2,5 ± 0,52	1,5 ± 0,52	0,9 ± 0,70	0,0 ± 0,00*	1,7 ± 0,46	1,3 ± 0,46	1,1 ± 0,59	0,3 ± 0,49
	Контроль	2,8 ± 0,77	2,3 ± 0,62	2,5 ± 0,52	1,7 ± 0,46	1,0 ± 0,53	0,5 ± 0,52	1,7 ± 0,70	1,2 ± 0,77	0,8 ± 0,41	0,5 ± 0,52
						P. ostreatus ІВК-1535					
	$Ca10^{-2}$%	2,2 ± 0,40*	2,2 ± 0,41	2,4 ± 0,51	1,8 ± 0,41	0,6 ± 0,51	0,0 ± 0,00*	1,0 ± 0,00*	1,2 ± 0,41	0,8 ± 0,41*	0,2 ± 0,41*
	$Ca10^{-3}$%	2,6 ± 0,83	2,2 ± 0,41	2,8 ± 0,41	2,0 ± 0,65	1,4 ± 0,51	0,2 ± 0,41*	1,2 ± 0,41	1,2 ± 0,41	0,6 ± 0,51*	0,8 ± 0,41
	$Fe10^{-3}$%	4,2 ± 0,41*	2,1 ± 0,70	2,8 ± 0,41	2,8 ± 0,40*	1,2 ± 0,41	1,0 ± 0,65	1,7 ± 0,46*	1,6 ± 0,51	0,6 ± 0,51*	1,0 ± 0,65
	$Fe10^{-4}$%	3,6 ± 0,51*	2,0 ± 0,65*	2,6 ± 0,51	1,8 ± 0,41	1,0 ± 0,65	0,2 ± 0,41*	1,4 ± 0,51	1,0 ± 0,65	0,2 ± 0,41*	0,6 ± 0,51
	$Se10^{-5}$%	3,1 ± 0,35	2,5 ± 0,64	2,3 ± 0,46	1,7 ± 0,46	1,3 ± 0,49	0,0 ± 0,00*	2,1 ± 0,70*	1,3 ± 0,46	1,1 ± 0,64	0,5 ± 0,52
	$Se10^{-6}$%	3,5 ± 0,52*	2,8 ± 0,77	2,1 ± 0,35*	1,7 ± 0,49	0,7 ± 0,49	0,0 ± 0,00	1,5 ± 0,52	0,9 ± 0,35*	1,7 ± 0,46	0,1 ± 0,35*
	Контроль	3,1 ± 0,52	2,5 ± 0,52	2,6 ± 0,51	2,1 ± 0,59	1,0 ± 0,53	0,6 ± 0,51	1,3 ± 0,49	1,3 ± 0,49	1,5 ± 0,52	0,8 ± 0,41

Примітка: * – різниця статистично достовірна для $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Для штамів ІВК-549 та ІВК-551 спостерігали вищу інтенсивність максимумів поглинання світла за 200–210 нм, ніж у діапазоні 260–300 нм. Для штаму ІВК-1535 відмічена протилежна залежність. Це ймовірно пояснюється різним співвідношенням основних летких сполук в екстрактах грибів.

Отримані результати корелюють із даними інших дослідників. У працях Silva et al. (2013) також показано, що культивування штамів *P. ostreatus* та *P. eryngii* на картопляно-декстрозному агарі, збагаченому Na_2SeO_3 у концентрації 25,4–101,8 мг/л, спричинює яскраво-жовте забарвлення колоній та характерний сильний запах, що імовірно пояснюється синтезом летких сполук, таких як нонадеканова кислота, 9,12-октадекадієн-1-ол, метиловий ефір цис-лінолевої кислоти, етиловий ефір пальмітинової кислоти та інших складових аромату грибів. Інші автори відмічають, що додавання селену до середовища культивування сприяло підвищенню антиоксидантної активності екстрактів плодових тіл *P. ostreatus* та *P. eryngii*, яку пов'язують зі збільшенням утворення фенольних, флавоноїдних сполук і аскорбінової кислоти (Gasecka et al., 2015), а також посиленню лакказної активності *Lentinus edodes* (Nunes et al., 2012). Під час порівняння субстратів для культивування стосовно синтезу запашних сполук грибами за допомогою УФ-спектроскопії прослідковано значно вищу інтенсивність світлопоглинання екстрактів усіх досліджених штамів, вирощених на соняшниковому лушпинні, ніж для зразків, отриманих на соломі ячменю.

Висновки

У ході дослідження культурально-морфологічних параметрів росту міцелію та плодових тіл *P. ostreatus* (штами ІВК-549,

ІВК-551 та ІВК-1535) на субстратах із добавками кальцію, заліза та селену відмічено незначне варіювання строків появи примордіїв та першої хвилі плодоносіння залежно від штаму гриба та субстрату. Сенсорний профільний аналіз показав підвищення інтенсивності характерних грибних нот запаху у разі додавання до субстрату (соняшникового лушпиння) кальцію та селену (штами ІВК-549 та ІВК-1535), заліза та селену (ІВК-551).

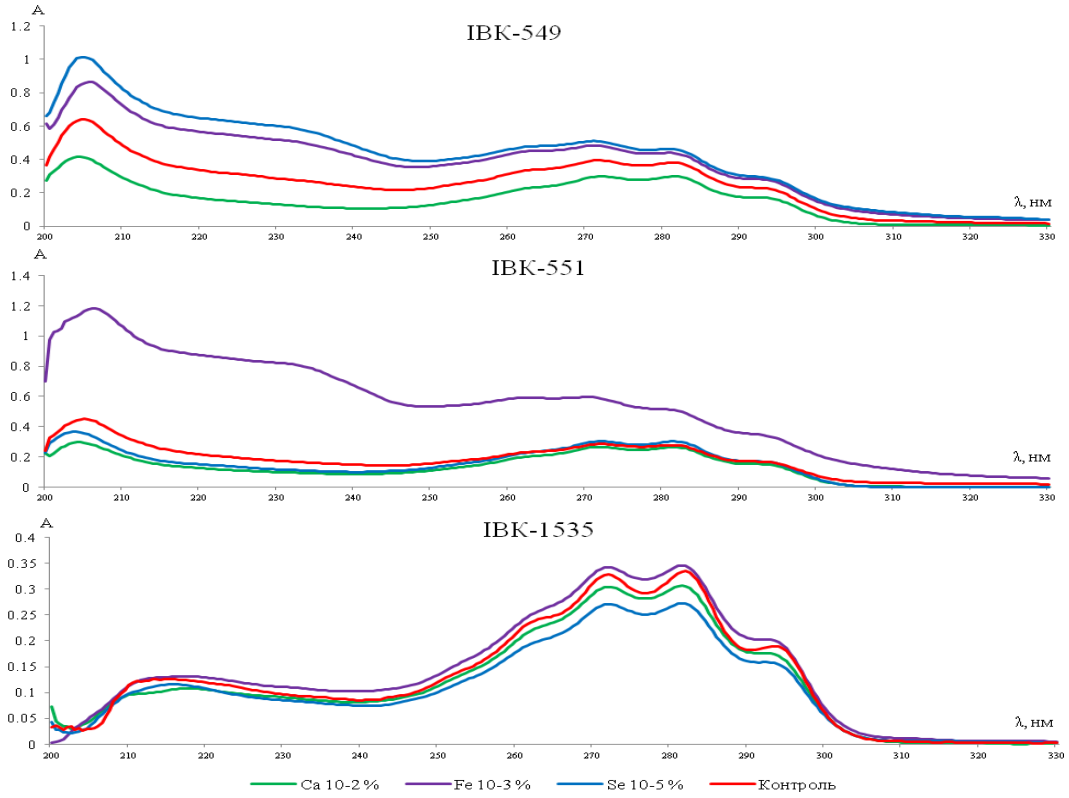


Рис. 5. УФ-спектри гексанових екстрактів штамів *P. ostreatus*: субстрат – соняшникове лушпиння

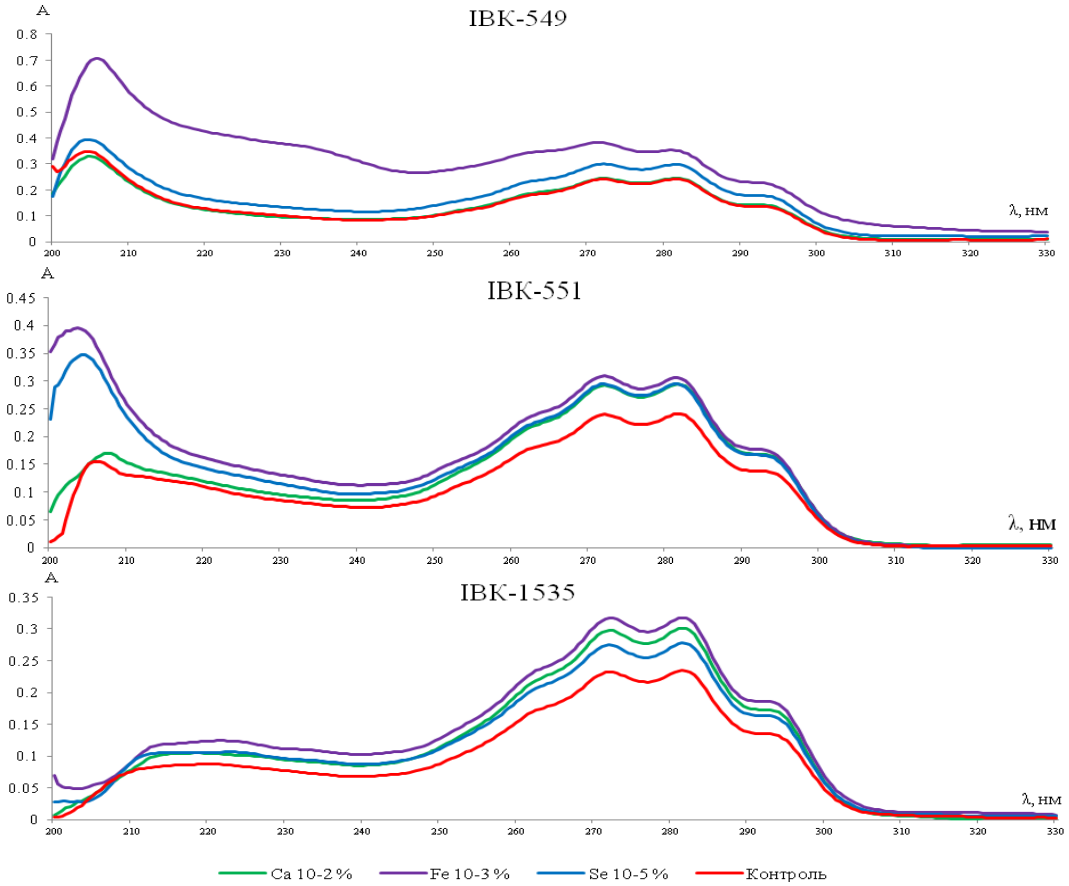


Рис. 6. УФ-спектри гексанових екстрактів штамів *P. ostreatus*: субстрат – солома ячменю

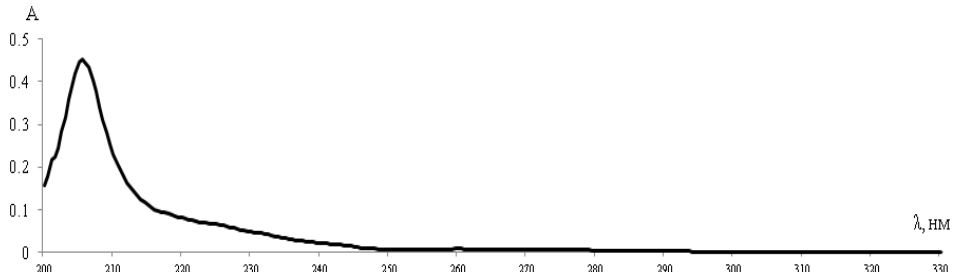


Рис. 7. УФ-спектр розчину 1-октен-3-олу в гексані

Порівнюючи профілі аромату зразків грибів, отриманих на різних субстратах, спостерігали їх зміщення у бік грибних, м'ясних і деревних нот для соняшникового лушпиння, та у бік солодких, квіткових і трав'янистих – для соломи ячменю. Інтенсивність характерного грибного аромату вища для всіх штамів, культивованих на соняшниковому лушпинні. Досліджені гексанові екстракти висушених зразків плодових тіл штамів *P. ostreatus* мали максимуми світлопоглинання у діапазоні 200–210 та 260–300 нм. Додавання заліза та селену сприяло підвищенню утворення летких запашних сполук, що підтверджується збільшенням інтенсивності світлопоглинання отриманих грибних екстрактів. Добавки кальцію не мали суттєвого впливу на спектри поглинання грибних екстрактів.

Проведене дослідження показало можливість підвищення органолептичної якості плодових тіл *P. ostreatus* у процесі твердофазного культивування шляхом збагачення складу лігноцелюлозних субстратів різними мінеральними добавками, такими як солі кальцію, заліза та селену.

References

Al-Maali, G. A. (2015). Vplyv cytrativ metaliv, otrymanyh metodom akvananothenologii', na rist shtamiv likars'kyh makromicetiv *Ganoderma lucidum* 1900 i *Trametes versicolor* 353 [The influence of metal citrates obtained by aquananotechnology on growth of the strains of medical macromycetes *Ganoderma lucidum* 1900 and *Trametes versicolor* 353]. Ukrainian Botanical Journal, 72(4), 393–397 (in Ukrainian).

Bekker, Z. J. (1988). Fiziologija i biohimija gribov [Physiology and biochemistry of fungi]. Izdatel'stvo Moskovskogo Universiteta, Moscow (in Russian).

Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Avila, S., Hornung, P. S., Junior, A. M., & Ribani, R. H. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. Saudi Journal of Biological Sciences, 1–14.

Buhalo, A. S. (1988). Vysshie s'edobnye bazidiomicety v chistoj kul'ture [Higher edible basidiomycetes in pure culture]. Naukova Dumka, Kiev (in Russian).

Buhalo, A. S., Bis'ko, N. A., Solomko, J. F., & Bilaj, V. T. (2004). Kul'tivirovanie sjedobnyh i lekarstvennyh gribov [The cultivation of edible and medicinal mushrooms]. Chernobyl'interinform, Kyiv (in Russian).

Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D. C., & Burton, K. S. (2006). Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: Properties, analysis, and biosynthesis. Mycoscience, 47, 317–326.

Curvetto, N. R., Figlas, D., Devalis, R., & Delmastro, S. (2002). Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N–NH_4^+ and/or Mn(II). Bioresource Technology, 84,171–176.

El Habbasha, S. F., & Faten, M. I. (2015). Calcium: Physiological function, deficiency and absorption. International Journal of ChemTech Research, 8(12), 196–202.

Gasecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., & Niedzielski, P. (2015). Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. European Food Research and Technology, 242(5), 723–732.

Golovanov, A. B., Mjagkova, G. Y., & Groza, N. V. (2008). Lipoksigenaznoe okislenie zhirnyh kislot v rastenijah [Lipoxygenase oxidation of fatty acids in plants]. Fine Chemical Technologies, 3(6), 26-33 (in Russian).

Jackson, S. L., & Heath, I. B. (1993). Roles of calcium ions in hyphal tip growth. Microbiological Reviews, 57(2), 367–382.

Nunes, R. G., Luz, J. M., Freitas, R. B., Higuchi, A., Kasuya, M. C., & Vanetti, M. C. (2012). Selenium bioaccumulation in Shiitake mushrooms: A nutritional alternative source of this element. Journal of Food Science, 77(9), C983–C986.

Nyegue, M., Zollo, P.-H. A., Bessiere, J.-M., & Rapior, S. (2003). Volatile components of fresh *Pleurotus ostreatus* and *Termitomyces shimperi* from Cameroon. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 6(3), 153–160.

Ostadalova, I. (2012). Biological effects of selenium compounds with a particular attention to the ontogenetic development. Physiological Research, 61, S19–34.

Philpott, C. C., Leidgens, S., & Frey, A. G. (2012). Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. Biochimica et Biophysica Acta, 1823, 1509–1520.

Pitt, D., & Ugalde, U. O. (1984). Calcium in fungi. Plant, Sell and Environment, 7(6), 467–475.

Regalado, C. M. (1998). Roles of calcium gradients in hyphal tip growth: A mathematical model. Microbiology, 144, 2771–2782.

Rodina, T. G. (2004). Sensornyj analiz prodovol'stvennyh tovarov [Sensory analysis of food products]. Akademija, Moscow (in Russian).

Savic, M. D., Petrovic, J. P., Klaus, A. S., Niksic, M. P., Rajkovic, M. B., Filipovic, N. R., & Antic-Mladenovic, S. B. (2009). Growth and fruit body formation of *Pleurotus ostreatus* on media supplemented with inorganic selenium. Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke, 116, 209–216.

Sil'verstejn, R., Bassler, G., & Morril, T. (1977). Spektrometricheskaja identifikacija organicheskih soedinenij [Spectrometric identification of organic compounds]. Mir, Moscow (in Russian).

Silva, M., Naozuka, J., Luz, J. M., Assuncao, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M., Bazzolli, D., & Kasuya, M. (2012). Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. Food Chemistry, 131, 558–563.

Silva, M., Nunes, M. D., Luz, J. M., & Kasuya, M. C. (2013). Mycelial growth of *Pleurotus* spp. in Se-enriched culture media. Advances in Microbiology, 3, 11–18.

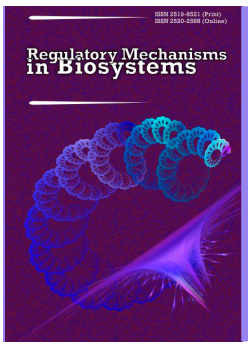
Velychko, N. A., & Berykashvyly, Z. N. (2008). Himicheskij sostav plodovogo tela griba *Pleurotus ostreatus* (Fr) Kumm. [Chemical composition of fruit body mushroom *Pleurotus ostreatus* (Fr) Kumm.]. Vestnik Krasnojarskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta, 4, 274–278 (in Russian).

Vlasenko, K. M., & Kuznecova, O. (2016). Zastosuvannja sensornogo analizu u biotehnologii' kul'tyvuvannja makromicetiv [The use of sensory analysis in biotechnology of the cultivation of macromycetes]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 347–352 (in Ukrainian).

Werner, A. R., & Beelman, R. B. (2002). Growing high-selenium edible and medicinal button mushrooms (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) as ingredients for functional foods or dietary supplements. International Journal of Medicinal Mushrooms, 4(2), 112–120.

Yokota, M. E., Frison, P. S., Marcante, R. C., Jorge, L. F., Valle, J. S., Dragunski, D. C., Colauto, N. B., & Linde G. A. (2016). Iron translocation in *Pleurotus ostreatus* basidiocarps: Production, bioavailability, and antioxidant activity. Genetics and Molecular Research, 15(1), 1–10.

Zawirska-Wojtasiak, R., Siwulski, M., Mildner-Szkudlarz, S., & Wasowicz, E. (2009). Studies on the aroma of different species and strains of *Pleurotus* measured by GH/MS, sensory analysis and electronic nose. Acta Scientiarum Polonorum, 8(1), 47–61.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 497–500
doi: 10.15421/021776

Comparative characteristics of the composition of microbial associations of the gastrointestinal tract in humans in the norm and during dysbiosis

T. M. Shevchenko, I. L. Rozhnyeva, T. V. Dyklenko, O. S. Voronkova

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 25.09.2017
Received in revised form 30.10.2017
Accepted 03.11.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-056-372-58-76
E-mail: dnushevchenkot@gmail.com

Shevchenko, T. M., Rozhnyeva, I. L., Dyklenko, T. V., & Voronkova, O. S. (2017). Comparative characteristics of the composition of microbial associations of the gastrointestinal tract in humans in the norm and during dysbiosis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 497–500. doi:10.15421/021776

The causes of the imbalance of the microbiota of the human body, in particular the intestines, are diverse: they include changes in environmental conditions, inappropriate nutrition and the use of harmful products, acute intestinal infections, chronic diseases and dysfunction of the gastrointestinal tract, the widespread use of antibiotics, reduced immunological reactivity of the organism, etc. Dysbiosis is accompanied by an increase of the detection frequency and quantity of opportunistic microorganisms. Such changes are characterized by negative consequences that can provoke the development of a number of complications of the functioning of various systems and organs of the human body. If significant deviations of the composition of the microflora compared to the state of the norm take place, it is absolutely necessary to correct it, which is possible with the use of preparations based on microbial cultures – probiotics. However, the mechanisms of antagonistic relationships between representatives of opportunistic microflora and normal non-pathogenic flora from different ecotopes of the macroorganism have not been completely studied. At the same time, it is known that the development of various forms of infectious processes, both acute and chronic, depends on the manifestation of pathogenicity and the persistence of a potential pathogen. Important for the correction of dysbiotic states is knowledge of the microbiota composition characteristics, including the formation of associations by individual of microorganisms in the associations, which in each case requires the development of individual approaches to therapy. In view of this, the aim of our research was to analyze the frequency of detection of opportunistic microorganisms and their associations in people with dysbiosis of gastrointestinal tract. As a result of our studies on the composition of the microflora of the gastrointestinal tract, in the contingent of the surveyed persons dysbiosis was confirmed for 56 (77.8%) individuals. It was determined that during normobiosis the formation of the following associations was typical: triple and five-membered 25.0%, six-membered – 18.8%, and most numerous-four membered associations – 31.3%. Of these, bacterial associations were determined in 87.5% of cases, bacterial-fungi associations – in 12.5%. During dysbiosis of the gastrointestinal tract, the following groups of microorganisms were isolated: *Staphylococcus* – 87.5%, *Citrobacter* – 64.3%, *Klebsiella* – 51.8%, *Streptococcus* – 50.0%, *Serratia* – 25%, *Candida* – 21.4%, and *Hafnia* – 5.4%, which were the part of the associations: six members – 37.5%, four members constituted – 25.0%, five members – 21.4%,three members – 14.3%, and a double association – 1.8%. Bacterial associations were determined in 78.6% of cases, bacterial-fungi associations – in 21.4%.

Keywords: dysbiosis; opportunistic microorganisms; association; gastrointestinal tract

Порівняльна характеристика складу мікробних асоціацій шлунково-кишковового тракту людини в нормі та за дисбіозу

Т. М. Шевченко, І. Л. Рожнєва, Т. В. Дикленко, О. С. Воронкова

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Дисбіози – зміни складу мікробіоти, що супроводжуються зростанням частоти виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів, які колонізують різні біотопи організму людини, зокрема шлунково-кишковий тракт. Подібні зміни характеризуються негативними наслідками, здатні спровокувати розвиток низки ускладнень функціонування різних систем та органів тіла людини. Важливі для корекції дисбіотичних станів знання особливостей складу мікробіоти, у тому числі про утворення окремими мікроорганізмами асоціацій, що у кожному конкретному випадку вимагає розроблення індивідуальних підходів до терапії. Визначення мікробного складу має пріоритетне значення. У результаті досліджень складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту контингенту обстежуваних стан дисбіозу підтверджено для 56 (77,8%) осіб. За нормобіозу типове утворення таких асоціацій: потрійних і п'ятичленних (по 25,0%), шеститичленних (18,8%), а найбільше – почетверних асоціацій (31,3%). Із них бактеріальні асоціації (87,5%), бактеріально-грибкові (12,5%). За дисбіозу шлунково-кишкового тракту виявляли стафілококи (87,5%), цитробактер (64,3%), клебсієлу (51,8%), стрептококи (50,0%), серації (25,0%), кандиди (21,4%) і гафнії (5,4%), які

входили до складу асоціацій: шестичленні (37,5%), почетверні (25,0%), п'ятичленні (21,4%), потрійні (14,3%) та подвійні (1,8%). Частка бактеріальних асоціацій – 78,6%, бактеріально-грибкових – 21,4%.

Ключові слова: дисбіоз; умовно-патогенні мікроорганізми; асоціації; шлунково-кишковий тракт

Вступ

Дисбіоз кишечника – порушення складу мікробіоти нижніх відділів шлунково-кишкового тракту, яке останніми роками набуває все більшого поширення (Walker, 2016; Cheng et al., 2017). Причини порушення рівноваги різні: зміни екологічного стану довкілля, нераціональне харчування, вживання шкідливих продуктів, гострі кишкові інфекції, хронічні захворювання та дисфункція шлунково-кишкового тракту, широке застосування антибіотиків, зниження імунологічної реактивності організму тощо (Brown et al., 2012; Butto and Haller, 2016; Lange et al., 2016; Cheng et al., 2017; Lippert et al., 2017; Montandon and Jornayvaz, 2017).

Підтримання стану здоров'я людини неможливе без нормального функціонування єдиного екологічного комплексу макро- та мікроорганізму (Jostins et al., 2012; Marchesi et al., 2015). За суттєвих відхилень складу мікрофлори від стану норми абсолютно необхідна її корекція, можлива із застосуванням препаратів на основі мікробних культур – пробіотиків (McFarland, 2014; Mayorga Reyes et al., 2016). Проте залишаються недостатньо вивченими механізми антагоністичних взаємовідносин між представниками умовно-патогенної мікрофлори та нормальної непатогенної флори з різних екотопів макроорганізму (Liu et al., 2016). Розвиток різних форм інфекційних процесів, як гострого, так і хронічного, залежить від прояву патогенності та персистенції потенційного збудника (Zhang et al., 2015). Стан дисбіозу ускладнюється ще й тим, що практично завжди має місце утворення асоціацій умовно-патогенних мікроорганізмів, кожен з яких робить свій внесок у порушення складу мікрофлори та загального стану здоров'я. Більшість із цих мікроорганізмів відрізняється тим, що має прояв доволі широкого спектра факторів патогенності, у тому числі й колонізаційних факторів, що значно ускладнює можливості терапії дисбіозів (Ardesia et al., 2015; Lamont and Hajishengallis, 2015; Lin and Zhang, 2017). Вивчення видового складу асоціацій мікроорганізмів стаовить значний науковий інтерес, адже дозволяє виявити закономірності змін, що виникають у структурі мікробіоти шлунково-кишкового тракту (Jalanka-Tuovinen et al., 2011), а це, у свою чергу, дозволяє розробити схему профілактичних заходів (Moreno de LeBlanc and LeBlanc, 2014; Shaw et al., 2016). Кожен випадок дисбіозу унікальний стосовно змін у складі мікроорганізмів (Flint et al., 2012; Schippa and Conte, 2014; DeGruttola et al., 2016), а отже, потребує вибору незалежної лікувальної схеми, що вкладається у сучасну концепцію персоналізованої медицини (Bellaguarda and Chang, 2015; Pallister and Spector, 2016).

З огляду на це, мета цієї статті – оцінити частоту виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів та їх асоціацій в осіб із дисбіозами шлунково-кишкового тракту.

Матеріал і методи досліджень

Досліджували 72 зразки біологічного матеріалу (фекалії) від осіб із підозрою на дисбіоз кишечника. Виділяли та ідентифікували культури бактеріологічним методом. Стан дисбіозу визначали за результатами бактеріологічного дослідження (Nezgoda and Naumenko, 2011). Ідентифікацію мікроорганізмів проводили відповідно до переліку їх ознак, наведеного у Визначнику бактерій Берджі (Holt et al., 1994).

Здатність до плівкоутворення визначали на 96-лункових планшетах (Медполимер, РФ). Для цього добову культуру суспендували в ізотонічному розчині NaCl (0,5%) за стандартом мутності 1×10^4 КУО/мл. Отриману суспензію (50 мкл) вносили в лунки планшета, що містили 150–200 мкл поживного бульйону (HiMedia, Індія). Інкубацію проводили у термостаті за температури 37 °C (72 години). Після закінчення інкубації залишки живильного середовища обережно відбирали шприцом, а лунки тричі промивали ізотонічним розчином (0,5% NaCl). Якщо на стінках та дні лунок планшета залишалася біоплівка, штам вважали біоплівкотвірним (Lyamin et al., 2012; Tchebotar and Guryev, 2012).

Результати та їх обговорення

Під час дослідження 72 зразків біологічного матеріалу (фекалії) від умовно-здорових осіб (n = 14) та від осіб зі скаргами – підозра на дисбіоз (n = 58) факт порушення складу мікробіоти кишечника встановлено для двох (14,3%) осіб із групи умовно-здорових та у 54 (93,1%) обстежених із підозрою на дисбіоз. Наявність дисбіозу встановлено за зниженням кількості біфідобактерій і появою у кількості понад 10^3 клітин/г фекалій умовно-патогенних мікроорганізмів (рис. 1).

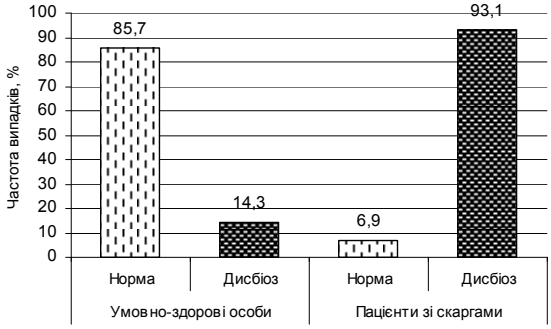


Рис. 1. Частота встановлення дисбіозу

Дослідження мікробного складу фекалій показало, що в осіб, для яких установлено відповідність нормі, переважали біфідобактерії, лактобактерії та нормальна кишкова паличка, а умовно-патогенні мікроорганізми не виявлялися взагалі або їх кількість не перевищувала 10^3 КУО/г – критерій норми (рис. 2, табл. 1).

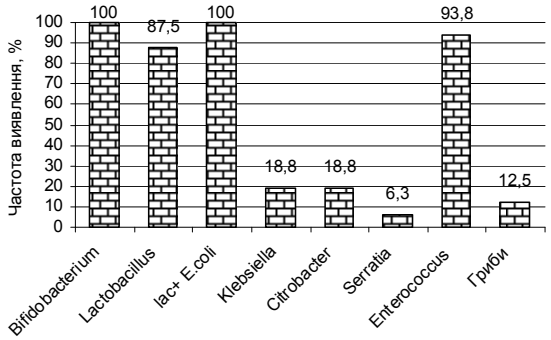


Рис. 2. Частота виявлення різних представників мікрофлори у групі осіб, для яких бактеріологічно не визначено дисбіоз

Отже, в усіх осіб (100%) мало місце виявлення біфідобактерій і лактозопозитивної кишкової палички у титрах, відповідних нормі, тобто у кількості понад 10^7 КУО/г фекалій. Також у більшості осіб виявлено лактобацили – 87,5% та ентерококи – 93,8% – типові представники мікрофлори шлунково-кишкового тракту (Takiishi et al., 2017; Thursby and Juge, 2017). Для низки осіб виявлено також інші мікроорганізми, що належать до ентеробактерій, але тих видів, які вважають потенційно небезпечними. У 18,8% випадків виявлено клебсієли та цитробактери, у 6,3% випадків – серації. Найбільшу загрозу ризику розвитку дисбіозу становлять гриби: їх виявлено у 12,5% випадків, тобто у двох осіб. Їх кількісний показник не виходив за межі норми, що дозволило встановити для цих осіб стан нормобіозу.

Таблиця 1
Кількість виявлених мікроорганізмів (x ± SD)

Мікроорганізм	Вміст, lg КУО/г
Bifidobacterium	8,82 ± 6,89
Lactobacillus	7,45 ± 6,12
lac + E. coli	7,98 ± 6,02
Klebsiella	2,12 ± 1,36
Citrobacter	2,48 ± 1,22
Serratia	1,36*
Enterococcus	2,66 ± 1,51
Гриби	1,67 ± 0,89

Примітка: * – виявлені в однієї особи.

Всі виявлені мікроорганізми визначено в асоціаціях, тому наступним етапом став аналіз складу асоціацій (рис. 3).

Рис. 3. Частота виявлення асоціацій мікроорганізмів у складі мікрофлори за нормобіозу шлунково-кишкового тракту

Отже, для складу норми типове утворення таких асоціацій: потрійних та п'ятичленних по 25,0%, шестичленних – 18,8%, і найбільше – почетверних асоціацій – 31,3%. У жодному з випадків монокультури не виявлено.

До складу всіх асоціацій входили біфідобактерії та лактозопозитивна кишкова паличка, інші компоненти асоціацій варіювали. Якщо ділити асоціації за ознакою таксономічної належності мікроорганізмів до різних груп, більшість становили бактеріальні асоціації – 87,5%, меншість – 12,5% бактеріально-грибкова асоціація.

Аналогічний аналіз матеріалів дослідження здійснено і для результатів вивчення біологічного матеріалу від осіб із бактеріологічно підтвердженим дисбіозом. Дослідження мікробного сладу фекалій показало, що в осіб із дисбіозом почасти відсутні представники сапрофітної флори (біфідобактерії, лактобактерії та нормальна кишкова паличка), у той час як умовно-патогенні мікроорганізми перевищували показник норми (10^3 КУО/г, рис. 4, табл. 2). Подібні результати – типові маркери дисбіозу шлунково-кишкового тракту.

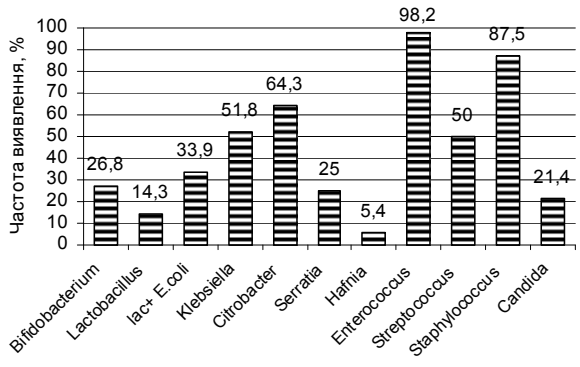


Рис. 4. Частота виявлення різних представників мікрофлори у групі осіб, для яких бактеріологічно підтверджено дисбіоз

Отже, у низки осіб (14–33%) мало місце виявлення біфідобактерій, лактобактерій і лактозопозитивної кишкової палички у титрах, відповідних нормі (понад 10^7 КУО/г фекалій), що вказує на найменший ступінь дисбіозу. Також у більшості осіб виявлено ентерококи (98,2%) – типові представники мікрофлори шлунково-кишкового тракту; у випадку, коли вони не мають вираженого прояву факторів патогенності, враховуються як нормальна мікрофлора (Nezgoda and Naumenko, 2011).

З інших типово умовно-патогенних мікроорганізмів, у кількостях, вищих за значення норми (lg 3 КУО/г), виявили стафілококи (87,5%), цитробактер (64,3%), клебсієлу (51,8%), стрептококи (50,0%), серації (25,0%), кандиди (21,4%) і гафнії (5,4%). Із виділених мікроорганізмів найтиповіші збудники дисбіозу – стафілококи, виділені від більшості осіб, та кандиди.

Таблиця 2
Кількість виявлених умовно-патогенних мікроорганізмів

Мікроорганізм	Вміст, lg КУО/г
Klebsiella	6,48 ± 6,03
Citrobacter	5,99 ± 4,08
Serratia	6,46 ± 5,12
Hafnia	4,32 ± 3,08
Enterococcus	6,59 ± 6,01
Streptococcus	3,88 ± 2,12
Staphylococcus	6,81 ± 5,87
Candida	4,49 ± 3,63

Для більшості з виділених умовно-патогенних мікроорганізмів перевищення норми доволі значне, що враховується для встановлення фази дисбіозу. З наведених у таблиці 2 даних можна побачити, що переважають стафілококи. Найменший із зафіксованих показників, що перевищував норму, становив lg 3,18 КУО/г, тобто не в усіх випадках наявності стафілококка мало місце його домінування. Також за кількістю високою була численність ентерококів, клебсієл і серацій, що вказує на виражений аеробний дисбіоз.

На наступному етапі аналізу вивчено склад асоціацій (рис. 5). Отже, для дисбіозу визначено формування таких асоціацій: найбільше шестичленних асоціацій (37,5%, 21), почетверних (25,0%, 14), п'ятичленних (21,4%, 12), потрійних (14,3%, 8), в єдиному випадку виявлено подвійну асоціацію (1,8%). Як і за нормобіозу, в жодному з випадків монокультур умовно-патогенних мікроорганізмів не виявлено, вони завжди входять до складу асоціацій.

За ознакою таксономічної належності мікроорганізмів до різних груп, більшість асоціацій, як і за нормобіозу, представлені бактеріальними (78,6%, 44 особи), частка бактеріально-грибкових асоціацій склала 21,4% (12 осіб).

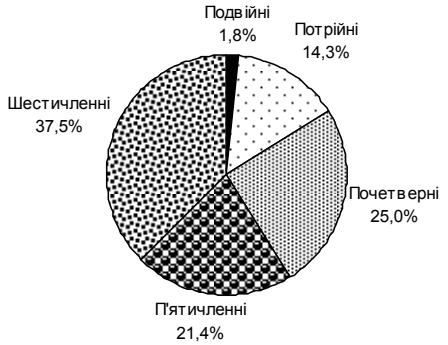


Рис. 5. Частота виявлення асоціацій мікроорганізмів у складі мікрофлори за дисбіозу шлунково-кишкового тракту

Залежно від складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту та співвідношень численності різних мікроорганізмів можна виділити різні фази дисбіозу (критерії Куваєвої – Ладодо) (Nezgoda and Naumenko, 2011). Проведено аналіз отриманих результатів для встановлення стадії дисбіозу (рис. 6).

Для 56 осіб бактеріологічно підтверджено дисбіоз. За результатами аналізу складу мікрофлори в обстежуваних частота виявлення різних стадій дисбіозу склала 42,9% – це найбільший показник частоти, який визначено для II стадії дисбіозу.

Це пускова фаза, що характеризується зниженням кількості біфідобактерій і лактобактерій на тлі виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів. Частота виявлення I стадії становила 21,4%. Це латентна фаза дисбіотичних порушень, для якої характерне зниження кількості сапрофітних бактерій і досягнення нижнього порогу кількості одним із видів умовно-патогенних мікроорганізмів. III стадію дисбіозу визначено у 19,6% випадків. Це – фаза агресії аеробної мікрофлори, за якої типове виявлення двох – трьох представників умовно-патогенних мікроорганізмів у кількостях понад норму. IV стадію визначено для 16,1% пацієнтів. Це фаза глибоких порушень складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту, що характеризується повним зникненням сапрофітних бактерій і одночасним виявленням у надмірних кількостях умовно-патогенних мікроорганізмів. Для цієї фази часто відмічається виражене домінування будь-якого одного умовно-патогенного мікроорганізму, але з вираженим проявом факторів патогенності (Nezgoda and Naumenko, 2011; Zhang et al., 2015).

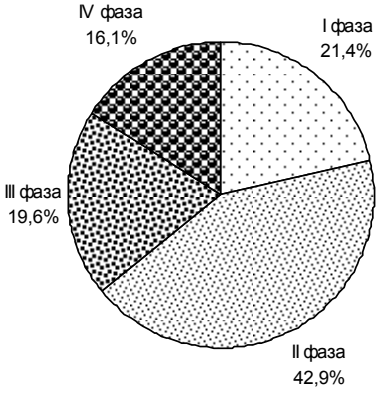


Рис. 6. Частота виявлення різних стадій дисбіозу

Висновки

У контингенту обстежуваних стан дисбіозу підтверджено для 56 (77,8%) осіб. За нормобіозу типове утворення таких асоціацій: потрійних і п'ятичленних по 25,0%, шестичленних – 18,8%, і найбільше – почетверних асоціацій – 31,3%. Із них бактеріальні асоціації – 87,5%, бактеріально-грибкові – 12,5%.

За дисбіозу шлунково-кишкового тракту виявляли стафілококи – 87,5%, цитробактер – 64,3%, клебсієлу – 51,8%, стрептококи – 50,0%, серації – 25%, кандиди – 21,4% і гафнії – 5,4%, які входили до складу асоціацій: шестичленних – 37,5%, почетверних – 25,0%, п'ятичленних – 21,4%, потрійних – 14,3% і подвійних – 1,8%. Частка бактеріальних асоціацій – 78,6%, а бактеріально-грибкових – 21,4%.

References

Ardesia, M., Villanacci, V., & Fries, W. (2015). The aged gut in inflammatory bowel diseases. Minerva Gastroenterologica E Dietologica, 61(4), 235–247.

Bellaguarda, E., & Chang, E. B. (2015). IBD and the gut microbiota – from bench to personalized medicine. Current Gastroenterology Reports, 17(4), 15.

Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. Nutrients, 4, 1095–1119.

Buttó, L. F., & Haller, D. (2016). Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. International Journal of Medical Microbiology, 306(5), 302–309.

Chang, C., & Lin, H. (2016). Dysbiosis in gastrointestinal disorders. Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology, 30(1), 3–15.

Cheng, R. Y, Li, M., Li, S. S., He, M., Yu, X. H., Shi, L., & He, F. (2017). Vancomycin and ceftriaxone can damage intestinal microbiota and affect the development of the intestinal tract and immune system to different degrees in neonatal mice. Pathogens and Disease, 75(8).

DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. Inflammatory Bowel Diseases, 22(5), 1137–1150.

Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 9, 577–589.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (Eds.). (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.

Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkila, J., Immonen, O., Kekkonen, R., Lahti, L., Palva, A., & de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in healthy adults: Temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. PLoS ONE, 6, e23035.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J. C., Schumm, L. P., Sharma, Y., & Anderson, C. A. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature, 491, 119–124.

Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. Trends in Molecular Medicine, 21(3), 172–183.

Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., & Bruns, T. (2016). Effects of antibiotics on gut microbiota. Digestive Diseases, 34(3), 260–268.

Lin, L., & Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. BMC Immunology, 18(1), 2.

Lippert, K., Kedenko, L., Antonielli, L., Kedenko, I., Gemeier, C., Leitner, M., Kautzky-Willer, A., Paulweber, B., & Hackl, E. (2017). Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. Beneficial Microbes, 8(4), 545–556.

Liu, Z., Liu, W., Ran, C., Hu, J., & Zhoua, Z. (2016). Abrupt suspension of probiotics administration may increase host pathogen susceptibility by inducing gut dysbiosis. Scientific Reports, 6, 23214.

Lyamin, A. V., Botkin, E. A., & Zhestkov, A. V. (2012). Metodyi vyiyavleniya bioplenok v meditsine: Vozmozhnosti i perspektivyi [Methods of biofilm evaluation: Opportunities and perspectives]. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 14(1), 17–22 (in Russian).

Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2015). The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. Gut, 65(2), 330–339.

Mayorga Reyes, L., González Vázquez, R., Cruz Arroyo, S. M., Melendez Avalos, A., Reyes Castillo, P. A., Chavaro Pérez, D. A., Ramos Terrones, I., Ramos Ibáñez, N., Rodríguez Magallanes, M. M., Langella, P., Bermúdez Humarán, L., & Azaola Espinosa, A. (2016). Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 67(4), 470–478.

McFarland, L. V. (2014). Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: A systematic review. BMJ Open, 4(8), e005047.

Montandon, S. A., & Jornayvaz, F. R. (2017). Effects of antidiabetic drugs on gut microbiota composition. Genes (Basel), 8(10), E250.

Moreno de LeBlanc de, A., & LeBlanc, J. G. (2014). Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. World Journal of Gastroenterology, 20(44), 16518–16528.

Nezgoda, I. I., & Naumenko, O. M. (2011). Dysbakterioz kyshkivnyka u ditey: Problemni pytannya, suchasni metody diahnostyky [Intestinal dysbacteriosis in children: Problem issues, modern methods of diagnosis]. Klinichna immunolohiia. Alerholohiia. Infektolohiia, 5, 29–32 (in Ukrainian).

Pallister, T., & Spector, T. D. (2016). Food: A new form of personalised (gut microbiome) medicine for chronic diseases? Journal of the Royal Society of Medicine, 109(9), 331–336.

Schippa, S., & Conte, M. P. (2014). Dysbiotic events in gut microbiota: Impact on human health. Nutrients, 6(12), 5786–5805.

Shaw, K. A., Bertha, M., Hofmekler, T., Chopra, P., Vatanen, T., Srivatsa, A., Prince, J., Kumar, A., Sauer, C., Zwick, M. E., Satten, G. A., Kostic, A. D., Mulle, J. G., Xavier, R. J., & Kugathasan, S. (2016). Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease. Genome Medicine, 8(1), 75.

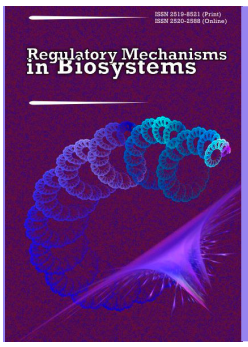
Takiishi, T., Fenero, C. I. M., & Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. Tissue Barriers, e1373208.

Tchebotar, I. V., & Guryev, E. L. (2012). Laboratornaya diagnostika klinicheski znachimyih bioplyonochnyih protsessov [Laboratory diagnostics of clinically significant microbial biofilms]. Voprosy Diagnostiki v Pediatrii, 4, 15–20 (in Russian).

Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. Biochemical Journal, 474(11), 1823–1836.

Walker, M. M. (2016). Inflammation, genetics, dysbiosis, and the environment: New paradigms for diagnosis in complex chronic gut syndromes. Journal of Clinical Gastroenterology, 50(Suppl. 1), S4–5.

Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. International Journal of Molecular Sciences, 16(4), 7493–7519.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 501–505
doi: 10.15421/021777

Proliferative activity of bone marrow cells of rats under the influence of biologically active substances of a medical leech

R. F. Aminov, A. K. Frolov

Zaporizhzhia National University, Zaporizhzhia, Ukraine

Article info

Received 02.10.2017
Received in revised form 29.10.2017
Accepted 05.11.2017

Zaporizhzhia National University, Zhukovskogo st., 66, Zhaporizhzhia, 69600, Ukraine.
Tel.: +38-067-479-65-91
E-mail: 91_amin_91@ukr.net, a_frolov@ukr.net

Aminov, R. F., & Frolov, A. K. (2017). Proliferative activity of bone marrow cells of rats under the influence of biologically active substances of a medical leech. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 501–505. doi:10.15421/021777

Hirudotherapy has been used in medicine since time immemorial. The advantage of this type of treatment is that the bite of a leech has a restorative effect on the entire body. The leech bites the skin and injects into the patient's blood biologically active substances that activate blood microcirculation and promote immunity. The saliva of the leech contains more than 100 substances that contribute to the spectrum of therapeutic effects. But there are no studies on the effect of hirudotherapy on the proliferation of bone marrow cells, which is ontogenetically primary in the development of myeloid and lymphoid tissues. Therefore, it is important to study the mitotic activity of bone marrow of rats at the early stages of postembryonic development against the background of influence by the leech. Female nonlinear rats, two weeks before and two weeks after mating with males, were presented each week to one hungry medical leech weighing 400 mg. The females were examined after feeding their offspring and their offspring were likewise examined on day 1, 15, 30, 45, 60 of the experiment. The animals were kept in vivarium conditions on a standard diet in individual cages. All animals were decapitated under ether anesthesia and the number of leukocytes, the leukocyte blood count, the number of erythrocytes, hemoglobin, and the color index were examined. After that, the femurs were quickly removed and the adjacent muscles separated with a sterile gauze. We cut the epiphyses and cut along the bone. Bone marrow from the femur was flushed with a warm (37 °C) hypotonic 0.9% sodium citrate solution into a sterile centrifuge tube using a Pasteur pipette. The resulting cell suspension was incubated in a hypotonic solution for 10 minutes at 37 °C. The resulting suspension was centrifuged for 5 minutes at 1000 rpm leaving only a small residue of sediment in the test tube. The cells were fixed in methyl alcohol with glacial acetic acid (three parts methyl alcohol and one part acetic acid). 3,000 cells were analyzed, among which we determined those that are in mitosis, and expressed their share. As a result of our studies, the immunomodulating effect of the saliva of the medical leech was revealed, which manifested itself in an increase in the proliferative activity of bone marrow cells, which led to an increase in the number of red blood cells, increased hemoglobin and increase in the number of leukocytes. The color index and the leukocyte blood count were within the normal limits.

Keywords: hirudotherapy; hirudology; stages of mitosis; leukocytes; erythrocyte; hemoglobin

Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки

Р. Ф. Амінов, О. К. Фролов

Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна

Гірудотерапія (у перекладі з латини – лікування п'явками) – один із натуротерапевтичних методів, який знайшов застосування у сучасній медицині. У слині медичної п'явки виявлено понад 100 біологічно активних речовин, які викликають широкий спектр профілактично-лікувальних ефектів. Досліджено вплив біологічно активних речовин медичної п'явки *Hirudo verbana* (Carena, 1820) на мітотичну активність кісткового мозку та гематологічні показники крові: загальну кількість лейкоцитів, еритроцитів, гемоглобін, кольоровий показник і лейкоцитарну формулу крові самок нелінійних щурів після вигодовування приплоду, яким за два тижні до парування та два тижні після приставляли по одній медичній п'явці кожного тижня (масою 400 мг), таку саму процедуру робили їх приплоду на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу. У тварин брали кров і досліджували її показники. Стегнові кістки швидко очищали від прилеглих м'язів. Відрізали епіфізи та розрізали уздовж кістки, вимиваючи кістковий мозок теплим гіпотонічним 0,9% розчином цитрату натрію у стерильну пробірку. Отриману клітинну суспензію інкубувати в гіпотонічному середовищі 10 хв за температури 37 °С. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв за 1 000 об./хв і залишали небагато осаду у пробірці. Клітини фіксували у метиловому спирті з крижаною оцтовою кислотою. За 12 год. фіксації тричі змінювали фіксатор із проміжним ресуспензуванням осаду та наступним центрифугуванням. В останньому фіксаторі осад ресуспензували та наносили на чисто вимите предметне скло. Скло швидко проводили через полум'я пальника, щоб фіксатор запалав, але не допускали

перегрівання. Аналізували 3 000 клітин, серед яких визначали такі, що перебувають у мітозі. Виявлено імуномоделювальну дію слини медичної п'явки, відмічено тенденцію до збільшення мітотичної активності клітин кісткового мозку у самок щурів. Аналіз приплоду достовірного підвищення проліферативної активності клітин кісткового мозку не виявив. Зростання мітотичної активності кісткового мозку в самок щурів зумовило збільшення кількості еритроцитів, підвищення концентрації гемоглобіну, кількості лейкоцитів. Кольоровий показник і лейкоцитарна формула крові залишились у межах норми. Отримані результати можуть свідчити про вплив біологічно активних речовин слини *H. verbana* на механізми позитивної регуляції онтогенезу.

Ключові слова: гірудотерапія; гірудологія; стадії мітозу; лейкоцити; еритроцити; гемоглобін

Вступ

Сучасна фармакологія, безумовно, досягла великих успіхів, але часто виявляють побічні дії від її використання у лікуванні низки захворювань. З'явилася ціла серія хвороб, які звуть лікарськими (Matvjejeva et al., 2011). Тому дослідники все більше починають вивчати та досліджувати різні натуротерапевтичні методи впливу на організм тварини та людини, один з яких – гірудотерапія. Нині вона набуває все більшого значення (Abdullah et al., 2012). Гірудотерапію широко застосовують у медицині (Mumcuoglu et al., 2004; Hullett et al., 2007; Abbas Zaidi et al., 2011) та ветеринарії (Popova, 2003; Frolov et al., 2010; Sobczak and Kantyka, 2014). Перевага цього виду лікування в тому, що укус п'явки дає відновлювальний ефект на весь організм (Zharov, 2003; Savinov, 2004; Kamenev and Baranovskij, 2010). П'явка прокушує шкіру та вводить у кров пацієнта біологічно активні речовини (Meriaux et al., 2011; Abdualkader et al., 2013; Frolov and Litvinenko, 2014), які активізують мікроциркуляцію крові та сприяють підвищенню імунітету (Aminov and Frolov, 2015; Frolov and Litvinenko, 2015). Слина п'явки містить понад 100 речовин, що сприяють спектру терапевтичних ефектів (Eldor et al.,1996; Pospelova and Barnaulov, 2010; Hildebrandt and Lemke, 2011; Koeppen et al., 2014). Тому гірудотерапію та фармакологічні препарати на основі слини п'явки ефективно використовують із метою лікування та профілактики в дерматології (Kumar, 2012), кардіології (Isahanjan and Arutjunjan, 1991), оториноларингології (Flaum and Shahov, 2008), травматології (Michalsen et al., 2008) та в інших сферах медицини. У практиці зарубіжних країн медичних п'явок використовують головним чином під час трансплантацій із метою усунення венозного застою (конгестії) (Chepeha et al., 2002; Frodel et al., 2004; Bank et al., 2008).

Дослідження морфофізіологічних змін у кіз після курсів гірудологічних приставок у період їх роздоювання показали у них збільшення маси тіла та молочності без ускладнення маститом, а в репродуктивний період відмічено 100% запліднення із народженням двійнят зі збільшеною вагою (Frolov et al., 2010). Під час дослідів, які проводили на коровах, гірудологічні приставки сприяли пришвидшеній післяпологовій реабілітації, зворотній інволюції репродуктивних органів до фізіологічного стану (Popova, 1999).

У попередніх дослідах доведено, що слина медичної п'явки після гірудотерапії стимулює морфогенетичні процеси, опосередковані в основному через фактори імунної системи (підвищення фізіологічних параметрів тіла, стимуляція мієлоїдної та лімфоїдної тканин (селезінки та тимусу) і, як наслідок, збільшення розмірів органів) (Aminov et al., 2016), посилення функціональної активності нейтрофілів крові (Zharov, 2003; Savinov, 2004; Kamenev and Baranovskij, 2010; Aminov and Frolov, 2016), але відсутні дослідження впливу гірудотерапії на проліферацію клітин кісткового мозку – середовища розвитку мієлоїдних та лімфоїдних тканин.

Тому мета наших досліджень – виявити мітотичну активність кісткового мозку щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудологічного впливу.

Матеріал і методи досліджень

Дорослим самкам нелінійних щурів масою 150–200 г два тижні до парування та два тижні після робили приставки по одній голодній медичній п'явці *Hirudo verbana* (Carena, 1820) кожного тижня масою 400 мг (4 приставки). Тварин розподіляли на дві групи: перша (дослідна) група тварин за впливу біологічно активних речовин *H. verbana*; друга (контрольна) група – без втручань. Досліджували самок після вигодовування приплоду, а також приплід у динаміці на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу. Експериментальні дослідження виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей, згідно із Законом України від 21.02.2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та згідно з етичними нормами та правилами роботи з лабораторними тваринами. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному раціоні в індивідуальних клітках (Zapadnjuk et al., 1983). Усього в експерименті задіяно 40 нелінійних самок щурів та 200 екземплярів приплоду.

Усіх тварин декапітували під ефірним наркозом і досліджували кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові, кількість еритроцитів, гемоглобін і кольоровий показник (Berkalo et al., 2003). Після цього швидко вилучали стегнові кістки, очищали їх від прилеглих м'язів за допомогою стерильної марлі. Відрізали епіфізи та розрізали вздовж кістки. Кістковий мозок зі стегнової кістки вимивали теплим (37 °С) гіпотонічним 0,9% розчином цитрату натрію у стерильну центрифужну пробірку, використовуючи для цієї мети пастерівську піпетку.

Шматочки кісткового мозку подрібнювали піпетуванням. Отриману клітинну суспензію інкубували в гіпотонічному середовищі 10 хв за температури 37 °С. Суспензію центрифугували протягом 5 хв за 1 000 об./хв, залишаючи небагато осаду у пробірці (тонкий шар на дні пробірки). Обережно відсмоктували піпеткою всю надосадову рідину. Клітини фіксували у метиловому спирті з крижаною оцтовою кислотою (три частини метилового спирту та одна частина оцтової кислоти). Для цього до осаду обережно доливали охолоджений фіксатор (близько 2 мл), намагаючись не розбити осад. Загальний час фіксації – 12 год. За цей час тричі змінювали фіксатор, із проміжним ресуспензуванням осаду та наступним центрифугуванням. В останньому фіксаторі осад ресуспензували та наносили на чисто вимите предметне скло (скло тримали у дистильованій воді в холодильнику) 2–3 краплини суспензії клітин у фіксаторі. Скло швидко проводили через полум'я пальника, щоб фіксатор запалав, але не допускали перегрівання. Добре висушені препарати фарбували методом Романовського – Гімза 40 хв, після чого промивали у дистильованій воді та диференціювали в підкисленій HCl воді. Аналізували 3 000 клітин, серед яких визначали ті, що перебували в мітозі, та виражали їх частку в проміле (Bogdanova, 2016).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми SPSS v.21,0 (IBM SPSS Statistics, USA). Вибіркові параметри, наведені в таблиці, мають такі позначення: x – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою F-критерію Фішера. Вірогідною вважали різницю між вибірками $P < 0,05$.

Результати

Під час дослідження проліферативної активності клітин кісткового мозку відмічали тенденцію до збільшення мітотичного індексу в дослідної групи самок щурів (на 32,6%, $P < 0,07$, табл. 1). У їх приплоду достовірне підвищення проліферативної активності клітин кісткового мозку спостерігали на 15-ту

(на 29,1%, P < 0,05) та 45-ту добу (на 32,2%, P < 0,01), із тенденцією до збільшення на 1-шу (на 50,9%, P < 0,06), 30-ту (на 42,0%, P < 0,07) та 60-ту добу (на 25,2%, P < 0,08) порівняно з контрольною групою (табл. 1). У результаті підвищення мітотичного індексу відмічали збільшення еритроцитарних і лейкоцитарних показників периферичної крові дослідних самок та їх приплоду (табл. 2). У самок тенденція до збільшення кількості еритроцитів (на 24,4%, P < 0,08), гемоглобіну (на 16,1%, P < 0,09), лейкоцитів (на 54,2%, P < 0,06) зареєстрована порівняно з контрольною групою. Адекватні позитивні зрушення гематологічних показників спостерігали також у приплоду. Причому найбільші зміни реєстрували до 30-ї доби життя (табл. 2). Збільшення кількості лейкоцитів у дослідної групи щурів відмічали без істотних змін у лейкоцитарній формулі крові (табл. 3).

Таблиця 1

Мітотична активність кісткового мозку самок щурів та їх приплоду за впливу біологічно активних речовин *H. verbana* (‰, x ± SE, n = 20)

Доба онтогенезу	Контроль	Вплив слини *H. verbana*
220-та (самки)	14,84 ± 0,32	22,24 ± 1,06
1-ша	14,33 ± 0,30	28,90 ± 0,44
15-та	15,09 ± 1,14	21,53 ± 1,16*
30-та	9,17 ± 0,48	16,23 ± 1,26
45-та	9,05 ± 0,53	14,16 ± 0,16**
60-та	10,96 ± 0,54	14,38 ± 0,43

Примітка: * – P < 0,05; ** – P < 0,01 порівняно з контролем.

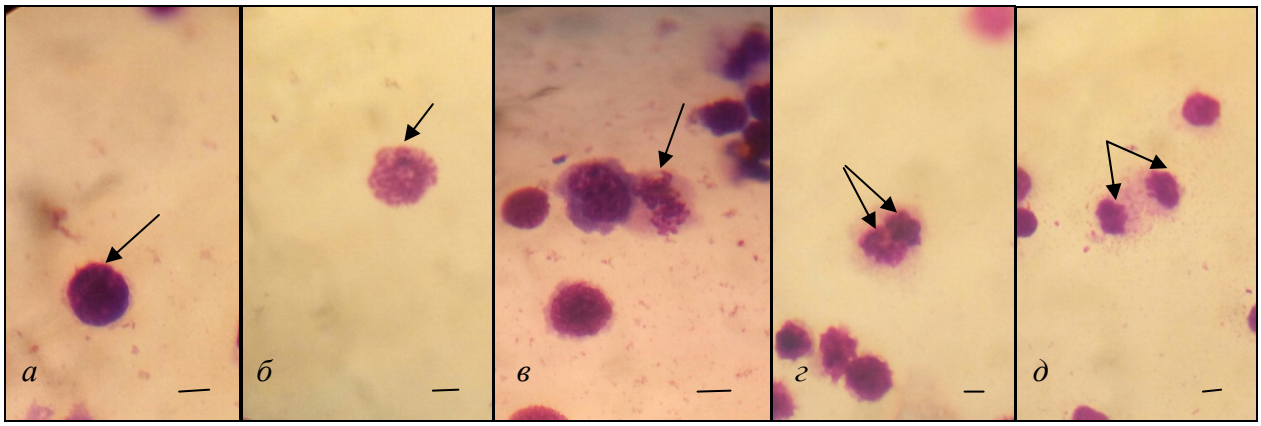


Рис. 1. Стадії мітозу: *а* – інтерфаза, *б* – профаза, *в* – метафаза, *г* – анафаза, *д* – телофаза (чорними стрілками помічена клітина у стадії мітозу); довжина бара – 10 мкм; забарвлення за методом Романовського – Гімза

Таблиця 2

Кількість лейкоцитів і еритроцитів, гемоглобін, кольоровий показник у самок щурів та їх приплоду за впливу біологічно активних речовин *H. verbana* (x ± SE, n = 20)

Доба онтогенезу	Група тварин	Показники			
		лейкоцити, × 10^9/л	еритроцити, × 10^{12}/ л	гемоглобін, г/л	кольоровий показник, %
220-та (самки)	контроль	5,02 ± 0,25	7,08 ± 0,40	136,1 ± 4,8	0,58 ± 0,04
	вплив слини *H. verbana*	8,16 ± 0,66	8,78 ± 0,29	158,4 ± 3,6	0,54 ± 0,02
1-ша	контроль	5,85 ± 0,35	2,84 ± 0,10	62,7 ± 2,7	0,66 ± 0,12
	вплив слини *H. verbana*	7,68 ± 0,55	3,11 ± 0,22	83,8 ± 2,7	0,81 ± 0,10
15-та	контроль	6,74 ± 0,54	4,16 ± 0,18	79,5 ± 1,6	0,57 ± 0,06
	вплив слини *H. verbana*	7,87 ± 0,51***	3,69 ± 0,29	86,2 ± 3,5*	0,70 ± 0,01
30-та	контроль	3,39 ± 0,30	3,79 ± 0,13	90,9 ± 3,1	0,72 ± 0,05
	вплив слини *H. verbana*	5,43 ± 0,29	4,76 ± 0,22**	102,0 ± 3,4	0,64 ± 0,04
45-та	контроль	6,81 ± 0,51	5,20 ± 0,14	143,2 ± 5,4	0,83 ± 0,09
	вплив слини *H. verbana*	7,12 ± 0,31	5,07 ± 0,33	140,5 ± 6,1	0,83 ± 0,08
60-та	контроль	7,29 ± 0,45	6,65 ± 0,19	155,1 ± 5,7	0,70 ± 0,06
	вплив слини *H. verbana*	8,23 ± 0,45	6,46 ± 0,20	153,3 ± 5,0	0,71 ± 0,05

Примітка: * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 порівняно з контролем.

Таблиця 3

Лейкоцитарна формула крові самок щурів та їх приплоду за впливу біологічно активних речовин *H. verbana* (x ± SE, n = 20)

Доба онтогенезу	Група тварин	Лейкоцитарна формула крові, %					
		нейтрофіли			лімфоцити	моноцити	еозинофіли
		паличко-ядерні	сегменто-ядерні	загальний відсоток			
220-та (самки)	контроль	8,01 ± 0,29	14,20 ± 1,42	22,41 ± 1,02	70,09 ± 1,48	7,40 ± 0,88	0,30 ± 0,02
	вплив слини *H. verbana*	9,61 ± 0,22	13,96 ± 1,02	23,57 ± 1,31	70,51 ± 1,64	5,46 ± 0,22	0,46 ± 0,06
1-ша	контроль	8,68 ± 0,46	43,29 ± 2,87	51,97 ± 1,29	46,63 ± 2,39	1,25 ± 0,01	0,15 ± 0,01
	вплив слини *H. verbana*	9,92 ± 0,87	41,95 ± 2,99	51,87 ± 2,33	46,78 ± 3,02	1,18 ± 0,19	0,17 ± 0,02
15-та	контроль	4,95 ± 0,65	16,62 ± 0,88	21,57 ± 1,22	76,95 ± 1,62	1,31 ± 0,13	0,17 ± 0,02
	вплив слини *H. verbana*	5,87 ± 0,67	14,22 ± 1,54	20,09 ± 1,44	78,54 ± 2,32	1,19 ± 0,10	0,18 ± 0,01
30-та	контроль	5,10 ± 0,29	11,93 ± 1,42	17,00 ± 1,02	81,87 ± 1,80	0,47 ± 0,02	0,63 ± 0,12
	вплив слини *H. verbana*	4,81 ± 2,11	15,97 ± 2,06	20,63 ± 1,34	78,98 ± 2,87	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,01
45-та	контроль	2,78 ± 0,34	10,42 ± 0,45	13,01 ± 1,32	85,86 ± 1,36	1,24 ± 0,12	0,08 ± 0,01
	вплив слини *H. verbana*	6,43 ± 0,77	11,53 ± 0,98	17,96 ± 1,11	81,40 ± 1,72	0,37 ± 0,02	0,17 ± 0,02
60-та	контроль	3,64 ± 0,38	8,20 ± 0,36	11,84 ± 0,97	86,68 ± 0,67	1,39 ± 0,15	0,09 ± 0,01
	вплив слини *H. verbana*	3,70 ± 0,33	12,28 ± 0,97	16,18 ± 0,87	82,90 ± 2,00	1,04 ± 0,01	0,08 ± 0,02

Обговорення

Дослідження продемонструвало стимулювальний вплив біологічно активних речовин слини медичної п'явки на гістогенетичні реакції самок щурів та їх потомства, які проявлялися підвищенням мітотичної активності та гематологічних показників крові.

Приплід піддавався впливу тільки в преембріональний і ембріональний періоди розвитку. Отже, такий пролонгований ефект від біологічно активних речовин слини медичної п'явки, можливо, стає наслідком різних механізмів, за рахунок власних компонентів слини медичної п'явки, які частково адсорбуються до закладання тканин приплоду, частково поступаючи у рециркуляцію організму самок щурів, здійснюючи регуляцію гістогенезу. Подібні експериментальні дані описані під час дослідження впливу біологічно активних речовин слини медичної п'явки на дрібній (Frolov et al., 2010) і великій рогатій худобі (Popova and Petrov, 1999; Demidchik, 2001; Romanova et al., 2008), домашніх хребетних тваринах (Canpolat and Sağlam, 2004; Krjachko and Lukojanova, 2009; Sobczak, 2014), але без дослідів їх приплоду.

Збільшення кількості лейкоцитів у дослідної групи щурів відмічали без істотних змін лейкоцитарної формули крові порівняно з контролем. Цей факт свідчить про гомеостатичний вплив біологічно активних речовин слини медичної п'явки на гематологічний гістогенез (Meriaux, 2011; Koeppen, 2014; Mumcuoglu, 2014). Можна передбачити, що у подальшому розвитку онтогенезу в дослідної групи приплоду не будуть спостерігатись відхилення від фізіологічних меж. Подібні дані описували інші автори, але мітотичну активність не було досліджено (Mineo, 2004; Frodel, 2004; Hullett, 2007). Також описано вплив біологічно активних речовин на гомеостаз (Zharov, 2003; Savinov, 2004; Kamenev and Baranovskij, 2010). Ми вперше дослідили та виявили гірудологічний вплив не тільки на дорослих тваринах, а і на їх приплоді.

Висновки

Приставки *H. verbana* самкам протягом двох тижнів до парування та двох тижнів після нього сприяють підвищенню проліферативної активності кісткового мозку щурів та їх приплоду. Адекватне підвищенню мітотичного індексу клітин кісткового мозку збільшення еритроцитарних показників (кількість еритроцитів і гемоглобін) і лейкоцитарних показників (кількість лейкоцитів). Лейкоцитарна формула крові залишається без суттєвих змін. Отримані результати мають прикладне значення для вивчення можливостей механізмів регуляції онтогенезу за впливу біологічно активних речовин слини *H. verbana*.

References

Abdualkader, A. M., Ghawi, A. M., Alaama, M., Awang, M., & Merzouk, A. (2013). Leech therapeutic applications. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 75(2), 127–137.

Abdullah, S., Dar, M. L., Rashid, A., & Tewari, A. (2012). Hirudotherapy. Leech therapy: Applications and indications in surgery. Archives of Clinical and Experimental Surgery, 1(3), 172–180.

Aminov, R. F., & Frolov, O. K. (2015). Vplyv biologichno aktyvnyh rechovyn sol'ovogo ekstraktu medychnoi' p'javky na fagocytarnu aktyvnist' nejtrofiliv i cytomorfometrychni zminy limfocytiv krovi ljudyny u kul'turi [Influence of biologically active substances in the salt extract of the medicinal leech on phagocytic activity of neutrophils and cytomorphometric changes of blood lymphocytes in culture]. Naukovyj Visnyk Chernivec'kogo Universytetu. Biologija, 7(1), 108–112 (in Ukrainian).

Aminov, R. F., & Frolov, O. K. (2016). Fagocytarna ta metabolichna aktyvnist' nejtrofiliv shhuriv na rannih etapah postembrional'nogo rozvytku za vplyvu biologichno aktyvnyh rechovyn sol'ovogo ekstraktu *Hirudo verbana* [Phagocytic and metabolic activity of neutrophils of rats in the early stages of post-embryonic development under the influence of biologically active substances of the salt extract of *Hirudo verbana*]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 7(2), 96–100 (in Ukrainian).

Aminov, R. F., Frolov, A. K., & Fedotov, E. R. (2016). The impact of fetal load of biologically active substances of *Hirudo verbana* saline extract antigens on the morphometric and hematologic parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. Immunopathology, Allergology, Infectology, 4, 6–11.

Bank, J., Zilinsky, Y., Haik, J., Winkler, E., & Goldan, O. (2008). Medicinal leech fixation in precarious locations. Reconstructive Microsurgery, 24, 67–68.

Berkalo, L. V. (2003). Metody klinichnyh ta eksperymental'nyh doslidzhen' v medycyni [Methods of clinic eksperimentalnih dozen in charity fund medical]. Polimet, Poltava (in Ukrainian).

Bogdanova, M. S. (2016). Kletochnye kul'tury [Cell cultures]. Politehn, Saint Petersburg (in Russian).

Canpolat, İ., & Sağlam, N. (2004). Treatment of diffuse hematoma in a dog with the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 2(2), 97–99.

Chepeha, D. B., Nussenbaum, B., Bradford, C. R., & Teknos, T. N. (2002). Leech therapy for patients with surgically unsalvageable venous obstruction after revascularized free tissue transfer. Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 128, 960–965.

Demidchik, L. G. (2001). Girudoterapija pri skrytom mastite korov [Hirudotherapy with hidden cow mastitis]. Veterinarija, 2, 441 (in Russian).

Eldor, A., Orevi, M., & Rigbi, M. (1996). The role of the leech in medical therapeutics. Blood Reviews, 10, 201–209.

Flaum, R. A., & Shahov, A. V. (2008). Primenenie girudorefleksoterapii v lechenii pacientov s zabolevanijami vnutrennego uha [Application girudorefleksoterapii in the treatment of patients with diseases of the inner ear]. Medicinskij Al'manah, 2, 63–65 (in Russian).

Frodel, J., Barth, P., & Wagner, J. (2004). Salvage of partial facial soft tissue avulsions with medicinal leeches. Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 131, 934–939.

Frolov, A. K., & Litvinenko, R. A. (2014). Reaction of patients' lymphocytes' blast-transformation in blood, stimulated by plant mitogens and annelid antigens at hirudotherapy. Immunopatologija, Allergologija, Infektologija, 3, 10–13.

Frolov, A. K., & Litvinenko, R. A. (2015). Basic morphofunctional features of pharmaceutic leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820) tissues in various forms of response after hirudotherapeutic procedures. Annals of Parasitology, 61(1), 27–35.

Frolov, A. K., Kopejka, V. V., & Fedotov, E. R. (2010). Vlijanie girudoterapii na fiziologicheskie pokazateli u koz [The impact of treatment on physiological parameters in goats]. Zhivotnovodstvo Ukrainy, 7, 7–10 (in Russian).

Hildebrandt, J. P., & Lemke, S. (2011). Small bite, large impactsaliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. Naturwissenschaften, 98(12), 995–1008.

Hullett, J. S., Spinnato, G. G., & Zi, V. (2007). Treatment of an ear laceration with adjunctive leech therapy: A case report. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 65, 2112–2114.

Isahanjan, G. S., & Arutjunjan, V. M. (1991). Medicinskie pijavki ih lechebnoe primenenie v terapevticheskoj klinike [Medical leeches: their therapeutic use in a therapeutic clinic]. Terapevticheskij Arhiv, 63(8), 110–112 (in Russian).

Kamenev, O. J., & Baranovskij, A. J. (2010). Lechenie pijavkami – teorija i praktika girudoterapii [Treatment by leeches: Theory and practice hirudotherapy]. Ves', Saint Petersburg (in Russian).

Koeppen, D., Aurich, M., & Rampp, T. (2014). Medicinal leech therapy in pain syndromes: A narrative review. Wiener Medizinische Wochenschrift, 164(5–6), 95–102.

Krjachko, O. V., & Lukojanova, L. A. (2009). Vlijanie girudoterapii na nekotorye gematologicheskie i biohimicheskie pokazateli pri intoksikacionnom sindrome u sobak [The influence of hirudotherapy on some hematologic and biochemical indices in case of intoxication syndrome in dogs]. Veterinarnaja Praktika, 1, 65–68 (in Russian).

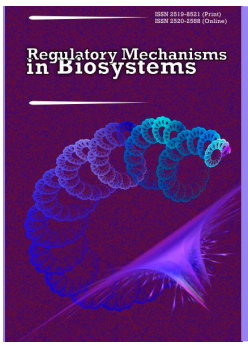
Kumar, S. A. (2012). Anti inflammatory effect of leech therapy in the patients of psoriasis. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 1(1), 71–74.

Matvjejeva O. V., Viktorov O. P., Blihar V. J., Puhlyk B. M., Chop'jak, V. V., Jajchenja, V. P., Logvina, I. O., & Bykanova, I. I. (2011). Do pytannja klasyfikacii' pobichnyh reakcij likars'kyh zasobiv ta pidhodiv do i'h dyferenciacii' (bibliografichnyj ogljad) [To the question of classification of adverse reactions of medicinal products and approaches to their differentiation (bibliographic review)]. Ukrai'ns'kyj Medychnyj Chasopys, 82, 78–84 (in Ukrainian).

Meriaux, C., Arafah, K., Tasiemski, A., Wisztorski, M., Bruand, J., Boidin-Wichlacz, C., Desmons, A., Debois, D., Laprévote, O., Brunelle, A., Gaasterland, T., Macagno, E., Fournier, I., & Salzet, M. (2011). Multiple changes in peptide and lipid expression associated with regeneration in the nervous system of the medicinal leech. PLoS ONE, 6(4), e18359.

Michalsen, A., Lüdtke, R., Cesur, O., Afra, D., Musial, F., Baecker, M., Fink, M., & Dobos, G. J. (2008). Effectiveness of leech therapy in women with symptomatic arthrosis of the first carpometacarpal joint: A randomized controlled trial. Pain, 137(2), 452–459.

Mineo, M., Jolley, T., & Rodriguez, G. (2004). Leech therapy in penile replantation: A case of recurrent penile selfamputation. Urology, 63, 981–983.
Mumcuoglu, K. Y. (2014). Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1, 1–7.
Popova, L. K., & Petrov, A. N. (1999). Girudoakupunktura pri subklinicheskom mastite u korov [Hirurdoacupuncture with subclinical mastitis in cows]. Veterinarija, 10, 23–24 (in Russian).
Pospelova, M. L., & Barnaulov, O. D. (2010). Effects of hirudotherapy on intravascular thrombosis activation in different groups of patients with cerebrovascular pathologies. Aktuelnosti iz Neurologije, Psihijatrije i Graničnih Područja, 18(3), 27–32.
Romanova, E. M., Klimina, O. M., & Kozlova, L. A. (2008). Primenenie girudoterapii i girudoakupunktury pri subklinicheskoj forme mastita u korov [The use of hirudotherapy and hirudoacupuncture in the subclinical form of mastitis in cows]. Veterinarnyj Vrach, 4, 35–37 (in Russian).
Savinov, V. A. (2004). Girudoterapija [Hirudotherapy]. Medicina, Moscow (in Russian).
Sobczak, N., & Kantyka, M. (2014). Hirudotherapy in veterinary medicine. Annals of Parasitology, 60(2), 89–92.
Zaidi, S. M., Jameel, S. S., Zaman, F., Jilani, S., Sultana, A., & Khan, S. A. (2011). A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. Alternative Medicine Review, 16(1), 59–65.
Zapadnjuk, I. P., Zapadnjuk, V. I., & Zaharija, E. A. (1983). Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, soderzhanie, ispol'zovanie v jeksperimente [Laboratory animals. Breeding, keeping, use in the experiment]. Vishha Shkola, Kiev (in Russian).
Zharov, D. G. (2003). Sekrety girudoterapii ili kak lechit'sja pijavkami [Secrets of treatment or how to treat leeches]. Feniks, Rostov (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 506–511
doi: 10.15421/021778

Species-specific response to acute hyperthermal stress of *Haworthia* (Asphodelaceae) plants

N. V. Nuzhyna, M. M. Gaidarzhy, Y. V. Aviekin

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 04.10.2017
Received in revised form 09.11.2017
Accepted 13.11.2017

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Symona Petlyury st., 1, Kyiv, 01032, Ukraine.
Tel. +38-067-339-97-73
E-mail: nuzhynan@gmail.com

Nuzhyna, N. V., Gaidarzhy, M. M., & Aviekin, Y. V. (2017). Species-specific response to acute hyperthermal stress of Haworthia (Asphodelaceae) plants. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 506–511. doi:10.15421/021778

An increase in environmental temperature is one of the most common stress factors for plant organisms. The study of the plants' adaptation to stress factors remains extremely important and relevant. This article presents the results of a acute short-term influence of hyperthermia on species of two subgenera of the genus *Haworthia* Duval. We investigated the different levels of antioxidant protection and damage degree of the members of two subgenera of the genus *Haworthia* at the biochemical level, measuring the lipid peroxidation, superoxide dismutase and peroxidase activities, total flavonoid content and content of photosynthetic pigments with a spectrophotometer. To determine the drought tolerance of plants, the water supply of tissues, water shortage and loss of water after an hour of wilting were measured. The values for different groups were compared by ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test. The studied plants were warmed in a thermostat at temperatures of 40 °C and 50 °C for three hours under the conditions of natural light. The control group of plants was kept at 25 °C. The research has shown that *H. attenuata*, *H. limifolia* and *H. cymbiformis* are characterized with the increase of concentration of malonic dialdehyde at 40 °C and 50 °C, but a significant difference of values wasn't received,which indicates the relative resistance of these plants to the influence of high temperatures. The sharp increase of temperature causes the highest level of lipid peroxidation in *H. parksiana* plants, along with which, warming to 50 °C launches a mechanism of activation and synthesis of superoxide dismutase and flavonoids for the plants. The studied species of the subgenus *Haworthia* have a photosynthetic system relatively resistant to thermal stress in comparison to the subgenus *Hexangulares*. *H. limifolia* plants have a slight inhibition of photosynthesis. The adaptation of *H. cymbiformis* to thermal stress is due to the strategy of accumulation of a pool of active enzymes, superoxide dismutase, peroxidase, flavonoids under normal conditions and the activation of new peroxidase enzymes as a result of stress. *H. attenuata* is characterized by activation of new enzymes of superoxide dismutase and peroxidase under stress. It was found that *H. cymbiformis* and *H. attenuata* are more heat resistant in comparison with the other two species. Acute short-term hyperthermia has a different influence on the antioxidant system of different species of *Haworthia*. *H. limifolia* has the highest drought tolerance, *H. cymbiformis* has the lowest, the other two species from different subgenera have similar drought tolerance indicators. We did not find any dependence of the mechanisms of action of the antioxidant system under hyperthermia on the type of adaptation to arid conditions at the anatomical level in plants of different subgenera of the genus *Haworthia*.

Keywords: antioxidant system; superoxide dismutase; peroxidase; malone dialdehyde; pigments; drought resistance

Видоспецифічна відповідь на різкий високотемпературний стрес у рослин роду *Haworthia* (Asphodelaceae)

Н. В. Нужина, М. М. Гайдаржи, Я. В. Авєкін

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Підвищення температури навколишнього середовища – один із найпоширеніших факторів стресу для організму рослин. Вивчення адаптації рослин до стресових факторів залишається надзвичайно важливим і актуальним. У статті наведено результати різкого короткотривалого впливу гіпертермії на окремі види двох підродів роду *Haworthia* Duval. Досліджено різні ланки антиоксидантного захисту та ступінь пошкодження представників двох підродів роду *Haworthia* на біохімічному рівні, а також посухостійкість цих рослин. Дослідні рослини нагрівали в термостаті за температури 40 та 50 °С протягом трьох годин в умовах природного освітлення. Контрольну групу рослин тримали за 25 °С. Різке підвищення температури викликає найбільше перекисне окиснення ліпідів у рослин *H. parksiana*, разом із тим під час прогрівання до 50 °С вмикається механізм активації та синтезу супероксиддисмутази та флавоноїдів. Досліджені види підроду *Haworthia* мають стійку до температурного стресу фотосинтетичну систему, ніж види підроду *Hexangulares*. У *H. limifolia* відбувається незначне пригнічення фотосинтезу. Адаптація *H. cymbiformis* до температурного стресу відбувається за рахунок стратегії накопичення за нормальних умов пулу активних ферментів супероксиддисмутази, пероксидази, флавоноїдів, а також активації пероксидази внаслідок стресу.

Для *H. attenuata* характерне зростання активності ферментів супероксиддисмутази та пероксидази внаслідок стресу. *H. cymbiformis* і *H. attenuata* більш жаростійкі порівняно з двома іншими видами, а посухостійкість найвища у *H. limifolia*, а найнижча у *H. cymbiformis*, інші два види з різних підродів мають подібні між собою показники посухостійкості. Не виявлено залежності механізмів дії антиоксидантної системи за гіпертермії від типу пристосування до аридних умов на анатомічному рівні в рослин різних підродів роду *Haworthia*.

Ключові слова: антиоксидантна система; супероксиддисмутаза; пероксидаза; малоновий діальдегід; пігменти; посухостійкість

Вступ

Упродовж останніх десятиліть в усьому світі спостерігається стійка тенденція до підвищення середньорічних температур повітря (Hansen et al., 1999; Jones and Moberg, 2003; Bita and Gerats, 2013). Погодно-кліматичні умови стають все більш нестабільними. Гіпертермія, а також інші абіотичні стресові чинники, як відомо, викликають окисний стрес у різних рослин (Hernandez et al., 2000; Mittler et al., 2004). Супероксиддисмутаза, каталаза та пероксидаза – перша ланка захисту клітин від активних форм кисню (Grant, 2000; Caverzan et al., 2012; Mansoor and Naqvi, 2013). Якщо активність ферментів антиоксидантної системи зростає, можна припустити, що адаптація відбувається успішно. Висока чутливість фотосинтетичного апарату рослин також використовується як маркер негативного впливу факторів довкілля (Chen et al., 2012; Ashraf and Harris, 2013; Martinazzo et al., 2013). Дослідження адаптивних механізмів проводили в основному на сільськогосподарських культурах (Sunkar, 2006; Rai et al., 2015; Rodríguez et al., 2015), у той час як сукулентам не приділяли достатньої уваги (Ardelean, 2014). Сукуленти, як правило, характеризуються високою посухо- та теплостійкістю. Проте представники різних родів мають різні критичні температури та методи адаптації до високих температур і посушливих умов і особливо чутливі до негативних чинників на ранніх стадіях розвитку (Zutta et al., 2011; Rosas et al., 2012). Сукулентні рослини роду *Haworthia* Duval (Asphodelaceae) – ендеміки Південної Африки, де вони поширені на кам'янистих ґрунтах у саванах, на схилах гір і горбів (Eggli, 2001). Більшість таксонів включені до Червоного списку рослин Південної Африки та мають різні категорії рідкісності (Red List of South Africa Plants, 2009). Рід нараховує близько 200 видів, різновидів і форм, поділених на три підроди (Bayer, 1999). В основу поділу рослин на підроди покладена морфологічна будова квітки, але наші дослідження показали, що рослини двох підродів (*Haworthia* та *Hexangulares*) характеризуються також відмінними пристосуваннями до аридних умов на анатомічному рівні (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015). Тому мета цієї статті – виявити біохімічні зміни представників роду *Haworthia*, які відбуваються в результаті впливу короткочасної гіпертермії, проаналізувати відмінності роботи антиоксидантної системи за різних анатомічних пристосувань, що дозволять виявити особливості адаптації конкретних видів, а також роду в цілому.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкти досліджень – чотири рідкісні види з двох підродів роду *Haworthia* з Колекції сукулентних рослин Ботанічного саду імені академіка О. В. Фоміна (табл. 1).

В експерименті використано листя середнього ярусу дворічних рослин, вирощених в оранжерейних умовах. Дослідження проводили у другій декаді травня, коли денна температура повітря у приміщенні з рослинами становила +23…+25 °С, на не пристосованих до високих температур рослинах. Дослідні рослини у горщиках із землею прогрівали у повітряному термостаті за температури +40 та +50 °С протягом трьох годин. Температуру в термостаті контролювали термометром, розміщеним на рівні рослин. Передня стінка термостата була скляною, рослини утримували за природного освітлення. Ми не використовували додаткового освітлення під час термообробки, оскільки відомі факти про посилення інгібувальної дії високих температур на фотосинтетичну систему за яскравого освітлення (Foyer and Harbinson, 1994). Контрольну групу рослин витримували за температури +25 °С. Біохімічні дослідження проводили за допомогою спектрофотометра СФ-2000 (Spectr, Russia). Перекисне окиснення ліпідів установлювали за вмістом малонового діальдегіду, визначеного за кольоровою реакцією з тіобарбітуровою кислотою, заснованою на утворенні в кислому середовищі забарвленого триметинового комплексу, що має характерний спектр поглинання з максимумом 533 нм. Кількість малонового діальдегіду виражали в мкмоль/г сирої маси (Kumar and Knowles, 1993).

Таблиця 1
Ступінь рідкісності експериментальних рослин

Підрід	Вид	Ступінь рідкісності
Haworthia	*Haworthia cymbiformis* (Haworth) Duval	LC
	H. parksiana v. Poellnitz.	CR
Hexangulares	*H. attenuata* Haworth	EN
	H. limifolia Marloth	VU

Активність супероксиддисмутази визначали за допомогою методу, заснованого на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали, що надходять із реакції фотоокиснення рибофлавіну за 560 нм. Активність супероксиддисмутази виражали у відносних одиницях активності на 1 мг білка (Giannopolitis and Ries, 1977). Вміст білка визначали методом Sibgatullina et al. (2011) за 595 нм, у мг/г сирої речовини.

Активність пероксидази визначали за швидкістю реакції окиснення бензидину до утворення синього продукту його окиснення за присутності H_2O_2 та пероксидази за 590 нм. Активність пероксидази виражали у відносних одиницях активності на 1 г сухої маси (Sharifi and Ebrahimzadeh, 2010).

Сумарний вміст флавоноїдів у перерахунку на рутин і абсолютно суху масу у відсотках визначали за методикою Trineeva et al. (2014) за довжини хвилі 410 нм.

Пігменти екстрагували з рослинного матеріалу 80% ацетоном і визначали спектрофотометричним методом за 663, 646, 470 нм (Lichtenthaller, 1987). Вміст пігментів визначали з розрахунку на масу сирої речовини.

Із метою визначення посухостійкості рослин за методикою Giang and Tokhtar' (2011) вимірювали оводненість тканин, водний дефіцит і втрату води за одну годину в'янення.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Prism GraphPad 6 (GraphPad Software, Inc., USA, 2012). Достовірність відмінностей результатів визначали за ANOVA.

Результати

Визначення рівня перекисного окиснення ліпідів важливе для розуміння розвитку реакції рослинних клітин на стрес. Накопичення малонового діальдегіду свідчить про низьку стійкість рослин до несприятливих зовнішніх умов. Для *H. attenuata*, *H. limifolia* та *H. cymbiformis* характерна тенденція до збільшення концентрації малонового діальдегіду за +40 та +50 °С, однак достовірної різниці значень не отримано, що вказує на відносну стійкість до різкої дії високих температур цих рослин. У *H. parksiana* достовірно збільшилась кількість малонового діальдегіду, особливо за +40 °С, що, ймовірно, можна пояснити малоефективною роботою антиоксидантної системи у рослин цього виду за незначного збільшення температури (рис. 1*а*).

Дія високої температури викликає зниження активності супероксиддисмутази в усіх досліджених видів рослин. У *H. cymbiformis* за нормальних умов формується найпотужніший запас супероксиддисмутази (рис. 1*б*), що дає можливість швидкої реакції

на короткотривалу стресову дію, тобто цей фермент відіграє значну роль в адаптивних реакціях цих рослин. Найменша кількість супероксиддисмутази за нормальних умов у *H. parksiana* відповідає найсильнішому перекисному окисненню ліпідів до та після різкого прогрівання до +40 ºС. У цього виду за +50 ºС перекисне окиснення ліпідів виявлене меншою мірою, ніж за прогрівання +40 ºС, що, ймовірно, пов'язано з активацією супероксиддисмутази. Тобто за +40 ºС йде використання наявного пулу супероксиддисмутази, а за інтенсивнішого стресового чинника (+50 ºС) запускається активація або синтез цих антиоксидантних ферментів. Досліджуючи пероксидазу, можна відмітити значне зростання її активності в *H. cymbiformis* і *H. attenuata*, що вказує на потужну антиоксидантну дію за гіпертермії (рис. 1*в*). Причому активність пероксидази у цих видів за +40 ºС вища, ніж за +50 ºС. Для *H. cymbiformis*, як і у випадку з супероксиддисмутазою, характерний найбільший пул пероксидази в нормі (порівняно з іншими дослідженими видами), з подальшим зростанням активності ферменту за помірного підвищення температури та, ймовірно, збалансованим утворенням – використанням даного ферменту за інтенсивного збільшення температури (+50 ºС). На відміну від інших досліджених видів, у *H. limifolia* та *H. parksiana* пероксидаза відіграє незначну роль у захисній реакції на температурний стрес.

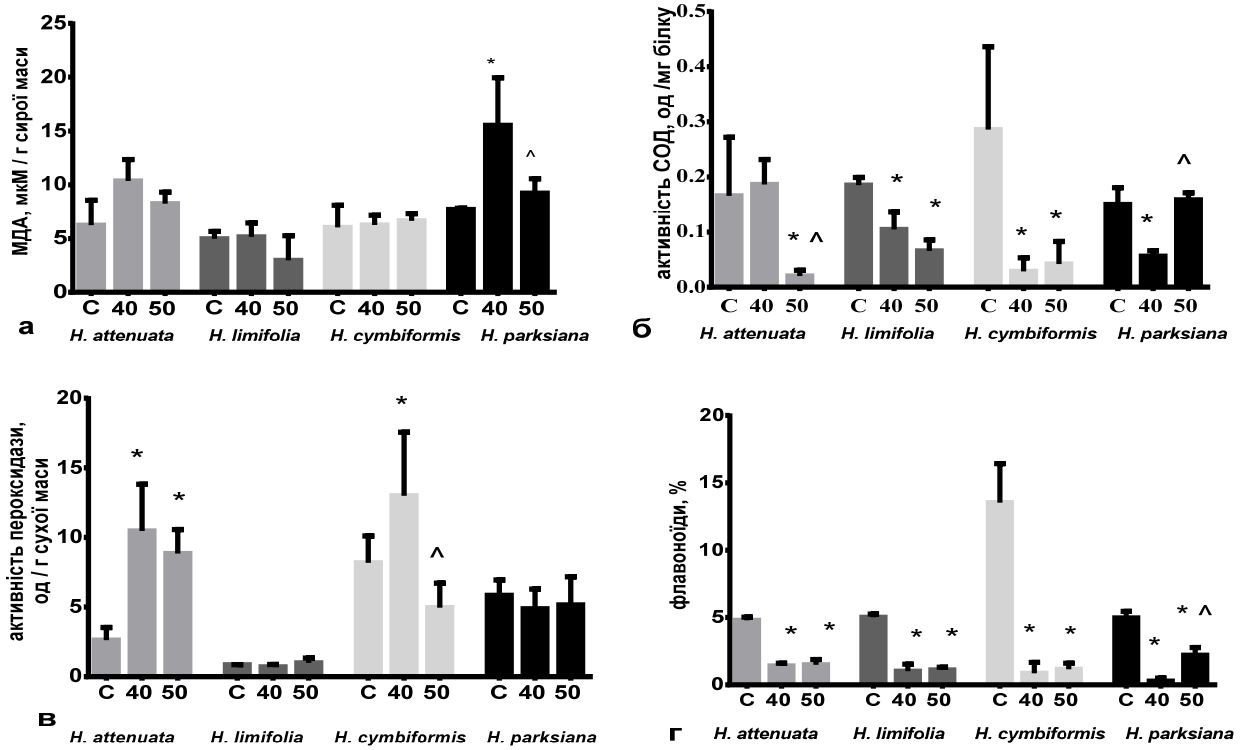


Рис. 1. Стан антиоксидантної системи за гіпертермії (X ± SD, n = 6):
* – P < 0,05 відносно контролю, ^ – відносно групи +40 ºС; МДА – малоновий діальдегід, СОД – супероксиддисмутаза

Різке прогрівання рослин значно зменшувало кількість флавоноїдів у всіх дослідних групах, можливо, за рахунок їх руйнування. За отриманими даними, найбільше флавоноїдів у нормі накопичується у *H. cymbiformis* (рис. 1*г*), що забезпечує цим рослинам певний антиоксидантний захист, особливо на перших етапах температурного стресу. Певне збільшення кількості флавоноїдів за +50 °С порівняно з +40 °С у *H. parksiana*, можливо, свідчить про включення додаткового захисного механізму за дії інтенсивнішого стресу.

Короткотривале прогрівання рослин *H. attenuata* за +40 °С викликає підвищення кількості хлорофілів і каротиноїдів (рис. 2*а*), що, можливо, є адаптивною відповіддю на таку зміну температурного режиму. За прогрівання +50 °С спостерігається збільшення кількості лише каротиноїдів порівняно з контролем. Такі показники свідчать про досить високу пристосованість рослин даного виду до підвищення температури. Зниження співвідношення хлорофілу *a* до хлорофілу *b* спричинене інтенсивнішим збільшенням кількості останнього (рис. 2*б*).

Іншим чином впливає підвищення температури на пігментну систему *H. limifolia*. Зокрема, прогрівання до +40 °С зумовлює незначне пригнічення фотосинтезу за рахунок зменшення кількості хлорофілів, тоді як за температури +50 °С зменшується також і кількість каротиноїдів, що відображається на показнику відношення суми хлорофілів до каротиноїдів (рис. 3*а*, *б*). Інтенсивніше руйнування хлорофілів *b* пояснює зростання показника співвідношення хлорофілу *a* до хлорофілу *b*. Подібні результати отримано і для представників родини *Cactaceae* Juss. (Nuzhyna et. al., 2016).

За літературними даними, утримання *Opuntia ficus-indica* протягом однієї години за +55 °С повністю інгібувало поглинання CO_2, але повне відновлення цього процесу відбувалося через 60 діб. Спостерігали диференціальну інактивацію фотосистеми I, фотосистеми II і всього ланцюга перенесення електронів; фотосистема I виявилась найвитривалішою за +55 °С і відновилася найшвидше (через 45 діб) (Chetti and Nobel, 1988).

Картина впливу короткотривалого температурного стресу на рослини *H. cymbiformis* в цілому подібна до такої у *H. limifolia*, відрізняється лише наявністю тенденції до зменшення кількості каротиноїдів уже за температури +40 °С, що відображається на показнику (хлорофіл *a* + хлорофіл *b*) / каротиноїди (рис. 4). Співвідношення хлорофілу *a* до хлорофілу *b*, а також суми хлорофілів до каротиноїдів достовірно не змінюється після короткотривалого високотемпературного стресу.

Для рослин *H. parksiana*, подібно *H. attenuata*, характерне збільшення або тенденція до збільшення кількості основних пігментів фотосинтетичної системи за короткотривалої дії температури +40 °С, а також +50 °С (рис. 5*а*). Однак збільшення адаптивної відповіді за рахунок каротиноїдів спостерігається лише за +40 °С, що зумовлює достовірну відмінність між співвідношенням суми хлорофілів до каротиноїдів за короткотривалих дій температур різної інтенсивності. У *H. parksiana* за температури +40 °С стабільним залишилось співвідношення хлорофілу *a* до хлорофілу *b* та (хлорофіл *a* + хлорофіл *b*) / каротиноїди (рис. 5*б*). Дані співвідношення – критерії фотосинтетичної активності, їх використовують як маркери стійкості до стресових умов.

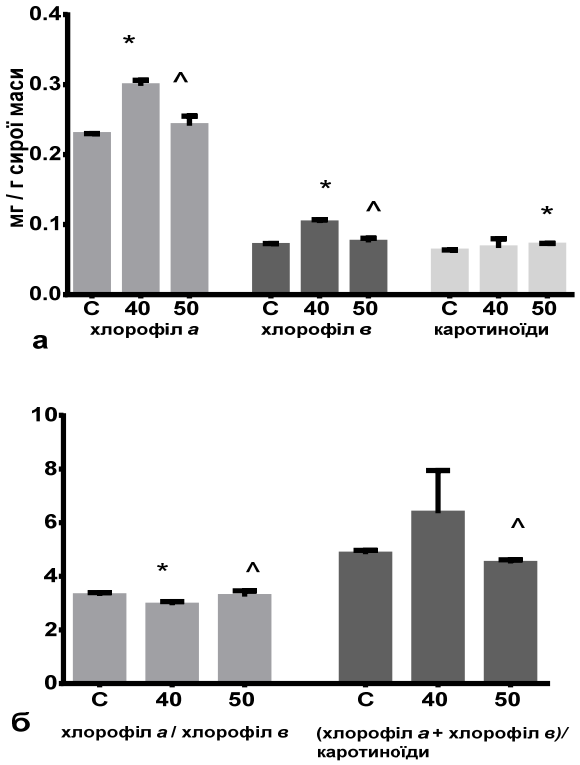


Рис. 2. Зміни пігментного складу *H. attenuata* після впливу високих температур: * – P < 0,05 відносно контрольної групи, ^ – P < 0,05 відносно +40 °C

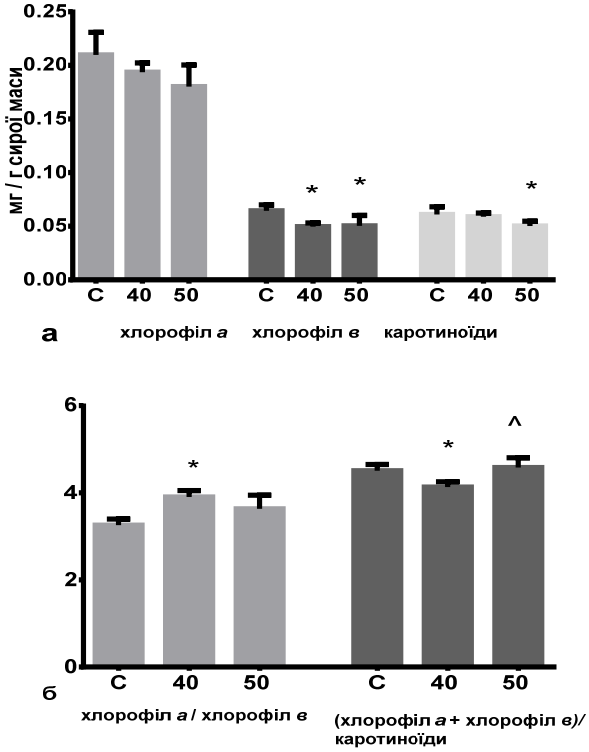


Рис. 3. Зміни пігментного складу *H. limifolia* після впливу високих температур: * – P < 0,05 відносно контрольної групи, ^ – P < 0,05 відносно +40 °C

Як відомо, вміст хлорофілів у листку відображає пристосованість рослини до певної інтенсивності освітлення. Досить низький вміст пігментів у нормі та дослідних групах *H. cymbiformis* можна пояснити найменшою кількістю шарів хлоренхіми серед розглянутих видів (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015), що вказує на більшу світлолюбність рослин цього виду. Кількісні показники фотосинтетичних пігментів найбільші у *H. attenuata*, це вказує на порівняно більшу тіньовитривалість.

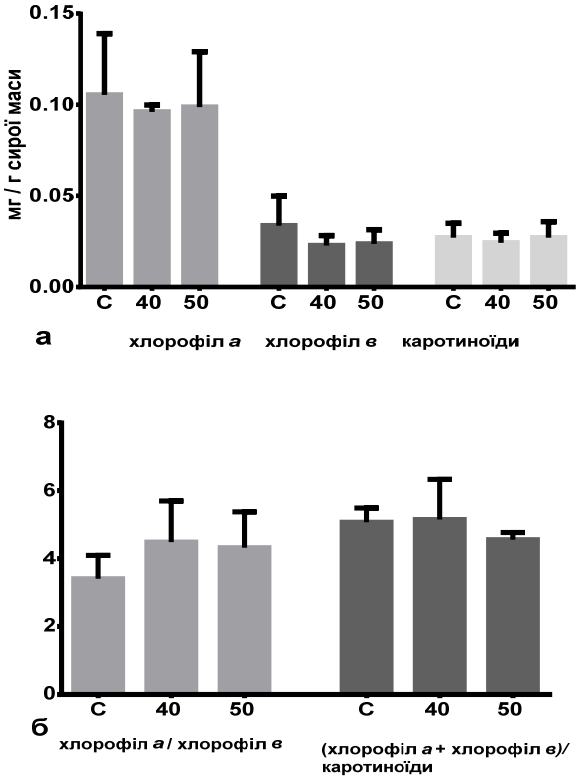


Рис. 4. Зміни пігментного складу *H. cymbiformis* після впливу високих температур: * – P < 0,05 відносно контрольної групи, ^ – P < 0,05 відносно +40 °C

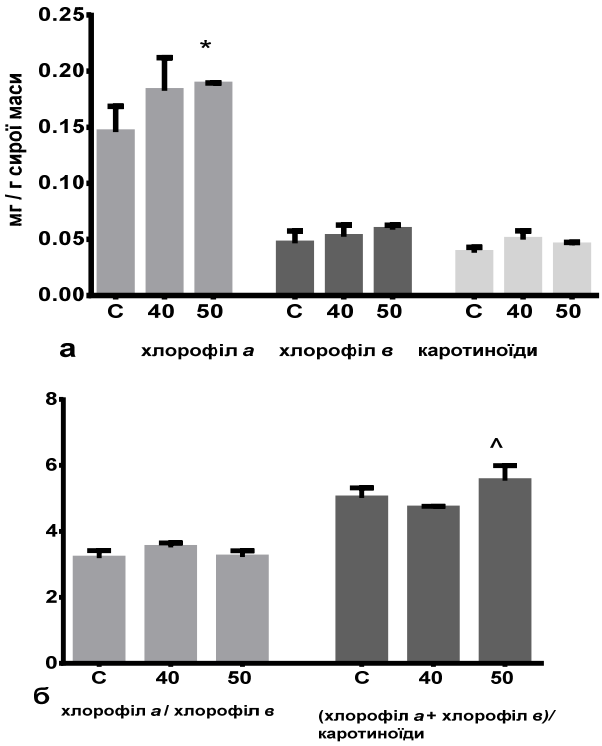


Рис. 5. Гістограма зміни пігментного складу *H. parksiana* після впливу високих температур: * – P < 0,05 відносно контрольної групи, ^ – P < 0,05 відносно +40 °C

Дослідження посухостійкості рослин роду *Haworthia* показують високий вміст води в листках, що характерно для суку-

лентних рослин (табл. 2). Найбільша оводненість листків спостерігається у *H. cymbiformis*. Дефіцит води характеризує недонасиченість рослин водою. Цей показник найвищий у *H. parksiana*. Здатність утримання води використовують як основний параметр стійкості рослин до посухи. Її оцінюють за швидкістю вивільнення води вегетативними органами. У нашому дослідженні *H. cymbiformis* показує максимальне значення втрати води за годину в'янення.

Таблиця 2
Посухостійкість представників роду *Haworthia* (x ± SD, n = 10)

Види	Втрата води за 1 годину в'янення, %	Оводненість тканин, %	Водний дефіцит, %
H. attenuata	7,53 ± 2,9	89,02 ± 1,2	6,51 ± 1,1
H. limifolia	4,32 ± 0,7	88,12 ± 1,1	5,88 ± 0,8
H. cymbiformis	22,29 ± 4,4	95,41 ± 1,3	5,35 ± 2,3
H. parksiana	7,44 ± 4,6	89,15 ± 2,1	6,88 ± 1,4

Обговорення

Різке підвищення температури викликає найбільше перекисне окиснення ліпідів у рослин *H. parksiana*. Рослини цього виду мають відносно тонку епідерму та кутикулу (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015), що, можливо, є однією з передумов низької терморезистентності досліджуваних рослин. Разом із тим, у них під час прогрівання до +50 °C вмикаються механізми адаптації на рівні супероксиддисмутази та флавоноїдів. Різкий вплив гіпертермії на рослини *H. limifolia*, як і на рослини інших дослідних видів, викликає пригнічення активності супероксиддисмутази та зменшення кількості флавоноїдів. Це підтверджується літературними даними стосовно інших рослин (Smirnoff, 1993; Zhang and Kirkham, 1994). За літературними даними, зниження активності супероксиддисмутази внаслідок стресу пов'язане саме з денатурацією цього ферменту (Barkasdjieva et al., 2000; Rizhsky et al., 2002). Деякі дослідники спостерігали різноспрямовані реакції супероксиддисмутази на тепловий стрес різної інтенсивності у рослин різних видів, що вказує на різні способи адаптації (Panda and Khan, 2004; He, 2010; Harsha, 2016). У *H. attenuata* та *H. cymbiformis* внаслідок різкого підвищення температури спостерігається підвищення активності пероксидази. Підвищення активності пероксидази у відповідь на високотемпературну обробку також підтвердили інші дослідники (He, 2010; Ardelean et al., 2014). Адаптація *H. cymbiformis* до температурного стресу відбувається за рахунок стратегії накопичення за нормальних умов пулу активних супероксиддисмутази, пероксидази, флавоноїдів, а також активації пероксидази внаслідок стресу. Таким чином, *H. cymbiformis* та *H. attenuata* краще адаптовані до різкої зміни температури на рівні антиоксидантної системи порівняно з двома іншими видами, хоча і належать до різних підродів. Тому не можна стверджувати, що тип пристосування до аридних умов на анатомічному рівні у рослин підроду *Haworthia* (збільшення накопичення води, наявності «вікон», продихи меншого розміру та тонша зовнішня стінка клітин епідерми) чи тип пристосування, характерний представникам підроду *Hexangulares* (зменшення транспірації, наявність сосочків і потовщена епідерма та її зовнішня клітинна стінка) (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015) ефективніший. Також не виявлено односпрямованого пристосування на біохімічному рівні до температурного стресу за односпрямованої адаптації на анатомічному рівні.

Дослідження фотосинтетичної системи рослин – одна з важливих ланок у напрямку розуміння їх адаптації до температурних стресових факторів (Zutta et al., 2011). Пігментний склад фотосинтетичного апарату формується залежно від генотипу, екологічних умов і періоду розвитку рослини (Nepliy et al., 2013). На представниках Cactaceae показано деструктивні зміни в хлоренхімі вже за одногодинного прогрівання +46 °C (Didden-Zopfy and Nobel, 1982). Загартовування ж рослин шляхом поступового підвищення денної та нічної температури повітря значно збільшило їх жаростійкість (Didden-Zopfy and Nobel, 1982; Chetti and Nobel, 1988). Тому саме різкі температурні зміни небезпечні для цих рослин.

Важливо зазначити, що пігментна система у *H. attenuata* краще пристосована до різких температурних коливань, порівняно з іншими видами, за рахунок вмикання адаптивних механізмів. У *H. parksiana* захисна реакція вмикається лише за +50 °C, а за +40 °C достовірних змін не відбувається. Разом із цим, кількість світлозбиральних пігментів у *H. cymbiformis* достовірно не змінюється, що теж свідчить про певну стабільність системи до дії гіпертемії. Лише у *H. limifolia* відбувається незначне пригнічення фотосинтезу. Тобто можна говорити про більшу інертність фотосинтетичної системи до короткотривалої дії високих температур рослин підроду *Haworthia* відносно підроду *Hexangulares*. Така стійкість може бути пояснена більшою кількістю продихів (а отже, кращою транспірацією та охолодженням листкової пластинки) у видів цього підроду, а також наявністю трихом та «вікон» (що також зменшує перегрівання) у *H. parksiana* (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015).

H. cymbiformis показує максимальне значення втрати води за годину в'янення, що відбувається, зокрема, через найбільшу серед досліджуваних видів кількість продихів, і, отже, вищу втрату води під час транспірації за підвищеної температури, а також найтоншу зовнішню клітинну стінку епідерми (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015). Аналізуючи анатомічну будову листків, можна виявити особливості, які впливають на посухостійкість рослин найбільше. Кутикула мало проникна для води та газу, тому захищає листки від надмірного випаровування. Згідно з нашими попередніми дослідженнями (Nuzhyna та Gaydarzhy, 2015), найкраще розвинена зовнішня клітинна стінка епідерми (у тому числі кутикула) у *H. limifolia*, яка, поряд із малою щільністю продихів, зумовлює найменшу втрату води за годину в'янення.

Висновки

За нашими даними, *H. cymbiformis* та *H. attenuata* жаростійкіші порівняно з двома іншими видами. Різка короткотривала гіпертермія впливає по-різному на антиоксидантну систему різних видів хавортій. Досліджені види підроду *Haworthia* мають стійкішу до температурного стресу фотосинтетичну систему ніж види підроду *Hexangulares*.

Посухостійкість найвища у *H. limifolia* та найнижча у *H. cymbiformis*, інші два види з різних підродів мають подібні між собою показники посухостійкості. Показники посухостійкості та стан фотосинтетичної системи за гіпертермії більше залежать від анатомічної структури, ніж механізм дії антиоксидантної системи.

References

Ardelean, M., Cachita-Cosma, D., Ardelean, A., Ladasius, C., & Mihali, V. C. (2014). The effect of heat stress on hyperhydricity and guaiacol peroxidase activity (GPOX) at the foliar lamina of *Sedum telephium* L. ssp. *maximum* (L.) Krock. Vitroplantlets. Analele Ştiinţifice ale Universităţii „Al. I. Cuza" Iaşi s. II a. Biologie vegetală, Scientific Annals of „Alexandru Ioan Cuza" University of Iasi, Biology Series. 60(2), 21–31.

Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. Photosynthetica, 51(2), 163–190.

Barkasdjieva, N. T, Chrostov, K. N., & Christina, K. N. (2000). Effect of calcium and zinc on the acivity and thermostability of superoxide dismuatse. Biologia Plantarum, 43, 73–78.

Bayer, B. (1999). Haworthia revisied. A revision of genus. Umdaus Press, Pretoria.

Bita, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. Frontiers in Plant Science, 4, 273–285.

Caverzan, G. Passaia, S., Rosa, S. B., Barcellos, R., Ribeiro, W. C., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and Molecular Biology, 35(4), 1011–1019.

Chen, W. R., Zheng, J. S., Li, Y. Q., & Guo, W. D. (2012). Effects of high temperature on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, chloroplast ultrastructure, and antioxidant activities in fingered citron. Russian Journal of Plant Physiology, 59(6), 732–740.

Chetti, M. B., & Nobel, P. S. (1988). Recovery of photosynthetic reactions after high-temperature treatments of a heat-tolerant cactus. Photosynthesis Research, 18(3), 277–286.

Didden-Zopfy, B., & Nobel, P. S. (1982). High temperature tolerance and heat acclimation of *Opuntia bigelovii*. Oecologia, 52(2), 176–180.

Eggli, U. (2001). Illustrated Handbook of succulent plants. Monocotyledones. Press: Springler-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Foyer, C. H., & Harbinson, J. (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants. CRC Press, Boca Ratón, 1–42.

Giang, D., & Tokhtar', V. K. (2011). Issledovanie zasuhoustoychivosti perspektivnyih vidov *Momordica charantia* L. i *M. balsamina* L. (Cucurbitaceae) [Drought resistance study of respective for introduction of *Momordica charantia* L. and *M. balsamina* L. Species (Cucurbitaceae)]. Nauchnyie Vedomosti. Seriya Estestvennyie Nauki, 9, 43–47 (in Russian).

Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 2, 309–314.

Grant, J. J. (2000). Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiology, 124, 21–29.

Hansen, J., Ruedy, R., Glascoe, J., & Sato, M. (1999). GISS analysis of surface temperature change. Journal of Geophysical Research, 104, 30997–31022.

Harsh, A., Sharma, Y. K., Joshi, U., Rampuria, S., Singh, G., Kumarb, S., & Sharma, R. (2016). Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). Annals of Agricultural Sciences, 61(1), 57–64.

He, Y., & Huang, B. (2010). Differential responses to heat stress in activities and isozymes of four antioxidant enzymes for two cultivars of kentucky bluegrass contrasting in heat tolerance. Journal of the American Society for Horticular Science. 135(2), 116–124.

Hernandez, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., & Sevilia, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant Cell and Environment, 23, 583–862.

Jones, P. D., & Moberg, A. (2003). Hemispheric and large-scale surface air temperature variations: An extensive revision and an update to 2001. Journal of Climate, 16, 206–223.

Kumar, G. N. M., & Knowles, N. R. (1993). Changes in lipid peroxidation and lipolitic and free radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. Plant Physiology, 102, 115–124.

Lichtenthaller, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148, 350–382.

Mansoor, S., & Naqvi, F. N. (2013). Effect of heat stress on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. African Journal of Biotechnology, 12(21), 3196–3203.

Martinazzo, E. G., Ramm, A., & Bacarin, M. A. (2013). The chlorophyll a fluorescence as an indicator of the temperature stress in the leaves of *Prunus persica*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 24(4).

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science, 9, 490–498.

Nepliy, L., Babayants, O., Molodchenkova, O., & Lyashuk, N. L. (2013). Vplyv VZhKYa na kil'kisnyy vmist khlorofiliv, karotynoyidiv ta zahal'nykh tsukri u lystkakh ozymoyi pshenytsi v pivdennomu stepu Ukrayiny [Influence of HPLC on the quantitative content of chlorophylls, carotenoids and common sugars in leaves of winter wheat in the Southern Steppe of Ukraine]. Visnyk Kyyivs'koho Natsional'noho Universytetu Ukrayiny. Seriya Biolohiya], 63, 29–33. (in Ukrainian).

Nuzhyna, N. V., & Gaydarzhy, M. N. (2015). Comparative characteristics of anatomical and morphological adaptations of plants of two subgenera *Haworthia* Duval (Asphodelaceae) to arid environmental conditions. Acta Agrobotanika, 68(1), 23–31.

Nuzhyna, N., Bahlay, K., & Avyekin, Y. (2016). Dynamika pihmentnoho kompleksu *Echinocactus grusonii* Hildm., *Mammillaria bocasana* Pos., *Aylostera flavistyla* Ritt. za umov hipertermiyi [Dynamics of the pigment complex *Echinocactus grusonii* Hildm., *Mammillaria bocasana* Pos., *Aylostera flavistyla* Ritt. under hyperthermia]. Visnyk Kyyivskogo Universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Introduktsiya ta Zberezhennya Roslynnoho Riznomanittya, 34, 66–68 (in Ukrainian).

Panda, S. K., & Khan, M. H. (2004). Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2, 115–118.

Rai, N., Rai, K. K., Tiwari, G., & Singh, P. K. (2015). Changes in free radical generation, metabolites and antioxidant defense machinery in hyacinth bean (*Lablab purpureus* L.) in response to high temperature stress. Acta Physiologiae Plantarum, 37(3), 46–57.

Red List of South Africa Plants. Pretoria, (2009).

Rizhsky, L., Hongjian, L., Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiology, 130, 1143–1151.

Rodríguez, V. M., Soengas, P., Alonso-Villaverde, V., Sotelo, T., Cartea, M. E., & Velasco, P. (2015). Effect of temperature stress on the early vegetative development of *Brassica oleracea* L. BMC Plant Biology, 15, 145.

Rosas, U., Zhou, R. W., Castillo, G., & Collazo-Ortega, M. (2012). Developmental reaction norms for water stressed seedlings of succulent cacti. PLoS ONE, 7(3).

Sharifi, G., & Ebrahimzadeh, H. (2010). Changes of antioxidant enzyme activities and isoenzyme profiles during *in vitro* shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Acta Biologica Hungarica, 61(1), 73–89.

Sibgatullina, G. V., Haertdinova, L. R., Gumerova, E. A., Akulov, A. N., Kostyukova, Y. A., Nikonorova, N. A., & Rumyantsev, N. I. (2011). [Metody opredelenia redox-statusa kul'tiviruemyh kletok rasteniy] Methods for determining the redox status of cultured plant cells. Kazan Federal University, Kazan (in Russian).

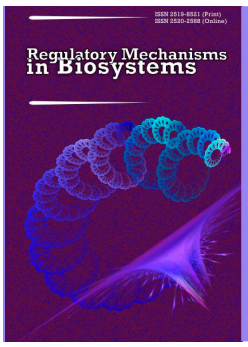
Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in response to water deficit and dessication. New Phytology, 125, 27–58.

Sunkar, R. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. Plant Cell, 18, 2051–2065.

Trineeva, O. V., Slivkin, A. I., & Voropayeva, S. (2014). Razrabotka i validatsiya metodiki kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v listyah krapivyi dvudomnoy. [Development and validation of a technique of quantitative definition flavonoids in nettle leaves a two-blast furnace]. Vestnik VGU, Himiya, Biologiya, Farmatsiya, 1, 138–144 (in Russian).

Zhang, J., & Kirkham, M. (1994). Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. Plant Cell Physiology, 35, 785–791.

Zutta, B. R., Nobel, P. S., Aramians, A. M., & Sahaghian, A. (2011). Low-and high-temperature tolerance and acclimation for chlorenchyma versus meristem of the cultivated cacti *Nopalea cochenillifera*, *Opuntia robusta*, and *Selenicereus megalanthus*. Journal of Botany, Article ID 347168.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 512–520
doi: 10.15421/021779

The role of mitochondria in the myocardium of senescent *Meriones unguiculates*

Y. Potapenko, O. Dyomshina, G. Ushakova

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 04.10.2017
Received in revised form 10.11.2017
Accepted 13.11.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-607-52-83
E-mail: olga-d2009@ukr.net

Potapenko, Y., Dyomshina, O., & Ushakova, G. (2017). The role of mitochondria in the myocardium of senescent Meriones unguiculates. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 512–520. doi:10.15421/021779

According to the mitochondrial theory of aging, changes in the functional state of mitochondria, which lead to excessive formation of active forms of oxygen, are the main factor in the development of age changes in organs and tissues of the whole organism. The assessment of the mitochondria state of the heart of senescent gerbils (Mongolian Gerbilia, *Meriones unguiculates* Milne-Edwards, 1867). It is proved that the aging of the heart is preceded by the appearance of dysfunction in mitochondria. The disturbance of metabolic processes in the myocardium of gerbils over the age of two years was established, which was accompanied by activation of oxidative stress by increasing the concentration of TBK-active compounds. An increase in the concentration of cytochrome C in cytosol has been shown due to the destructive effects of oxidized products on the outer membrane of mitochondria and enhancement of its permeability. The violation of bioenergetic processes, increase of the anaerobic respiration and the accumulation of lactate and unoxidative metabolites, which increases oxidative stress and cell damage, are determined. We established that for gerbils the critical age for senescence is 24 months. Major metabolic changes in the heart occur mostly at this age. This is marked by activation of prooxidants formation, proteolytic processes (decrease in total protein concentration) and inhibition of aminotransferase activity in cytosol. The switching of metabolic processes in the mitochondria of the heart with the participation of aminotransferases has been registered: increased activity of the mitochondrial isoenzyme alanine aminotransferase and reciprocal reduction of aspartate aminotransferase. After two years of age in the experimental gerbils the intensification of adaptive processes was established: activation of catalase, γ-glutamyltransferase, relative restoration of the activity of alanine and aspartate aminotransferase, thus maintaining the processes of the vital activity of the whole organism, but at a new metabolic level. With age, irreversible damage to cardiomyocytes occurs, which gradually lose the ability to convert lactate, resulting in its increase, and the processes of its utilization are inhibited. The results confirm the key role of mitochondria in the process of aging of the myocardium. However, when gerbils reach the 36 months of age the metabolic disturbances in the myocardium reach their peak, resulting in large-scale cell damage.

Keywords: TBK-active products; superoxide dismutase; catalase; cytochrome C; aminotransferases; lactate dehydrogenase; γ-glutamyltransferase

Роль мітохондрій міокарда піщанок упродовж фізіологічного старіння

Є. О. Потапенко, О. О. Дьомшина, Г. О. Ушакова

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Наведено дані щодо оцінки мітохондрій та біохімічного стану серця монгольських піщанок (Mongolian Gerbilia, *Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867) в умовах старіння. Основний фактор розвитку вікових змін в органах і тканинах цілісного організму – надмірне утворення активних форм оксигену, що провокує зміни функціонального стану мітохондрій, зниження ефективності процесу аутофагії / мітофагії. Старінню серця передують появи дисфункцій у мітохондріях. Установлено порушення метаболічних процесів у міокарді піщанок віком старше двох років, що супроводжувалося активацією окисного стресу за рахунок збільшення концентрації ТБК-активних сполук. Доведено збільшення концентрації цитохрому С у цитозолі внаслідок руйнівного впливу окиснених продуктів на зовнішню мембрану мітохондрій та підвищення її проникності. Визначено порушення біоенергетичних процесів, збільшення частки анаеробного дихання та накопичення лактату й недоокиснених метаболітів, що посилює окисний стрес і пошкодження клітин. Для піщанок переломний вік – 24 місяці. Саме в цьому віці відбуваються основні метаболічні зміни в їхньому серці: активізація утворення прооксидантів, протеолітичних процесів (зниження загальної концентрації протеїну), пригнічення активності амінотрансфераз у цитозолі. Зареєстровано переключення метаболічних процесів у мітохондріях серця за участю амінотрансфераз: збільшення активності мітохондріального ізоензиму аланінамінотрансферази та реципрокне зниження аспартатамінотрансферази. Після дворічного віку у дослідних піщанок установлено посилення адаптаційних процесів: активізація каталази, γ-глутамілтрансферази, відносного відновлення активності аланін- й аспартатамінотрансферази, завдяки чому зберігаються процеси життєдіяльності цілісного організму, але на новому метаболічному рівні. Отримані результати підтверджують головну роль мітохондрій у процесі старіння міокарда. При досягненні віку 36 місяців у міокарді піщанок метаболічні розлади досягають свого піку, що спричинює масштабні пошкодження клітин. Незважаючи на численні дослідження причин старіння серця, участі мітохондрій у даному процесі, біохімічні причини сенесценції потребують подальшого вивчення.

Ключові слова: ТБК-активні продукти; супероксиддисмутаза; каталаза; цитохром С; амінотрансферази; лактатдегідрогеназа; γ-глутамілтрансфераза

Вступ

Старіння – мультифакторний процес, який перебуває під впливом генетики, способу життя та факторів навколишнього середовища, дегенеративний процес, пов'язаний із фізіологічним занепадом, невід'ємна частина життя (Lopez-Otin et al., 2013; Biala et al., 2015; Lakatta, 2015).

Відповідно до мітохондріальної теорії старіння, основний фактор у розвитку вікових змін в органах і тканинах цілісного організму – зміни функціонального стану мітохондрій, що викликає надмірне утворення активних форм оксигену (Judge and Leeuwenburgh, 2007; Marques et al., 2015; Anayt et al., 2017).

Згідно з вільнорадикальною теорією, у процесі старіння відбувається наростання молекулярних пошкоджень мембран і генетичного апарату клітини, послаблення активності захисних механізмів (Josq Maryn-Garcya, 2005; Hayat, 2014; Lekli et al., 2017). Одна з основних причин такого явища – інтенсивна генерація активних форм оксигену. Це викликає збільшення дефектів у функціонуванні антиоксидантної системи, фізіологічно спрямованої проти утворення реакційно активних радикальних сполук (Das et al., 2013; Ikeda et al., 2014; Payne and Chinnery, 2015), і як наслідок, спричиняє накопичення радикалів у тканинах і пошкодження найчутливіших молекул протеїнів, ліпідів, ДНК. А це, у свою чергу, тягне за собою загибель клітин. У процесі старіння організму розвивається стан гіпоксії тканин, що індукує збільшення рівня відновлення компонентів дихального ланцюга та накопичення у тканинах субстратів, коферментів, флавін- і гемовмісних компонентів у відновленому стані. За цих умов надлишок донорів електронів може провокувати їх інтенсивніший витік, що пов'язано з додатковою генерацією активних форм оксигену, роз'єднанням окисного фосфорилювання, підвищенням лактату та, відповідно, розвитком стану ацидозу в тканинах. Таким чином, активація окисних процесів у мітохондріях кардіоміоцитів може викликати патогенез серцево-судинних захворювань (Marzetti et al., 2013; Zhao et al., 2014; Owada et al., 2017).

Продукти перекисного окиснення, які утворюються внаслідок збільшення концентрації активних форм оксигену, викликають глибокі зміни протеїнів, пов'язані з їх окисною деструкцією, зміною конформації (Tosi et al., 2014; Roya et al., 2017). Виходячи з цього, автори виявили у довгоживучих особин низький вміст ненасичених жирних кислот і низький рівень малонового діальдегіду – лізинових і карбоксиметил-лізинових протеїнових похідних у мітохондріях серця та печінки. Такий низький ступінь ненасиченості жирних кислот пов'язаний із генетично детермінованою низькою активністю D_5- і D_6-десатураз (КФ 1.14.99.5) у довгоживучих особин. Показано зв'язок процесів старіння організму та окисної модифікації протеїнів у еритроцитах і фібробластах людини, гепатоцитах (Malathi and Rajamurugan, 2015). У старих еритроцитів збільшена концентрація карбонільних залишків окиснених протеїнів і знижена активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3). У фібробластах донорів відмічено зростання швидкості окиснених протеїнів залежно від віку. Така сама залежність виявлена під час дослідження гепатоцитів щурів різного віку.

Низка дослідників показали, що існує пряма залежність між умістом і активністю антиоксидантних ензимів у організмі та тривалістю життя (Anayt et al., 2017; Lykhatskyi and Fira, 2017). Пропонується гіпотеза, що, можливо, старіння пов'язане зі зниженням ензиматичної активності антиоксидантів. Особливо велика увага приділяється геропротекторній ролі супероксиддисмутази у процесі старіння організму (Das and Muniyappa, 2013). Виявлена позитивна кореляція між високим рівнем антиоксидантного захисту і, зокрема, супероксиддисмутази, і максимальною тривалістю життя. Однак, у той же час, існують абсолютно протилежні відомості, в яких зазначено, що ендогенні ензими-антиоксиданти та окремі низькомолекулярні антиоксиданти негативно корелюють із максимальною тривалістю життя.

Каталаза – один із найважливіших ензимів антиоксидантної системи, який вже при мінімальних кількостях перекису гідрогену проявляє свою активність і таким чином захищає клітину від розвитку окисного стресу (Marni et al., 2013; Serova et al., 2016; Dyomshina et al., 2017). Співавтори (Marques et al., 2015) розглядають каталазу разом із супероксиддисмутазою та непротеїновими тіолами цитоплазми як єдине окисно-відновне середовище клітини. У своїй праці автори стверджують, що активність каталази зменшується у щурів віком 24 місяці на тлі збільшення концентрації непротеїнових тіолів (головним чином представлених глутатіоном). У самців щурів, які регулярно піддавалися фізичному навантаженню, активність каталази у тканині міокарда збільшувалася. Це пояснюється тим, що під час фізичних навантажень відбулися адаптивні зміни в антиоксидантній системі організму, зокрема, зниження продукції активних форм оксигену (незважаючи на те, що потреба в оксигені та його потік до дихального ланцюга мітохондрій зросли), підвищення активності ензимів антиоксидантного захисту та окиснення ліпідів. У серцевому м'язі, печінці та скелетних м'язах тренованих тварин пошкодження клітин значно менші, ніж у тих, які вели малорухливий спосіб життя.

Один із механізмів природного старіння та загибелі клітини, що може спричинити передчасне старіння цілісного організму – підвищення концентрації цитохрому С у цитозолі, яке пов'язане з розвитком окисного стресу та свідчить про апоптичні процеси в клітинах. За підвищення концентрації перекисних продуктів у мітохондріях запускається механізм пероксидазної активності комплексу цитохрому С із кардіоліпіном (Demin, 2008; Birk et al., 2014). У результаті цього стимулюється дисоціація комплексу, внаслідок чого цитохром С вивільняється із зв'язку з кардіоліпіном. Активізується окиснення ліпідів, відбувається дезорганізація мітохондріальної мембрани, що підвищує її проникність за рахунок або формування пор, або ініціації розкриття тимчасових пор перехідної проникності мембрани (Vickers, 2009; Begriche, 2011; Donghong, 2015; Boengler et al., 2017). Внаслідок цього відбувається вивільнення цитохрому С у цитоплазму, що запускає реакцію апоптозу клітини.

Існує ще один механізм підвищення проникності мітохондріальної мембрани внаслідок взаємодії протеїнів родини Bcl 2 з тимчасовою порою перехідної проникності (Shan et al., 2015). У нормі така мітохондріальна пора замала для молекули цитохрому С, її діаметр становить 2 нм. Але протеїни родини Bcl 2 мають гідрофобні залишки, за допомогою яких здатні прикріплятися до зовнішньої мітохондріальної мембрани в області пори. Ці протеїни вступають у взаємодію з аденілатним транспортером, розширюючи канал пори до 3 нм. Саме через подібну пору відбувається вихід таких великих молекул як цитохром С. Скоріше за все, окисний стрес ініціює цей процес. Опинившись у цитоплазмі, цитохром С, за присутності АТР, взаємодіє з неактивними формами каспази-9 та APAF1, утворюючи апоптосому. Вже в апоптосомі відбувається активація каспази-9, яка стимулює каспазу-3 – головний фактор внутрішнього шляху апоптозу (Bonglee et al., 2015).

Далеко не останню роль у вивільненні цитохрому С відіграють активні форми оксигену, у першу чергу $O_2^{\bullet-}$, які утворюються в дихальному ланцюзі перенесення електронів на рівні комплексу I (НАДН/убіхінон оксидоредуктази) та комплексу IV (цитохромоксидаза). Перетворення супероксиду мітохондріальною СОД викликає утворення ще однієї активної молекули оксигену H_2O_2, який у надмірній кількості може викликати пошкодження мітохондрій (Serova et al., 2016; Dyomshina et al., 2017; Owada et al., 2017). Слід зазначити, що за фізіологічного старіння підвищення чутливості до відкриття пори тимчасової проникності відбувається зі зниженням Ca^{2+}-ємності мітохондрій (Fernandez-Sanz et al., 2015; Rohit et al., 2016). Цьому можуть сприяти різні причини, зокрема, підвищення активності фосфоліпаз, а також збільшений вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у тканинах старих тварин. У міокарді старих щурів виникають умови для обмеження швидкості окисно-відновних

перетворень у циклі трикарбонових кислот (Mdaki et al., 2016). Такі зміни швидкості найпотужнішого енергетично забезпечувального процесу свідчать про формування в мітохондріях так званої «напруги» в стані біоенергетичних процесів у серці. Це, у свою чергу, зумовлює появу з віком у тварин особливостей у зміні їх стану в умовах підвищення потреби серцевого м'яза в АТФ під час стресу (Терр et al., 2016, 2017).

Ензим, який знаходиться на перетині вуглеводного, протеїнового та енергозабезпечувальних процесів, – лактатдегідрогеназа. Дослідження у серцевому м'язі щурів адаптаційних процесів за старіння та додаткових навантажень у вигляді фізичних вправ і різних температур показали зміни активності лактатдегідрогенази та її ізоензимів (Prathima and Devi, 1999). Із віком у тварин за умов тренувань відбувався перерозподіл ізоферментів ЛДГ, що забезпечувало стійкість кардіоміоцитів до стресових впливів і поліпшення компенсаторних можливостей за зміни потреби в оксигені та зниження ризику розвитку кардіоваскулярних захворювань.

Незважаючи на численні дослідження причин старіння серця, участі мітохондрій у даному процесі, вирішення цього питання залишається актуальним донині. Тому мета цієї статті – визначити зміни окремих біохімічних ланок функціонування мітохондрій серця піщанок за старіння.

Матеріал і методи досліджень

Експеримент проводили на монгольських піщанках (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867) різного віку із середньою вагою 63–83 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Тварин поділили на п'ять дослідних груп (по 6 тварин у кожній): 1 – тварини віком 6 місяців, 2 – 24 місяці, 3 – 30 місяців, 4 – 36 місяців, 5 – 39 місяців. Наприкінці тварин зважували та виводили з експерименту за етерного наркозу, видаляли серце, промивали у фізіологічному розчині та використовували для подальших досліджень.

Гомогенат серця, його водорозчинну та мітохондріальну фракції отримували шляхом диференційного центрифугування у градієнті сахарози методом Wieckowski et al. (2009). Визначення активності аспартатамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), γ-глутамінтрансферази (ГГТП, КФ 2.3.2.2) проводили з використанням стандартних лабораторних тест-наборів (Фелісіт, Дніпро) методами Burtis et al. (2012) та Young (2014) згідно з протоколом фірми виробника. Активність каталази (КТ, КФ 1.11.1.6) визначали за здатністю пероксиду гідрогену утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс (Koroluk et al., 1988). Активність каталази виражали в мккат/мг протеїну мітохондріальної фракції. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) оцінювали як здатність ензиму інгібувати реакцію окиснення кверцетину (Kostuk et al., 1990). Активність СОД виражали в умовних одиницях (у. о./мг протеїну). За умовну одиницю брали активність ензиму, який здатний викликати інгібування кверцетину на 50% у розрахунку на протеїни тканини. Кількість ТБК-активних продуктів визначали за концентрацією забарвленого комплексу, який утворювався за реакції малонового діальдегіду (МДА) у кислому середовищі з двома молекулами тіобарбітурової кислоти (ТБК) (Andreeva et al., 1988). Кількість МДА виражали у мкмолях ТБК-активних продуктів на 1 мг протеїну мітохондріальної фракції. Кількість цитохрому С – за його здатністю відновлювати дітіонат натрію (Selivanov et al., 1997). Статистичний аналіз результатів проводили методом ANOVA. Вірогідними вважали відмінності за $P < 0,05$. Кореляційний аналіз проведено за коефіцієнтом Пірсона.

Результати

Аналіз стану прооксидантних чинників і антиоксидантної системи у водорозчинній фракції, отриманої з серця піщанок, показав збільшення концентрації ТБК-активних продуктів за досягнення тваринами віку 24 місяці (рис. 1).

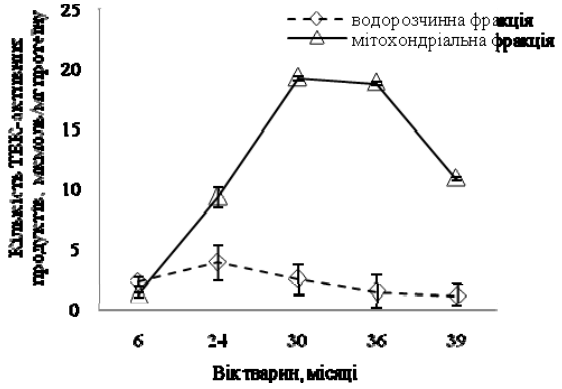


Рис. 1. Кількість ТБК-активних продуктів (прооксидантної системи) у водорозчинній та мітохондріальній фракціях, отриманих із серця піщанок різних вікових груп, мкмоль/мг протеїну ($x \pm SD$, $n = 6$)

Зі збільшенням віку зареєстровано поступове зменшення ТБК-активних продуктів, яке досягло 1,16 ± 0,11 мкмоль/мг протеїну у піщанок віком 39 місяців порівняно з 6-місячними тваринами (2,25 ± 0,18 мкмоль/мг протеїну). Таке явище пов'язане зі зниженням із віком концентрації ліпідів як основних субстратів ендогенної пероксидації та гальмуванням відновлення основних субстратів метаболізму – протеїнів і вуглеводів. У мітохондріальній фракції, отриманій із серця піщанок, визначено параболічне коливання концентрації ТБК-активних продуктів упродовж 24–39 місяців життя, що свідчить про розвиток суттєвого окисного стресу в дослідженому компартменті кардіоміоцитів, що супроводжує старіння.

Після 36 місяців життя у піщанок визначено зниження концентрації перекисних продуктів, що також пов'язано зі зниженням інтенсивності відновлення структурних компонентів мембран мітохондрій. Оскільки середня тривалість життя монгольських піщанок складає 24 місяці, і в цьому віці вже починаються процеси старіння, тварин віком 39 місяців можна вважати довгожителями. Аналізуючи співвідношення цитоплазматичного та мітохондріального рівня ТБК, варто зазначити, що у 6-місячних піщанок у водорозчинній фракції він трохи вищий, ніж у мітохондріальній. У старих тварин це співвідношення порушується. Починаючи з віку 24 місяці, рівень ТБК-активних продуктів у мітохондріях старих піщанок перевищує цитоплазматичний. Очевидно, що з віком у цитозолі зменшується кількість функціонально активних протеїнів і ліпідів, тому окисний стрес у цій фракції менш виражений, а отже, рівень перекисних продуктів нижчий. Зниження концентрації продуктів ТБК у піщанок віком 39 місяців, найстарших серед експериментальних тварин, відбувається, можливо, завдяки розвитку адаптивних процесів в антиоксидантній системі або зниженню загальнометаболічних процесів. Цілком зрозуміло, що у літньому віці процеси відновлення пошкоджень мітохондріальних мембран відбуваються менш ефективно.

Захист клітини від окисного стресу забезпечують ключові ензими: СОД, каталаза та протеїн цитохром С. Експериментальні дані (табл. 1, 2) вказують на незвичайне співвідношення активності супероксиддисмутази у водорозчинній та мітохондріальній фракціях, отриманих із серця дослідних піщанок.

У мітохондріальній фракції встановлено підвищення активності СОД у 3–6 разів серед груп старих тварин порівняно з 6-місячними, а у водорозчинній – навпаки, зменшення цієї активності. У мітохондріях і цитоплазмі клітин серця відбувалися хвилеподібні зміни активності СОД, пов'язані з віком піддослідних тварин. Відхилення активності СОД від першої групи (6 місяців) вперше відбувалося у віці 24 місяці. У період із 30 до 36 місяців визначено сплеск активності мітохондріальної СОД. Така динаміка зміни активності ензиму в цілому узгоджується зі зміною інших дослідних

біохімічних показників у старіючих піщанок. Активність іншого ензиму антиоксидантної системи каталази зросла як у водорозчинній, так і в мітохондріальній фракціях серця піддослідних піщанок, відносно першої групи (6 місяців). Активність мітохондріального ізоензиму каталази значно вища, ніж цитозольного (табл. 1, 2). Динаміка зміни активності каталази у процесі старіння тварин також має хвилеподібний характер, причому найяскравіше простежується у водорозчинній фракції.

Таблиця 1

Активність ензимів антиоксидантної системи у водорозчинній фракції, отриманій із серця піщанок різних вікових груп (x ± SD, n = 6)

Ензим	Вік тварин, місяці				
	6	24	30	36	39
СОД, у. о./мг протеїну	12,35 ± 2,38	9,38 ± 2,28*	13,24 ± 3,76	5,15 ± 0,22**	14,02 ± 1,87
Каталаза, мккат/мг протеїну	34,74 ± 1,79	90,47 ± 13,21*	103,79 ± 14,76*	90,56 ± 8,22**	97,26 ± 3,25***
Цитохром С, нг/г тканини	29,15 ± 5,45	52,29 ± 13,76**	57,28 ± 16,81*	42,68 ± 14,16*	61,14 ± 18,18*

Примітка:* – P < 0,05, ** – P < 0,01, *** – P < 0,001 відносно першої групи (6 місяців).

Таблиця 2

Активність ензимів антиоксидантної системи у мітохондріальній фракції, отриманій із серця піщанок різних вікових груп (x ± SD, n = 6)

Ензим	Вік тварин, місяці				
	6	24	30	66	39
СОД, у. о./мг протеїну	3,67 ± 0,94	12,13 ± 2,12**	23,40 ± 4,05*	22,88 ± 5,05*	12,13 ± 1,5***
Каталаза, мккат/мг протеїну	2,13 ± 0,64	10,56 ± 1,96*	9,74 ± 1,63*	10,39 ± 1,1**	9,01 ± 2,5*
Цитохром С, нг/г тканини	64,53 ± 10,72	33,39 ± 14,76*	42,44 ± 15,55*	33,72 ± 15,15*	39,63 ± 12,59**

Примітка: див. табл. 1.

Одним із механізмів фізіологічного старіння та загибелі клітин, що може спричинити передчасне старіння цілого організму, розглядається підвищення концентрації цитохрому С у цитозолі, пов'язане з розвитком окисного стресу. У наших дослідах показано поступове підвищення концентрації цитохромму С у водорозчинній фракції, отриманій із серця, яке досягало максимального значення у найстаріших тварин (підвищення на 50% порівняно із 6-місячними тваринами). У мітохондріальній фракції відбувалось зниження на 28–36% залежно від вікової групи цього показника. Відмічено статистичну різницю транспорту цитохрому С до мітохондрій міокарда у 24- та 36-місячних тварин. Цей факт вказує на існування двох переломних вікових періодів, у які мітохондрії найуразливіші до пошкоджувальної дії перекисних продуктів.

Важливі діагностичні параметри стану серця – активність ензимів лактатдегідрогенази, γ-глутамілтрансферази, амінотрансфераз, особливо аспартатамінотрансферази, зміни яких у водорозчинній фракції, отриманій із серця, подано у таблиці 3, а мітохондріальних ізоензимів АлАт та АсАТ – у таблиці 4.

Таблиця 3

Активність ензимів водорозчинної фракції, отриманої із серця піщанок різних вікових груп (од./кг тканини, x ± SD, n = 6)

Ензим	Вік тварин, місяці				
	6	24	30	36	39
АлАТ	7,13 ± 0,79	5,81 ± 1,19**	9,50 ± 1,29*	7,39 ± 0,91	6,33 ± 1,58
АсАТ	8,87 ± 1,44	6,44 ± 1,42***	7,92 ± 0,91	6,33 ± 1,58	5,28 ± 1,83*
ГТТ	2,81 ± 0,54	3,74 ± 0,84	4,68 ± 0,54***	4,37 ± 1,08*	4,30 ± 0,54***
$ЛДГ_{піруват}$	37,99 ± 9,59	65,14 ± 13,73*	84,49 ± 11,50**	68,18 ± 2,01*	64,94 ± 17,84*
$ЛДГ_{лактат}$	191,47 ± 81,01	69,44 ± 13,55**	88,49 ± 20,85**	45,02 ± 10,43***	42,09 ± 7,77***

Примітка: див. табл. 1.

Таблиця 4

Активність мітохондріальних ізоформ амінотрансфераз серця піщанок різних вікових груп (од./кг тканини, x ± SD, n = 6)

Ензим	Вік тварин, місяці				
	6	24	30	36	39
мАлАТ	5,86 ± 1,52	11,19 ± 1,77*	7,92 ± 0,91	6,97 ± 0,32	6,76 ± 0,18
мАсАТ	18,37 ± 1,44	10,98 ± 1,25***	16,15 ± 1,31	20,06 ± 2,42*	18,16 ± 0,37

Примітка: див. табл. 1.

Активність аланінамінотрансферази (АлАТ) у водорозчинній фракції серця піщанок віком 24 місяці знижена на 20% порівняно з першою групою (6 місяців). Із часом, по досягненні тваринами віку 30 місяців, зафіксовано підвищення активності цього ензиму порівняно з дворічними особинами на 40% та на 25% порівняно з 6-місячними, після чого знову виявлено поступове зниження активності АлАТ. У мітохондріальній фракції, отриманій із серця піщанок, визначено іншу картину: за досягнення тваринами віку 24 місяці активність цієї трансаміназ збільшувалася на 50%, і надалі поступово знижувалась.

Для аспартатамінотрансферази (АсАТ) установлено іншу тенденцію змін активності. У водорозчинній фракції, отриманій із серця піщанок, активність ензиму знижувалася та у віці 39 місяців була нижчою за таку першої групи тварин (6 місяців) на 40%. Активність мітохондріального ізоензиму в серці дворічних тварин знижувалася на 40% порівняно з першою групою. У тварин старшого віку відбувалось достовірне підвищення активності АсАТ порівняно з групою тварин віком 24 місяці, але вірогідно не відрізнялася від дослідного показника у тварин віком 6 місяців. Активність мітохондріальних АлАт і АсАТ у серці піщанок суттєво відрізнялась від цитозольних ізоформ (табл. 4). У 24-місячних тварин активність мАлАТ збільшувалась порівняно з мАсАТ, активність якої, навпаки, зменшувалась. Отримані результати вказують на індукцію активності мАлАТ за рахунок збільшення у середовищі пірувату (табл. 3).

Ензим, який міститься на перетині анаеробного та аеробного енергозабезпечення клітини, – лактатдегідрогеназа. У тварин віком 24 місяці активність ЛДГ, спорідненої до лактату ($ЛДГ_{лактат}$), знижується в 2,5 раза порівняно з першою групою тварин (6 місяців), потім дещо підвищується протягом 6 місяців, але лишається нижчою за першу групу та значимо зменшується у тварин старших 36 місяців (табл. 3). Варто звернути увагу на те, що у піщанок першої групи тварин (6 місяців), активність $ЛДГ_{лактат}$ вища, ніж ЛДГ, спорідненої до пірувату ($ЛДГ_{піруват}$). У 24 місяці це співвідношення починає порушуватися, й у 30 місяців активність обох різновидів ензиму зрівнюється. У подальшому визначено зміну

співвідношення у бік зростання активності ЛДГ$_{піруват}$ і зменшення ЛДГ$_{лактат}$.

Один з ензимів, який бере участь у транспорті амінокислот до клітин, – γ-глутамілтранспептидаза (ГГТП). У нашому експерименті у водорозчинній фракції, отриманій із серця піщанок, показано поступове підвищення активності цього ензиму (табл. 3). Проведено кореляційний аналіз дослідних параметрів за коефіцієнтом Пірсона (табл. 5, 6).

Таблиця 5

Кореляційні зв'язки між дослідними параметрами водорозчинної фракції, отриманої із серця піщанок (x ± SD, n = 6)

Кореляційний коефіцієнт Пірсона	6 місяців	24 місяці	30 місяців	36 місяців	39 місяців
ТБК-активні продукти – КТ	0,60	0,61	0,95***	0,92***	–0,75*
ТБК-активні продукти – СОД	–0,98***	–0,39	–0,91***	0,84**	–0,95***
ТБК-активні продукти – цитохром С	–0,54	0,82**	0,02	0,03	–0,30
СОД – цитохром С	0,70*	0,09	–0,31	–0,52	0,58
СОД – КТ	–0,56	–0,46	–0,75*	0,98***	0,92***
АлАТ – АсАТ	0,58	–0,66	–0,71*	0,87**	0,87**
АлАТ – ЛДГ$_{лактат}$	–0,73*	0,28	–0,87**	–0,98***	–0,44
АлАТ – ЛДГ$_{піруват}$	0,51	0,66	–0,58	0,10	0,92***
ЛДГ$_{лактат}$ – ЛДГ$_{піруват}$	–0,47	0,35	0,62	–0,99***	–0,05
ГГТП – цитохром С	0,78*	–0,12	–0,51	–0,80**	0,99***
АлАТ – ГГТП	–0,23	0,26	0,12	–0,55	0,82**
АсАТ – ГГТП	–1,00***	1,00***	0,01	0,01	0,01

Примітка: див. табл. 1.

У водорозчинній фракції, отриманій із серця піщанок, установлено прямий зв'язок високого ступеня значимості між кількістю ТБК-активних продуктів і активністю каталази (r = 0,95, P < 0,001) у віці 30 місяців, (r = 0,92, P < 0,001) у віці 36 місяців, тоді як у віці 6 місяців спостерігався поміркований прямий зв'язок (r = 0,60, P < 0,05) та (r = 0,61, P < 0,05) у віці 24 місяці. У тварин похилого віку (понад два роки) визначено позитивну залежність між активністю СОД і каталази (r = 0,98, P < 0,001; r = 0,92, P < 0,001), кількістю ТБК-активних продуктів і активністю СОД (r = 0,84, P < 0,01); кількістю ТБК-активних продуктів та вмістом цитохрому С (r = 0,82, P < 0,01); активністю СОД і кількістю цитохрому С (r = 0,70, P < 0,05). Таким чином, із віком збільшення концентрації прооксидантних чинників викликає активізацію високомолекулярних компонентів системи антиоксидантного захисту у цитозолі кардіоміоцитів. Активізація прооксидантної системи опосередковано ініціює процес загибелі клітин шляхом підвищення концентрації цитохрому С у цитозолі.

Аналіз кореляційних зв'язків між дослідженими біохімічними маркерами стану міокарда піщанок похилого віку показав наявність прямого зв'язку високого ступеня значимості між активністю аланінамінотрансферази та лактатдегідрогенази, субстрат якої – піруват (r = 0,92, P < 0,001); активністю аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази (r = 0,87, P < 0,01); активністю ГГТП та кількістю цитохрому С (r = 0,99, P < 0,001); активністю аланінамінотрансферази та ГГТП (r = 0,82, P < 0,01). Тобто з віком активність одних ензимів викликає підвищення концентрації субстратів для інших ензимів основних метаболічних шляхів у клітині, що старіє.

Установлено відмінний зв'язок високого ступеня значимості між кількістю ТБК-активних продуктів як основного компонента прооксидантної системи та активністю СОД як високомолекулярного ензиму антиоксидантної системи, r = –0,98, P < 0,001 у водорозчинній фракції міокарда тварин віком 6 місяців, r = –0,91, P < 0,001 – 30 місяців і r = –0,95, P < 0,001 – 39 місяців. Отже, інтенсифікація утворення перекисних продуктів викликає інгібування активності СОД. Кореляційний аналіз підтверджує літературні дані про те, що надмірні концентрації перекису інгібують СОД. Кореляційний аналіз між активністю основних високомолекулярних компонентів антиоксидантної системи СОД і каталазою показав також зростання відмінного зв'язку високого ступеня значимості з віком: r = –0,75, P < 0,05 у тварин віком 24 місяці; r = –0,87, P < 0,01 – 30 місяців і r = –0,98, P < 0,001 – 36 місяців.

Активність лактатдегідрогенази, субстрат якої – піруват, мала відмінний зв'язок високого ступеня значимості з активністю лактатдегідрогенази, субстрат якої – лактат r = –0,99, P < 0,001 у тварин похилого віку. Отримані дані вказують на превалювання анаеробного шляху перетворення глюкози у серцевому м'язі з віком.

Між активністю аспартатамінотрансферази та γ-глутамілтранспептидази у водорозчинній фракції серця визначено обернено пропорційну залежність у 6-місячних піщанок (r = –1,00), яка з віком (24 місяці) змінювалась на позитивну (r = 1,00), і зі збільшенням віку втрачалась будь-яка залежність між активностями вказаних ензимів.

У мітохондріальній фракції серця піщанок установлено прямий зв'язок високого ступеня значимості між кількістю прооксидантних ТБК-активних продуктів і активністю антиоксидантного ензиму СОД (r = 0,86, P < 0,001) у тварин віком 30 місяців, r = 0,95, P < 0,001 у тварин віком 39 місяців (табл. 6).

Таблиця 6

Кореляційні зв'язки між дослідними параметрами мітохондріальної фракції, отриманої із серця піщанок (x ± SD, n = 6)

Кореляційний коефіцієнт Пірсона	6 місяців	24 місяці	30 місяців	36 місяців	39 місяців
ТБК-активні продукти – КТ	–0,91 ± 0,83***	0,21 ± 1,95	–0,36 ± 1,86	0,01 ± 2,00	0,55 ± 1,67
ТБК-активні продукти – СОД	–0,04 ± 1,99	0,34 ± 1,88	0,86 ± 0,99**	0,63 ± 1,56	0,95 ± 0,65***
ТБК-активні продукти – цитохром С	0,89 ± 0,90***	0,56 ± 1,65	0,39 ± 1,84	0,27 ± 1,92	–0,73 ± 1,37*
СОД – цитохром С	–0,15 ± 1,97	–0,20 ± 1,96	0,60 ± 1,60	0,92 ± 0,77***	–0,50 ± 1,73
СОД – КТ	–0,28 ± 1,92	–0,22 ± 1,95	–0,23 ± 1,94	0,01 ± 2,00	0,24 ± 1,94
АлАТ – АсАТ	0,61 ± 1,58	0,12 ± 1,98	0,70 ± 1,43*	0,03 ± 1,99	0,48 ± 1,75

Примітка: див. табл. 1.

На відміну від цитозолю, у мітохондріях із віком відбувається посилення кореляційного зв'язку між даними показниками. Це може вказувати на те, що з віком саме мітохондріальний ізоензим СОД стає джерелом утворення перекису. Також установлено прямий зв'язок високого ступеня значимості між кількістю ТБК-активних продуктів та вмістом цитохрому С (r = 0,89, P < 0,001) у піщанок віком 6 місяців. Із віком кореляційний зв'язок слабшав, однак у тварин віком 39 місяців посилювався та змінювався на від'ємний (r = – 0,73, P < 0,05). Отже, у похилому віці в мітохондріях підвищена концентрація перекису може провокувати зниження концентрації цитохрому С. Кореляційний аналіз інших показників у мітохондріальній фракції, отриманій із серця піщанок, показав наявність помірних зв'язків.

Обговорення

З'ясування співвідношення прооксидантних чинників і стану антиоксидантної системи у водорозчинній фракції серця піщанок показало збільшення концентрації ТБК-активних продуктів у 24-місячному віці (табл. 1). У подальшому відбувається поступове зменшення цього показника (мінімум – у віці 39 місяців). Таке явище, перш за все, пов'язане зі зниженням концентрації ліпідів як основних субстратів ендогенної пероксидації. Із віком відбувається гальмування відновлення основних субстратів метаболізму – протеїнів, вуглеводів, ліпідів, найчутливіших до дії будь-яких несприятливих факторів.

У мітохондріальній фракції, отриманій із серця піщанок, спостерігали різке підвищення концентрації ТБК-активних продуктів (у 9–19 разів порівняно з першою групою тварин віком 6 місяців). Це свідчить про суттєвий окисний стрес, що супроводжує старіння (табл. 2). Після 36 місяців життя відбувається зниження концентрації перекисних продуктів, що також пов'язано зі зниженням інтенсивності відновлення структурних компонентів мембран мітохондрій. Оскільки середня тривалість життя монгольських піщанок складає 24 місяці, у цьому віці вже посилюються процеси старіння, і тварин віком 39 місяців можна вважати довгожителями. З огляду на це, встановлений рівень ТБК-активних продуктів означає, що процеси ПОЛ і руйнування протеїнів клітинних мембран уже відбулися, і система антиоксидантного захисту намагається пристосуватися до таких навантажень для забезпечення енантіостазу. Це підтверджується літературними даними (Judge and Leeuwenburgh, 2007; Marques et al., 2015; Anayt et al., 2017).

Аналізуючи співвідношення цитоплазматичного та мітохондріального рівня ТБК, слід зазначити, що у 6-місячних піщанок у водорозчинній фракції він вищий, ніж у мітохондріальній. У групах старих тварин таке співвідношення порушується. Починаючи з віку 24 місяці, рівень ТБК-активних продуктів у мітохондріях старих піщанок перевищує цитоплазматичний. Очевидно, з віком у цитозолі зменшується кількість функціонально активних протеїнів і ліпідів, тому окисний стрес у цій фракції менше виражений, а отже, рівень перекисних продуктів нижчий. За час атаки активними формами оксигену, головним чином, пошкоджуються біомембрани органел і самої клітини. Оскільки мітохондрії вважаються осередком утворення активних форм оксигену, процеси перекисного окиснення та окисної модифікації протеїнів більше виражені, а отже, рівень ТБК-активних продуктів вищий. Тобто у старіючих тварин окисне пошкодження найбільше виявляється в мітохондріях. Надлишкове утворення перекисних продуктів викликає накопичення дисфункціональних і аномальних мітохондрій, що визначається важливою патофізіологічною особливістю старіння серця (Ikeda et al., 2014; Zhao et al., 2014). У похилому віці знижується ефективність репараційних процесів, а саме аутофагія / мітофагія, тобто видалення пошкоджених, не функціональних мітохондрій (Hayat, 2014; Lekli et al., 2017).

Зниження концентрації ТБК-активних продуктів у піщанок віком 39 місяців, найстарших серед експериментальних тварин, відбувається завдяки розвитку адаптаційних процесів у антиоксидантній системі. Беручи до уваги недостовірне зниження перекисних продуктів у водорозчинній фракції, можна припустити, що, крім високомолекулярних сполук антиоксидантного захисту, до цього процесу також залучаються низькомолекулярні антиоксиданти, наявні в дуже низьких концентраціях у цитоплазмі клітини.

У літньому віці процеси відновлення пошкоджень клітин відбуваються менш ефективно (Zhao et al., 2014; Owada et al., 2017; Teppa et al., 2017). Ресурси старого організму обмежені, тому повністю відновити всі пошкодження через компенсаторні реакції йому вже не вдається. Внаслідок цього починають розвиватися патологічні процеси. У цьому випадку пошкоджені клітини міокарда вже повністю не відновлюються, а в деяких місцях будуть спостерігатися ділянки, заміщені сполучною тканиною (Anmann et al., 2014; Ikeda et al., 2014). Отже, пошкодження серцевого м'яза у піщанок мають місце після 24 місяців життя.

У водорозчинній та мітохондріальній фракціях, отриманих із серця піщанок дослідних груп, спостерігається таке співвідношення активності супероксиддисмутази. У мітохондріальній фракції вона підвищується в 3–6 разів в усіх дослідних груп, а у водорозчинній – зменшується порівняно з першою групою тварин (6 місяців). У мітохондріях і цитоплазмі (табл. 1, 2) відбувалися хвилеподібні зміни активності СОД. Вони пов'язані з віком дослідних тварин. Відхилення активності супероксиддисмутази від значень шестимісячних піщанок вперше відбувається у віці 24 місяці. У період 30–36 місяців відбувається сплеск активності мітохондріальної СОД. У водорозчинній фракції, отриманій із серця 24-місячних тварин активність супероксиддисмутази дещо знижується, у 30 місяців повертається до показників 6-місячних тварин, у 36 місяців активність значно зменшується, а в 39 місяців (найстаріші тварини) – знову повертається до рівня 6-місячних тварин. Така динаміка зміни активності ензиму, в цілому, узгоджується зі зміною інших досліджуваних показників у старіючих піщанок.

Одразу декілька авторів вказують, що активність СОД цитоплазми та мітохондрій обернено пропорційна тривалості життя (Das and Muniyappa, 2013; Anayt et al., 2017; Lykhatskyi and Fira, 2017). Тобто, у довгоживучих організмів її активність не змінюється, або зміни незначні. Більшість авторів стверджують, що у старіючих організмах відбувається пригнічення функціонування супероксиддисмутази та системи антиоксидантного захисту в цілому. Однак, вищезгадані дослідження проведені на лабораторних щурах віком 24 місяці. У нашому експерименті дослідні піщанки досягали віку 39 місяців. Літературні дані, де б фігурували настільки старі тварини, відсутні.

Беручи до уваги літературні та отримані під час нашого експерименту дані, у тварин-довгожителів підвищення активності мітохондріальної СОД і повернення активності цитоплазматичної СОД до рівня 6-місячних можна пояснити ефектом пристосування клітин до зниженої інтенсивності метаболізму. Із віком рівень продукції активних форм оксигену та завданих ними пошкоджень клітин збільшується, тому відбувається пристосування систем захисту для нейтралізації пошкодження біологічних молекул і захисту клітин від загибелі. Однак енергетичні ресурси старого організму обмежені, тому певний окисний стрес і пошкодження клітин міокарда все ж відбуваються. Це припущення підтверджують підвищені рівні ТБК-активних продуктів і активності лактатдегідрогенази, спорідненої до піруват (табл. 3, 4).

Активність каталази, одного з ензимів антиоксидантного захисту, зростала як у водорозчинній, так і в мітохондріальній фракціях піддослідних піщанок відносно першої групи тварин (6 місяців). При цьому в мітохондріях вона була більшою (табл. 1, 2). Зміна активності каталази також мала хвилеподібний характер. Каталаза стійка до зовнішніх впливів і першою вступає в реакцію знешкодження перекису. Її активність залежить від концентрації ТБК-активних продуктів.

У водорозчинній фракції серця після 24 місяців життя концентрація ТБК-активних продуктів підвищувалася, а потім поступово зменшувалася, одночасно із цим активність каталази підвищувалася утричі та залишалася на такому рівні до кінця дослідного терміну життя тварин. Збільшення вмісту ТБК-активних продуктів корелювало з активацією каталази в усіх вікових групах понад 24 місяці. З віком у піщанок поступово зростає продукція активних форм оксигену, які пошкоджують біологічні молекули. При цьому руйнівний вплив спрямований переважно на мітохондрії, тому починає активізуватися каталаза. Її активність у мітохондріальній фракції серця старих тварин порівняно з 6-місячними вища уп'ятеро. Але у найстарших тварин (39 місяців) інтенсивність перекисного окиснення стає нижчою, а активність каталази як у цитоплазмі, так і в мітохондріях залишається вищою за значення першої групи тварин (6 місяців). Особливо важливий цей ензим має саме у мітo-

хондріях, де деструктивні процеси з віком набувають критичного значення. Пероксид гідрогену пошкоджує ліпіди та білки мембран клітин і органел, що спричиняє накопичення продуктів ТБК. На це організм відповідає збільшенням активності каталази. Руйнівний вплив зачіпає також мітохондрії. Щоб зберегти гомеостаз і життя, організм починає пристосовуватися до нових умов існування шляхом запуску адаптивних реакцій. Одна з таких реакцій – висока активність каталази у цитозолі та мітохондріях, яка захищає клітину від смертельних пошкоджень. Таким чином, із віком саме каталаза виконує основну роль в адаптації клітин до підвищеної інтенсивності катаболічних, деструктивних, протеолітичних процесів.

Одним із механізмів природного старіння та загибелі клітини, що може спричинити передчасне старіння цілого організму, вважають підвищення концентрації цитохрому С у цитозолі, пов'язане з розвитком окисного стресу. Підвищення концентрації перекисних продуктів у мітохондріях запускає механізм пероксидазної активності комплексу цитохрому С із кардіоліпіном (Demin, 2008; Birk et al., 2014). У результаті цього стимулюється дисоціація комплексу, внаслідок чого цитохром С відщеплюється від кардіоліпіну. Активізується окиснення ліпідів, відбувається дезорганізація мітохондріальної мембрани, що підвищує її проникність за рахунок або формування пор, або ініціації розкриття тимчасових пор проникності мембрани (Vickers, 2009; Begriche, 2011; Donghong, 2015). Відбувається вивільнення цитохрому С у цитоплазму, що запускає реакцію апоптозу клітини. У наших дослідах показано поступове підвищення вмісту цитохрому С у водорозчинній фракції серця, яке досягало максимального значення у найстаріших тварин (підвищення на 50% порівняно із 6-місячними тваринами). Одночасно у мітохондріальній фракції відбувається зниження з піком 36% у двох вікових груп – 24 та 36 місяців. Цей факт вказує на існування двох переламних вікових періодів, у які мітохондрії найчутливіші до пошкоджувальної дії перекисних продуктів.

Наявність цитохрому С у цитоплазмі може провокувати апоптичні процеси у клітинах міокарда старих піщанок. Існує ще один механізм підвищення проникності мітохондріальної мембрани внаслідок взаємодії протеїнів родини Bcl 2 з тимчасовою порою перехідної проникності (Shan et al., 2015). У нормі така мітохондріальна пора замала для молекули цитохрому С, її діаметр становить 2 нм. Але протеїни родини Bcl 2 мають гідрофобні залишки, здатні прикріплятися за їх допомогою до зовнішньої мітохондріальної мембрани в області пори, вступають у взаємодію з аденілатним транспортером, розширюючи канал пори до 3 нм. Саме через подібні пори відбувається вихід таких великих молекул, як цитохром С. Скоріше за все, окисний стрес, що формується у серці старіючих піщанок, також ініціює цей процес.

Результати розподілу цитохрому С у цитозолі та мітохондріях підтверджують літературні дані про те, що активні форми оксигену здатні індукувати апоптоз, та про роль цитохрому С як апоптичного фактора. Його поступове збільшення у мітохондріальній фракції у віці 30 та 39 місяців – додаткове підтвердження того, що в організмі піщанок-довгожителів вмикаються адаптаційні механізми: пристосування мітохондрій до метаболічного навантаження. Можливо, саме лабільністю та «живучістю» мітохондрій зумовлений феномен довголіття.

Важливі діагностичні параметри стану серця – активність ензимів лактатдегідрогенази, γ-глутамілтрансферази, амінотрансфераз, особливо аспартатамінотрансферази, зміни яких у водорозчинній та мітохондріальній фракціях наведено у таблицях 3 та 4. Активність АлАТ у водорозчинній фракції, отриманій із серця піщанок, у дворічних тварин знижується на 20% порівняно з 6-місячними. Із часом, по досягненні віку 30 місяців, зафіксовано підвищення активності цього ензиму порівняно з 24-місячними особинами на 40% та 6-місячними – на 25%. У подальшому відбувалось поступове зниження активності АлАТ. У мітохондріальній фракції серця спостерігали інакшу картину. Для АсАТ спостерігали іншу тенденцію: саме у віці 24 місяці відбувається зниження активності обох трансаміназ у водорозчинній фракції, що пояснюється, насамперед, протеолітичними процесами, які підтверджено даними щодо зниження загальної кількості протеїну в досліджених фракціях. Про адаптаційні процеси, які відбуваються у подальшому, свідчить збільшення активності цих ензимів.

У мітохондріях спостерігали суттєво іншу картину: перенаправлення метаболічних процесів. У віці 24 місяці активність мітохондріального ізоензиму АлАТ збільшувалась порівняно з АсАТ, активність якої, навпаки, зменшувалась, що вказує на підвищення концентрації пірувату. Це підтверджено даними щодо активності $ЛДГ_{піруват}$. Цей факт підтверджено прямим кореляційним зв'язком високого ступеня значимості ($r = 0,92$, $P < 0,001$) між активністю аланінамінотрансферази та $ЛДГ_{піруват}$ у водорозчинній фракції, отриманій із серця найстаріших піщанок віком 39 місяців (табл. 5). У цьому випадку незвичний той факт, що в нормі активність мітохондріального ізоензиму АлАТ низька, а його підвищення в мітохондріях серця тварин похилого віку вказує на збільшення концентрації недоокиснених продуктів, а саме пірувату. Переробляти піруват у надлишкових кількостях за старіння мітохондрії серця не здатні. Тому одним зі шляхів його перетворення стає утворення або аланіну, або лактату. Також на нездатність мітохондрій перетворювати піруват вказує одночасне зниження активності АсАТ, яка у мітохондріях забезпечує цикл трикарбонових кислот оксалоацетатом. Отже, отримані дані свідчать не тільки про перенаправлення метаболічних процесів, а і про порушення енергетичних процесів у клітинах міокарда під час старіння. АсАТ також бере участь у роботі малат-аспартатного човникового механізму та забезпечує цитоплазму субстратами для глюконеогенезу (перетворення пірувату на глюкозу) та синтезу протеїнів. Зниження активності АсАТ у мітохондріальній фракції свідчить про пригнічення цих процесів під час старіння. Із віком відбувається відносне відновлення активності амінотрансфераз, що вказує на адаптацію мітохондрій щодо забезпечення енергією серцевого м'яза за старіння організму.

Ензим, який знаходиться на перетині вуглеводного, протеїнового та енергозабезпечувальних процесів, – лактатдегідрогеназа. Варто звернути увагу на те, що у піщанок віком 6 місяців активність ЛДГ, спорідненої до лактату, вища, ніж ЛДГ, спорідненої до пірувату (табл. 3). Цей факт підтверджено літературними даними (Prathima and Devi, 1999), що кардіоміоцити активно перетворюють лактат на піруват із подальшим утворенням глюкози. У 24 місяці це співвідношення починає порушуватися, а у 30 місяців активність обох ізоформ ензиму зрівнюється. У подальшому відбувається зміна співвідношення у бік зростання $ЛДГ_{піруват}$ і зменшення $ЛДГ_{лактат}$. За старіння міокарда процес перетворення пірувату на лактат превалює, що блокує залучення пірувату до ЦТК і глюконеогенезу. На цей факт також вказує зниження активності АсАТ у старих особин. Тобто в клітинах серця старіючих піщанок відбувається інтенсифікація анаеробних процесів, які дають менше енергії, ніж дихальний ланцюг мітохондрій. Із віком відбуваються незворотні ушкодження кардіоміоцитів, які поступово втрачають здатність перетворювати лактат, внаслідок чого його кількість зростає, а утилізація інгібується.

Один з ензимів, які беруть участь у транспорті амінокислот до клітин – γ-глутамілтранспептидаза (ГГТП). В нашому експерименті у водорозчинній фракції серця піщанок відмічали поступове підвищення активності цього ензиму (табл. 3). Літературні дані (Whitfield, 2001; Babiy et al., 2010) вказують, що збільшення активності ензиму відображає динаміку відновних процесів у клітинах і розцінюється як загальна відповідь організму на патологічний стан, що розвивається.

Аналіз результатів показав, що для піщанок переломний вік – 24 місяці. Скоріше за все, в цьому віці відбуваються зміни напрямків метаболічних процесів: превалювання катаболічних над анаболічними процесами. Із віком у саркоплазмі кардіоміоцитів і ендотеліоцитів спостерігається включення ліпідів і ліпофусцину, зниження кількості рибосом, полісом і гранул

глікогену (Rudnyova et al., 2014). Більше того, під час старіння клітин виявляються зміни ультраструктури мітохондрій: частина з них сильно набряклі з просвітленим матриксом і розширеними просторами між кристами, інша перебуває на різних стадіях дегенерації, що супроводжується лізисом крист і зовнішніх мембран. Дегенеративні та деструктивні зміни мітохондрій свідчать про істотне порушення внутрішньоклітинної біоенергетики.

В організмі старіючих піщанок спостерігається перерозподіл метаболітів і активізація адаптивних процесів, завдяки чому зберігається життєдіяльність цілісного організму, але на новому метаболічному рівні. Також можлива реалізація ще одного шляху адаптації кардіоміоцитів частково за рахунок видалення пошкоджених мітохондрій за механізмом аутофагії або мітофагії, які контролюють якість мітохондрій і гомеостаз серця (Hayat, 2014; Biala et al., 2015; Lekli et al., 2017), що потребує подальших досліджень.

Висновки

У старіючих тварин відбуваються порушення метаболічних процесів у міокарді. Підвищується рівень генерації активних форм оксигену, що пошкоджують біологічні молекули, руйнівний вплив яких спрямований переважно на мітохондрії, що, в цілому, спричиняє погіршення енергопостачання клітин. Із віком збільшується частка анаеробного дихання, внаслідок накопичення лактату. Загалом відбувається пошкодження та загибель клітин серця, вивільнення цитохрому С у цитоплазму, превалювання протеолітичних процесів, зниження загальної концентрації протеїну, перерозподіл метаболітів. Одночасно відбувається активізація адаптаційних процесів, спрямованих на збереження енантіостазу та життєдіяльності цілісного організму, але на новому метаболічному рівні. Доведено, що мітохондрії відіграють важливу роль у процесах, залучених до старіння серця, та адаптаційних процесах кардіоміцитів. Можливо, саме лабільністю та «живучістю» мітохондрій зумовлений феномен довголіття.

References

Anayt, U., Mustafe, K. M., & Biswajit, S. (2017). Coenzyme Q_{10} prevents oxidative stressand fibrosis in isoprenaline induced cardiacremodeling in aged rats. BMC Pharmacology and Toxicology, 18(1), 1–10.

Andreeva, L. Y., Kozhemjakyn, L. A., & Kyshkun, A. A. (1988). Modyfykacyja metoda opredelenyja perekysej lypydov v teste s tyobarbyturovoj kyslotoj [Modification of the method for the determination of lipid peroxides in the test with thiobarbituric acid]. Laboratory Work, 2, 41–43 (in Russian).

Anmann, T., Varikmaa, M., Timohhina, N., Tepp, K., Shevchuk, I., Chekulayev, V., Saks, V., & Kaambre, T. (2014). Formation of highly organized intracellular structure and energy metabolism in cardiac muscle cells during postnatal development of rat heart. Biochemistry Biophysics Acta, 1837(8), 1350–1361.

Babij, S. O., Domshyna, O. O., & Shtemenko, N. I. (2010). γ-Glutamiltransferaza v modeli kancerogenezu u shhuriv [γ-Glutamyltransferase in the model of carcinogenesis in rats]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 1(1), 28–33 (in Ukrainian).

Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. Journal of Hepatology, 54, 773–794.

Biala, A. K., Dhingra, R., & Kirshenbaum, L. A. (2015) Mitochondrial dynamics: Rchestrating the journey to advanced age. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 83, 37–43.

Birk, A. V., Chao, W. M., Bracken, C., Warren, J. D., & Szeto, H. H. (2014). Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. British Journal of Pharmacology, 171(8), 2017–2028.

Bonglee, K., Sanjay, K. S., & Sung-Hoon, K. (2015). Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 19(1), 113–127.

Burtis, C., Ashvud, E., & Bruns, D. (2012). Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. WB Saunders, Filadelfiya.

Das, K. C., & Muniyappa, H. (2013) Age-dependent mitochondrial energy dynamics in the mice heart: Role of superoxide dismutase-2. Experimental Gerontology, 48(9), 947–959.

Demin, E. M., Proskurnina, E. V., & Vladimirov, Y. (2008). Antioxidant effect of DHQ and rutin in peroxidase reactions catalyzed by cytochrom C. Moscow University Bulleten Chemistry 49(3), 354–360.

Donghong, L., & Lei, L. (2015). Apoptosis of hela cells induced by a newtargeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress. OncoTargets and Therapy, 7(8), 703–711.

Dyomshina, O. O., Ushakova, G. O., & Stepchenko, L. M. (2017). The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 185–190 (in Ukrainian).

Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., & Castellano, J. (2015). Altered FoF1 ATP synthase and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore during ischaemia and reperfusion in aging cardiomyocytes. Thrombosis and Haemostasis, 113(3), 441–451.

Hayat, E. (2014). Cardiac senescence and autophagy. Tumor Dormancy, Quiescence, and Senescence: Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies, 3, 125–137.

Ikeda, Y., Sciarretta, S., & Nagarajan, N. (2014). New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, ID 210934.

Judge, S., & Leeuwenburgh, C. (2007). Cardiac mitochondrial bioenergetics, Oxidative stress and aging. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 292(6), 1983–1992.

Koroljuk, M. A., Yvanova, L. Y., Majorova, Y. G., & Tokareva, V. E. (1988). Metod opredelenyja aktyvnosty katalazy [Method for the determination of catalase activity]. Laboratory Work, 1, 16–19 (in Russian).

Kostjuk, V. A., Potapovych, A. Y., & Kovaleva, Z. V. (1990). Prostoj i chuvstvitel'nyj metod opredelenija aktivnosti superoksiddismutazy, osnovannyj na reakcii okislenija kvercetina [A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the oxidation reaction of quercetin]. Questions of Medical Chemistry, 36(2), 88–91 (in Russian).

Lakatta, E. G. (2015). So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? Journal of Molecular Cellular Cardiology, 83, 1–13.

Lekli, I., Haines, D. D., Balla, G., & Tosaki, A. (2017). Autophagy: An adaptive physiological countermeasure to cellular senescence and ischaemia / reperfusion-associated cardiac arrhythmias. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 21(6), 1058–1072.

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. Cell, 153(6), 1194–1217.

Lykhatskyi, P. H., & Fira, L. S. (2017). Activity of oxidative processes in the rats' body of different age, affected by sodium nitrite, on the background of tobacco intoxication. The Pharma Innovation Journal, 6(6), 18–24.

MacQueen, H. A., Wassif, W. S., & Walker, I. (2011). Age-related biomarkers can be modulated by diet in the rat. Food and Nutrition Sciences, 2, 884–890.

Malathi, R., & Rajamurugan, R. (2015). Protection against oxidative damage using momordica charantia extract incase of phenyl hydrazine induced hemolysis. International Journal of Recent Scientific Research, 6(7), 5209–5214.

Marni, E. C., Muneaki, T., Kenichi, I., & Kuniyasu, O. (2013). Orally supplemented catechin increases heme amounts and catalase activities in rat heart blood mitochondria: A comparison between middle-aged and young rats. Experimental Gerontology, 48(11), 1319–1322.

Marques, G. L., Neto, F. F., & Oliveira, C. A. (2015). Oxidative damage in the aging heart: An experimental rat model. The Open Cardiovascular Medicine Journal, 9, 78–82.

Marzetti, E., Csiszar, A., & Dutta, D. (2013). Role of mitochondrial dysfunction and altered autophagy in cardiovascular aging and disease: From mechanisms to therapeutics. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 305(4), H459–H476.

Mdaki, K. S., Larsen, T. D., Weaver, L. J., & Baack, M. L. (2016). Age related bioenergetics profiles in isolated rat cardiomyocytes using extracellular flux analyses. PLoS ONE, 11(2), 0149002.

Owada, T., Yamauchi, H., Saitoh, S., Miura, S., Machii, H., & Takeishi, Y. (2017). Resolution of mitochondrial oxidant stress improves aged-cardiovascular performance. Coronary Artery Disease, 28(1), 33–43.

Payne, B. A., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. Biochimica et Biophysica Acta, 1847(11), 1347–1353.

Prathima, S., & Asha, D. S. (1999). Adaptations in lactate dehydrogenase and itsisozymes in aging mammalian myocardium: Interaction of exercise and temperature. Mechanisms of Ageing and Development, 108, 61–75.

Rodrнguez, G., & Lypez, M. (2014). Brain Na^+,K^+-ATPase activity in aging and disease. International Journal of Biomedical Science, 10(2), 85–102.

Rohit, B., Bhuwan, C. J., Ajudhiya, N. K., & Atish, P. (2016). Antioxidant-rich fraction of *Urtica dioica* mediated rescue of striatal mito-oxidative damage in MPTP-induced behavioral, cellular, and neurochemical alterations in rats. Molecular Neurobiology, 54(7), 5632–5645.

Roya, D., Sudhir, K., Tomi-Pekka, T., & Jyrki, K. V. (2017). Associations of estimated D-5-desaturase and D-6-desaturase activities with stroke risk

factors and risk of stroke: The kuopio ischaemic heart disease risk factor study. British Journal of Nutrition, 117(4), 582–590.

Rudnyeva, Y. V., Nevzorov, V. P., Babiychuk, V. G., Chernyavskaya, E. A., & Kulik, V. V. (2015) Features of changes of ultrastructure organization of myocardium cardiomyocytes and myocardium blood capillaries endotheliocytes in dynamics of aging in rats. Bulletin of Problems in Biology and Medicine, 4(2), 253–258 (in Ukrainian).

Selyvanov, E. A., Hmilova, G. A., Beljaeva, Y. S., Slepneva, L. V., & Sydorova, N. D. (1997). Sposob kolychestvennogo opredelenyja cytohroma C v preparatah, soderzhashhyh kollagen [Method of quantitative determination of cytochrome C in preparations containing collagen]. Patent of Russian Federation No 2084869, G01N21/25, application number 94023438/25 (in Russian).

Serova, D., Taran, O., & Dyomshina, O. (2016). Biologichna aktyvnist' preparativ na osnovi guminovyh rechovyn u pechinci pishhanok (*Meriones unguiculatus*) [Biological activity of humic substances in the liver of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 410–415 (in Ukrainian).

Shan, H., Yan, R., Diao, J., Lin, L., Wang, S., Zhang, M., Zhang, R., & Wei, J. (2015). Involvement of caspases and their upstream regulators in myocardial apoptosis in a rat model of selenium deficiency-induced dilated cardiomyopathy. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 31, 85–91.

Tepp, K., Puurand, M., & Timohhina, N. (2017). Changes in the mitochondrial function and in the efficiency of energy transfer pathways during cardiomyocyte aging. Molecular and Cellular Biochemistry, 432, 141–158.

Tepp, K., Timohhina, N., Puurand, M., Klepinin, A., Chekulayev, V., Shevchuk, I., & Kaambre, T. (2016). Bioenergetics of the aging heart and skeletal muscles: Modern concepts and controversies. Ageing Research Reviews, 28, 1–14.

Tosi, F., Sartori, F., & Guarini, P. (2014). Delta-5 and delta-6 desaturases: Crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. Advances in Experimental Medicine and Biology, 824, 61–81.

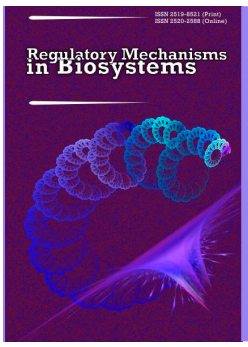
Vickers, A. E. M. (2009). Characterization of hepatic mitochondrial injuryinducedby fatty acid oxidation inhibitors. Toxicology Pathology, 37(1), 78–88.

Whitfield, J. B. (2001). Gamma glutamyl transferase. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 38(4), 263–355.

Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Duszynski, J., & Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. Nature Protocols, 4(11), 1582–1590.

Young, D. S. (2014). Effects on clinical laboratory tests: Drugs, disease, herbs and natural products, american association for clinical chemistry, John Wiley & Sons, Inc.

Zhao, L., Zou, X., & Feng, Z. (2014). Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats. Experimental Gerontology, 56, 3–12.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 521–526
doi: 10.15421/021780

Effect of hydrogen peroxide on Na^+,K^+-ATPase activity in spermatozoa of infertile men

R. V. Fafula, O. I. Meskalo, E. I. Lychkovskyy, U. P. Iefremova, O. K. Onofrovych, H. V. Maksymyuk, O. V. Melnyk, I. A. Nakonechnyi, D. Z. Vorobets, Z. D. Vorobets

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Article info

Received 27.09.2017
Received in revised form 30.10.2017
Accepted 02.11.2017

Danylo Halytsky Lviv National Medical University,
Pekarska st., 69,
Lviv, 79010, Ukraine.
Tel.: +38-097-29-680-69
E-mail: roman_fafula@ukr.net

Fafula, R. V., Meskalo, O. I., Lychkovskyy, E. I., Iefremova, U. P., Onufrovych, O. K., Maksymyuk, H. V., Melnyk, O. V., Nakonechnyi, I. A., Vorobets, D. Z., & Vorobets, Z. D. (2017). Effect of hydrogen peroxide on Na^+,K^+-ATPase activity in spermatozoa of infertile men. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 521–526. doi:10.15421/021780

Na^+,K^+-ATPase plays an essential role in sperm motility, hyperactivation, chemotaxis, acrosome reaction etc. Na^+,K^+-ATPase is sensitive to ROS insult. Apart from production of highly reactive molecules, H_2O_2 can exert a number of direct effects on cells, their metabolism and enzymes. In the present study, exposure to exogenous H_2O_2 was used to characterize the effects of H_2O_2 on Na^+,K^+-ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. It was shown that Na^+,K^+-ATPase activities in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia were inhibited by exposure to H_2O_2 (50−500 μM). H_2O_2, one of the most toxic oxygen species, has the ability to depress Na^+,K^+-ATPase activity in a dose-dependent manner. Severe inhibition of the hydrolytic activity was observed when higher H_2O_2 were used. The time course of incubation with 100 μM H_2O_2 showed a sharp decrease in the enzyme activity during the first 5 min of incubation for both normozoospermic and pathozoospermic men. The enzymatic activity of Na^+,K^+-ATPase in the sperm was completely destroyed at 20 min for asthenozoospermic men and 30 min for normozoospermic men. We show that an administation of H_2O_2 inhibited Na^+,K^+-ATPase activity in normozoospermic samples with IC_{50} of 106.6 ± 7.9 μM. IC_{50} for patients with asthenozoospermia was two times less than for healthy men with preserved fertility. For other studied groups, the differences in IC_{50} were not significant. These observations suggest that Na^+,K^+-ATPase in pathozoospermic samples is more vulnerable to H_2O_2-induced damage than in normozoospermic men. The Hill coefficient was significantly increased only for patients with asthenozoospermia, indicating increased positively cooperative binding. The decreases in Na^+,K^+-ATPase hydrolase activity in H_2O_2-treated sperm cells in men with normozoospermia were largely attenuated by exogenous GSH at 5 mM. This suggests that GSH partially protects the Na^+,K^+-ATPase from inhibition under experimental oxidative stress. However, treatment of oligo-, astheno- and oligoasthenozoospermic samples with 100 μM H_2O_2 and 5 mM GSH did not result in protection of Na^+,K^+-ATPase against induced oxidation, suggesting that the impaired Na^+,K^+-ATPase in pathozoospermic samples appears to be an irreversible event. In contrast, presence of GSH only after H_2O_2 treatment does not reverse Na^+,K^+-ATPase inhibition. This study has provided a deeper insight into the role Na^+,K^+-ATPase plays in sperm cells,it also could offer clues to the clinical application of antioxidant therapy in male infertility therapy.

Keywords: reactive oxygen species; enzyme inhibition; pathospermia; male infertility

Introduction

Na^+,K^+-ATPase (Na^+,K^+-activated Mg^{2+}-dependent ATP-hydrolase, EC 3.6.1.37) has been widely studied and verified in different cells, including spermatozoa (Thundathil et al., 2006). Two isoforms of the catalytic subunit of the Na^+,K^+-ATPase, α1 and α_4 which have different biochemical properties, coexist in sperm cells. Spermatozoa from knockout mice lacking α_4 were incapable of fertilizing eggs *in vitro* , indicating the essential role of Na^+,K^+-ATPase for sperm fertility (Sanchez et al., 2006).

Hyperproduction of reactive oxygen species (ROS) can damage sperm cells and is considered to be one of the mechanisms of infertility (Mahfouz et al., 2010). Spermatozoa have an unusual lipid composition of plasma membranes which is distinct from those of mammalian somatic cells. They are rich in polyunsaturated fatty acids and are very susceptible to attack by ROS (Shi et al., 2010). ROS are continuously produced in most cells and their levels are regulated by a number of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. They have drawn attention for their potential to disrupt normal cell functions by targeting proteins for modification. ROS include hydrogen peroxide, singlet oxygen, the superoxide radical and the hydroxyl radical. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is generated by the dismutation of the superoxide anion radical and can cross cell membranes more easily (Groeger et al., 2009). ROS can modify different biomolecules including the polyunsaturated fatty acids of sperm membranes, resulting in a lipid peroxidation and disruption of membrane proteins.

It is known that Na^+,K^+-ATPase plays a crucial role in cell signalling. Na^+,K^+-ATPase regulates cell motility, cell proliferation, glycogen synthesis, intracellular calcium and sodium homeostasis, calcium signalling, apoptosis etc. (Barwe et al., 2005; Khundmiri et al., 2006; Nguyen et al., 2007). The signaling functions of the enzyme were demonstrated in various cells including spermatozoa (Thundathil et al., 2006). Oxidative stress can activate the Na^+,K^+-ATPase signalling. H_2O_2 and exogenously added glucose oxidase (which generates a sustained low level of H_2O_2) activates Na^+,K^+-

ATPase signaling in cardiac myocytes (Liu et al., 2006). Na^+,K^+-ATPase is sensitive to ROS insult. It is known that increases in superoxide anion/hydrogen peroxide and reactive nitrogen species nitric oxide, which are mainly produced by mitochondria, NADPH oxidase, xanthine oxidase and uncoupled NO synthesis, can modify the Na^+,K^+-ATPase α and β subunit to inhibit the Na^+,K^+-ATPase enzymatic (ion exchange) activity (Petrushanko et al., 2012; Liu et al., 2012). Exogenous addition of H_2O_2 has been shown to increase intracellular ROS levels in spermatozoa (Mahfouz et al., 2008). Apart from production of highly reactive molecules, H_2O_2 can exert a number of direct effects on cells, their metabolism and enzymes. In the present study, exposure to exogenous H_2O_2 was used to characterize the effects of H_2O_2 on Na^+,K^+-ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia.

Materials and methods

Patients. 24 infertile men with different forms of pathospermia were involved in this study. They were recruited between September 2016 and February 2017. A detailed medical history was performed in all studied cases. Exclusion criteria: subjects currently on any medication or antioxidant supplementation were not included. In addition, subjects with infertility lasting over 10 years, azoospermia, genital infection, chronic illness and serious systemic diseases, smokers and alcoholic men were excluded from the study because of their well-known high seminal reactive oxygen species levels and decreased antioxidant activity, which may affect ATPase activities.

The control group consisted of 13 healthy men with somatic fertility, normozoospermia and confirmed parenthood (married for 3–10 years and have healthy 1–3 children). Semen samples were obtained by masturbation and collected into sterile containers, following 3–5 days' abstinence from sexual activity. After liquefaction at 37 °C with 5% CO_2 in air, semen samples were examined for volume, sperm concentration, pH, morphology and motility according to World Health Organization guidelines (WHO, 2010). Before participating in the study, all the men were made aware of patient information leaflets and gave informed consent to participate in the research. Terms of sample selection meet the requirements of the principles of Helsinki Declaration on Protection of Human Rights, Convention of Europe Council on Human Rights and Biomedicine and the provisions of laws of Ukraine. Approval for study was taken from the Ethics Committee of Danylo Halytsky Lviv National Medical University. All patients and healthy donors gave written informed consent to participate in the research (Ethical Committee Approval, protocol No 2 from February 16, 2015).

Cell preparation. Sperm cells were washed from semen plasma by three times centrifugation at 3,000 g for 10 min in media which contained (mM): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (pH 7.4). The content of total protein in the samples was determined by the Lowry method using a kit to determine its concentration ("Simko Ltd"). The aliquots were subjected to exogenous ROS stimulation with H_2O_2 (5 min, 37 °C, 5% CO_2) at different concentrations (50, 100 and 500 μM) (if nothing else is indicated). Sperm samples without exogenous H_2O_2 served as control in the study. Also, when indicated, reduced glutathione (5.0 mM GSH) was present during the H_2O_2-treatment or was introduced for 10 min only after H_2O_2-treatment.

Assay of Na^+,K^+-ATPase activity. Determination of Na^+,K^+-ATPase activities was carried out in permeabilized spermatozoa. The detergent saponin in a final concentration of 0.5% was added to sperm suspension for permeabilization of sperm membranes. The total Na^+,K^+-ATPase activity was assayed with the following incubation medium (mM): 120 NaCl, 30 KCl, 5 $MgCl_2$, 3 ATP, 1 EGTA, 0.01 thapsigargin (specific inhibitor of SERCA), 1 NaN_3 (specific inhibitor of mitochondrial ATPase), 20 Hepes-Tris (pH 7.4; at 37 ºC). The protein concentration did not exceed 50 mg/ml. The reaction was started by addition of aliquot of permeabilized sperm cells. After a 5 min incubation, 1 ml of a stop solution containing (mM) 1.5 M sodium acetate, 3.7% formaldehyde, 14% ethanol, 5% trichloroacetic acid (pH 4.3) acid was added. P_i was determined by the Fiske-Subbarow method using assay kit "Simko Ltd" (Ukraine). Ouabain-sensitive Na^+,K^+-ATPase activity was determined as the difference in ATP hydrolysis in the absence and presence of 1 mM ouabain, which is known to completely block the Na^+,K^+-ATPase.

Statistical analysis. Experimental data were processed by methods of variation statistics using software MS Office. The results are presented as the mean ± standard error (x ± SE). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the difference in the means between infertile and healthy men. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

Na^+,K^+-ATPase is one of the targets for ROS and is directly involved in oxidative stress. Spermatozoa were subjected to oxidative stress in the form of H_2O_2. It was shown that exposure of sperm cells to various concentrations of H_2O_2 demonstrated the ability of ROS to depress Na^+,K^+-ATPase activity in a dose-dependent manner. The low concentrations of H_2O_2 noticeably decreased the Na^+,K^+-ATPase activity, but they did not lower Na^+,K^+-ATPase activity dramatically, contrary to the higher concentrations. Specifically, Na^+,K^+-ATPase activity of sperm cells decreased to 94.0 ± 7.4 and 37.6 ± 5.9% of initial activity in spermatozoa of healthy men (normozoospermia) treated with 50 μM and 100 μM H_2O_2, respectively (Fig. 1). However, the residual enzyme activities (10.6 ± 1.9% of initial activity) remain.

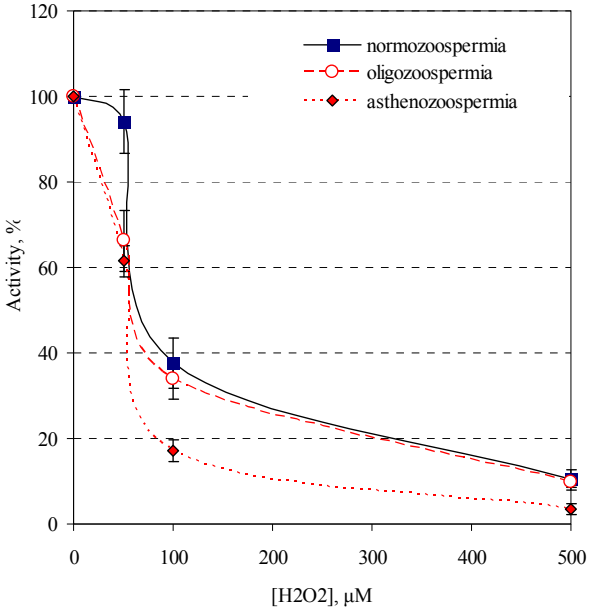


Fig. 1. Effect of hydrogen peroxide on the ouabain-sensitive Na^+,K^+-ATPase activity of spermatozoa of fertile and infertile men; data are presented as x ± SE, n = 4–6

When sperm cells of patients with pathospermia were exposed to various concentrations of H_2O_2, a dose-dependent inhibition of Na^+,K^+-ATPase enzymatic activity was also seen. For example, in patients with oligozoo- and asthenozoospermia the Na^+,K^+-ATPase activity of sperm cells decreased to 33.9 ± 4.6 and 17.3 ± 5.8% of initial activity when treated with 100 μM H_2O_2, respectively. Similar results were obtained for sperm cells of patients with oligoasthenozoospermia (data not shown). Also, sperm cells were incubated with 100 μM H_2O_2 at different times and then Na^+,K^+-ATPase activity was determined (Fig. 2). The time course of incubation with 100 μM H_2O_2 showed a sharp decrease in the enzyme activity during the first 5 min of incubation for both normozoospermic and pathozoospermic men. The enzymatic activity of the sperm Na^+,K^+-ATPase was completely destroyed at 20 min for asthenozoospermic men and 30 min for normozoospermic men.

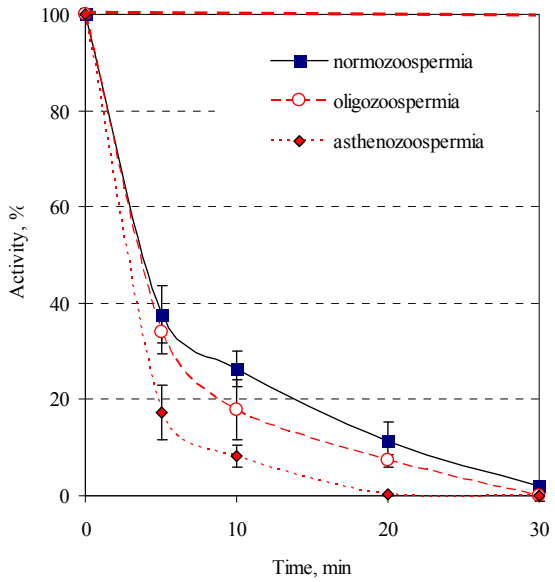


Fig. 2. Time course of Na^+,K^+-ATPase inhibition by H_2O_2; data are presented as x ± SE, n = 4–6

In order to elucidate the possible mechanism of H_2O_2 inhibitory effect the main kinetic parameters of inhibition were determined. Linearization of concentration curves in Hill's plot is represented on Figure 3. Obtained values of half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and Hill coefficient (nH) are represented in Table 1. The susceptibility of Na^+,K^+-ATPase to H_2O_2 in healthy men differed greatly from that of pathozoospermic patients. This is evidenced by the fact that IC_{50} for inhibition of Na^+,K^+-ATPase by H_2O_2 was greater for normozoospermic than for patients with oligo-, astheno- and oligoasthenozoospermia. IC_{50} for patients with asthenozoospermia was two times less than for healthy men with preserved fertility ($P < 0.05$). For other studied groups the differences in IC_{50} were not significant. These observations suggest that Na^+,K^+-ATPase in pathozoospermic samples is more vulnerable to H_2O_2 induced damage than in normozoospermic men. The Hill coefficient was significantly increased only for patients with asthenozoospermia indicating increased positively cooperative binding.

Table 1
Inhibition parameters of Na^+,K^+-ATPase of the ouabain-sensitive Na^+,K^+-ATPase of spermatozoa of fertile and infertile men by H_2O_2

Kinetic parameters	Normozoospermic men	Pathozoospermic men		
		oligozoospermia	asthenozoospermia	oligoasthenozoospermia
IC_{50}, μM	106.6 ± 21.9	74.6 ± 9.8	52.8 ± 3.2*	83.9 ± 8.0
n_H	1.42 ± 0.18	1.45 ± 0.16	2.00 ± 0.15*	1.52 ± 0.11

Note: data are presented as means ± standard error; n = 4–6; * – $P < 0.05$ compared to normozoospermic men (men with preserved fertility).

It is known that catalytic activity of the Na^+,K^+-ATPase protein is critically dependent on free SH groups. Therefore, we next tested whether glutathione (GSH) protected H_2O_2-induced inhibition of the enzyme. A single concentration of 100 μM H_2O_2 was chosen, as this was close to the IC_{50} value for Na^+,K^+-ATPase inhibition (Table 1). In the present study, the decreases in Na^+,K^+-ATPase hydrolase activity in H_2O_2-treated sperm cells in men with normozoospermia were largely attenuated by exogenous GSH at 5 mM (Fig. 4*a*).

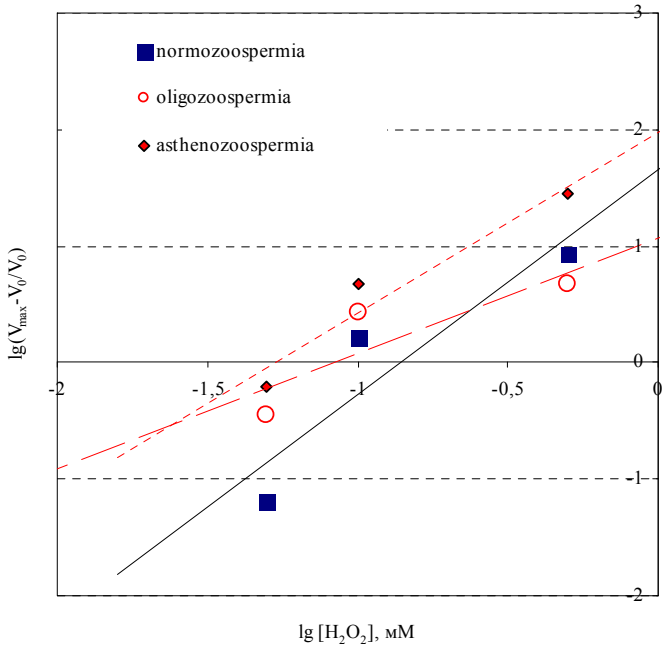


Fig. 3. Linearization of concentration curves represented on Fig. 1 in Hill's plot: x ± SE, n = 4–6; $R^2 > 0.85$

Specifically, the effect of 100 mM H_2O_2 in absence of GSH in incubation medium resulted in decrease of Na^+,K^+-ATPase activity to 37.6 ± 5.9% of initial activity, while in presence of 5 mM GSH no inhibitory effect was noted (Na^+,K^+-ATPase activity was 85.6 ± 8.8% of initial activity). This suggests that GSH partially protects the Na^+,K^+-ATPase from inhibition under experimental oxidative stress. However, treatment of oligozoospermic samples with 100 μM H_2O_2 and 5 mM GSH did not result in a protection of Na^+,K^+-ATPase against induced oxidation, suggesting that the impaired Na^+,K^+-ATPase in oligozoospermic samples appears to be an irreversible event (Fig. 4*b*). Similar results were obtained for asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic samples (data not shown).

GSH alone significantly did not alter the Na^+,K^+-ATPase hydrolase activity in both normozoospermic and pathospermic samples (Fig. 5). Presence of GSH during H_2O_2 treatment had a protective effect on Na^+,K^+-ATPase activity and confers protection against oxidative stress. Thus it appears that GSH effectively "scavenges" H_2O_2 and, thus, prevents Na^+,K^+-ATPase inhibition.

In contrast, presence of GSH only after H_2O_2 treatment does not reverse Na^+,K^+-ATPase inhibition (data not shown). It is known that H_2O_2 can oxidize SH groups to disulfides, which leads to the enzyme disruption. However, addition of disulfide-reducing agents GSH after H_2O_2 exposure in our experiments did not result in a recovery of Na^+,K^+-ATPase activity.

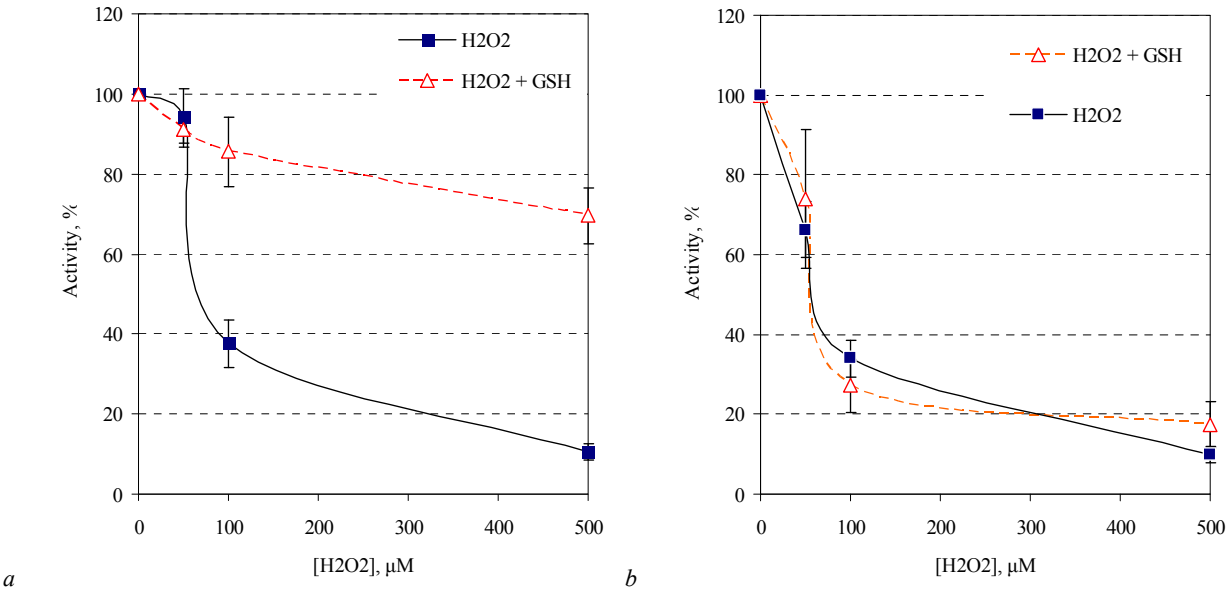


Fig. 4. Effects of 0.1 mM H_2O_2 and 5 mM GSH on the ouabain-sensitive Na^+,K^+-ATPase of spermatozoa of fertile men (*a*) and infertile men (oligozoospermia) (*b*): x ± SE, n = 4–6

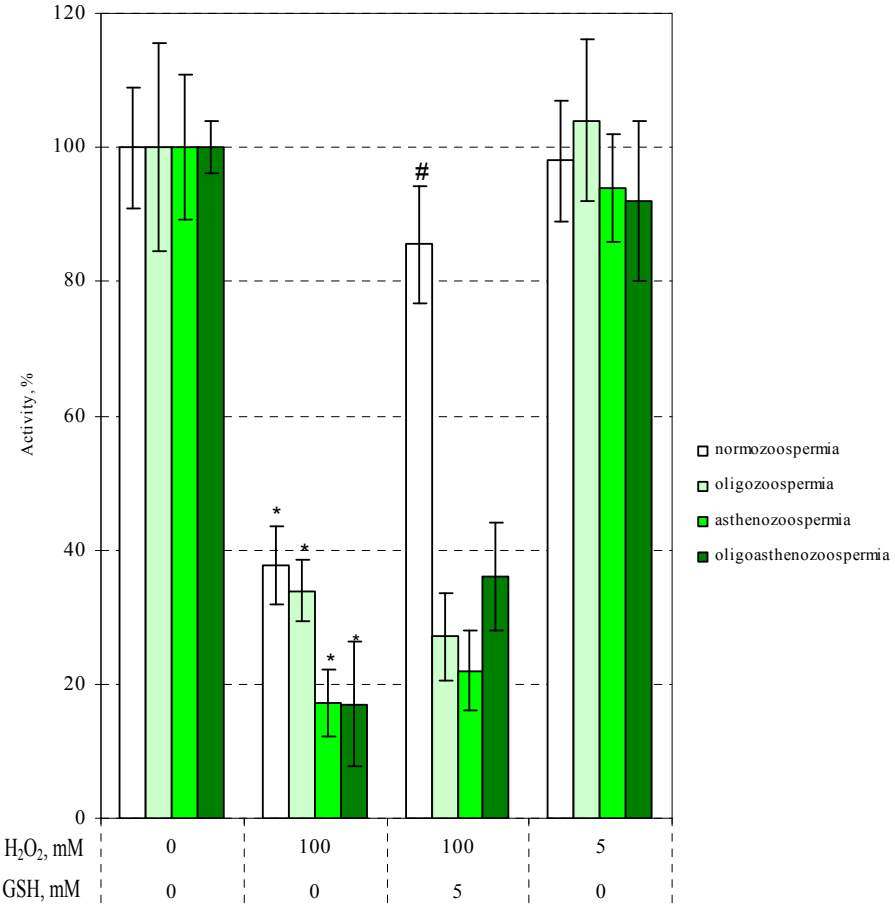


Fig. 5. Effects of 0.1 mM H_2O_2 and 5 mM GSH on the ouabain-sensitive Na^+,K^+-ATPase of spermatozoa of fertile and infertile men with different forms of pathospermia; x ± SE, n = 4–6; * – P < 0.05 compared to normozoospermic men (men with preserved fertility); # – P < 0.05 compared to data without exogenous GSH

Discussion

In our previous study (Meskalo et al., 2017), we found that spermatozoa of men with normozoospermia showed activity of ouabainsensitive Na^+,K^+-ATPase about 46.3 ± 4.2 nmol Pi/min•mg protein. Oligozoo-, asthenozoo-, oligoasthenozoo- and leucocytospermic patients have significantly impaired Na^+,K^+-ATPase compared to healthy men. In present study, H_2O_2, one of the most toxic oxygen species, has the ability to depress Na^+,K^+-ATPase activity in a dose-dependent manner.

Overall, our results are consistent with several other studies. In particular, Na^+,K^+-ATPase activity was markedly inhibited in ghost cells in the presence of 0.5 mM H_2O_2 (Derham et al., 2003). Liu et al. showed that ROS stress acted as ouabain and stimulated endocytosis of the Na^+,K^+-ATPase, which resulted in a significant inhibition of Na^+,K^+-ATPase activity (Liu et al., 2004). However, conflicting data

have been obtained in other studies. In some earlier studies researchers have shown that H_2O_2 increases Na^+,K^+-pump activity in bovine pulmonary arterial endothelial cells (Meharg et al., 1993). A sharp increase in Na^+,K^+-ATPase activity was observed in *Leishmania amazonensis* in response to low increased amounts (0.1 μM) of H_2O_2 (Rocco-Machado et al., 2015).

Oxidative stress mediated by lipid peroxidation of sperm membranes may be responsible for the inhibition of Na^+,K^+-ATPase. ROS attack polyunsaturated fatty acids of membrane phospholipids, can modify different biomolecules, resulting in a lipid peroxidation. Spermatozoa have an unusual lipid composition of plasma membranes which is distinct from those of mammalian somatic cells. They are rich in polyunsaturated fatty acids and are very susceptible to attack by ROS. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are the more important marker of lipid peroxidation, which has been used to monitor the degree of peroxidative damage in spermatozoa (Januszewski et al., 2005). In our previous study, the increased TBARS content has been noted in sperm cells of infertile men compared with men with preserved fertility (Fafula et al., 2017).

It is known that catalytic activity of the Na^+,K^+-ATPase protein is critically dependent on free SH groups. It was found that control spermatozoa (healthy men with normozoospermia) exhibited Na^+,K^+-ATPase and free -SH content significantly higher than those of as thenozoospermic patients (Vignini et al., 2009). A decrease in the number of free -SH groups suggests that the SH groups may have been oxidized to disulfides by H_2O_2. However, in another study no correlation was found between Na^+,K^+-ATPase activity and SH content (Koçak-Toker et al., 2002). It is also known that different enzyme and non-enzyme antioxidants and some inhibitors of oxidase activity can attenuate ROS mediated inhibition of Na^+,K^+-ATPase activity. Intracellular GSH depletion is capable of sensitizing many types of cells to apoptosis (Tsai-Turton and Luderer, 2006), however, little is known concerning the relationship between intracellular GSH loss and Na^+,K^+-ATPase in sperm cells. Therefore, we tested whether GSH protected H_2O_2-induced inhibition of Na^+,K^+-ATPase. We found that a decrease in Na^+,K^+-ATPase hydrolase activity in H_2O_2-treated sperm cells in men with normozoospermia was largely attenuated by exogenous GSH at 5 mM. This suggests that GSH partially protects the Na^+,K^+-ATPase from inhibition under experimental oxidative stress. Similar results which show protective effects of GSH on Na^+,K^+-ATPase against oxidation were demonstrated earlier (Schulpis et al., 2006). However, administration of GSH only after H_2O_2 treatment does not reverse Na^+,K^+-ATPase inhibition. This result may be explained by assumption that GSH led to recovery of cysteines but not enzyme activity or that inhibition is the result of modifying other aminoacids or not only -SH groups account for the Na^+,K^+-ATPase inhibition by H_2O_2.

Na^+,K^+-ATPase may serve as a molecular target for ROS and signaling via the Na^+,K^+-ATPase by ROS may generate second messengers such as intracellular Ca^{2+} ions. It was shown that ROS-induced changes in intracellular Ca^{2+} appeared to be correlated to its effect on the Na^+,K^+-ATPase. In addition, ouabain and ROS exhibited the additive effect on intracellular Ca^{2+}, suggesting a common target for both stimuli (Liu et al., 2006). It was found that Na^+,K^+-ATPase is sensitive to redox and oxygen status of cell (Bogdanova et al., 2006). Na^+,K^+-ATPase is redox-sensitive with an "optimal redox potential range," where ROS levels out of this "optimal range" are capable of inhibiting Na^+,K^+-ATPase activity (Petrushanko et al., 2006). Inhibition in the effect of ROS on Na^+,K^+-ATPase can be explained by protein modification. In purified renal Na^+,K^+-ATPase, peroxynitrite ($ONOO^-$) causes tyrosine nitration and cysteine thiol group modification of the Na^+,K^+-ATPase (Reifenberger et al., 2008).

Inhibition of sperm Na^+,K^+-ATPase activity could be explained by a direct effect of the exogenous H_2O_2, but could also result from the generation of ROS and reactive nitrogen species (RNS) by damaged spermatozoa. It was shown that mitochondria as the major site for ROS production can contribute significantly to oxidative stress in defective spermatozoa (Koppers et al., 2008). We believe that indirect effect of H_2O_2 is associated with damage to sperm cells, in particular mitochondria disruption causing the mitochondria to leak high levels of free electrons. In turn, damaged mitochondria contribute to the increase in ROS and RNS levels. The results support our assumption that exogenous H_2O_2 should adversely affect sperm motility parameters and corresponds to the results of other studies. Excessive ROS levels have been linked to lipid peroxidation of the sperm plasma membrane, resulting in a loss of membrane fluidity, structure and function (Mahfouz et al., 2009a). Undoubtedly, this study has provided a deeper insight into the role Na^+,K^+-ATPase plays in sperm cells, also could offer clues to the clinical application of antioxidant therapy in male infertility therapy.

Conclusions

H_2O_2, one of the most toxic oxygen species, has the ability to depress Na^+,K^+-ATPase activity in a dose-dependent manner. IC_{50} value for patients with asthenozoospermia was two times less than for healthy men with preserved fertility. These observations suggest that Na^+,K^+-ATPase in pathozoospermic samples is more vulnerable to H_2O_2 induced damage than in normozoospermic men. The Hill coefficient was significantly increased only for patients with asthenozoospermia, indicating increased positively cooperative binding. The decreases in Na^+,K^+-ATPase hydrolase activity in H_2O_2-treated sperm cells in men with normozoospermia were largely attenuated by exogenous GSH at 5mM.

The publication contains the results of studies conducted under the President of Ukraine's grant for competitive projects (project No Ф63/97-2016 from 10.08.2016 "Molecular biological regulatory mechanisms of disturbance of fertilizing ability spermatozoa and the development of new immunobiochemical diagnostic methods of fertility in men" (scientific supervisor – Doc. Sci. D. Vorobets) of the State Fund for Fundamental Research (The President's Order No 97/2016-рп dated: April 13, 2016).

References

Barwe, S. P., Anilkumar, G., Moon, S. Y., Zheng, Y., Whitelegge, J. P., Rajasekaran, S. A., & Rajasekaran, A. K. (2005). Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. Molecular Biology of the Cell, 16(3), 1082–1094.

Bogdanova, A., Petrushanko, I., Boldyrev, A., & Gassmann, M. (2006). Oxygen- and redox-induced regulaton of the Na/K ATPase. Current Enzyme Inhibition, 2(1), 37–59.

Derham, B. K., Ellory, J. C., Bron, A. J., & Harding, J. J. (2003). The molecular chaperone a-crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K-ATPase against glycation and oxidative stress. European Journal of Biochemistry, 270, 2605–2611.

Fafula, R. V., Onofrovych, O. K., Iefremova, U. P., Nakonechnyi, I. A., & Vorobets, Z. D. (2017). Intensity of processes of lipid peroxidation in sperm of men with fertility breach. Bulletin of Problems Biology and Medicine, 135, 199–204.

Groeger, G., Mackey, A. M., Pettigrew, C. A., Bhatt, L., & Cotter, T. G. (2009). Stress-induced activation of Nox contributes to cell survival signalling via production of hydrogen peroxide. Journal of Neurochemistry, 109, 1544–1554.

Januszewski, A. S., Alderson, N. L., Jenkins, A. J., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (2005). Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. Journal of Lipid Research, 56, 1440–1449.

Khundmiri, S. J., Metzler, M. A., Ameen, M., Amin, V., Rane, M. J., & Delamere, N. A. (2006). Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. American Journal of Physiology, Cell Physiology, 291(6), 1247–1257.

Koçak-Toker, N., Aktan, G., & Aykaç-Toker, G. (2002). The role of Na,K-ATPase in human sperm motility. International Journal of Andrology, 25(3), 180–185.

Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughli, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 93(8), 3199–3207.

Liu, C.-C.,Garcia, A., Mahmmoud, Y. A., Hamilton, E. J., Galougahi, K. K., Fry, N. A. S., Figtree, G. A., Cornelius, F., Clarke, R. J., & Rasmussen, H. H. (2012). Susceptibility of β_1 Na^+-K^+ pump subunit to glutathionylation and oxidative inhibition depends on conformational state of pump. Journal of Biological Chemistry, 287, 12353–12364.

Liu, J.., Kesiry, R., Periyasamy, S. M., Malhotra, D., Xie, Z., & Shapiro, J. I. (2004). Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. Kidney International, 66, 227–241.

Liu, L., Li, J., Liu, J., Yuan, Z., Pierre, S. V., Qu, W., Zhao, X., & Xie, Z. (2006). Involvement of Na^+/K^+-ATPase in hydrogen peroxide-induced hypertrophy in cardiac myocytes. Free Radical Biology and Medicine, 41(10), 1548–1556.

Mahfouz, R. Z., Aziz, N., Sharma, R., Bykova, M., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2008). Assessment of intracelular human sperm reactive oxygen species after hydrogen peroxide exposure using four different probes. Fertility and Sterility, 90(Suppl 1), 320–321.

Mahfouz, R. Z., du Plessis, S. S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2010). Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. Fertility and Sterility, 93(3), 814–821.

McKenna, M. J., Medved, I., Goodman, C. A., Brown, M. J., Bjorksten, A. R., Murphy, K. T., Petersen, A. C., Sostaric, S., & Gong, X. (2006). N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na^+,K^+-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. Journal of Physiology, 576(1), 279–288.

Meharg, J. V., McGowan-Jordan, J., Charles, A., Parmelee, J. T., Cutaia, M. V., & Rounds, S. (1993). Hydrogen peroxide stimulates sodium-potassium pump activity in cultured pulmonary arterial endothelial cells. American Journal of Physiology, 265(6), 613–621.

Meskalo, O., Fafula, R. V., Lychkovskyj, E. I., & Vorobets, Z. D. (2017). Na^+,K^+-ATPase and Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. Studia Biologica, 11(2), 5–12.

Nguyen, N. T., Wallace, D. P., & Blanco, G. (2007). Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. Journal of the American Society of Nephrology, 18(1), 46–57.

Petrushanko, I. Y., Yakushev, S., Mitkevich, V. A., Kamanina, Y. V., Ziganshin, R. H., Meng, X., Anashkina, A. A., Makhro, A., Lopina, O. D., Gassmann, M., Makarov, A. A., & Bogdanova, A. (2012). S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic alpha subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. Journal of Biological Chemistry, 287, 32195–32205.

Petrushanko, N., Bogdanov, E., Bulygina B., Grenacher, T., Leinsoo, A., Boldyrev, M., Gassmann, M., & Bogdanova, A. (2006). Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 290(4), 916–925.

Reifenberger, M. S., Arnett, K. L., Gatto, C., & Milanick, M. A. (2008). The reactive nitrogen species peroxynitrite is a potent inhibitor of renal Na-K-ATPase activity. American Journal of Physiology, 295(4), 1191–1198.

Rocco-Machado, N., Cosentino-Gomes, D., & Meyer-Fernandes, J. R. (2015). Modulation of Na^+/K^+ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis*. PLoS One, 10(6), e0129604.

Sanchez, G., Nguyen, A. T., Timmerberg, B., Tash, J. S., & Blanco, G. (2006). The Na,K-ATPase a4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. Molecular Human Reproduction, 12, 565–576.

Schulpis, K. H., Papassotiriou, I., Parthimos, T., Tsakiris, T., & Tsakiris, S. (2006). The effect of L-cysteine and glutathione on inhibition of Na^+,K^+-ATPase activity by aspartame metabolites in human erythrocyte membrane. European Journal of Clinical Nutrition, 60(5), 593–597.

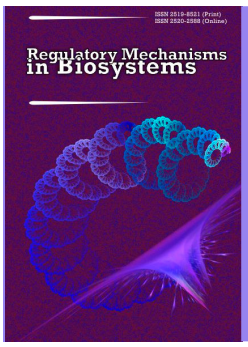
Shi, L. G., Yang, R. J., Yue, W. B., Xun, W. J., Zhang, C. X., Ren, Y. S., Shi, L., & Lei, F. L. (2010). Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal Reproduction Science, 118 (2–4), 248–254.

Thundathil, J. C., Anzar, M., & Buhr, M. M. (2006). Na^+/K^+-ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. Biology of Reproduction, 75, 308–317.

Tsai-Turton, M., & Luderer, U. (2006). Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. Endocrinology, 147, 1224–1236.

Vignini, A., Buldreghini, E., Nanetti, L., Amoroso, S., Boscaro, M., Ricciardo-Lamonica, G., Mazzanti, L., & Balercia, G. (2009). Free thiols in human spermatozoa: are Na^+/K^+-ATPase, Ca^{2+}-ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation? Reproductive BioMedicine Online, 18(1), 132–140.

WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. (2010). WHO.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 527–531
doi: 10.15421/021781

Adhesive properties of film-forming strains of staphylococci, isolated from different compartments of the human gastrointestinal tract

T. M. Shevchenko, O. Y. Hovorukha, Y. S. Voronkova, O. S. Voronkova

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 20.10.2017
Received in revised form 14.11.2017
Accepted 16.11.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-056-372-58-76
E-mail: dnushevchenkot@gmail.com

Shevchenko, T. M., Hovorukha, O. Y., Voronkova, Y. S., & Voronkova, O. S. (2017). Adhesive properties of film-forming strains of staphylococci, isolated from different compartments of the human gastrointestinal tract. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 527–531. doi:10.15421/021781

Dysbiotic disorders, realized as changes in the composition of microbiota of different biotopes, are among the most difficult conditions to cure. This is due primarily to the fact that opportunistic microorganisms that actually mediate the development of such states are characterized by an increased colonization potential, which at the first stage of penetration into a biotope is realized as adhesion to the cell surface. When a microorganism successfully realises this stage it enters into a competitive relationship with the autochthonous flora and begins to inhibit its development. Such strategy becomes especially successful if the colonist has the ability to form a biofilm. It is known that the initial stage of biofilm formation is adhesion onto the surface, therefore, the study of adhesive properties of clinical strains opens the way for understanding the initial processes of development of dysbiosis and allows for the development of preventive measures. The aim of our research was to investigate the differences in the manifestation of adhesive properties of film-forming strains of staphylococci isolated from different compartments of the human gastrointestinal tract. We established that the frequency of detection of film-forming strains of staphylococci in different compartments of the gastrointestinal tract in the norm or during the development of lesions was for *Staphylococcus aureus* from 23.8% to 79.4%, and for *S. epidermidis* from 15.4% to 100%, which indicates the significant role of these microorganisms in the development of complications at the specified biotope. It was determined that the maximal manifestation of adhesive properties was typical for biofilm-forming strains of *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated during intestinal dysbiosis. The average values of the adhesion index were 6.00 ± 1.41 and 5.88 ± 2.22 and the index of adhesion of microorganisms was 6.61 ± 1.46 and 6.64 ± 2.48 respectively. The lowest value of these indices for film-forming strains was determined for strains of staphylococci isolated from the gastrointestinal tracts of patients suffering from food poisoning – 2.60 ± 1.14 and 2.86 ± 1.23 respectively. The obtained data suggest that the ability for biofilm-formation and a high level of adhesion indexes indicate with a high probability that a strain will cause long-lasting lesions, such as dysbiosis. The determination of these markers at the diagnostic stage will allow a broader study of the biological properties of the strain, which may be the basis for the development of an individual, optimal therapeutic scheme that conforms with the tasks of personalized medicine.

Keywords: *Staphylococcus*; adhesive properties; biofilm; gastrointestinal tract; dysbiosis

Адгезивні властивості плівкотвірних штамів стафілококів, виділених із різних відділів шлунково-кишкового тракту людини

Т. М. Шевченко, О. Ю. Говоруха, Ю. С. Воронкова, О. С. Воронкова

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Дисбіотичні порушення, що виражаються у змінах складу мікробіоти окремих біотопів, – одні з найбільш складно виліковних станів. Умовно-патогенні мікроорганізми, які власне опосередковують розвиток таких станів, відрізняються підвищеним колонізаційним потенціалом, що на першому етапі їх проникнення реалізується як адгезія до клітинної поверхні. За вдалої реалізації цього етапу мікроорганізм вступає у конкурентні відносини з автохтонною флорою та починає інгібувати її розвиток. Особливого успіху така стратегія досягає за наявності в колоніста здатності до формування біоплівки. Частота виявлення плівкотвірних штамів стафілококів у різних відділах шлунково-кишкового тракту в умовах норми та за розвитку уражень становила для *S. aureus* 23,8–79,4%, а для *S. epidermidis* – 15,4–100,0%. Максимальний прояв адгезивних властивостей типовий для біоплівкотвірних штамів епідермального та золотистого стафілококів, виділених за дисбіозу кишечника. Середні значення показника адгезії становили 6,0 і 5,9, а індексу адгезивності мікроорганізмів 6,6 і 6,7, відповідно. Найменші вказані показники для плівкотвірних штамів визначено для штамів стафілококів, виділених під час харчових отруєнь: 2,6 та 2,9, відповідно.

Ключові слова: стафілококи; адгезивні властивості; біоплівка; шлунково-кишковий тракт; дисбіоз

Вступ

Поширення стафілококових біоплівок нині доволі відома проблема біології та медицини. У першу чергу це пов'язано з тим, що у плівковій формі мікроорганізми набувають ознак посиленої стійкості до дії факторів довкілля (Hoiby et al., 2010; McKew et al., 2011; Wright et al., 2013). Крім того, плівкотвірні штами мають підвищений колонізаційний потенціал, що дозволяє їм швидко адаптуватися до практично будь-якого біотопу з витриманням конкурентного впливу автохтонних мікроорганізмів (Sannasiddappa et al., 2011). Колонізаційна здатність визначається низкою зовнішніх і внутрішніх факторів, серед яких першочергове значення звичайно мають властивості самих мікроорганізмів. Переважне значення серед різних біологічних властивостей штамів мікроорганізмів для колонізації різних біотопів організму людини мають адгезивні властивості, адже адгезія – перший процес, який власне визначає можливість колонізації поверхні та закріплення на ній (Paster et al., 2001; Nair et al., 2014; Lin et al., 2015). Посилені адгезивні властивості сприяють затриманню транзиторних мікроорганізмів і підвищенню їх виживання в умовах антагоністичних відносин та дії захисних факторів місцевого імунітету слизових оболонок (Patterson et al., 2010; Becker et al., 2014). Стафілококи у більшості мають виражені адгезивні властивості, саме тому їх розглядають як найбільш схильні до плівкотвірних процесів бактерії (Becker et al., 2014; Misawa et al., 2015). За потенціалом до утворення біоплівки вони поступаються лише псевдомонадам (Hou et al., 2012; Orazi and O'Toole, 2017). Під час первинного прикріплення до поверхні відбувається активація специфічних груп генів, що забезпечують посилений синтез екзополімеру та молекул, які здійснюють міжклітинні контакти, зокрема, триває синтез міжклітинного полісахаридного адгезину. Ці групи генів активуються лише у прикріплених форм і їх нокаут унеможливлює утворення біоплівки (Giaouris et al., 2015; Hobley et al., 2015). У разі реалізації вказаних подій ініціюється формування біоплівки (Archer et al., 2011; Gostev and Sidorenko, 2012; Wright et al., 2013).

Мета цієї статті – оцінити відмінності прояву адгезивних властивостей плівкотвірних штамів стафілококів, виділених із різних відділів шлунково-кишкового тракту людини.

Матеріал і методи досліджень

Для досліджень взято штами стафілококів, виділені з різних відділів шлунково-кишкового тракту людини: ротової порожнини (відбирання тампоном з ясенних карманів) та з кишечника (фекалії). Окремо досліджували групи штамів, виділені від осіб із порушеннями мікробіоти та від осіб, яких вважали здоровими.

Культури ідентифікували за результатами вивчення морфологічних, тинкторіальних та фізіолого-біохімічних ознак. Ідентифікацію отриманих штамів проводили відповідно до ознак, наведених у визначнику бактерій Берджі (Holt et al., 1994). Для виділення представників роду *Staphylococcus* проводили висівання на стафілококовий агар 110 (HiMedia, Індія) та інкубували протягом доби за температури 37 °С. Мікроскопіювали матеріал зі зрослих колоній мікроорганізмів (Labinskaia and Volina, 2008). Зі зрослих колоній кремових і жовтих відтінків відбирали матеріал, з якого виготовляли мікроскопічні препарати, які забарвлювали за Грамом. Визначаючи грампозитивні коки, зібрані у грона, культури тестували за такими ознаками: ферментація глюкози в анаеробних умовах з утворенням кислоти (позитивна), каталаза (позитивна), ріст за концентрації натрію хлориду 15% (позитивний). Варіабельні ознаки: відновлення нітратів до нітритів, наявність коагулази та продукція гемолізинів.

Здатність до плівкоутворення визначали на 96-лункових планшетах (Медполимер, РФ). Для цього добову культуру суспендували в ізотонічному розчині NaCl (0,5%) за стандартом мутності $1 \cdot 10^4$ КУО/мл. Отриману суспензію у кількості 50 мкл вносили у лунки планшета, що містили 150–200 мкл поживного бульйону (HiMedia, Індія). Інкубацію проводили у термостаті за температури 37 °С 72 години. Після закінчення інкубації залишки живильного середовища обережно відбирали шприцом, а лунки промивали тричі ізотонічним розчином (0,5% NaCl). Якщо на стінках та дні лунок планшета залишалася біоплівка, штам вважали біоплівкотвірним (Lyamin et al., 2012; Tchebotar and Guryev, 2012).

Адгезивну активність досліджених штамів стафілококів визначали за їх здатністю адсорбуватися на букальному епітелії (Brilis et al., 1986; Kovalenko et al., 2010). Для цього штами вирощували протягом 24 год. у поживному бульйоні, після чого центрифугували 5 хв. за 6 000 об./хв. Одержану клітинну масу ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері такого складу (г/100 мл): NaCl – 0,85, Na_2HPO_4 – 1,42 (pH 7,2). Одержували суспензію бактерій, яка містила $1,0 \cdot 10^9$ клітин/мл. Зразок букального епітелію переносили у буфер, епітеліоцити центрифугували за 6 000 об./хв супернатант видаляли, а одержаний осад знову ресуспендували у буфері та центрифугували в такому саме режимі. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва. Готували суспензію епітеліальних клітин у концентрації $1,0 \cdot 10^8$ клітин/мл. Одержані суспензії бактеріальних та епітеліальних клітин змішували у рівних об'ємах у мікропробірці та інкубували за температури 37 °С протягом 30 хв. Після закінчення експозиції клітини двічі промивали фосфатно-сольовим буфером протягом 5 хв за 6 000 об./хв щоб звільнити епітеліоцити від неприкріплених бактеріальних клітин. З осаду клітин готували мазки, забарвлювали за Грамом і підраховували кількість бактерій, які знаходилися на поверхні епітеліоцитів (Kovalenko et al., 2010).

Адгезію оцінювали за індексом адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) за формулою:

$$\text{ІАМ} = \frac{СПА}{КУЕ} \cdot 100\%,$$

де ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізмів (середня кількість мікробних клітин, адгезованих на одному еритроциті, що бере участь в адгезивному процесі); СПА – середній показник адгезії (середня кількість мікроорганізмів, що прикріпились до одного еритроцита, під час підрахунку не менше 50 еритроцитів); КУЕ – коефіцієнт участі еритроцитів (відсоток еритроцитів, що мають на поверхні адгезовані мікроорганізми).

Під час оцінювання критеріїв адгезії згідно з методикою при значенні ІАМ < 1,75 мікроорганізми вважали неадгезивними; від 1,76 до 2,50 – низькоадгезивними; від 2,51 до 4,00 – середньоадгезивними та за ІАМ > 4,00 – високоадгезивними.

Результати та їх обговорення

Біологічні властивості штамів стафілококів, виділених із ротової порожнини здорових осіб і осіб із пародонтитом. Із ротової порожнини здорових осіб виділено 14 штамів стафілококів, а від осіб із пародонтитом – 51 штам, які ідентитфіковано як *S. aureus* – 1 та 27 штамів, відповідно та *S. epidermidis* – 13 та 24 штами, відповідно. Для всіх них вивчено здатність до утворення біоплівки. З ізолятів золотистих стафілококів, виділених в осіб із пародонтитом, здатністю до плівкоутворення володіли 8 (29,6%). Єдиний ізолят золотистого стафілокока, виділений від здорової особи, не проявляв здатності до утворення біоплівки.

Серед ізолятів епідермального стафілокока відсоток здатних до плівкоутворення більший: із виділених від осіб із пародонтитом 19 (79,2%) ізолятів плівкотвірні, натомість серед ізолятів епідермального стафілокока, виділених від здорових осіб, частка плівкотвірних штамів менша – 2 (15,4%). Це може свідчити на користь того, що плівкоутворення – додатковий чинник, який ускладнює патологічний процес.

Для всіх штамів стафілококів, виділених із ротової порожнини здорових осіб та від осіб із пародонтитом, досліджено прояв адгезивних властивостей (рис. 1, 2).

Єдиний штам золотистого стафілокока, виділений у здорової особи, був неадгезивним, а решта тією чи іншою мірою мали здат-

ність до адгезії. Рівень адгезивних властивостей плівкотвірних штамів був значно вищим, ніж у неплівкотвірних. Зокрема, для штамів золотистого стафілокока, виділених в осіб із пародонтитом і здатних до утворення біоплівки, СПА склав 5,25 ± 1,98, а ІАМ – 5,99 ± 2,32 за відповідних показників неплівкотвірних штамів 1,63 ± 1,42 та 1,82 ± 1,58.

Більшість плівкотвірних штамів – 7 (87,5%) – належали до високоадгезивних і лише 1 (12,5%) – до середньоадгезивних. Серед неплівкотвірних штамів лише 2 (10,5%) належали до високоадгезивних, інші – до середньо- (2, 10,5%), низько- (12, 63,2%) або неадгезивних узагалі (3, 15,8%).

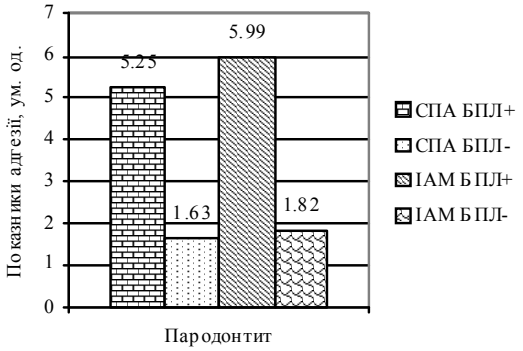


Рис. 1. СПА та ІАМ штамів *S. aureus*, виділених зі здорової ротової порожнини та з пародонтитом: БПЛ+ – плівкотвірні штами, БПЛ- – неплівкотвірні штами

Штами епідермального стафілокока, не здатні до утворення біоплівки, мали близькі показники адгезивності. Так, СПА та ІАМ штамів, виділених у здорових осіб, становили відповідно 1,73 ± 1,49 та 1,96 ± 1,64, а виділені від осіб із пародонтитом – 2,00 ± 1,58 та 2,26 ± 1,76, що вказує на підвищений рівень агресивності виділених в осіб із пародонтитом штамів. Вищі показники мали штами, здатні до утворення біоплівки: СПА та ІАМ виділених від здорових осіб штамів становили 3,50 ± 0,71 та 3,99 ± 1,03, а з пародонтитом – відповідно 4,53 ± 2,46 та 5,13 ± 2,79.

Отримані дані про мікроорганізми у зубній бляшці відповідають існуючим відомостям про склад бактерій у біоплівці, типовій для порожнини рота (Nishihara and Koseki, 2004; Paster et al., 2011; Tsarev et al., 2011).

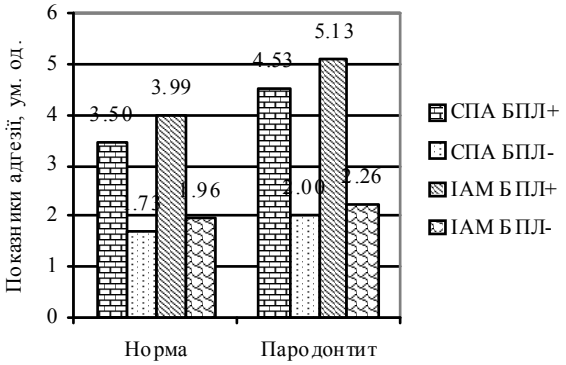


Рис. 2. СПА та ІАМ штамів *S. epidermidis*, виділених зі здорової ротової порожнини та з пародонтитом: БПЛ+ – плівкотвірні штами, БПЛ- – неплівкотвірні штами

Біологічні властивості штамів стафілококів, виділених за дисбіозу кишечника. Стафілококи – один із найвідоміших бактеріальних збудників уражень шлунково-кишкового тракту, зокрема дисбіозів. Перебування у нижніх відділах шлунково-кишкового тракту потребує від мікроорганізму наявності виражених колонізаційних властивостей для формування пристінкової флори та реалізації конкурентних взаємодій із нормальними симбіонтами. У цьому сенсі стафілококи відрізняються значною колонізаційною ефективністю: вони здатні продукувати низку факторів, що сприяють виживанню у середовищі кишечника (Labinskaia and Volina, 2008), їх колонізаційний потенціал може підвищуватися за рахунок адгезії та здатності формувати біоплівку (Moormeier et al., 2014). Для всіх узятих у подальше дослідження 38 штамів стафілококів проводили визначення здатності до утворення біоплівки та адгезивних властивостей. Дослідження здатності до утворення біоплівки показало, що всі чотири штами епідермального стафілокока – плівкотвірні, а зі штамів золотистого (n = 34) – 27 (79,4%). Значення СПА та ІАМ плівкотвірних штамів золотистого та епідермального стафілококів сягали 5,88 ± 2,22 і 6,64 ± 2,48 та 6,00 ± 1,41 та 6,61 ± 1,46, відповідно, за аналогічних показників неплівкотвірних штамів 1,43 ± 0,98 та 1,60 ± 1,11 (рис. 3).

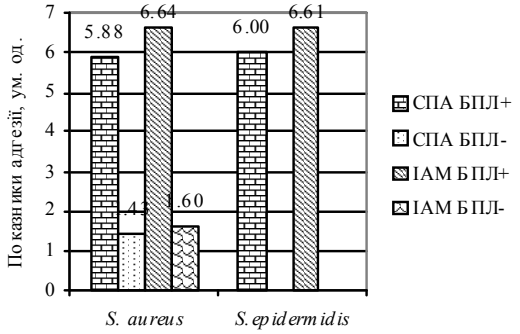


Рис. 3. СПА та ІАМ штамів стафілококів, виділених із біологічного матеріалу від осіб із дисбіозом шлунково-кишкового тракту: БПЛ+ – плівкотвірні штами, БПЛ- – неплівкотвірні штами

Адгезивні властивості виділених штамів варіювали, але серед штамів, здатних до формування біоплівки, переважно були високоадгезивні – 25 (92,6%) штамів золотистого та всі 4 – епідермального стафілококів. Серед неплівкотвірних високі адгезивні властивості проявив лише 1 (14,3%) штам.

Властивості стафілококів, виділених в осіб із харчовими отруєннями. Стафілококи займають значне місце у структурі харчових отруєнь, зумовлюючи важкі випадки за рахунок продукування токсинів (Labinskaia and Volina, 2008). Здатністю до утворення біоплівки володіли лише 5 штамів (23,8%) з 21.

Дослідження адгезивних властивостей дозволило встановити, що більшість штамів, виділених в осіб із харчовими отруєннями, належали до середньо- або низькоадгезивних. Із плівкотвірних 4 штами (80,0%) були середньоадгезивними, а 1 (20,0%) – низькоадгезивним. Серед неплівкотвірних середньоадгезивними були 8 (50,0%), низькоадгезивними – 5 (31,3%), неадгезивними – 2 (12,5%). Високоадгезивним виявився лише один штам (6,3%).

Плівкотвірні штами мали дещо вищі показники СПА та ІАМ (рис. 4), які складали відповідно 2,60 ± 1,14 та 2,86 ± 1,23. Для неплівкотвірних штамів ці показники становили відповідно 1,93 ± 1,39 та 2,22 ± 1,60. Це дозволяє стверджувати, що штами, які викликають гострі ураження, мають нижчий колонізаційний потенціал порівняно з тими, що персистують в організмі хронічно.

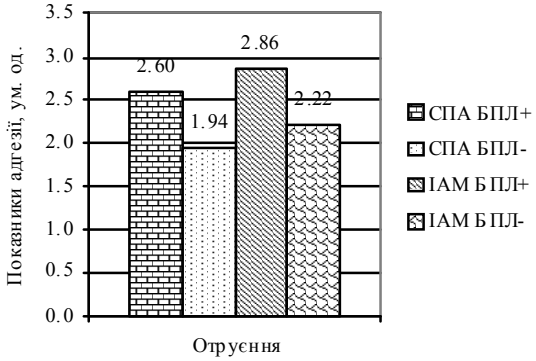


Рис. 4. СПА та ІАМ штамів *S. aureus*, виділених із біологічного матеріалу від осіб із харчовими отруєннями: БПЛ+ – плівкотвірні штами, БПЛ- – неплівкотвірні штами

Для плівкотвірних штамів, виділених від осіб без ознак патологічного процесу, показники адгезії нижчі, як і для штамів, виділених за гострої форми ураження – харчового отруєння. Для штамів епідермального стафілокока, виділених із ротової порожнини здорових осіб, у середньому СПА становив 3,50, а ІАМ – 3,99, що відповідає рівню середньоадгезивних штамів. Неадгезивних штамів серед плівкотвірних взагалі не було, а переважали високоадгезивні (понад 75–80%). Ponomarenko et al. (2014) вказують, що адгезивними властивостями володіють практично всі штами стафілококів, виділені за патологічних станів у людини, але рівень їх адгезивних властивостей у понад 60% випадків оцінюється як середній. Частка високоадгезивних штамів складає третину або чверть від усіх плівкотвірних, що нижче за показники, отримані нами. Ці самі автори вказують, що серед штамів, виділених від назальних носіїв із числа медперсоналу (умовно-здорові особи), також переважали середньоадгезивні форми. Це збігається з отриманими нами даними про те, що від здорових осіб (зокрема, з їх ротової порожнини) виділялися середньоадгезивні штами.

Загалом, адгезивні властивості – важливий аспект вивчення біоплівкотвірних штамів мікроорганізмів, адже саме здатність до адгезії на поверхнях лежить в основі формування плівок (Naumenko and Shipitsyna, 2011). Адгезивні властивості можна розглядати як фактор конкуренції умовно-патогенних мікрорганізмів із представниками нормальної мікробіоти, оскільки вдале закріплення у біотопі дозволяє досягти певного популяційного рівня (Buharin, 2009). Прояв адгезивних властивостей залежить здебільшого від бактерії, а також може контролюватися макроорганізмом (Akinkunmi et al., 2014). З боку останнього – це реакція специфічних і неспецифічних механізмів місцевого імунітету, наприклад, секреторних антитіл, лізоциму тощо, а також за рахунок наявності на поверхні клітин структур, здатних взаємодіяти з адгезинами, наприклад, такого білка як фібронектин, що викликає формування плівки (Murashkin et al., 2012).

Висновки

Частота виявлення плівкотвірних штамів стафілококів у різних відділах шлунково-кишкового тракту за норми та за патологічних змін становила для *S. aureus* 23,8–79,4%, а для *S. epidermidis* – 15,4–100,0%. Максимальний прояв адгезивних властивостей типовий для штамів епідермального та золотистого стафілококів, виділених за дисбіозу кишечника. Середні значення СПА становили 6,00 ± 1,41 і 5,88 ± 2,22, ІАМ – 6,61 ± 1,46 і 6,64 ± 2,48, відповідно. Найменше значення вказаних показників для плівкотвірних штамів визначено для штамів стафілококів, виділених в осіб із харчовими отруєннями: 2,60 ± 1,14 та 2,86 ± 1,23, відповідно.

References

Akinkunmi, E. O., Adeyemi, O. I., Igbeneghu, O. A., Olaniyan, E. O., Omonisi, A. E., & Lamikanra, A. (2014). The pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* on the intestinal organs of rats and mice: An experimental investigation. BMC Gastroenterology, 14, 126.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2(5), 445–459.

Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative Staphylococci. Clinical Microbiology Reviews, 27(4), 870–926.

Brilis, V. I., Brilene, T. A., Lentsner, H. P., & Lentsner, A. A. (1986). Metodika izucheniya adgezivnogo protsessa mikroorganizmov [Method for studying the adhesive process of microorganisms]. Laboratornoe Delo, 4, 210–212 (in Russian).

Buharin, O. V. (2009). Infektsiya – modelnaya sistema assotsiativnogo simbioza [Infection is a model system of associative symbiosis]. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 1, 83–86 (in Russian).

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hebraud, M., Meretre, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kacaniova, M., Czaczyk, K., Olmez, H., & Simoes, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology, 6, 841.

Gostev, V. V., & Sidorenko, S. V. (2012). Bakterialnyie bioplenki i infektsii [Bacterial biofilms and infections]. Journal of Infectology, 2(3), 4–15 (in Russian).

Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiology Reviews, 39(5), 649–669.

Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents, 35, 322–332.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (Eds.). (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.

Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 53(9), 5624–5631.

Kovalenko, N. K., Livinska, O. P., Poltavska, O. A., Garmasheva, I. L., Shinkarenko, L. M., & Oleshchenko, L. T. (2010). Probiotychni vlastyvosti promyslovykh shtamiv laktobatsyl i bifidobakteriy [Probiotic properties of industrial strains of lactobacilli and bifidobacteria]. Microbiologichny Zhurnal, 72(1), 9–17 (in Ukrainian).

Labinskaia, A. S., & Volina, Y. H. (Eds.). (2008). Rukovodstvo po medicinskoi mikrobiolohii. Obshaia i sanitarnaia mikrobiolohiia [Manual of medical microbiology. General and sanitary microbiology]. Binom, Moscow (in Russian).

Lin, M. H., Shu, J. C., Lin, L. P., Chong, K. Y., Cheng, Y. W., Du, J. F., & Liu, S. T. (2015). Elucidating the crucial role of poly N-acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. PLoS One, 10(4), e0124216.

Lyamin, A. V., Botkin, E. A., & Zhestkov, A. V. (2012). Metodyi vyiyavleniya bioplenok v meditsine: Vozmozhnosti i perspektivyi [Methods of biofilm evaluation: Opportunities and perspectives]. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 14(1), 17–22 (in Russian).

McKew, B. A., Taylor, J. D., McGenity, T. J., & Underwood, G. J. (2011). Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. The ISME Journal, 5, 30–41.

Misawa, Y., Kelley, K. A., Wang, X., Wang, L., Park, W. B., Birtel, J., Saslowsky, D., & Lee, J. C. (2015). *Staphylococcus aureus* colonization of the mouse gastrointestinal tract is modulated by wall teichoic acid, capsule, and surface proteins. PLOS Pathogens, 11(7), e1005061.

Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R., & Bayles, K. W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. mBio, 5(5), e01341-14.

Murashkin, N., Gluzmin, M., Skoblikow, N., Bakulev, A., Materikin, A., Gluzmina, M., & Khotko, A. (2012). Rol metitsillinrezistentnyih shtammov zolotistogo stafilokokka v patogeneze tyazhelyih form atopicheskogo dermatita v detskom vozraste. Puti dostizheniya remissii [Role of MRSA strains in the pathogenesis of severe atopic dermatitis in childhood. Ways of achieving remission]. Vestnik Dermatologii i Venerologii, 1, 66–74 (in Russian).

Nair, N., Biswas, R., Gotz, F., & Biswas, L. (2014). Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. Infection and Immunity, 82(6), 2162–2169.

Naumenko, Z. S., & Shipitsyna, I. V. (2011). Sravnitelnaya otsenka adgezivnoy aktivnosti bakteriy, vyidelennyih u bolnyih iz osteomielitícheskogo ochaga i iz ran otkryityih perelomov [Comparative evaluation of adhesive activity of the bacterii, isolated in patients from their osteomyelitic focus, as well as from open fracture wounds]. Orthopaedic Genius, 4, 31–34 (in Russian).

Nishihara, T., & Koseki, T. (2004). Microbial etiology of periodontitis. Periodontology, 36, 14–26.

Orazi, G., & O'Toole, G. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* sensitivity to vancomycin in a biofilm model of cystic fibrosis infection. mBio, 8(4), e00873-17.

Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. Microbiology Spectrum, 4(2).

Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. Journal of Bacteriology, 183(12), 3770–3783.

Patterson, J. L., Stull-Lane, A., Girerd, P. H., & Jefferson, K. K. (2010). Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. Microbiology, 156, 392–399.

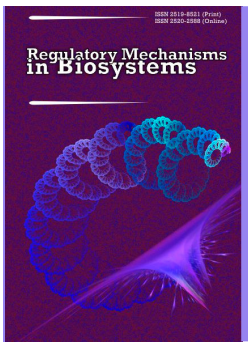
Ponomarenko, S. V., Voronkina, I. A., Osolodchenko, T. P., Port, O. V., & Pirtskhalava, T. V. (2014). Zdatnist do bioplivkoutvorennya izolyativ *S. aureus*, vydilenykh z riznykh ekonish [The ability to biofilm formation isolates *S. aureus*, received by different ecological niches]. Bulletin of Problems Biology and Medicine, 112, 245–248 (in Ukrainian).

Sannasiddappa, T. H., Costabile, A., Gibson, G. R., & Clarke, S. R. (2011). The influence of *Staphylococcus aureus* on gut microbial ecology in an *in vitro* continuous culture human colonic model system. PLoS One, 6(8), e23227.

Tchebotar, I. V., & Guryev, E. L. (2012). Laboratornaya diagnostika klinicheski znachimyih bioplyonochnyih protsessov [Laboratory diagnostics of clinically significant microbial biofilms]. Voprosyi Diagnostiki v Pediatrii, 4, 15–20 (in Russian).

Tsarev, V., Trefilov, A., Kleymenova, G., & Levkin, A. (2011). Prostranstvenno-vremennaya model formirovaniya bioplyonki polosti rta: Vzaimosvyaz protsessov pervichnoy adgezii i mikrobnoy kolonizatsii [The space-time model of oral biofilm formation: The interrelation of primary adhesion and microbial colonization]. Sovremennaya Stomatologiya, 2, 22–27 (in Russian).

Wright, C. J., Burns, L. H., Jack, A. A., Back, C. R., Dutton, L. C., Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2013). Microbial interactions in building of communities. Molecular Oral Microbiology, 28(2), 83–101.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 532–539
doi: 10.15421/021782

New finding of green algae with potential for algal biotechnology, *Chlorococcum oleofaciens* and its molecular investigation

Y. I. Maltsev, T. V. Konovalenko

Bogdan Khmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, Melitopol, Ukraine

Article info

Received 14.09.2017
Received in revised form 28.10.2017
Accepted 03.11.2017

Bogdan Khmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, Getmanska st., 20, Melitopol, Zaporizhia region, 72312, Ukraine.
Tel.: +38-096-548-34-36
E-mail: mz_5@ukr.net

Maltsev, Y. I., & Konovalenko, T. V. (2017). New finding of green algae with potential for algal biotechnology, Chlorococcum oleofaciens and its molecular investigation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 532–539. doi:10.15421/021782

The practice of soil algology shows that algae from the order Chlamydomonadales are among the most poorly studied and difficult to identify due to the high heterogeneity of their morphology and ultrastructure. Only the involvement of molecular genetic methods usually makes it possible to determine their taxonomic status with high accuracy. At the same time, in the algae flora of Ukraine there are more than 250 species from the order Chlamydomonadales, the status of which in most cases is established exclusively on the basis of light microscopy. This work is devoted to the study of the biotechnologically promising green alga *Chlorococcum oleofaciens*, taking into account the modern understanding of its taxonomic status. Two new strains of this species, separated from samples of forest litter and oak forest soil (the Samara Forest, Dnipropetrovsk region), are described. The strains were studied at the morphological level by using light microscopy methods, as well as using molecular genetic methods based on the studies of the nucleotide genes sequences of the 18S ribosomal DNA (rDNA) and chloroplast *rbc*L genes, the topology of secondary structures of internal transcribed spacer 2 (ITS2). The obtained results helped to confirm the presence of *C. oleofaciens* in the algae flora of Ukraine. Also, the authors of the article discuss the differences in the secondary structure of ITS2 in different strains of *C. oleofaciens* associated with the presence of compensatory base change (CBC), hemi-CBC in helices I and II, as well as deletions in helix IV and providing a basis for the hypothesis of the existence of cryptic species within *C. oleofaciens*. The obtained data can be used at the stage of preliminary selection of biochemical research objects.

Keywords: *Chlorococcum oleofaciens*; 18S rDNA; *rbc*L; ITS2; molecular phylogeny; morphology

Introduction

Chlorococcum Menegh. is one of the largest genera of the order of Chlamydomonadales, containing approximately about 50 species (Ettl and Gärtner, 1988, 1995, 2014). Among *Chlorococcum* species, *Chlorococcum oleofaciens* Trainor & H.C. Bold is well studied at both the ultrastructural and molecular levels. Besides, this species is characterized by such an important feature as the ability to accumulate oils in large quantities, which with aging cells can become yellow-orange.

C. oleofaciens was first separated from the soil of a farm field near Duanesburg, New York (Trainor and Bold, 1953). Hereafter, a number of similar species were described which, after revision of the morphological features, were summarized by G. Ettl and G. Gärtner (1995) into six synonyms for *C. oleofaciens*: *C. aquaticum* P. A. Archibald, *C. croceum* P. A. Archibald et H. C. Bold, *C. granulosum* P. A. Archibald, *C. microstigmatum* P. A. Archibald et H. C. Bold, *C. nivale* P. A. Archibald, *C. rugosum* P. A. Archibald et H. C. Bold. Later, another revision was carried out, in which, in addition to studying the morphology, the attention was paid to phylogenetic analysis, as well as reconstruction of the secondary structure of internal transcribed spacers ITS and ITS2 (Kawasaki et al., 2015). 18 samples that corresponded to strains of *C. oleofaciens* from different culture collections, as well as to supposed synonyms and related species, were covered by the study. As a result, *C. croceum*, *C. gelatinosum* P. A. Archibald et H. C. Bold, *Neospongiococcum gelatinosum* (P. A. Archibald et H. C. Bold) Ettl et Gärtner, *C. sphacosum* P. A. Archibald et H. C. Bold, *C. granulosum* and *C. tatrense* P. A. Archibald have been confirmed to be synonyms for *C. oleofaciens*. At the same time *C. microstigmatum*, *C. rugosum*, *C. aquaticum* and *C. nivale* were recognized to be independent species, and *Macrochloris rubrioleum* Yur. Kawas. & Nakada has been described as a new species to science. As the main morphological criteria for the differentiation of species, the authors used the size of the cells, the degree of thickening of the cell wall with the age of the cultures, the shape, size and position of stigma in zoospores and the color of the oils accumulated in old cells. On the basis of molecular analysis, the different positions of the newly separated species in the phylogenetic tree (although all belonged to the *Stephanosphaerinia* clade) and the presence of a specific set of nucleotide substitutions in the secondary structure of ITS and ITS2 were shown.

The systematic position of *C. oleofaciens* still remains not fully resolved. In the description, this species was assigned to the family Chlorococcaceae, order Chlorococcales, where it remained for a long period (Trainor, Bold, 1953; Ettl and Gärtner, 1995; Andreeva, 1998). The application of molecular genetic methods led to revision of the taxonomy of many green algae genera, including *Chlorococcum*. It was proposed to exclude from Chlorococcaceae a number of species of *Chlorococcum*, which have cytological and molecular features of protosiphonal algae (Friedl, 1997). Such species as *C. oleofaciens*, *C. minimum* Ettl et Gärtner, *C. ellipsoideum* Deason & H. C. Bold, *C. rugosum*, *C. vacuolatum* R. C. Starr, *C. sphacosum*, *C. gelatinosum* and others were transferred to the family Neospongiococcaceae (Kostikov et al., 2001) on the basis of a single core presence, a paren-

tal chloroplast with a clearly discernable perinode with a continuous starch sheath. The polyphyleticity of the genus *Chlorococcum* has been currently shown, as well as its species belonging to the clades of *Moewusinia*, *Tatrensinia* and *Stephanosphaerinia* within the order of Chlamydomonadales (Nakada et al., 2008; Kawasaki et al., 2015; Neustupa et al., 2015; Nakada and Tomita, 2011, 2016).

A long period of inconsistency in the number of synonymous taxonomic units of *C. oleofaciens* and the independence of certain species complicated the notion of geographical spread of *C. oleofaciens* and species derived from the status of its synonyms. The issue of the distribution of *C. oleofaciens* and species, the independence of which was for a certain time doubtful, is also relevant for the territory of Ukraine. *C. oleofaciens* has been repeatedly noted in various ecotopes of Ukraine since 1985 (Kostikov et al., 2001; Maltseva, 2009; Tsarenko et al., 2011). But with the further use of these data, it should be taken into account that by the methods of molecular phylogeny, the presence of several closely species related to *C. oleofaciens* has been found, the morphological differences between which were only recently shown (Kawasaki et al., 2015), as well as the possible presence of cryptic and pseudocritic taxonomic units. Bearing in mind that *C. oleofaciens* is able to accumulate a large amount of oil, its strains can have biotechnological value, including for biofuel production (Abomohra et al., 2012; Del Río et al., 2015). At the moment, the prospect of a typical strain of *C. oleofaciens* SAG 213-11 for providing a source of fatty acids has been confirmed (Abomohra et al., 2012; Del Río et al., 2015, 2017). However, it should also be borne in mind that one of the criteria, according to which *C. aquaticum*, *C. microstigmatum*, *C. nivale* and *C. rugosum* were excluded from the rank of synonyms of *C. oleofaciens*, is the color of accumulated oil (Kawasaki et al., 2015). It follows that its fatty acid composition is different and can have not only various composition, but also the value of both species and strains. Thus, the study of the morphological and molecular-genetic homogeneity of *C. oleofaciens* is important not only to clarify their taxonomic status, geographical distribution, phylogeny, etc., but also for the preliminary selection of biochemical research objects.

The aim of our work was to study, with the help of morphological and molecular genetic methods, the new strains of *C. oleofaciens* isolated from forest litter and soil on the territory of the Samara Forest (Dnipropetrovsk region, Ukraine) as one of the stages of formation of a biotechnologically valuable microalgae species bank in the Collection of Algae at Bohdan Khmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University CAMU (WDCM 1158).

Materials and methods

The objects of the study were strains CAMU MZ–Ch4 and CAMU MZ–Ch27, isolated from forest litter and soil in the oakwood of the Samara Forest (coordinates 48°39'30.44"N 35°39'2.17"E). Samara Forest is one of the most southerly of natural forests in the steppe zone of Ukraine, and grows in the valley of the Samara river (Dnipropetrovsk region) within the zone of herb-fescue-feather grass steppes. The monoclonal strains were isolated by micropipeting of individual cells under an inverted microscope. The cultures were maintained in a liquid WC medium (Guillard and Lorenzen, 1972) under illumination with 12 hours light / 12 hours dark cycle. The time of observation of the strain was from 24 hours to 12 months.

The DNA of the investigated strains CAMU MZ–Ch4 and CAMU MZ–Ch27 were extracted using the InstaGeneTM Matrix kit according to the manufacturer's protocol. Amplification of a fragment of the 18S rDNA gene with a length of 1689 bp. was performed with a pair of primers 18S–FA2 (5'–ACC TGG TTG ATC CTG CCA GTA–3') and 18S–RB2 (5'–GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT ACG–3') (Nakada et al., 2010). Amplification conditions: initial denaturation – 5 min at 95 °C, followed by 32 cycles (denaturation at 94 °C – 30 sec, annealing of primers – 40 sec at 64 °C, elongation – 1.5 min at 72 °C), final elongation – 5 min at 72 °C. Amplification of a fragment of the chloroplast gene *rbc*L with a length of 1002-1062 bp. was performed with a pair of primers *rbc*L–F9 (5'–CGT GAC AAA CTA AAC AAA TAT GG–3') and *rbc*L–R8 (5'–AAG ATT TCA ACT AAA GCT GGC A–3') (Nakada et al., 2010). Amplification conditions: initial denaturation – 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles (denaturation at 94 °C – 30 s, annealing of primers – 40 s at 60 °C, elongation – 1.2 min at 72 °C), final elongation – 5 min at 72 °C. Amplification of the site of ITS1–5.8S–ITS2 rDNA with a length of 680 bp was performed with a pair of primers ITS1 (5'–TCC GTA GGT GAA CCT GCG G–3') and ITS4 (5'–TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC–3') (White et al., 1990). Amplification conditions: initial denaturation – 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles (denaturation at 94 °C – 30 s, annealing of primers – 30 s at 60 °C, elongation – 1 min at 72 °C), final elongation – 5 min at 72 °C.

The resulting PCR products were visualized by horizontal agarose gel electrophoresis (1%) and stained with SYBR® Safe (Life Technologies, USA). Purification of PCR products was carried out with a mixture of FastAP, 10 × FastAP Buffer, Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, USA) and water. Sequencing was performed using the Genetic Analyzer 3500 sequencer (Applied Biosystems, USA). Internal primers were also used: for the 18S rDNA gene, 18S–MZ–F (5'–GGC TTC ACT GTC TGG GAC TC–3') and 18S–MZ–R (5'–ATC AAC CTG ACA AGG CAA CC–3') and the primer 5'–ATG GTT CCA CAA ACA GAA AC–3' (Nozaki et al., 1995) for *rbc*L.

Editing and assembling of the consensus sequences were carried out by comparing the direct and reverse chromatograms using the Ridom TraceEdit program (ver 1.1.0) and Mega6 (Tamura et al., 2013). In addition to these fragments, 50 DNA sequences of various representatives of green algae from GenBank were used in the subsequent analysis, including *Carteria obtuse* AF182818 EF113416 and *Carteria radiosa* D89770 D86500 taken as an outgroup. The nucleotide sequences were aligned using the Mafft v7 program using the E–INS–i model (Katoh and Toh, 2010). Reconstruction of phylogenetic relations was carried out by the maximum likelihood (ML) and Bayesian (BI) methods using the HKY+G+I model. The model of nucleotide substitutions was constructed using the program jModeltest 2.1.1 (Posada, 2006). The ML trees were built in the online RAxML program (Stamatakis et al., 2008) with 1000 bootstrap iterations. BI analysis was performed using the program MrBayes–3.2.5 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with the following parameters: random initial tree, number of starts – 2, number of parallel chains – 4, number of generations – 2×10^6, parameter record for every hundredth generation and parameter annealing – 25%. Viewing and editing of trees were carried out in the program FigTree (ver 1.4.2).

The secondary structure of the ITS2 rDNA region was modeled using the Mfold version 2.3 program (Zuker, 2003). The beginning and end of ITS2 were determined by constructing a hybrid stem with the 5.8S rDNA terminal site and the complementary LSU start site. The resulting secondary structure was visualized in the program PseudoViewer3 (Byun and Han, 2009).

Results

Phylum Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Chlamydomonadales
The Oleo-clade within Stephanosphaerinia clade
Genus *Chlorococcum*
Species *Chlorococcum oleofaciens*

Type: Trainor and H. C. Bold (1953) Figs. 20–41, 60, 61 (holotype based on culture FRT-2 [= SAG 213-11]).

Synonyms: *C. croceum* P. A. Archibald & H. C. Bold, *C. gelatinosum* P. A. Archibald & H. C. Bold, *Neospongiococcum gelatinosum* (P. A. Arch, H. C. Bold) H. Ettl & G. Gärtner, *C. sphacosum* P. A. Archibald & H. C. Bold, *C. granulosum* P. A. Archibald, *C. tatrense* P. A. Archibald.

***Chlorococcum oleofaciens* strain CAMU MZ–Ch4**

Young cells spherical, occasionally spherical or ellipsoidal (Fig. 1*A*). Mature vegetative cells usually spherical (Fig. 1*B*). Cell walls in

7-d-old cultures smooth and thin (up to 1 μm), in 3-month-old cultures thicker than those of young cells (up to 3–4 μm) (Fig. 1*C*). Single parietal hollow, cupshaped chloroplast with a small apical opening, sometimes with cracks. Single spherical pyrenoid with a continuous starch sheath located in the thickened part of the chloroplast. Pyrenoid often has irregular or gnarly shape with age of the culture (Fig. 1*B*). Nucleus is one, large, placed in the center of the cell or slightly displaced closer to the apical opening of the chloroplast. Young cells usually contain two contractile vacuoles (Fig. 1*A*). Orange or colorless oil droplets accumulating in older cells (Fig. 1*F*). Asexual reproduction by 2 to 64 aplanospores or zoospores produced in spherical sporangia with diameters up to 30–35 μm (Fig. 1*G*). Zoospores ellipsoidal to cylindrical with two flagella longer than the cell (Fig. 1*D*). Parietal chloroplast with a central pyrenoid and an anterior elongated elliptical stigma (Fig. 1*E*). Nucleus posterior to the pyrenoid. Diameter of young vegetative cells usually 8–10 μm and mature cells up to 18–26 μm. Zoospores 6–9 μm long and 4 μm wide.

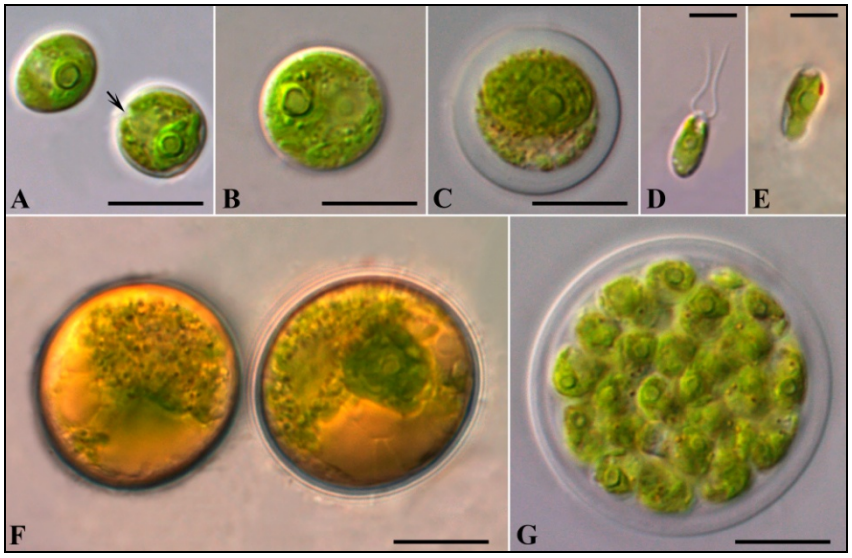


Fig. 1. Light micrographs of *Chlorococcum oleofaciens* strain MZ–Ch4. *A*. Young spherical and ellipsoidal cells: contractile vacuole (arrow) at the apical opening of the chloroplast. *B*. Mature vegetative cell: pyrenoid with continuous starch sheath. *C*. Mature cell with the thick cell wall. D. Zoospore: two flagella longer than the cell. *E*. Zoospore: an anterior elongated elliptical stigma. *F*. Mature cells with orange oil (6-month-old cultures). *G*. An aplanosporangium with aplanospores; scale bars – 10 μm (*A*, *B*, *C*, *F*, *G*) or 5 μm (*D*, *E*)

Habitat: the fermentation horizon of *Quercus robur* L. forest litter, Samara Forest (48°39'30.44"N 35°39'2.17"E), Dnipropetrovsk region, Ukraine, 2.05.2012. Forest litter temperature – 20 °C, stock of dry organic matter – 0.541 kg/m^2, pH – 6.07, ash content – 37.7%, forest litter moisture – 4.33%.

Depositing: in the Collection of Algae at Bohdan Khmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University as a perpetually transferred culture, strain CAMU MZ–Ch4 (Fig. 1). Also available in The Collection of Algae BOROK of IBIW RAS as an active culture BOROK MZ–Ch4.

Sequence data in GenBank: Nuclear-encoded LSU rDNA partial sequence (accession MG491216), plastid gene *rbc*L partial sequence (accession MG460305) and ITS1–5.8S–ITS2 rDNA sequence (accession MG491218).

***Chlorococcum oleofaciens* strain CAMU MZ–Ch27**

Young vegetative cells spherical, rarely elliptical, up to 15 μm in diameter (Fig. 2*A*). Mature cells usually spherical, occasionally oval up to 25–30 μm in diameter. Cell wall smooth (up to 0.5–1.0 μm), in some older cells moderately thick (up to 3.5 μm) (Fig. 2*B*). A single chloroplast hollow, with a small apical opening. The chloroplast contains one distinct and spherical pyrenoid with a continuous starch sheath of uniform thickness located in the basal part of the chloroplast (Fig. 2*A*). Mature cells uninucleate. Brownish or colorless oil droplets accumulating in older cells (Fig. 2*B*, *C*). Asexual reproduction by 2–64 aplanospores or zoospores produced in spherical sporangia with diameters up to 35 μm (Fig. 2*D*, *E*). Zoospores elliptical with two apical flagella and a simple parietal chloroplast, 7.0–8.0 μm long and 4.0 μm wide. Stigma elliptical and anterior.

Habitat: soil (horizon 0–5 cm), oak woodland (*Quercus robur*), within the Samara Forest (48°39'30.45"N 35°39'2.18"E), Dnipropetrovsk region, Ukraine, 20.06.2013. Soil temperature – 22 °C, pH – 5.9, ash content – 8.37%, soil moisture – 4.33%.

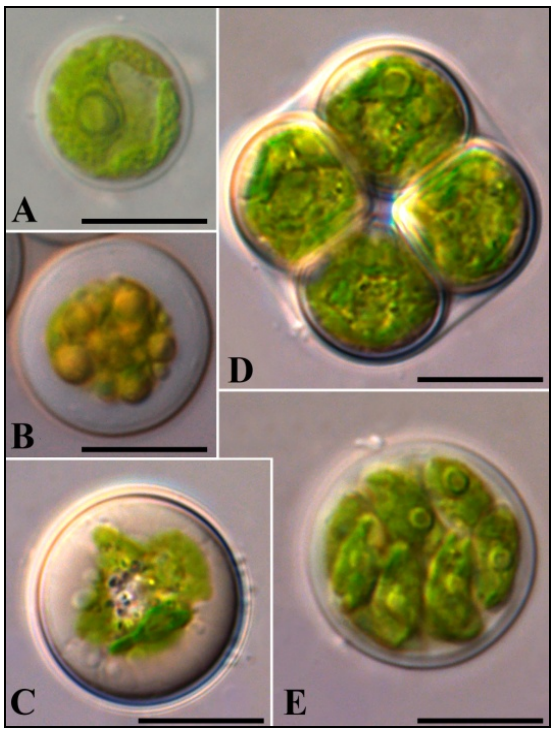


Fig. 2. Light micrographs of *Chlorococcum oleofaciens* strain MZ–Ch27. *A*. Young spherical cell with cupshaped chloroplast: pyrenoid with continuous starch sheath. *B*. Mature cell with the thick cell wall and brownish oil droplets. *C*. Mature cell and colorless oil. *D*. An aplanosporangium with four aplanospores. *E*. A zoosporangium with zoospores; scale bars – 10 μm

Depositing: in the Collection of Algae at Bohdan Khmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University as a perpetually transferred culture, strain CAMU MZ–Ch27 (Fig. 2). Also available in The Collection of Algae BOROK of IBIW RAS as an active culture BOROK MZ–Ch27.

Sequence data in GenBank: Nuclear–encoded LSU rDNA partial sequence (accession MG491217), plastid gene *rbc*L partial sequence (accession MG460306) and ITS1–5.8S–ITS2 rDNA sequence (accession MG491219).

Phylogenetic analyses based on the 18S rRNA and *rbc*L genes. Traditionally, taxonomic studies and the determination of phylogenetic relationships of green algae are carried out by using the nuclear gene SSU rDNA (18S) as a molecular marker (Nakada et al., 2008; Neustupa et al., 2011; Kawasaki et al., 2015; Nakada and Tomita, 2016). Nucleotide sequences of this gene are accumulated the largest number for volvocalean algae and on its basis it has been proposed to isolate 21 separate clades within the order of Chlamydomonadales (Nakada et al., 2008; Neustupa, 2015). However, the use of such a highly conserved gene as 18S rDNA does not always make it possible to solve the research objectives. The low variability of this gene sometimes makes it impossible to determine the taxonomic position of closely related species, that often reduces the use of 18S rDNA to the separation of evolutionarily older taxonomic units of green algae (Neustupa et al., 2011). Taking into account that in the last revision of *C. oleofaciens* and closely related species, only nuclear genes were used as molecular markers in phylogenetic reconstruction, it was expedient to build a tree based only on the 18S rDNA gene. To accomplish this, we obtained nucleotide sequences of this gene with a length of 1689 bp for the investigated strains CAMU MZ–Ch4 and CAMU MZ–Ch27. Sequences of eight different strains of *C. oleofaciens* were also included in the analysis, including the type strain SAG 213-11. In addition to different species of the genus *Chlorococcum*, the representatives of other closely related genera volvocalean were also included in the phylogenetic tree (Fig. 3). The reconstruction of phylogenetic connections by maximum likelihood methods (ML, where LB is the bootstrap value) and Bayes (BI, where PP is a posteriori probability) with a large statistical support (100 LB, 100 BI) showed belonging of strains CAMU MZ–Ch4, CAMU MZ–Ch27 to Oleo-clade sensu Kawasaki et al. (2015), which in turn is a part of the *Stephanosphaerinia* clade. In this case, the apical part of the Oleo-clade, represented by a sub-clade of different strains of *C. leofaciens*, is formed with low values of LB and BI (85 and 72, respectively), which does not allow one to speak with full confidence about its stability (Fig. 3). Thus, strains of CAMU MZ–Ch4 and CAMU MZ–Ch27 may be closely related to other species besides *C. oleofaciens*, inside the Oleo-clade. The remaining sample selection under the analysis was split into clades corresponding to the modern understanding of the phylogeny of Chlamydomonadales (Nakada et al., 2008; Kawasaki et al., 2015; Neustupa et al., 2015).

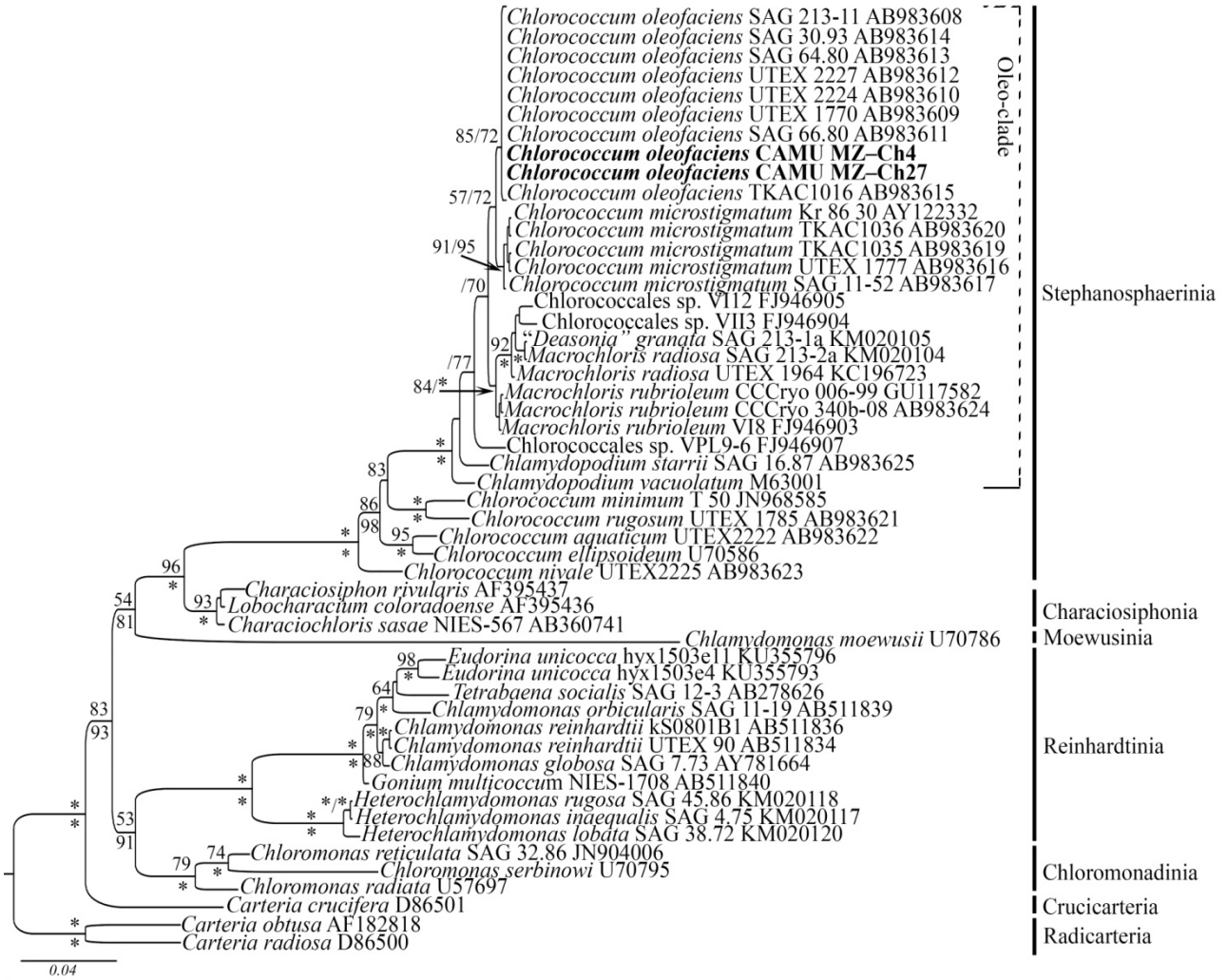


Fig. 3. Phylogenetic analysis for *Chlorococcum oleofaciens* CAMU MZ–Ch4, CAMU MZ–Ch27 (indicated in bold) constructed from an alignment with 50 sequences and 1703 characters (partial SSU rDNA). Values above horizontal lines (in front of the slash) are bootstrap support as RAxML analyses (<50 are not shown), values below horizontal lines (behind the slash) are Bayesian posterior probabilities (<70 are not shown); * – values at the level 100 for LB and BI. Species from *Radicarteria* clade were chosen as outgroup. Model of nucleotide substitution – HKY+G+I

Often, the low resolving power of the 18S rDNA gene when separating closely related species can be solved by bringing in other molecular markers. One of them can be presented by the chloroplast gene *rbc*L, which encodes a large subunit of the ribulose-bisphosphate-carboxylase ferment. In the study of green algae phylogeny, the variable gene *rbc*L is widely used in conjunction with the conservative 18S rDNA one (Neustupa et al., 2013; Fučíková et al., 2014; Skaloud et al., 2016).

Therefore, for a more complete and reliable analysis of the phylogenetic position of CAMU MZ–Ch4 and CAMU MZ–Ch27 strains, we have sequenced the fragments of the *rbc*L gene with the length of 1002 bp (for CAMU MZ–Ch27) and of 1062 bp (for CAMU MZ–Ch4). Phylogenetic analyses (BI, ML) for two genes also confirmed belonging of these strains to the Oleo-clade (Fig. 4). This analysis with the maximum statistical support (100 LB, 100 BI) showed a close relationship of CAMU MZ–Ch4, CAMU MZ–Ch27 and different strains of *C. oleofaciens*. The addition of the second gene to the analysis did not break the clade system within Chlamydomonadales isolated with 18S rDNA (Nakada et al., 2008; Kawasaki et al., 2015; Neustupa et al., 2015). One of the problems in constructing phylogenetic trees based on two genes for volvocalean is the smaller number of *rbc*L gene sequences obtained today, compared to 18S rDNA. This resulted in a decrease in the total sample selection to 28 various species from the order of Chlamydomonadales and the loss of such close to *C. oleofaciens* species as *C. microstigmatum*, *Macrochloris rubrioleum* and others from analysis.

Fig. 4. Phylogenetic analysis for *Chlorococcum oleofaciens* CAMU MZ–Ch4, CAMU MZ–Ch27 (indicated in bold) constructed from an alignment with 26 sequences and 2809 characters (partial SSU rDNA gene and partial *rbc*L gene). Values above horizontal lines (in front of the slash) are bootstrap support as RAxML analyses (<50 are not shown), values below horizontal lines (behind the slash) are Bayesian posterior probabilities (<70 are not shown); * – values at the level 100 for LB and BI. Species from *Radicarteria* clade were chosen as outgroup. Model of nucleotide substitution – HKY+G+I

Phylogenetic analyses based on the ITS region. The second internal transcribed spacer ITS2, as a rapidly evolving part of the nuclear operon, is successfully applied to solve the issues of phylogenetic status of systematically critical taxonomic units at the species and even genus levels (Coleman, 2003, 2009). The construction of secondary structure models of ITS2 allows determination of the homologous sites in individual ITS2 helices and the presence of compensatory base change (CBC) and hemi-CBC (hCBC) involving change of the nucleotide. It has been found that the presence of at least one CBC in the secondary structure of ITS2 in I–III helices of two organisms correlates with their complete sexual incompatibility. At the same time, it was shown that the presence of hCBC is not related to the possibility of crossing, but may indicate the inter-species differences (Coleman, 2009). In connection with this, the analysis of secondary structure of ITS2 topology can be used not as a universal method for distinguishing species, but as one of the approaches in combination with other molecular genetic or morphological methods. To confirm the taxonomic status of strains CAMU MZ–Ch27 and CAMU MZ–Ch27, we modelled secondary structures of the ITS2 rRNA region. Analysis of the obtained models topology showed their complete identity, which confirmed the strains as belonging to one biological species. These models had such key distinguishing features of the secondary structure of ITS2 in green algae (Coleman 2007): the pyrimidine-pyrimidine unpaired site of T-T in helix II, the conserved region of YRGGTAGGC on the 5' side of helix III, which in this case assumed the form of TGGGTGGGC taking into account the A→G transaction (Fig. 5). It should also be noted that there were present the conservative sites in the core model and the basal parts of helices (I-III) for the classes Chlorophyceae and Ulvophyceae in the secondary structure of ITS2 of the studied strains proposed by Caisová et al. (2013). Thus, helix I begins with pairs of T-G and C-G, the unique spacer between helices I and II consists of their three nucleotides ANC, helix II begins with pairs of T-G and G-T, the unique spacer between helices II and III consists of nine nucleotides and contains conserved region AANNNNAGA, helix III begins in pairs G-C, G-C (Fig. 5).

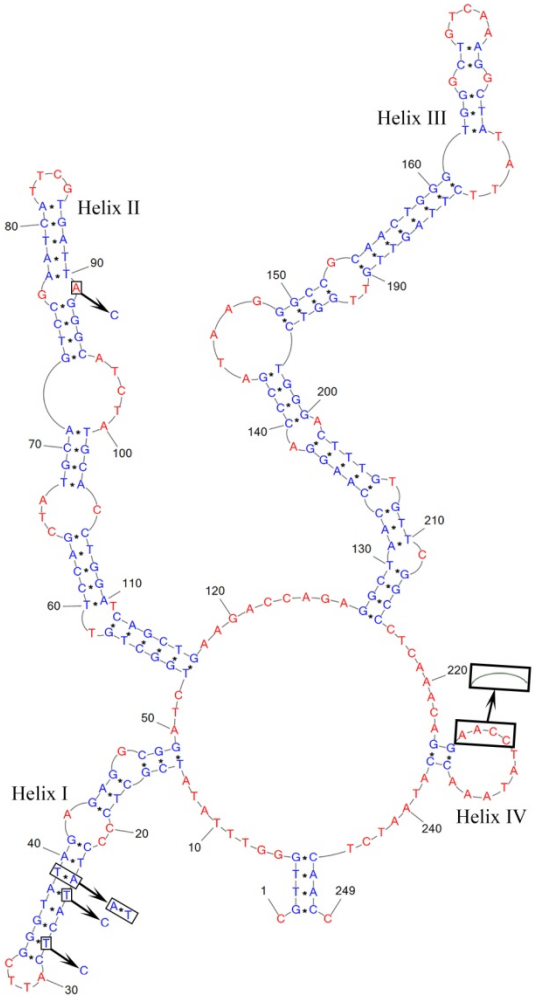


Fig. 5. Predicted secondary structure of the ITS2 sequence of *Chlorococcum oleofaciens* strain CAMU MZ–Ch4. Base numbering is indicated every 10 bases, the four helices are numbered with Roman numbers. Differences characteristic for the strain *Chlorococcum oleofaciens* strain SAG 213-11 (accession number AB983626) are shown by nucleotides outside the secondary structure

The comparison of the secondary structure topology of ITS2 rRNA strains CAMU MZ–Ch27 and CAMU MZ–Ch27 was also performed with similar models obtained by Kawasaki et al. (2015) for eight different strains of *C. oleofaciens* (including the type strain SAG 213-11). The analysis showed that only the strain TKAC 1016 is characterized by complete identity to the models we obtained. In this case, the remaining strains of *C. oleofaciens* by the number of differences can be divided into two groups, each of which differs by an equal number of nucleotide substitutions (but not their position in the helices). So the first group includes strains SAG 66.80 and UTEX 2227, which differ from our strains and strain TKAC 1016 with five hCBC: three in helix I and two in helix II. The second group includes strains SAG 213-11, UTEX 2224, SAG 30.93, SAG 64.80 and UTEX 1770, which are characterized by more significant substitutions: one CBC in helix I, two hCBC in helix I and one hCBC in helix II (Fig. 5). In addition to the listed differences, the type strain SAG 213-11 is characterized by four deletions in the unpaired sites of helix IV (Fig. 5) compared to these strains and all strains of *C. oleofaciens*, studied by Kawasaki et al. (2015).

Discussion

Species of the genus *Chlorococcum* are typical representatives of algal flora in the soil (Kostikov et al., 2001; Maltseva, 2009; Tsarenko et al., 2011; Scherbina et al., 2014; Shekhovtseva et al., 2015). On the territory of Ukraine, *C. oleofaciens* has been observed repeatedly in soils of different natural zones and types of biogeocoenoses: in soils of beech forests of the Ukrainian Carpathians, oak forests and mountain meadows of the Crimean mountains. In the forest zone the species has been noted in oak, alder, aspen forests of Volyn region; pine forests and robinia plantations in Sumy region; bottomland and grass meadows in Volyn and Zhytomyr regions, as well as on the fallow soil in Volyn region. In the forest-steppe, it has been found in pine forest in Sumy region and in hornbeam and pine forests in Cherkassy region (Kostikov et al., 2001). In the steppe zone, the species has been noted twice as *C.* (*Neospongiococcum*) *oleofaciens* in the soil algae communities of pine forest and birch outliers of the Samara Forest in Dnipropetrovsk region (Maltseva, 2009). The former synonym and the closest one, in terms of molecular phylogeny on the basis of the 18S rDNA gene, to *C. oleofaciens* species *C. microstigmatum* has also been noted in the soils of Ukraine more than once. In Polissia it has been found in mixed birch-aspen forests of Volyn region and pine forests of Kyiv region; in the forest-steppe – in the hornbeam-oak and hornbeam forests of Cherkassy region and oak forests of Kyiv region (Kostikov et al., 2001). In the steppe zone *C. microstigmatum* has been noted as a dominant in the upper horizon of the soil of the linden-ash ravine grove (Bolshoi Kapitanovskii ravine forest, Dnipropetrovsk region) (Cherevko, 1993) and in the soil of the virgin steppe (Dnipropetrovsk region) (Cherevko and Maltseva, 1995). However, with the further use of these data, it should be borne in mind that for 20 years the understanding of *C. oleofaciens* sensu lato included adding to the list of synonyms both *C. microstigmatum*, and *C. aquaticum*, and *C. nivale* and *C. rugosum*, which after the revision were given the status of independent species (Kawasaki et al., 2015).

Strains of *C. oleofaciens* CAMU MZ–Ch4 and MZ–Ch27 were isolated from the samples of forest litter and soil selected in the bottomland oak forest of the Samara Forest (Dnipropetrovsk region) in 2012–2013, where we laid test plots for seasonal studies of soil algae. In this case, strain MZ–Ch4 represents spring litter samples of 2012, whereas MZ–Ch27 represents summer soil samples of 2013. The presence of the same species in various biogeocoenotic horizons of forest biogeocoenosis indicates a similarity of the composition of algae of forest litter and the soil under it in steppe oak forests (Jaccard's coefficient varies in the range of 22.1–23.5%) (Maltsev, 2015). On the other hand, the change of the species habitat in different seasons gives evidence of a change in the conditions of algae existence (temperature and water regime, biological activity, etc.) (Scherbina et al., 2014; Maltsev et al., 2017a).

A comparison of morphological features of the studied strains shows that the main differences are in the larger diameter of adult cells and the smaller length of zoospores in the strain of *C. oleofaciens* CAMU MZ–Ch27 compared to CAMU MZ–Ch4. Despite this, the morphology of both strains fully coincides with the refined diagnosis of the species *C. oleofaciens* (Kawasaki et al., 2015).

Molecular-phylogenetic analysis based on two genes showed with high statistical support the strains CAMU MZ–Ch4 and MZ–Ch27 belonging to the subclade *C. oleofaciens* (Fig. 3, 4). However, the analysis of the secondary structure of ITS2 indicates some peculiarities. Firstly, the attention is drawn to the complete coincidence of the model topology of strains isolated from very remote locations with a significant time difference – Ukrainian CAMU MZ–Ch4 (05.2012), MZ–Ch27 (06.2013) and Japanese TKAC 1016 (06.2005), which was isolated from the soil in Oamishirasato, Chiba Prefecture, Japan (35°320 N, 140°180 E). Secondly, one should take into account the presence of three hCBC and one CBC in these strains, which distinguish them from other strains of *C. oleofaciens*, including the type SAG 213-11 (Fig. 5). Considering that the presence of CBC only in helices II and III is connected with the sexual incompatibility (Coleman, 2009), it is possible that the authors of the last revision (Kawasaki et al., 2015) did not raise the issue of another status of the strain *C. oleofaciens* TKAC 1016. However, our isolation of two new strains with the same molecular differences from the rest of the sample of strains of *C. oleofaciens* may indicate the existence of cryptic species within a given taxon.

Even when describing the species, the authors drew attention to such feature as the ability to accumulate a significant amount of oil in cells during the cultures aging (Trainor, Bold, 1953). Later this peculiarity attracted the biochemists' attention and it was found that *C. oleofaciens* is characterized by accumulation of a large amount of fatty acids: unsaturated – oleic and linoleic ones, saturated – palmitic one (Cojocaru et al., 1988). Hereafter, with the development of ideas for the production of biomass fuel, it was found that saturated fatty acids increase the octane number and biofuel resistance to degradation, unsaturated fatty acids reduce the pour point and gelation of fuel at low temperatures, and algae are generally a promising raw material for biodiesel production (Talebi et al., 2013; Maltsev et al., 2017b). These discoveries led to a further study of the biochemistry of *C. oleofaciens*. The following parameters of *C. oleofaciens* as a promising source of fatty acids were found: the ability to store biomass up to 2.6 CDW (g L^{-1}) and a high degree of fat storage capacity – up to 35 mg l^{-1} d^{-1} (Abomohra et al., 2012); ability to increase the productivity of fatty acid accumulation by 138% under nitrogen starvation, accumulate up to 13.6% of palmitic and 25.0% of linoleic fatty acids (% of total FA) (Del Rio et al., 2014). However, despite the abundance of biochemical characteristics, it is currently impossible to say whether they concern the species as a whole, since the data were mainly obtained for the type strain SAG 213-11. Meanwhile, in deriving from the rank of synonyms *C. aquaticum*, *C. microstigmatum*, *C. nivale* and *C. rugosum*, the authors used the color of accumulated oil as one of the criteria (Kawasaki et al., 2015). Therefore, the importance of studying fatty acid composition in different strains of *C. oleofaciens* may be determined by a successful experience in the separation of closely related species from the genus *Parietochloris* Watanabe et Floyd on the basis of lipidomic analysis (Řezanka et al., 2017). Perhaps, it is the application of biochemistry methods in combination with morphological and molecular genetic methods that will allow us to solve the question of the belonging to cryptic species with a wide distribution area of strains *C. oleofaciens* CAMU MZ–Ch4, CAMU MZ–Ch27 and TKAC 1016 in further studies.

Conclusions

In this study, based on the phylogeny of the 18S rDNA and *rbc*L genes, a comparison of the secondary structures of ITS2 and light microscopy, two new strains of *C. oleofaciens* (CAMU MZ–Ch4 and CAMU MZ–Ch27) are described as possible sources of fatty acids. They were isolated from forest litter and soil in oak woodland within the Samara Forest (Dnipropetrovsk region, Ukraine). Based on the topology analysis of the secondary structure of ITS2, the presence of three groups of strains within *C. oleofaciens* is shown, they differ in CBC and hCBC in helices II and III. The identity of two new Ukrainian strains and the Japanese strain *C. oleofaciens* TKAC 1016 is established. It is suggested that there may be a number of cryptic species within *C. oleofaciens*.

References

Abomohra, A. E.-F., Wagner, M., El-Sheekh, M., & Hanelt, D. (2012). Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: Screening studies towards biodiesel production. Journal of Applied Phycology, 25(4), 931–936.

Andreeva, V. M. (1998). Pochvennyie i aerofilnyie zelenyie vodorosli (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales) [Soil and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)]. Nauka, St. Petersburg (in Russian).

Byun, Y., & Han, K. (2009). PseudoViewer3: Generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. Bioinformatics, 25, 1435–1437.

Caisová, L., Marin, B., & Melkonian, M. (2013). A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. Protist, 164, 482–496.

Cherevko, S. P. (1993). Pochvennyie vodorosli lesnyih biogeotsenozov podzonyi nastoyaschih stepey Ukrainyi [Soil algae of forest phytocoenoses from true steppe subzone of Ukraine]. Algology, 3(2), 49–52 (in Russian).

Cherevko, S. P., & Maltseva, I. A. (1995). Vodorosli pochv lesnyh biogeotsenozov Prisamarya Dneprovskogo i drevesnyih nasazhdeniy Zapadnogo Donbassa [Soil algae of forest biogeocenoses from Dnieper Prisamarye and woody plantings of Western Donbass]. Monitoring of biogeocenotic in the steppe zone. Interuniversity collection of scientific works, 64–67 (in Russian).

Cojocarut, M., Shlosberg, M., Dubinsky, Z., & Finkel, A. (1988). Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of fatty acids found in aquatic algae. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 16, 477–480.

Coleman, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in Genetics, 19(7), 370–375.

Coleman, A. W. (2009). Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. Molecular Phylogenetics and Evolution, 50, 197–203.

Del Río, E., Armendáriz, A., García-Gómez, E., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2015). Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. Journal of Biotechnology, 195, 103–107.

Del Río, E., García-Gómez, E., Moreno, J., Guerrero, M. G., & García-González, M. (2017). Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. Algal Research, 23, 37–42.

Ettl, H., & Gärtner, G. (1988). Chlorophyta II. Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (Eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, 10. Gustav Fischer, Jena.

Ettl, H., & Gärtner, G. (1995). Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Gustav Fischer, Stuttgart.

Ettl, H., & Gärtner, G. (2014). Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen, 2nd edn. Springer Spektrum, Berlin.

Friedl, T. (1997). The evolution of the Green Algae. Plant Systematics and Evolution, 11, 87–101.

Fucíková, K., Lewis, P. O., & Lewis, L. A. (2014). Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera. Phycological Research, 62, 294–305.

Guillard, R. R. L., & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide c. Journal of Phycology, 8, 10–14.

Katoh, K., & Toh, H. (2010). Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. Bioinformatics, 26, 1899–1900.

Kawasaki, Y., Nakada, T., & Tomita, M. (2015). Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (Volvocales, Chlorophyceae), and its relatives. Journal of Phycology, 51, 1000–1016.

Kostikov, I., Romanenko, P., Demchenko, E., Dariyenko, T., Mikhailyuk, T., Rybczynski, A., & Solonenko, A. (2001). Vodorosti gruntiv Ukrainy (Istoriia i metody doslidzhennia, systema, konspekt flory) [Soil algae of Ukraine (history and methods of research, system, synopsis of flora)]. Phytosociocentr, Kyiv (in Ukrainian).

Maltsev, Y. (2015). Alhouhrupovannia riznykh bioheotsenotychnykh horyzontiv Staro-Berdianskoho lisu [Algae communities of different biogeocenotic horizons in Staro-berdyansk forest]. The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology, 2(35), 87–92 (in Ukrainian).

Maltsev, Y. I., Konovalenko, T. V., Barantsova, I. A., Maltseva, I. A., & Maltseva, K. I. (2017b). Prospects of using algae in biofuel production. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 455–460.

Maltsev, Y. I., Pakhomov, A. Y., & Maltseva, I. A. (2017a). Specific features of algal communities in forest litter of forest biogeocenoses of the Steppe zone. Contemporary Problems of Ecology, 10(1), 71–76.

Maltseva, I. A. (2009). Gruntovi vodorosti lisiv stepnoi zony Ukrainy [Soil algae of the forests of steppe area of Ukraine]. Lux, Melitopol (in Ukrainian).

Nakada, T., & Tomita, M. (2011). *Chlamydomonas neoplanoconvexa* nom. nov. and its unique phylogenetic position within Volvocales (Chlorophyceae). Phycological Research, 59, 194–199.

Nakada, T., & Tomita, M. (2016). Taxonomic revision of *Chlamydomonas* subg. *Amphichloris* (Volvocales, Chlorophyceae), with resurrection of the genus *Dangeardinia* and descriptions of *Ixipapillifera* gen. nov. and *Rhysamphichloris* gen. nov. Journal of Phycology, 52, 283–304.

Nakada, T., Misawa, K., & Nozaki, H. (2008). Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. Molecular Phylogenetics and Evolution, 48, 281–291.

Nakada, T., Shinkawa, H., Ito, T., & Tomita, M. (2010). Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan. Journal of Plant Research, 123, 67–78.

Neustupa, J. I. (2015). Chlorophyta, Streptophyta p.p. (except Ulvophyceae, Charophyceae; incl. Trentepohliales). In: Wolfgang, F. (Ed.). Syllabus of plant families. A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. Part 2/1: Photoautotrophic Eukaryotic Algae Glaucocystophyta, Cryptophyta, Dinophyta/Dinozoa, Haptophyta, Heterokontophyta/Ochrophyta, Chlorarachniophyta/Cercozoa, Euglenophyta/Euglenozoa, Chlorophyta, Streptophyta p.p. Borntraeger Science Pub., GmbH.

Neustupa, J. I., Elias, M., Skaloud, P., Nemcova, Y., & Sejnohova, L. (2011). *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. Phycologia, 50, 57–66.

Nozaki, H., Itoh, M., Sano, R., Uchida, H., Watanabe, M. M., & Kuroiwa, T. (1995). Phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta) inferred from *rbc*L gene sequence data. Journal of Phycology, 31, 970–979.

Posada, D. (2006). Modeltest server: A web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. Nucleic Acids Research, 34, 700–703.

Řezanka, T., Nedbalova, L., Lukavský, J., Procházková, L., & Sigler, K. (2017). Lipidomic analysis of two closely related strains of the microalga *Parietochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Algal Research, 25, 473–482.

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19, 1572–1574.

Scherbina, V. V., Maltseva, I. A., & Solonenko, A. N. (2014). Peculiarities of postpyrogene development of algae in steppe biocenoses at Askania Nova Biospheric National Park. Contemporary Problems of Ecology, 7(2), 187–191.

Shekhovtseva, O. G., & Maltseva, I. A. (2015). Physical, chemical, and biological properties of soils in the city of Mariupol, Ukraine. Eurasian Soil Science, 48(12), 1393–1400.

Skaloud, P., Friedl, T., Hallmann, C., Beck, A., & Dal Grande, F. (2016). Taxonomic revision and species delimitation of coccoid green algae currently assigned to the genus *Dictyochloropsis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology, 52, 599–617.

Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. Systematic Biology, 75, 758–771.

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.

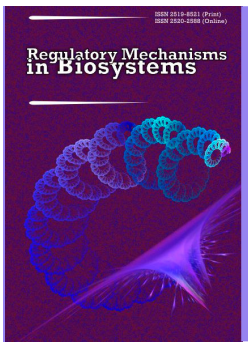
Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725–2729.

Trainor, F. R., & Bold, H. C. (1953). Three new unicellular Chlorophyceae from soil. American Journal of Botany, 40, 758–767.

Tsarenko, P. M., Wasser, S., & Nevo, E. (2011). Algae of Ukraine: Diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Vol. 3. Chlorophyta. A. R. G. Rugell: Gantner Verlag K. G., Königstein.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc., New York.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research, 31, 3406–3415.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 540–546
doi: 10.15421/021783

Resistance of nosocomial strains to antibacterial drugs and its link to biofilm formation

T. V. Sklyar, K. V. Lavrentieva, Y. A. Alyonkina, A. M. Kolomoets, A. I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 18.10.2017
Received in revised form 11.11.2017
Accepted 16.11.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-158-62-78
Email: microviro@ukr.net

Sklyar, T. V., Lavrentieva, K. V., Alyonkina, Y. A., Kolomoets, A. M., & Vinnikov, A. I. (2017). Resistance of nosocomial strains to antibacterial drugs and its link to biofilm formation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 540–546. doi:10.15421/021783

The problem of nosocomial infections is considered in connection with more frequent formation and wide distribution in clinical practice of new strains of hospital bacteria that have a cross-resistence to antibacterial drugs. The nosocomial agents were isolated from wounds and identified as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 72.0% of *S. aureus* strains and 61.5% of *P. aeruginosa* clinical isolates had the capability of forming biofilms. The sensitivity to antibiotics of all isolated strains was investigated with tne agar diffusion test. This method showed that all strains of *S. aureus* with the capability to form biofilms had resistence to erythromycin, gentamycin, ciprofloxacin and levofloxacin. The had the greatest sensitivity to klindamycin (90.3%), vancomycin (80.6%) and gatifloxacin (80.6% cultures). The strains of *S. aureus* with the capability to form biofilms were more resistent to antibiotics than strains of *S. aureus* without such properties. Only cefotaxim suppressed the growth of 75.0% of strains of staphylococci. All isolated strains of *S. aureus* without the capability to form biofilms were sensitive to doxycyclin, gentamycin, ciprofloxacin, levofloxacin and klindamycin. All clinical isolates of *P. aeruginosa* with capability to form biofilms had resistence to ampicillin, gentamycin, imipenem, cefotaxime and ceftriaxone. They were most sensitive (75.0%) to piperacillin and cefoperazone/sulbactam. The strains of *P. aeruginosa* without the capability to form biofilms kept the resistence to gentamycin, imipenem and ceftriaxone. They showed the greatest sensitivity (75.0%) to ciprofloxacin (80.0% isolates) and also to amikacin, ampicillin, meropenem, norfloxacin and cefotaxime (60.0% cultures). We investigated the minimum inhibitory concentrations of gentamycin and ciprofloxacin, which appeared higher for *P. aeruginosa* than for *S. aureus*. The most effective disinfectant against all isolated nosocomial agents without the capacity for biofilm formation was “Desactin” in a concentration 0.1% or 0.2%. For strains of staphylococci with this capability, the efficiency of “Desactin” went down by 9.7%. The best biocide effect against the strains of *P. aeruginosa* with the capability of forming biofilms was shown by 0.1% solution of “Neochlorine tabs”, which suppressed the growth of 75.0% of tested cultures. As a result, we detected a direct relationship between resistance to antibiotics and disinfectants and the capacities for biofilm formation among the nosocomial agents *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Keywords: antibiotics; disinfectants; biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*

Резистентність збудників внутрішньолікарняних інфекцій до антибактеріальних препаратів та її зв’язок із плівкоутворенням

Т. В. Скляр, К. В. Лаврентьєва, Ю. А. Альонкіна, А. М. Коломоєць, А. І. Вінніков

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Розглянуто проблему внутрішньолікарняних інфекцій у зв’язку зі все частішим формуванням і широким розповсюдженням у клінічній практиці нових госпітальних штамів мікроорганізмів, що мають перехресну стійкість до антибактеріальних препаратів. Із відокремлюваного ран виділено збудників внутрішньолікарняних інфекцій, ідентифікованих як *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*. Здатність до плівкоутворення мали 72,0% виділених штамів золотистого стафілокока та 61,5% клінічних ізолятів синьогнійної палички. Під час визначення антибіотикочутливості штамів диско-дифузійним методом найбільша кількість збудників внутрішньолікарняних інфекцій, здатних до плівкоутворення, проявила резистентність до гентаміцину, ципрофлоксацину та цефотаксиму. Методом мінімальних серійних розведень визначено, що вищий рівень резистентності за значеннями МПК ципрофлоксацину та гентаміцину мали клінічні штами синьогнійної палички порівняно з золотистим стафілококом. Найефективніший дезінфектант проти клінічних неплівкотвірних штамів золотистого стафілокока та синьогнійної палички – «Дезактин» у концентрації 0,1–0,2%. Відносно ізолятів *S. aureus*, здатних до плівкоутворення, його ефективність знизилась на 9,7%. Найкращий бактерицидний ефект відносно плівкотвірних штамів *P. aeruginosa* мав 0,1% розчин «Неохлор табс», який пригнічував ріст 75,0% тестованих культур. У клінічних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa* – збудників

внутрішньолікарняних інфекцій – існує прямий взаємозв'язок між показниками їх стійкості до антибіотиків і дезінфектантів і здатністю культур до плівкоутворення.

Ключові слова: антибіотики; дезінфектанти; біоплівки; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*

Вступ

У сучасних умовах невід'ємна частина діяльності державних медичних установ – контроль за циркуляцією в лікувально-профілактичних установах полірезистентних до антибіотиків і дезінфектантів штамів бактерій – збудників внутрішньолікарняних інфекцій, здійснення заходів щодо обмеження їх подальшого розповсюдження та попередження формування нових госпітальних варіантів.

Нині внутрішньолікарняні інфекції – всесвітня медична, соціальна та економічна проблема (Menegueti et al., 2015; Sonmezer et al., 2016; Rezai et al., 2017). Рівень поширення внутрішньолікарняних інфекцій у країнах Європи та США в середньому становить 8,0–9,0% усіх госпіталізованих хворих. У США він складає 4,5%, у Франції – 6,7%, Італії – 8,3%, Швейцарії – 10,1%, Канаді – 11,6%, Кореї – 5,7%, Австралії – 16,6%, Греції – 9,3%. За даними ВОЗ, щорічно від ускладнень внутрішньолікарняних інфекцій помирає 50–90 тис. пацієнтів у США і 5 тис. осіб у Великій Британії. В Україні протягом останніх 10 років рівень захворюваності на внутрішньолікарняні інфекції постійно зростає, а летальність становить 3,5–60,0% залежно від нозологічної форми (Taran, 2014). Водночас із соціальним виникає також юридичне питання, коли пацієнт або його сім'я звинувачують працівників лікарні в інфікуванні та вимагають матеріального відшкодування (Dasgupta et al., 2015).

Основні причини появи та розвитку внутрішньолікарняних інфекцій – формування та селекція в умовах стаціонару госпітальних штамів мікроорганізмів із високою вірулентністю та множинною стійкістю до лікарських засобів; нераціональна антимікробна хіміотерапія; недостатній контроль за циркуляцією умовно-патогенних і патогенних культур; високий рівень носійства збудників внутрішньолікарняних інфекцій серед медичних працівників; недотримання правил асептики та антисептики; порушення санітарно-епідемічного режиму в лікувально-профілактичних установах тощо (Scherbaum et al., 2014).

Спектр збудників внутрішньолікарняних інфекцій значний. Вони можуть бути викликані найпростішими (*Pneumocystis carinii*), грибами (*Candida* sp.), вірусами (віруси гепатитів В і С, ВІЛ, ентеровіруси тощо). Але перше місце в етіологічній структурі внутрішньолікарняних інфекцій посідають бактеріальні агенти: ентерококи, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Legionella* spp., представники родини Enterobacteriaceae (*Proteus mirablis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*). Найголовніша роль у виникненні внутрішньолікарняних інфекцій, за даними всесвітньої статистики, належить *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* (Abdallah et al., 2014; Khan et al., 2015; Murphy et al., 2016).

За результатами досліджень, проведених у західноєвропейських ICUs, частота висіву *P. aeruginosa* становить 17,0% від загальної кількості виділених госпітальних штамів мікроорганізмів і 29,0% від кількості грамнегативних збудників внутрішньолікарніних інфекцій. Синьогнійну паличку включено до списку патогенів ESKAPE Американського товариства інфекційних хвороб, що становлять найбільшу загрозу для здоров'я населення через поєднання її все більшого розповсюдження та неефективності сучасних антибактеріальних засобів, через існування таких механізмів резистентності до антибіотиків, як низька проникність мембрани, продукція декількох антиагрегантів, що інактивують ферменти, та формування біоплівок (Nathwani et al., 2014; Kim et al., 2014; Ali et al., 2015).

Другий значимий етіологічний агент внутрішньолікарняних інфекцій – бактерії роду *Staphylococcus* і, насамперед, *S. aureus*. Значний набір факторів патогенності та, водночас, широке та часто безконтрольне використання антимікробних засобів у медичній практиці сприяє формуванню нових госпітальних штамів збудника (Khan et al., 2015; Vuong et al., 2016). Все частіше з'являються та швидко розповсюджуються у стаціонарах генетично змінені варіанти *S. aureus* зі стійкістю до захищених β-лактамів, із множинною стійкістю до антибіотиків різних фармакологічних груп, із перехресною стійкістю до багатьох антимікробних препаратів, а також метицилінстійкі штами золотистого стафілокока (MRSA) (Ansari et al., 2014; Sowash et al., 2014; Baldan et al., 2014; Tong et al., 2015; Wang and Ruan, 2017). Останнім часом усе частіше з'являються повідомлення про наявність у збудників внутрішньолікарняних інфекцій явища перехресної стійкості до антибактеріальних засобів: множинної резистентності до антибіотиків на тлі адаптації до дезінфектантів (Abdallah et al., 2014).

Відмінна властивість багатьох збудників внутрішньолікарняних інфекцій від інших мікроорганізмів – здатність до формування біоплівок на об'єктах навколишнього середовища, зокрема, на небіологічних матеріалах, що, за їх контакту з організмом пацієнта, підвищують ризик розвитку в нього септичного стану (Abdallah et al., 2014). Якщо збудники внутрішньолікарняних інфекцій зі здатністю до плівкоутворення водночас матимуть ще перехресну стійкість до лікарських засобів, це значно ускладнить їх елімінацію в умовах стаціонару та перешкоджатиме під час проведення антибактеріальної терапії (Chadha, 2014; Singh et al., 2017).

Мета цього дослідження – оцінити стійкість до антибіотиків і дезінфектантів клінічних штамів мікроорганізмів – збудників внутрішньолікарняних інфекцій, виявити можливі взаємозв'язки між цими показниками та здатністю культур до плівкоутворення.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – відокремлюване ран пацієнтів із внутрішньолікарняними інфекціями. Проби відбирали відповідно до методичних рекомендацій щодо дотримання санітарно-епідеміологічного режиму в закладах охорони здоров'я України.

Тверді шматочки тканин (секвестри, шматочки шкіри, м'язів тощо), узятих стерильним пінцетом з області рани пацієнта, засівали у середовище для контролю стерильності та цукровий бульйон, а рідке (напіврідке) відокремлюване, узяте стерильним ватним тампоном, – ще й на чашку з 5,0% кров'яним агаром методом «тампон – петля». Тампоном проводили «доріжку» по діаметра чашки, а потім петлею матеріал розсівали паралельними штрихами у напрямку від «доріжки» до периферії чашки. Така техніка розсіву клінічного матеріалу дозволяє виділити чисті культури мікроорганізмів навіть із їх асоціації.

Засіяні рідкі та щільні живильні середовища термостатували за 37 °С. Через 18–24 години проводили відсівання окремих колоній на елективні та диференціально-діагностичні середовища для ідентифікації виділених бактеріальних культур.

Оскільки збудники внутрішньолікарняних інфекцій мають виражені адгезивні властивості та здатність до формування біоплівок, на наступному етапі за допомогою модифікованої методики у виділених штамів мікроорганізмів визначали здатність до плівкоутворення. Для цього у кожну лунку 96-лункового стерильного імунологічного планшета вносили по 200 мкл м'ясопептонного бульйону, який засівали 50 мкл суспензії клітин бактеріальних культур із початковою концентрацією 3,2 · 10^4 кл./мл (O'Toole et al., 2000).

Надалі визначали чутливість виділених штамів – збудників внутрішньолікарняних інфекцій до низки антибіотичних препаратів різних фармакологічних груп (диско-дифузійним методом і методом мінімальних серійних розведень) і дезінфектантів (методом батистових тест-об'єктів).

Референтний метод визначення чутливості збудників внутрішньолікарняних інфекцій до антибіотиків – метод серійних

розведень, тоді як диско-дифузійний метод дозволяє лише опосередковано робити висновок про величину мінімальної пригнічувальної концентрації. В останньому випадку результат дослідження – віднесення мікроорганізму до однієї з категорій чутливості: S – чутливий штам, R – помірно-стійкий або резистентний.

Спектр антибіотичних препаратів включав амікацин, ампіцилін, гентаміцин, іміпенем, меропенем, цефтазидим, норфлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гатифлоксацин, цефоперазон / сульбактам, цефоперазон, тетрациклін, цефотаксим, цефтриаксон, піперацилін, цефепім, доксициклін, еритроміцин, кліндаміцин, оксацилін, пеніцилін G, ванкоміцин.

Під час постановки методу батистових тест-об'єктів для отримання мікробної суспензії добову культуру кожного з виділених штамів – збудників внутрішньолікарняних інфекцій змивали стерильною водою, доводили до концентрації 2 млрд клітин в 1 мл суміші (за стандартом каламутності) та додавали 10,0% інактивованої кінської сироватки. Тест-об'єкти готували таким чином: стерильні шматочки батисту розміром 0,5 х 1,0 см розкладали в чашки Петрі, заливали мікробною суспензією на 15–20 хвилин, висушували в термостаті між стерильними листами фільтрувального паперу протягом 20 хвилин за 37 °С. Підготовані тест-об'єкти поміщали у чашки Петрі з 0,5 мл тестованого дезінфектанту (0,1% розчин «Дезактин», 0,2% розчин «Дезактин», 0,03% розчин «Неохлор табс», 0,1% розчин «Неохлор табс»). Час експозиції тест-об'єктів із дезінфектантом становив 5, 10, 20, 30, 40 і 60 хвилин. Після експозиції тест-об'єкти послідовно через кожні 5 хвилин переносили у ряд пробірок, перша з яких містила розчин нейтралізатора (0,5% розчин гіпосульфіту натрію для хлорумісних дезінфектантів або дистильована вода для інших засобів), друга – стерильну водопровідну воду, третя – м'ясопептонний бульйон. Пробірки інкубували в термостаті за 37 °С протягом 48 годин. Водночас ставили два контролі: культури та м'ясопептонного бульйону. Надалі з пробірок проводили висіви на елективні середовища. Посіви термостатували в термостаті за 37 °С протягом двох діб. Культури вважали чутливими до тестованого дезінфектанту, якщо ріст мікроорганізму на елективному середовищі відмічали після витримування тест-об'єкту з дезінфікувальним розчином менше 20 хвилин, стійкими – від 20 хвилин (Morozova et al., 2008).

Результати

Проаналізовано 135 клінічних зразків, із яких виділено 103 штами умовно-патогенних мікроорганізмів. 82 культури (79,6%) віднесено до категорії збудників внутрішньолікарняних інфекцій (рис. 1). Із них за вивченням фізіолого-біохімічних ознак 43 штами ідентифіковано як *Staphylococcus aureus*, 39 – як *Pseudomonas aeruginosa*. 31 із 43 штамів золотистого стафілокока мав здатність до плівкоутворення. Із 39 штамів синьогнійної палички здатність до плівкоутворення мали 24 ізоляти.

Під час визначення антибіотикочутливості виділених культур золотистого стафілокока диско-дифузійним методом встановлено, що всі штами, здатні до плівкоутворення, стійкі до еритроміцину, гентаміцину, ципрофлоксацину та левофлоксацину (рис. 2).

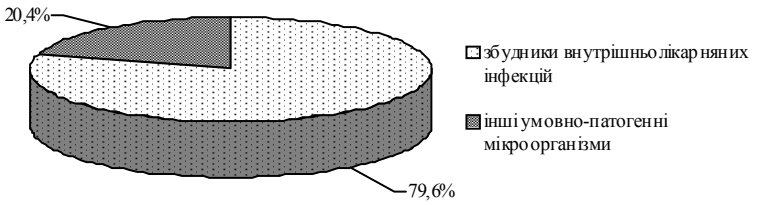


Рис. 1. Частота виділення госпітальних штамів бактерій із дослідних клінічних зразків пацієнтів із ВЛІ (n = 103)

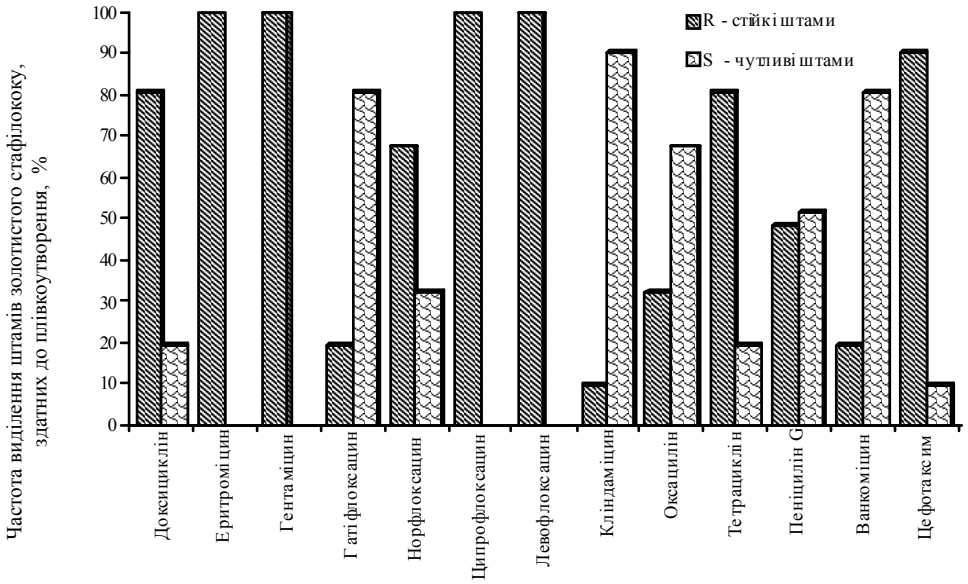


Рис. 2. Чутливість до антибіотиків штамів *Staphylococcus aureus*, здатних до плівкоутворення (n = 31)

Високий відсоток стійких плівкотвірних штамів *S. aureus* відмічали до цефотаксиму (90,3% культур) і препаратів тетрациклінового ряду – тетрацикліну та доксицикліну (80,6% культур). Найчутливішими штами *S. aureus*, здатні до плівкоутворення, виявилися до кліндаміцину (90,3%), ванкоміцину та гатифлоксацину (80,6% культур). Штами золотистого стафілокока, не здатні до плівкоутворення, менш стійкі до антибіотиків, ніж плівкотвірні ізоляти (рис. 3). Лише цефотаксим пригнічував ріст 75,0% штамів *S. aureus*. Усі дослідні культури виявилися чутливими до доксицикліну, гентаміцину, ципрофлоксацину, левофлоксацину та кліндаміцину. 75,0% неплівкотвірних штамів золотистого стафілокока мали чутливість до ванкоміцину, оксациліну, гатифлоксацину та норфлоксацину. Що стосується антибіотикочутливості клінічних ізолятів *P. aeruginosa*, здат-

них до плівкоутворення, то всі 24 штами проявили резистентність до ампіциліну, гентаміцину, іміпенему, цефотаксиму та цефтриаксону (рис. 4). Значна кількість штамів синьогнійної палички (75,0%) мала стійкість до ципрофлоксацину. До інших антибіотичних препаратів відсоток стійких ізолятів не перевищував 50,0%. Найчутливіші плівкотвірні штами *P. aeruginosa* до піперациліну та цефоперазон / сульбактаму. Ці антибіотики пригнічували ріст культур лише в 25,0% випадків.

Штами синьогнійної палички, не здатні до плівкоутворення, характеризувались дещо меншою стійкістю до антибіотиків різних фармакологічних груп, ніж плівкотвірні ізоляти (рис. 5). Але спектр антибіотиків, до яких проявили резистентність неплівкотвірні штами, був майже тим самим. Усі виділені культури зберігали стійкість до гентаміцину, іміпенему та цефтриаксону. Високий відсоток (80,0%) стійких штамів *P. aeruginosa*, не здатних до плівкоутворення, відмічали відносно цефоперазону, цефоперазон / сульбактаму, піперациліну та цефепіму. Найбільшу чутливість проявили неплівкотвірні штами *P. aeruginosa* до ципрофлоксацину (80,0% ізолятів), а також до амікацину, ампіциліну, меропенему, норфлоксацину та цефотаксиму (60,0% культур).

У зв'язку з тим, що високим ступенем резистентності характеризувалися переважно плівкотвірні ізоляти *P. aeruginosa* та *S. aureus*, на наступному етапі роботи досліджено їх антибіотикочутливість методом серійних розведень. Спектр антибіотиків (ципрофлоксацин, цефотаксим, гентаміцин) обрано за результатами попередньої серії дослідів. Саме до них виділені клінічні ізоляти збудників внутрішньолікарняних інфекцій проявляли максимальну стійкість.

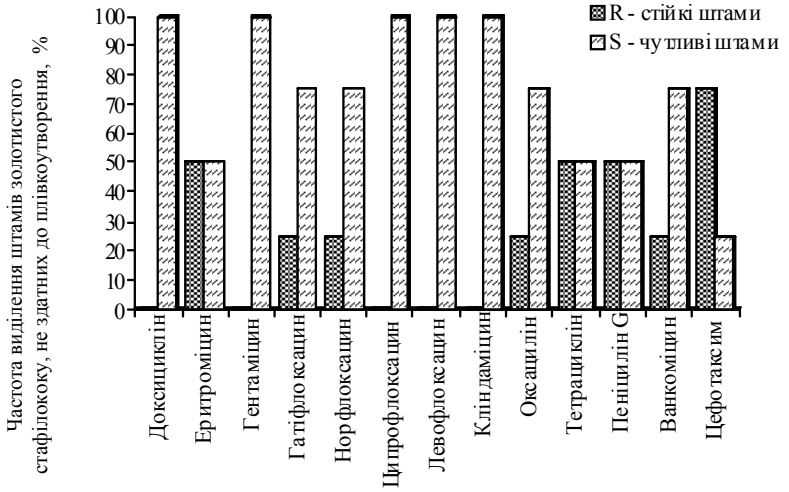


Рис. 3. Чутливість до антибіотиків штамів *Staphylococcus aureus*, не здатних до плівкоутворення (n = 12)

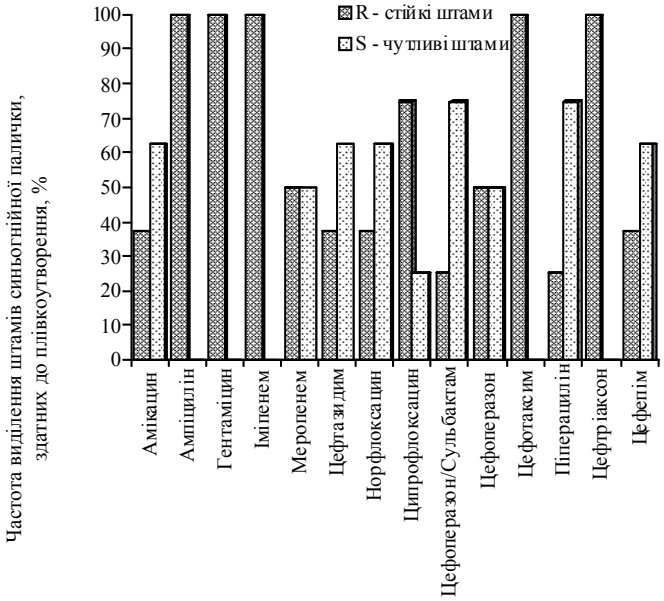


Рис. 4. Чутливість до антибіотиків штамів *Pseudomonas aeruginosa*, здатних до плівкоутворення (n = 24)

Для п'яти плівкотвірних штамів *S. aureus* (№ 8, 9, 15, 23 і 29) значення мінімальної пригнічувальної концентрації (МПК) ципрофлоксацину збігалося з пороговим для цього антибіотика (4 мкг/мл), для двох культур (№ 1 і 19) – перевищувало порогове удвічі (8 мкг/мл), а ще для трьох (№ 6, 12, 22) – учетверо (16 мкг/мл). Значення мінімальної пригнічувальної концентрації цефотаксиму та гентаміцину для шести ізолятів золотистого стафілокока (№ 6, 8, 9, 15, 23 і 29) збігалися з пороговими та становили, відповідно, 64 і 16 мкг/мл. Для ізолятів *S. aureus* № 1 і 12 значення МПК цефотаксиму перевищувало порогове удвічі (128 мкг/мл), а для ізолятів № 19 і 22 – учетверо (256 мкг/мл). Для штамів № 1 і 22 значення МПК гентаміцину перевищувало порогове удвічі (32 мкг/мл), а для ізолятів № 12 і 19 – учетверо (64 мкг/мл). Таким чином, методом серійних розведень установлено, що найрезистентнішими до трьох тестованих антибіотиків (ципрофлоксацину, цефотаксиму та гентаміцину) виявилися клінічні ізоляти *S. aureus* № 1, 6, 12, 19 і 22, які мали найвищі МПК дослідних антибактеріальних препаратів (табл. 1). Для трьох плівкотвірних штамів *P. aeruginosa* (№ 4, 19, 24) значення МПК ципрофлоксацину збігалося з пороговим для цього антибіотика (4 мкг/мл), для культур № 16 і 21 – перевищувало порогове, відповідно, удвічі та учетверо (8 і 16 мкг/мл), ще для трьох (№ 1, 11,

18) – ушестеро (32 мкг/мл). Значення МПК цефотаксиму для чотирьох ізолятів синьогнійної палички (№ 4, 16, 19 і 24) збігалися з пороговими та становили 64 мкг/мл. Для ізолятів *P. aeruginosa* № 18 і 21 значення МПК цефотаксиму перевищувало порогове удвічі (128 мкг/мл), а для штамів № 1 і 11 – учетверо (256 мкг/мл). Для культур *P. aeruginosa* № 1 і 16 значення МПК гентаміцину перевищувало порогове удвічі (32 мкг/мл), для штамів № 11 і 18 – учетверо (64 мкг/мл), для штаму № 21 – увосьмеро. Таким чином, до трьох тестованих антибіотичних препаратів (ципрофлоксацину, цефотаксиму та гентаміцину) найрезистентнішими виявилися клінічні ізоляти синьогнійної палички № 1, 11, 18 і 21 (табл. 2).

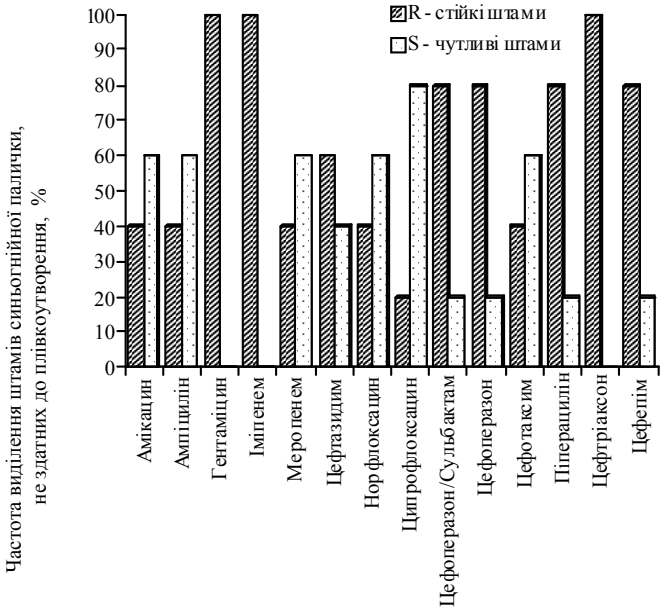


Рис. 5. Чутливість до антибіотиків штамів *Pseudomonas aeruginosa*, не здатних до плівкоутворення (n = 15)

Таблиця 1
Мінімальна пригнічувальна концентрація антибіотиків (мкг/мл) для штамів *S. aureus*, здатних до плівкоутворення (n = 10)

Антибіотик	Порядковий номер штаму *S. aureus*									
	1	6	8	9	12	15	19	22	23	29
Ципрофлоксацин	8	16	4	4	16	4	8	16	4	4
Цефотаксим	128	64	64	64	128	64	256	256	64	64
Гентаміцин	32	16	16	16	64	16	64	32	16	16

Таблиця 2
Мінімальна пригнічувальна концентрація антибіотиків (мкг/мл) для штамів *P. aeruginosa*, здатних до плівкоутворення (n = 8)

Антибіотик	Порядковий номер штаму *P. aeruginosa*							
	1	4	11	16	18	19	21	24
Ципрофлоксацин	32	4	32	8	32	4	16	4
Цефотаксим	256	64	256	64	128	64	128	64
Гентаміцин	32	16	64	32	64	16	128	16

Під час дослідження ефективності дії дезінфектантів отримано такі результати (табл. 3 і 4). Із двох видів хлорумісних дезінфектантів найефективнішим відносно всіх виділених культур золотистого стафілокока був «Дезактин». У 90,3% випадків 0,1% чи 0,2% розчин «Дезактину» пригнічував ріст виділених плівкотвірних ізолятів золотистого стафілокока. Що стосується неплівкотвірних ізолятів *S. aureus*, то до цього дезінфектанту чутливі всі 12 виділених збудників внутрішньолікарняних інфекцій. Менш ефективним дезінфектантом виявився «Неохлор табс». Кількість чутливих до нього штамів золотистого стафілокока, не здатних до плівкоутворення, не перевищувала 75,0%, а у випадку плівкотвірних ізолятів – і того менше (61,3%).

Під час дослідження ефективності дезінфектантів відносно псевдомонади встановлено, що у 100,0% випадків ріст неплівкотвірних ізолятів пригнічував «Дезактин» (0,1% або 0,2% розчин). Такий самий ефект спостерігали за дії 0,1% розчину «Неохлор табс». Плівкотвірні штами синьогнійної палички мали вищий ступінь резистентності до дії обох дезінфектантів: бактерицидний ефект 0,1% розчину «Неохлор табс» спостерігали в 75,0%, а розчинів «Дезактин», – у 62,5% випадків.

Таблиця 3
Чутливість виділених клінічних ізолятів *S. aureus* до дезінфектантів

Об'єкт дослідження	Вид і концентрація дезінфектанту	Чутливі штами		Стійкі штами	
		абсолютна кількість	%	абсолютна кількість	%
Плівкотвірні штами *S. aureus*, n = 31	«Дезактин», 0,1%	28	90,3	3	9,7
	«Дезактин», 0,2%	28	90,3	3	9,7
	«Неохлор табс», 0,03%	19	61,3	12	38,7
	«Неохлор табс», 0,1%	22	71,0	9	29,0
Неплівкотвірні штами *S. aureus*, n = 12	«Дезактин», 0,1%	12	100,0	0	0,0
	«Дезактин», 0,2%	12	100,0	0	0,0
	«Неохлор табс», 0,03%	9	75,0	3	25,0
	«Неохлор табс», 0,1%	9	75,0	3	25,0

Таблиця 4

Чутливість виділених клінічних ізолятів *P. aeruginosa* до дезінфектантів

Об'єкт дослідження	Вид і концентрація дезінфектанту	Чутливі штами		Стійкі штами	
		абсолютна кількість	%	абсолютна кількість	%
Плівкотвірні штами *P. aeruginosa*, n = 24	«Дезактин», 0,1%	15	62,5	9	37,5
	«Дезактин», 0,2%	15	62,5	9	37,5
	«Неохлор табс», 0,03%	12	50,0	12	50,0
	«Неохлор табс», 0,1%	18	75,0	6	25,0
Неплівкотвірні штами *P. aeruginosa*, n = 15	«Дезактин», 0,1%	15	100,0	0	0,0
	«Дезактин», 0,2%	15	100,0	0	0,0
	«Неохлор табс», 0,03%	12	80,0	3	20,0
	«Неохлор табс», 0,1%	15	100,0	0	0,0

Обговорення

Моніторинг резистентності до антибактеріальних препаратів нозокоміальних штамів мікроорганізмів – обов'язкова складова системи інфекційного контролю багатьох країн світу (Murphy et al., 2016; Choi et al., 2016; Iliyasu et al., 2016; Ramirez-Blanco et al., 2017; Singh et al., 2017).

Під час визначення антибіотикочутливості виділених культур – збудників внутрішньолікарніних інфекцій *P. aeruginosa* та *S. aureus* диско-дифузійним методом установлено, що найефективнішими антибіотичними препаратами проти клінічних ізолятів золотистого стафілокока виявилися кліндаміцин, ванкоміцин, оксацилін і гатифлоксацин, а синьогнійної палички – амікацин, меропенем і норфлоксацин. Найменш ефективним антибіотиком проти виділених штамів *S. aureus* можна вважати цефотаксим, а відносно синьогнійної палички – гентаміцин, іміпенем і цефтриаксон.

Отримані дані підтверджують результати досліджень, проведених Potochylova (2015) на базі Київської обласної клінічної лікарні. Вона показала, що із клінічного матеріалу від пацієнтів із гнійно-септичними ускладненнями найчастіше виділяли саме *P. aeruginosa* і *S. aureus*. Штами золотистого стафілокока характеризувались високою стійкістю до антибіотиків пеніцилінового та цефалоспоринового рядів, а синьогнійної палички – до імі- та меропенему, а також до цефалоспоринів: цефтазидиму, цефепіму, цефіксиму, цефазоліну, цефтибутену.

Negi et al. (2015) показали, що виділені з ран післяопераційних пацієнтів госпітальні штами *P. aeruginosa* виявилися найчутливішими до амікацину та піперациліну (54,5% від загальної кількості ізолятів синьогнійної палички). До інших антибіотиків кількість чутливих ізолятів не перевищувала 27,3%. Heydarpour et al. (2017) встановили, що високий рівень стійкості (понад 50,0% культур) проявили нозокоміальні штами *P. aeruginosa* відносно цефтазидиму, цефтриаксону, ципрофлоксацину та гентаміцину. Амікацин пригнічував ріст виділених культур лише в 33,3% випадків, що суперечить нашим даним.

Стосовно антибіотикорезистентності клінічних ізолятів золотистого стафілокока отримані нами результати узгоджуються з наведеними іншими авторами (Kahsay et al., 2014; Manyahi et al., 2014; Belbas et al., 2017; Chen et al., 2017). Вони показали, що госпітальні штами *S. aureus* характеризувались найбільшою стійкістю до пеніцилінів (пеніциліну G, ампіциліну, амоксицилін / клавуланату) та цефалоспоринів (цефотаксиму, цефтриаксону), а найменшою – до кліндаміцину та ванкоміцину.

Виділені штами золотистого стафілокока, не здатні до плівкоутворення, характеризувалися вищим рівнем чутливості до тестованих антибіотичних препаратів, ніж плівкотвірні ізоляти. Відносно синьогнійної палички такої тенденції не відмічали. Усі виділені штами *P. aeruginosa* мали вищий ступінь резистентності до дії антибіотиків, ніж штами *S. aureus*. Найбільшу стійкість ізоляти золотистого стафілокока та синьогнійної палички, здатні до плівкоутворення, проявили до гентаміцину, цефотаксиму та ципрофлоксацину.

На наступному етапі роботи під час визначення антибіотикочутливості виділених збудників внутрішньолікарняних інфекцій, здатних до плівкоутворення, методом серійних розведень, показано, що МПК ципрофлоксацину та гентаміцину у двох ізолятів *P. aeruginosa* перевищували МПК цих антибіотиків у *S. aureus*, що свідчить про вищий рівень резистентності у клінічних штамів синьогнійної палички порівняно із золотистим стафілококом. Із 31 плівкотвірного ізолята *S. aureus* найвищі МПК за трьома тестованими антибіотиками мали п'ять штамів: № 1 і 19, а також № 6, 12 і 22; а із 24 дослідних культур *P. aeruginosa* – штами № 1, 11, 18, 21. Їх можна вважати ізолятами з множинною резистентністю. За сучасною мікробіологічною термінологією до штамів із множинною резистентністю (MDR) відносять ті, які мають резистентність щонайменше до трьох антибіотичних препаратів (Gill et al., 2011; Magiorakos et al., 2012).

За результатами визначення ефективності дії хлорумісних дезінфектантів «Дезактин» і «Неохлор табс» проти виділених збудників внутрішньолікарняних інфекцій встановлено, що штами *S. aureus* та *P. aeruginosa*, здатні до плівкоутворення, характеризувались вищим ступенем резистентності до дії обох видів дезінфектантів, ніж неплівкотвірні ізоляти. Отримані нами результати узгоджуються з даними Bridier et al. (2011) і Abdallah et al. (2014) про те, що плівкотвірні штами збудників нозокоміальних інфекцій стійкіші до дії дезінфектантів порівняно з ізолятами, не здатними до утворення біоплівок. Причому найбільший бактерицидний ефект відносно плівкотвірних варіантів проявляють саме хлорумісні дезінфектанти (Bridier et al., 2011).

Отримані дані дозволяють констатувати, що у клінічних штамів *S. aureus* і *P. aeruginosa* – збудників внутрішньолікарняних інфекцій – існує прямий взаємозв'язок між показниками стійкості їх до антибіотиків та дезінфектантів і здатністю культур до плівкоутворення.

Висновки

Під час дослідження відокремлюваного ран пацієнтів у 79,6% клінічних зразків виділено збудники внутрішньолікарняних інфекцій, ідентифіковані як *S. aureus* і *P. aeruginosa*. Здатність до плівкоутворення мали 31 із 43 (72,0%) виділених штамів золотистого стафілокока і 24 із 39 (61,5%) клінічних ізолятів синьогнійної палички. Всі плівкотвірні штами проявили стійкість до еритроміцину, гентаміцину, ципрофлоксацину та левофлоксацину. Найчутливішими вони виявилися до кліндаміцину (90,3%), ванкоміцину (80,6%) та гатифлоксацину (80,6% культур). Неплівкотвірні штами золотистого стафілокока характеризувалися нижчим ступенем резистентності до антибіотиків, ніж плівкотвірні ізоляти. Лише цефотаксим пригнічував ріст 75,0% штамів *S. aureus*. Усі дослідні культури виявилися чутливими до доксицикліну, гентаміцину, ципрофлоксацину, левофлоксацину та кліндаміцину.

Плівкотвірні клінічні ізоляти *P. aeruginosa* проявили резистентність до ампіциліну, гентаміцину, іміпенему, цефотаксиму та цефтриаксону. Найчутливіші (75,0% культур) вони до піперациліну та цефоперазон / сульбактаму. Неплівкотвірні штами синьогнійної палички зберігали стійкість відносно гентаміцину, іміпенему та цефтриаксону. Найбільшу чутливість проявили вони до ципрофлоксацину (80,0% ізолятів), а також до амікацину, ампіциліну, меропенему, норфлоксацину та цефотаксиму (60,0% культур). Вищий рівень резистентності мали клінічні штами синьогнійної палички порівняно із золотистим стафілококом за значеннями МПК ципрофлоксацину та гентаміцину.

Найефективнішим дезінфектантом проти виділених клінічних неплівкотвірних штамів золотистого стафілокока та синьогнійної палички виявився «Дезактин» у концентрації 0,1% або 0,2%. Відносно ізолятів *S. aureus*, здатних до плівкоутворення, його ефективність знизилась на 9,7%. Найкращий бактерицидний ефект проти плівкотвірних штамів *P. aeruginosa* проявив 0,1% розчин «Неохлор табс». Він пригнічував ріст 75,0% тестованих культур.

У клінічних штамів *S. aureus* і *P. aeruginosa* – збудників внутрішньолікарняних інфекцій – існує прямий взаємозв'язок між показниками стійкості їх до антибіотиків та дезінфектантів і здатністю культур до плівкоутворення.

References

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Archives of Microbiology, 196, 453–472.

Ali, Z., Mumtaz, N., Naz, S. A., Jabeen, N., & Shafique, M. (2015). Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals. The Journal of the Pakistan Medical Association, 1, 12–16.

Ansari, S., Nepal, H. P., Gautam, R., Rayamajhi, N., Shrestha, S., Upadhyay, G., Acharya, A., & Chapagain, M. L. (2014). Threat of drug resistant *Staphylococcus aureus* to health in Nepal. BMC Infectious Diseases, 14, 1–5.

Baldan, R., Cigana, C., Testa, F., Bianconi, I., De Simone, M., Pellin, D., Di Serio, C., & Bragonzi, A. (2014). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways influences virulence of *Staphylococcus aureus in vitro* and murine models of co-infection. PLoS One, 9(3), e89614.

Belbase, A., Pant, N. D., Nepal, K., Neupane, B., Baidhya, R., Baidya, R., & Lekhak, B. (2017). Antibiotic resistance and biofim production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 16, 15.

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Greub, G., Thomas, V., & Briandet, R. (2011). Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofims. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 2648–2654.

Chadha, T. (2014). Bacterial biofilms: Survival mechanisms and antibiotic resistance. Journal of Bacteriology and Parasitology, 5(3).

Chen, K., Huang, Y., Song, Q., Wu, C., Chen, X., & Zeng, L. (2017). Drug-resistance dynamics of *Staphylococcus aureus* between 2008 and 2014 at a tertiary teaching hospital, Jiangxi Province, China. BMC Infectious Diseases, 17, 97.

Choi, J. Y., Kwak, Y. G., Yoo, H., Lee, S. O., Kim, H. B., Han, S. H., Choi, H. J., Kim, H. Y., Kim, S. R., Kim, T. H., Lee, H., Chun, H. K, Kim, J. S., Eun, B. W., Kim, D. W., Koo, H. S., Cho, E. H., & Lee, K. (2016). Korean Nosocomial Infections Surveillance System. Trends in the distribution and antimicrobial susceptibility of causative pathogens of device-associated infection in Korean intensive care. Journal of Hospital Infections, 92(4), 363–371.

Dasgupta, S., Das, S., Chawan, N. S., & Hazra, A. (2015). Nosocomial infections in the intensive care unit: Incidence, risk factors, outcome and associated pathogens in a public tertiary teaching hospital of Eastern India. Indian Journal of Critical Care Medicine, 19(1), 14–20.

Gill, M. M., Usman, J., Kaleem, F., Hassan, A., Khalid, A., Anjum, R., & Fahim, Q. (2011). Frequency and antibiogram of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan, 21(9), 531–534.

Heydarpour, F., Rahmani, Y., Heydarpour, B., & Asadmobini, A. (2017). Nosocomial infections and antibiotic resistance pattern in open-heart surgery patients at Imam Ali Hospital in Kermanshah, Iran. GMS Hygiene and Infection Control, 12, 1–8.

Iliyasu, G., Daiyab, F. M., Tiamiyu, A. B., Abubakar, S., Zaiya, G. H., Sarki, A. M., & Habib, A. G. (2016). Nosocomial infections and resistance pattern of common bacterial isolates in an intensive care unit of a tertiary hospital in Nigeria: A 4-year review. Journal of Critical Care, 34, 116–120.

Kahsay, A., Mihret, A., Abebe, T., & Andualem, T. (2014). Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* in patients with surgical site infection at Debre Markos Referral Hospital, Amhara Region, Ethiopia. Archives of Public Health, 72, 16.

Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(7), 509–514.

Kim, S., Lieberman, T. D., & Kishony, R. (2014). Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(40), 14494–14499.

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection, 18(3), 268–281.

Manyahi, J., Matee, M. I., Majigo, M., Moyo, S., Mshana, S. E., & Lyamuya, E. F. (2014). Predominance of multi-drug resistant bacterial pathogens causing surgical site infections in Muhimbili National Hospital, Tanzania. BMC Research Notes, 7, 500.

Menegueti, M. G., Canini, S. R. M. da S., Bellissimo-Rodrigues, F., & Laus, A. M. (2015). Evaluation of nosocomial infection control programs in health services. Revista Latino-Americana de Enfermagem, 1, 98–105.

Murphy, R. A., Okoli, O., Essien, I., & Teicher, C. (2016). Multidrug-resistant surgical site infections in a humanitarian surgery project. Epidemiology Adn Infection, 144(16), 3520–3526.

Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., & Menon, V. (2014). Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A systematic review and meta-analysis. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 3, 32.

Negi, V., Pal, S., Juval, D., Sharma, M. K., & Sharma, N. (2015). Bacteriological profie of surgical site infections and their antibiogram: A study from resource constrained rural setting of Uttarakhand State. India Journal of Clinical and Diagnostic Research, 9(10), 17–20.

O'Toole, G. F., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology, 54, 49–79.

Ramirez-Blanco, C. E., Ramirez-Rivero, C. E., Diaz-Martinez, L. A., & Sosa-Avila, L. M. (2017). Infection in burn patients in a referral center in Colombia. Burns, in press.

Rezai, M. S., Bagheri-Nesami, M., & Nikkhah, A. (2017). Catheter-related urinary nosocomial infections in intensive care units: An epidemiologic study in North of Iran. Caspian Journal of Internal Medicine, 8(2), 76–82.

Scherbaum, M., Kösters, K., Mürbeth, R. E., Ngoa, U. A., Kremsner, P. G., Lell, B., & Alabi, A. (2014). Incidence, pathogens and resistance patterns of nosocomial infections at a rural hospital in Gabon. BMC Infectious Diseases, 14, 124.

Singh, S., Malhotra, R., Grover, P., Bansal, R., Kaur, R., & Jindal, N. (2017). Antimicrobial resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonizing the anterior nares of health-care workers and outpatients attending the remotely located tertiary care hospital of North India, 9(4), 317–321.

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. The Open Microbiology Journal, 11, 53–62.

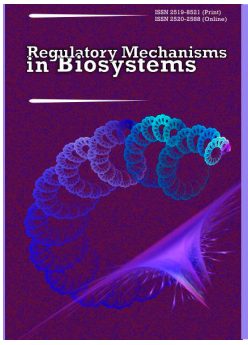
Sonmezer, M. C., Ertem, G., Erdincm, F. S., Kilic, E. K., Tulek, N., Adiloglu, A., & Hatipoglu, C. (2016). Evaluation of risk factors for antibiotic resistance in patients with nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2.

Sowash, M. G., & Uhlemann, A. C. (2014). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* case studies. Methods of Molecular Biology, 1085, 25–69.

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. J. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews, 28(3), 603–661.

Vuong, C., Yeh, A., Cheung, G., & Otto, M. (2016). Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 25(1), 73–93.

Wang, L., & Ruan, S. (2017). Modeling nosocomial infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with environment contamination. Scientific Reports, 7, 1–12.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 547–553
doi: 10.15421/021784

Improving the quality of life of patients with stable angina pectoris using combined therapy

K. O. Zolotarova

Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Article info

Received 28.09.2017
Received in revised form 20.10.2017
Accepted 25.10.2017

Odessa National Medical University, Valikhovski prov., 2, Odessa, 65000, Ukraine.
Tel. +38-048-723-42-49.
E-mail: sugar.fm@gmail.com

Zolotarova, K. O. (2017). Improving the quality of life of patients with stable angina pectoris using combined therapy. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 547–553. doi:10.15421/021784

Treatment of chronic ischemic heart disease includes the use of non-drug methods (anti-hypodynamia, smoking cessation, etc.), as well as drug therapy, the main tasks of which are to reduce the risk of complications such as stroke, myocardial infarction, sudden cardiac death, and to gain an increase in life expectancy. An important aspect of treatment is also a decrease in the frequency and intensity of angina attacks, the need for short-acting nitrates, to gain an increase in physical activity, that is, an overall, improvement in the quality of life of patients. The article presents the results of studying the quality of life indicators of patients with stable angina pectoris with the use of omega-3 polyunsaturated fatty acids and magnetotherapy. 85 patients with stable angina pectoris were examined, divided into three groups according to the method of therapy. 28 patients of the I (control) group received a drug complex corresponding to the national protocol for the treatment of patients with angina pectoris: nitrates, beta-blockers, ACE inhibitors, antiplatelet drugs, statins (atorvastatin at a daily dose of 20 mg). 29 patients of the II group, together with protocol therapy, received the drug omega-3 polyunsaturated fatty acids in a daily dosage of 2000 mg, divided into 2 doses. In connection with the known hypolipidemic action of omega-3 PUFA, the daily dose of atorvastatin in this and the next group was reduced to 10 mg. Group III consisted of 28 patients who were prescribed omega-3 polyunsaturated fatty acids and a course of magnetotherapy according to a special method against the background of the protocol medication complex. It was revealed that, initially in patients with angina, the quality of life indicators according to the Seattle questionnaire and the visual analogue scale were reduced. It was shown that with the use of the protocol medication complex, all the parameters of the quality of life improved reliably, with a significant reduction in the angina pain scales and less significant improvement on the scales of physical activity, assessments of health and the perception of the disease . Upon adherence to the therapy of omega-3 polyunsaturated fatty acids, there was a positive but very weak tendency to improve the quality of life indicators, which did not differ significantly from the control. The use of combined therapy with simultaneous inclusion of omega-3 polyunsaturated fatty acids and magnetotherapy led to significant and reliable improvement in the quality of life indicators, not only on the scales reflecting the pain component, but also on the indicators that characterize the psychological contribution to the quality of life (treatment satisfaction and quality of life (disease perception)). The significant improvement in the quality of life in patients receiving magnetotherapy in contrast to the absence of such influence in patients receiving omega-3 polyunsaturated fatty acids without magnetotherapy was due to the strong antianginal effect of MT, its sedative and emotionally relaxing action, and the ability to enhance the effects of medications.

Keywords: ischemic heart disease; Seattle Angina questionnaire; visual analogue scale; omega-3 polyunsaturated fatty acids; magnetotherapy

Улучшение качества жизни больных стабильной стенокардией напряжения при применении комбинированной терапии

К. О. Золотарева

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Представлены результаты изучения показателей качества жизни больных стабильной стенокардией напряжения при использовании омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и магнитотерапии. Обследовано 85 больных стабильной стенокардией напряжения I–III функциональных классов, разделенных на три группы по способу терапии. 28 больных контрольной группы для лечения получали протокольный медикаментозный комплекс для больных стенокардией, включающий нитраты, β-блокаторы, ингибиторы АПФ, антитромбоцитарные препараты, статины. 29 больным II группы совместно с протокольным комплексом назначался препарат омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (витрум кардио омега-3) в суточной дозировке 2 000 мг. 28 больным III группы на фоне протокольного медикаментозного комплекса назначались омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и курс магнитотерапии по специальной методике.

Исходно качество жизни больных значительно снижено, согласно показателям Сиэттлского опросника для больных стенокардией, а также показателям визуальной аналоговой шкалы. При применении протокольного медикаментозного комплекса отмечалось достоверное улучшение показателей качества жизни, однако, в основном за счет выраженного снижения количества ангинозных приступов, в то время как показатели ограничения физической активности, оценки самочувствия и восприятия болезни увеличились также достоверно, но менее выраженно. При добавлении к протокольному комплексу омега-3 полиненасыщенных жирных кислот по всем показателям качества жизни значительного и достоверного улучшения не отмечалось, хотя общая тенденция была положительной. При совместном использовании ώ -3 ПНЖК и магнитотерапии эффект воздействия на все показатели качества жизни был максимальным, причем не только по шкалам приступов стенокардии, но также и по показателям физической активности, удовлетворенности лечением, оценки самочувствия и, в итоге, по общему качеству жизни. Данный эффект обусловлен наличием помимо антиангинального эффекта магнитотерапии, ее седативным и снимающим эмоциональное напряжение действием.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; Сиэттлский опросник; визуальная аналоговая шкала; омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты; магнитотерапия

Введение

Лечение хронической ишемической болезни сердца (ИБС) включает в себя использование немедикаментозных методов (борьба с гиподинамией, отказ от курения и т. д.), а также медикаментозную терапию, основными задачами которой является снижение риска развития осложнений, таких как инсульт, инфаркт миокарда, внезапная сердечная смерть, а также увеличение продолжительности жизни. Важным аспектом лечения является также использование методов, направленных на уменьшение частоты и интенсивности ангинозных приступов, потребности в приеме нитратов, увеличение физической активности, то есть практически всех составляющих, входящих в понятие «качество жизни» больного стенокардией.

Термин качество жизни (КЖ) охарактеризован Всемирной организацией здравоохранения как «индивидуальное восприятие своей позиции в жизни в контексте с культурной средой и системой ценностей, в которой проживает индивид, и в соотношении с его целями, ожиданиями, стандартами и воззрениями». Начало изучения качества жизни современной медициной приходится на вторую половину XX века, когда стало очевидно, что в процессе лечения важно добиться не только редукции болезненных симптомов, но и улучшения качества жизни и социального функционирования больного (Zholdasbekova et al., 2016). В последние десятилетия наблюдается повышение интереса к исследованиям КЖ, а также возрастание роли этих исследований, что отражается в динамике числа публикаций по данной проблеме (Osipov et al., 2011).

Основными инструментами изучения качества жизни являются всевозможные анкеты, опросники, визуальные аналоговые шкалы, поскольку именно они позволяют оценить субъективное состояние больного, его отношение к своей болезни, степень влияния этой болезни на его повседневную жизнь. Методики, используемые в кардиологической практике, подразделяются на общие, то есть применяющиеся независимо от нозологии, а также специальные – разработанные с учетом конкретного заболевания или ведущего синдрома. Из общих методик наиболее часто применяется «Medical outcomes study 36-item short-form health survey» (SF-36) (Ware and Sherbourne, 1992), широко использующийся, в том числе для популяционных исследований, в различных странах мира. Среди специальных анкет широко применяется Миннесотский опросник – «Minnesota living with heart failure questionnaire» (MLHFQ), разработанный в 1987 г. T. Rector и J. Cohn, для больных с хронической сердечной недостаточностью, обладающий достаточной валидностью и высокой чувствительностью и позволяющий определить, насколько имеющаяся сердечная недостаточность ограничивает физические возможности больного, социально-экономические аспекты и общественные связи пациента, а также положительное эмоциональное восприятие жизни (Rector and Cohn, 1992). К специальным относятся также опросники, разработанные для больных артериальной гипертензией: «Описание гипертонического статуса» – «Hypertension status inventory» (HYPER), «Опросник по оценке качества жизни при артериальной гипертензии» – «Quality of life questionnaire for arterial hypertension» (CHAL) (Soboleva and Slobodenyuk, 2013).

У больных стабильной стенокардией напряжения наиболее часто для оценки качества жизни используется «Сиэттлский опросник для больных стенокардией» – «Seattle angina questionnaire» (SAQ) (Spertus et al., 1995). Анкета SAQ состоит из 19 вопросов, оценивающих КЖ по 5 шкалам (значения от 0% до 100%): физические ограничения, стабильность приступов стенокардии, частота приступов, удовлетворенность лечением и качество жизни (либо отношение к болезни). Выявлена достоверная корреляция между значениями каждой из шкал опросника и такими показателями как толерантность к физическим нагрузкам, тяжесть заболевания с точки зрения лечащего врача, употребление нитроглицерина. Данные об уровне КЖ, полученные с помощью SAQ, высоковоспроизводимы. Опросник обладает высокой чувствительностью к изменениям состояния пациентов с ИБС, в том числе и после оперативного лечения заболевания. Он получил широкое международное признание, переведен на 12 языков мира, применялся более чем в 20 рандомизированных исследованиях по оценке эффективности лечения больных ИБС и считается одним из наиболее адекватных опросников для определения качества жизни больных стабильной стенокардией (Dougherty et al., 1998; Zholdasbekova et al., 2016).

В последние годы не утихает интерес к омега-3 полиненасыщенным жирным кислотам (ω-3 ПНЖК) в терапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями в связи с выявленным множеством их позитивных эффектов у этой категории больных. Согласно литературным данным, ω-3 ПНЖК обладают гиполипидемическими, антиагрегационными, антиаритмическими, противовоспалительными, вазодилатирующими и другими свойствами (Lizogub et al., 2010; Saravanan et al., 2010). Такие эффекты как гипотензивный и антиаритмический позволяют этим жирным кислотам оказывать существенное влияние на клиническое течение ИБС, тем самым улучшая качество жизни больных (Tavazzi et al., 2008). Одновременно с этим продолжаются поиски средств, способствующих дальнейшему снижению заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии.

Следует учитывать, что больные ИБС по протокольной терапии имеют более чем достаточный набор лекарственных препаратов, что увеличивает не только стоимость лечения, но также и возможность появления побочных эффектов. С этой точки зрения особенно актуальна физиотерапия: магнитотерапия (МТ), известная своими положительными эффектами на сердечно-сосудистую систему (аналгезирующий, гипотензивный, гипокоагуляционный) (Zolotarova and Petrosjan, 2004; Ulashik et al., 2015). Кроме того, необходимо подчеркнуть, что МТ отличается хорошей переносимостью, безопасным воздействием, практически не имеет противопоказаний и применяется даже у больных с подострой стадией инфаркта миокарда (Serdiuk, 2004; Zolotarova and Panigrahi, 2008). При этом следует отметить, что влияние омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, магнитотерапии и, тем более, их сочетания на качество жизни больных ИБС в литературе освещено слабо, что диктует необходимость изучения данного вопроса.

Цель данной статьи – оптимизировать качество жизни больных стабильной стенокардией с использованием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и магнитотерапии.

Материал и методы исследований

Работа выполнена на базе кардиологического отделения Военно-медицинского клинического центра Южного региона Украины, а также на базе терапевтического отделения КУ «Южненская городская больница».

В исследование включено 85 больных стенокардией напряжения I–III функциональных классов. Диагноз стабильной стенокардии установлен в соответствии с рекомендациями Ассоциации кардиологов Украины (Kovalenko et al., 2016). В исследование не включены больные с нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда, диагностированными в течение последнего месяца, а также пациенты с серьезными нарушениями сердечного ритма, сердечной недостаточностью IIБ – III стадии и тяжелой соматической патологией (опухоли, сепсис, кровотечения в анамнезе и др.). Все больные дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Для решения поставленных задач сформировано три группы больных.

I группа (контрольная) – 28 больных. Для лечения применяли протокольный комплекс для больных стенокардией: нитраты, β-блокаторы, ингибиторы АПФ, антитромбоцитарные препараты, статины (аторвастатин в суточной дозе 20 мг).

II группа – 29 больных. На фоне протокольного комплекса применяли препарат ω-3 ПНЖК (витрум кардио омега-3 (приказ МЗ Украины 27.06.06 г. № 411, р. с. UA/4642/01/01) в суточной дозировке 2 000 мг, разделенных на два приема. Суточная доза аторвастатина уменьшена до 10 мг в связи с гиполипидемическим эффектом омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

III группа – 28 больных. К протокольному комплексу с низкотерапевтической (10 мг) дозой аторвастатина добавляли витрум кардио омега-3 и курс магнитотерапии по специальной методике: два индуктора одновременно располагали на область сердца (переменное магнитное поле, 14 мТл) и область печени (синусоидальное магнитное поле, 20 мТл). Курс лечения составлял 10 ежедневных процедур с экспозицией 20 минут, начиная с 5–7-х суток с начала медикаментозной терапии. Процедуры магнитотерапии проводили с использованием серийного аппарата ПДМТ-01 (ТУ 45-889-3293000 ТУ, № 132, 1989 г.). Переменное и синусоидальное магнитные поля выбраны как оптимальные по влиянию на сердечно-сосудистую систему (Sysoeva, 2005). Одновременное их воздействие на область сердца и область печени позволяет воздействовать на максимальный объем крови и использовать при этом минимальную индуктивность (20 и 14 мТл). Специальная методика с одновременным использованием двух видов полей с разной индуктивностью и на две зоны обуславливает теоретические предпосылки к максимальной коррекции основных этиопатогенетических звеньев ИБС (атеротромбоз, гипертензия, гиперкоагуляция, ангинозные приступы и др.), а значит и большие возможности улучшения качества жизни.

Период наблюдения составил 63,5 ± 3,1 суток. Все больные до и после лечения самостоятельно заполняли опросник SAQ (значения представлены в процентах, максимальное значение соответствует наиболее высокому показателю качества жизни), а также отмечали числовое значение, соответствующее общему уровню своего самочувствия по визуальной аналоговой шкале (ВАШ), на которой наилучшее состояние здоровья отмечено как 100, а наихудшее – как 0 (Martsevich et al, 2016).

Данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., USA). Проверку соответствия данных нормальному распределению проводили с использованием критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. В случаях нормального распределения для сравнения выборок применяли ANOVA. Данные представлены как среднее значение и ошибка среднего (M ± m). В случаях несоответствия данных нормальному распределению сравнение проводили с использованием непараметрических критериев Крускала – Уоллиса и Вилкоксона; данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_1 – Q_3$). Различия между параметрами считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты

Возраст больных колебался от 45 до 75 лет, среди них мужчин 47, женщин 38. Средний возраст больных в I, II и III группе составил соответственно 62,4 ± 1,2, 61,8 ± 1,3 и 63,1 ± 1,6 лет ($P > 0,05$). В I группе соотношение мужчин и женщин составило 57,1% и 42,9%, во II – 55,2% и 44,8%, в III – 53,6% и 46,4%. Распределение больных по функциональным классам стенокардии в группах статистически не различалось ($P > 0,05$, табл. 1).

Таблица 1
Распределение больных исследуемых групп по функциональным классам стенокардии

Функциональные классы стенокардии	I группа, n = 28		II группа, n = 29		III группа, n = 28	
	число больных	%	число больных	%	число больных	%
I	1	3,6	2	6,9	1	3,6
II	13	46,4	13	44,8	9	32,1
III	14	50,0	14	48,3	18	64,3

Большинство больных имели сопутствующую артериальную гипертензию, причем количество пациентов с ее наличием во всех исследуемых группах не различалось (89,3% в I, 86,2% во II и 89,3% в III группе). Количество больных с хронической сердечной недостаточностью I–IIA стадии также не различалось во всех группах (92,9% в I, 89,7% во II и 89,3% в III группе). Таким образом, по возрасту, полу, тяжести стабильной стенокардии, а также частоте встречаемости сопутствующих заболеваний и осложнений, группы были сопоставимы между собой. Достоверных отличий между исходными показателями качества жизни у больных разных групп не отмечено ($P > 0,05$, рис. 1).

Также из диаграммы видно, что согласно данным опросника SAQ изначально все показатели качества жизни у больных всех исследуемых групп до лечения были снижены относительно нормативных значений, составляющих 100% у здоровых людей. Хуже всего больные стабильной стенокардией оценили свое качество жизни по шкале частоты приступов (20,0%, 20,0%, 20,0% в I, II, III группах соответственно; $P > 0,05$), а также по шкале стабильности течения стенокардии (50,0%, 25,0%, и 25,0% в I, II и III группах соответственно; $P > 0,05$). Значительно сниженные показатели физической активности, едва превышающие 50% отметки (52,8%, 52,8% и 50,0% соответственно в I, II и III группах; $P > 0,05$), а также удовлетворенности лечением (56,3%, 56,3% и 50,0% в I, II и III группах соответственно; $P > 0,05$) обусловили, на наш взгляд, низкую общую оценку больными своего качества жизни (37,5%, 50,0% и 41,8% в I, II и III группах соответственно; $P > 0,05$). Анализ данных по визуальной аналоговой шкале также показал низкую оценку своего состояния обследованными больными (55,0%, 55,0% и 55,0% в I, II и III группах соответственно; $P > 0,05$). В целом медианы оценок по всем шкалам Сиэттлского опросника едва превышают 55% значения, что свидетельствует о значительном негативном влиянии стабильной стенокардии напряжения на качество жизни больных.

Анализ результатов исследования качества жизни у больных I (контрольной) группы после лечения показал значительный и достоверный прирост показателей по большинству шкал SAQ на фоне терапии протокольным для стабильной стенокардии медикаментозным комплексом (рис. 2).

Несмотря на достаточно выраженное улучшение показателей стабильности стенокардии (прирост составил 34,8%; $P = 1,8 \cdot 10^{-5}$) и частоты стенокардии (прирост составил 11,8%; $P = 8,9 \cdot 10^{-5}$), по шкалам ограничения физической активности, удовлетворенности лечением и визуальной оценке самочувствия прирост не был столь значительным (+4,2%, +12,7% и +11,2% соответственно; $P = 8,5 \cdot 10^{-5}$; $4,0 \cdot 10^{-5}$ и 0,03).

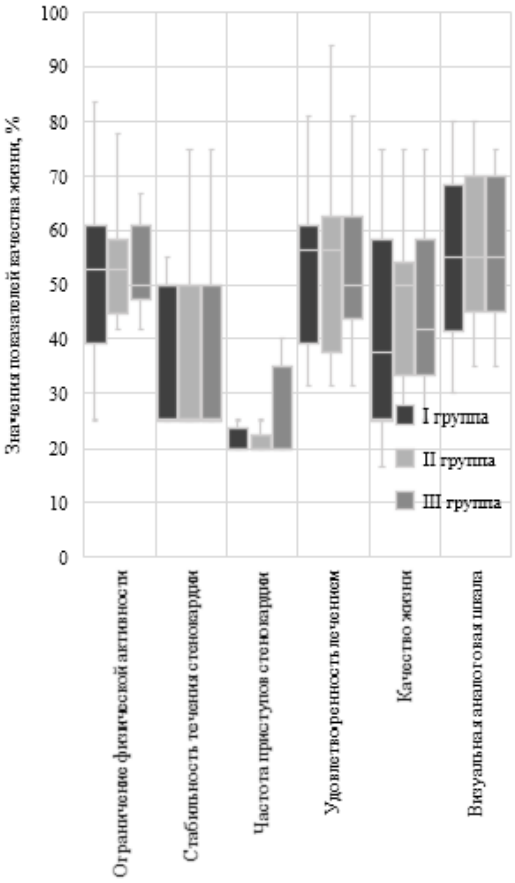


Рис. 1. Показатели качества жизни у больных исследуемых групп до лечения ($n_1 = 28$, $n_2 = 29$, $n_3 = 28$):

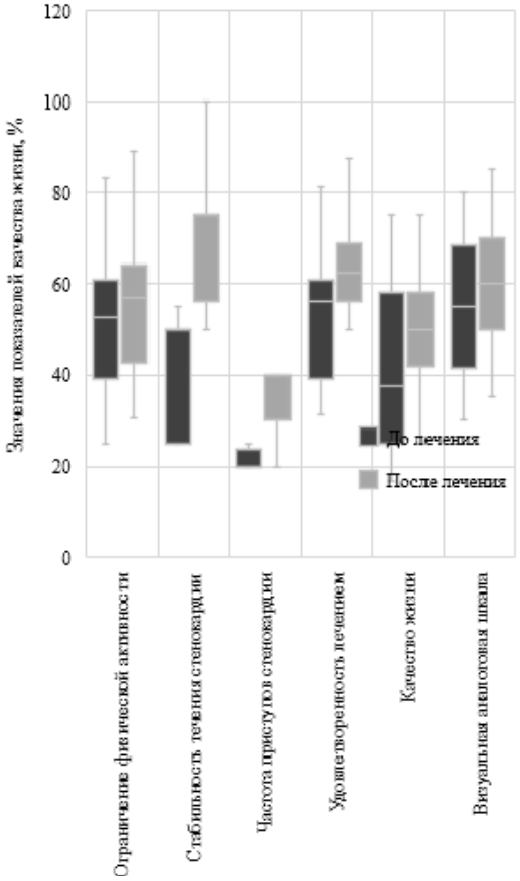


Рис. 2. Показатели качества жизни у больных I (контрольной) группы до и после лечения (n = 28):

верхняя и нижняя границы прямоугольников соответствуют значениям первого и третьего квартилей, горизонтальная линия внутри прямоугольника – медиане, вертикальные линии – максимальным и минимальным значениям выборки

На наш взгляд, это обусловлено эмоциональной составляющей, которая, со слов большинства больных, сводится к осторожности и боязни увеличения своей физической активности из-за уменьшившихся, но все еще сохраняющихся приступов стенокардии. В связи с этим прирост по шкале качества жизни составил в данной группе лишь 7,2% (с 37,5% до 50,0%) и был единственным из изучаемых показателей, не достигшим достоверных изменений после терапии (P = 0,054). Результаты исследования качества жизни у больных II группы, принимавших на фоне протокольной терапии препарат омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, показали, что после лечения все показатели SAQ и ВАШ увеличились достоверно (рис. 3).

Ни один из представленных показателей своих нормативных значений не достиг. Наибольший прирост отмечен по показателям шкал стабильности течения стенокардии и частоты приступов, увеличившиеся на 41,4% и 14,5% ($P = 8{,}3 \cdot 10^{-6}$ и $4{,}0 \cdot 10^{-5}$ соответственно). Также на 16,4% увеличился уровень удовлетворенности больных проводимым лечением ($P = 3{,}6 \cdot 10^{-5}$). Намного меньше увеличились показатели шкал ограничения физической активности (с 52,8% до 55,5%; $P = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$) и качества жизни (с 50,0 (33,3–50,0)% до 50,0 (50,0–66,8)%, $P = 9{,}2 \cdot 10^{-3}$), прирост по которым составил 6,9% и 8,6% соответственно. Общая оценка самочувствия также изменилась достоверно, увеличившись на 15,7%. Необходимо отметить, что некоторое несоответствие степени увеличения показателей физической активности и качества жизни более выраженному уменьшению симптомов стенокардии может объясняться, как уже было указано выше, отсутствием психологической адаптации больного к возможности расширения своей физической нагрузки. Больные III группы на фоне протокольного медикаментозного комплекса получали омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в суточной дозе 2 г и 10-дневный курс магнитотерапии с использованием переменного магнитного поля с величиной магнитной индукции 14 мТл на область сердца и синусоидального магнитного поля с величиной магнитной индукции 20 мТл на область печени. Изучение качества жизни у больных после лечения показало наибольший достоверный прирост показателей по всем шкалам Сиэттлского опросника, а также по данным визуальной аналоговой шкалы (рис. 4).

Практически все показатели (за исключением шкалы частоты приступов) после лечения приблизились, достигли либо превысили 60% значения. Как и в предыдущих группах, наиболее значительно возрос (на 54,6%) показатель стабильности течения стенокардии, медиана которого достигла 100% ($P = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$). Это свидетельствует о регистрации болей в груди, стеснении за грудиной или приступах стенокардии значительно реже, чем до лечения либо пациенты вообще не отмечали болей за исследуемый период. Шкалы частоты приступов и удовлетворенности лечением показали примерно равнозначный прирост (21,1% и 24,1%, $P = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$ и $5{,}6 \cdot 10^{-6}$, соответственно). Это показывает, что многие больные, по мере уменьшения выраженности симптомов стенокардии и снижения необходимости в короткодействующих нитратах, отмечают меньшую обременительность приема препаратов (то есть большинство больных на вопрос анкеты касательно обременительности приема лекарств ответили: «слегка обременительно» либо «совсем не обременительно»), а также в большей степени считают, что делается все возможное для улучшения их состояния. Показатель шкалы ограничения физической активности возрос на 12,1% ($P = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$), что больше, чем в предыдущих группах, но также несколько не соответствует степени значительного уменьшения симптомов стенокардии. Увеличение по шкале качества жизни составило 19,1% ($P = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$), а по визуальной шкале оценки самочувствия – 35,8%, ($P = 6{,}0 \cdot 10^{-5}$). Эти данные свидетельствуют о том, что, несмотря на некоторую осторожность и бо-

язнь увеличить свою физическую активность при уменьшившихся по частоте, но все еще сохраняющихся приступах стенокардии, у пациентов появляется осознание улучшения своего самочувствия и качества жизни.

Анализ качества жизни в группе больных с использованием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот показал несколько больший прирост всех показателей по сравнению с таковыми в контрольной группе (рис. 2, 3). Однако из таблицы 2 видно, что достоверной межгрупповой разницы после лечения не отмечено ($P_{1–2} > 0,05$). При этом все показатели продемонстрировали однонаправленную тенденцию к улучшению по сравнению с контролем, включая показатель качества жизни, увеличившийся в контроле на 7,2%, ($P = 0,054$; рис. 2), а в группе с использованием ώ-3 ПНЖК – достоверно на 8,6% ($P = 9,2 \cdot 10^{-3}$; рис. 3), однако межгрупповая разница по нему была также недостоверной ($P_{1–2} = 0,25$). Это свидетельствует о способности омега-3 полиненасыщенных жирных кислот несколько улучшать качество жизни больных стабильной стенокардией не столько за счет антиангинального действия, сколько за счет своих известных эффектов по ослаблению выраженности гипертензии, сердечной недостаточности и аритмии. В итоге добавление их в протокольный комплекс, по нашим данным, значительного влияния на качество жизни больных стабильной стенокардией не оказывало.

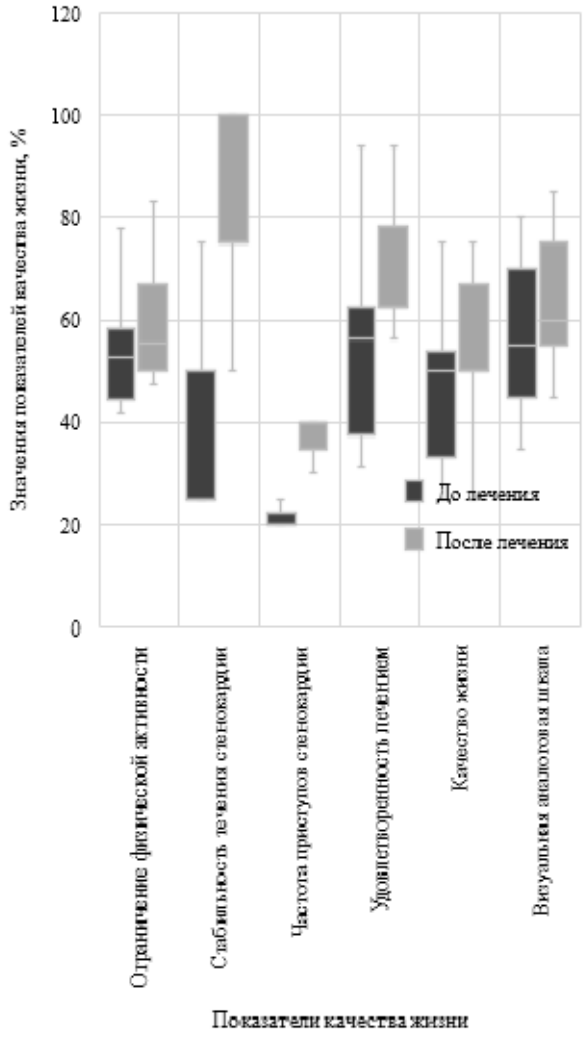


Рис. 3. Показатели качества жизни у больных II группы до и после лечения (n = 29): обозначения см. рис. 1

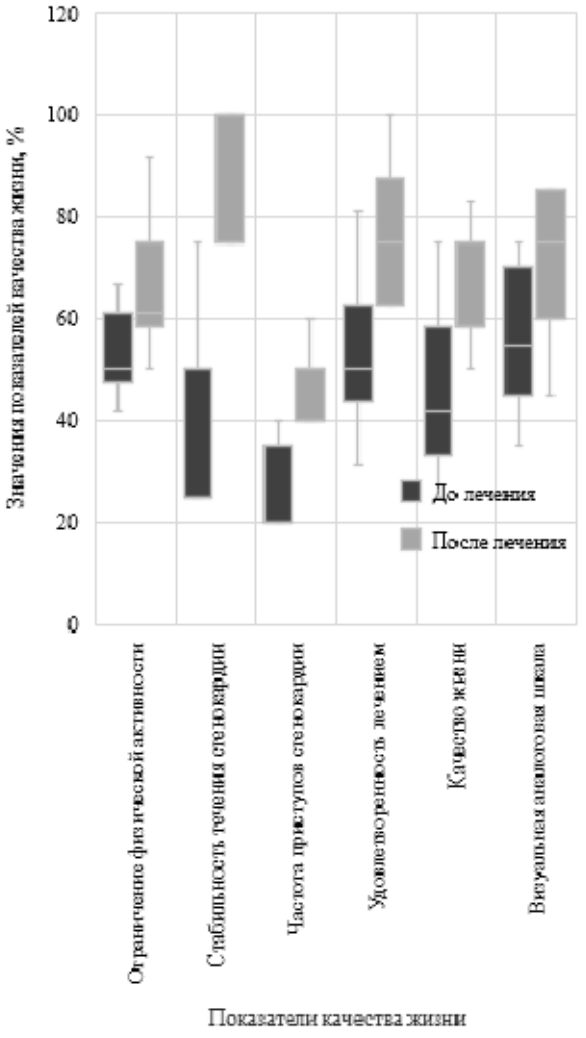


Рис. 4. Показатели качества жизни у больных III группы до и после лечения (n = 28): обозначения см. рис. 1

Таблица 2

Влияние терапевтических комплексов на качество жизни больных стабильной стенокардией (Me (Q_1–Q_3) $n_1 = 28$, $n_2 = 29$, $n_3 = 28$)

Показатель	I группа (контрольная)		II группа (ώ–ЗПНЖК)		III группа (ώ–ПНЖК+МТ)		$P_{1–2}$	$P_{2–3}$	$P_{1–3}$
	Me	Q_1–Q_3	Me	Q_1–Q_3	Me	Q_1–Q_3			
Шкала ограничения физической активности, %	56,9	43,13–64,0	55,5	50,0–66,8	61,0	58,3–75,0	0,92	0,11	0,006
Шкала стабильности течения стенокардии, %	75,0	75,0–75,0	75,0	75,0–100,0	100,0	100,0–100,0	0,39	0,03	0,0002
Шкала частоты приступов стенокардии, %	40,0	30,0–40,0	40,0	40,0–40,0	40,0	40,0–50,0	0,70	0,01	0,0002
Шкала удовлетворенности лечением, %	62,5	56,3–68,8	62,5	62,5–75,0	75,0	62,5–87,5	0,32	0,14	0,001
Шкала качества жизни, %	50,0	41,8–58,3	50,0	50,0–66,8	58,3	58,3–75,0	0,25	0,04	0,0001
Визуальная аналоговая шкала, абс.	60,0	50,0–70,0	60,0	55,0–75,0	75,0	60,0–85,0	0,62	0,15	0,004

При совместном использовании омега-3 полинасыщенных жирных кислот и магнитотерапии отмечалась достоверная межгрупповая разница с контролем по всем исследуемым показателям ($P_{1–3} = 0,006$ и ниже – табл. 2). Показатель качества жизни увеличился на 19,1%, в то время как в группе с использованием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот – на 8,6%, а в контрольной – на 7,2% ($P_{1–3} = 1,0 \cdot 10^{-4}$). При этом следует отметить, что влияние магнитотерапии на улучшение показателей было значительно большим, чем у омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, что подтверждается достоверной межгрупповой разницей по трем из

шести изучаемых показателей (стабильность течения стенокардии, частота приступов и качество жизни – $P_{2–3}$ = 0,03, 0,01 и 0,04 соответственно) и тенденцией, приближающейся к выраженной, у оставшихся трех ($P_{2–3}$ = 0,11, 0,14, 0,15, табл. 2).

Обсуждение

Общеизвестно, что ишемическая болезнь сердца является в настоящее время главной причиной смертности в Европе, несмотря на большие усилия, направленные на лечение данной патологии (Müller-Nordhorn et al., 2008). Основными современными стратегиями терапии хронических форм ИБС является снижение риска развития сердечно-сосудистых осложнений и улучшение качества жизни больных.

В данном исследовании при изучении качества жизни больных стабильной стенокардией по опроснику SAQ и ВАШ выявлено значительное снижение показателей по всем анализируемым шкалам, медианы которых едва превышали 55%. Это свидетельствует о выраженном негативном влиянии стабильной стенокардии напряжения на качество жизни больных, что согласуется с данными Sizova et al. (2016) и является прогностически неблагоприятным, поскольку ассоциировано с повышением риска смертности и риска возникновения острого коронарного синдрома (Spertus et al., 2002). Визуальная аналоговая шкала, на наш взгляд, является несколько упрощенным и менее объективным способом оценки качества жизни, хотя некоторые авторы оценивают ее как интегральный показатель, в частности, при использовании совместно с опросником SAQ (Martsevich et al., 2016). Анализ данных по ВАШ подтвердил низкую оценку своего состояния обследованными больными (55,0% в каждой из групп) и также совпадает с мнением других авторов (Tendera et al., 2016).

Современная стандартная медикаментозная терапия стабильной стенокардии способна, по некоторым данным, значительно уменьшить проявления болезни, однако это не всегда влечет за собой достаточное улучшение качества жизни (Marcevich et al., 2016; Tendera et al., 2016). Аналогичные результы получены в нашем исследовании. Представленное достоверное улучшение всех изучаемых показателей качества жизни у больных с использованием протокольной терапии являлось вполне ожидаемым, прежде всего, в связи с наличием в ее составе антиангинальных средств, таких как β-блокаторы и нитраты, способных значительно уменьшать частоту и ослаблять интенсивность ангинозных приступов. При этом значительного увеличения физической активности и удовлетворенности лечением не наблюдали, что обусловлено эмоциональной составляющей, которая, со слов большинства больных, сводится к осторожности и боязни увеличения своей физической активности из-за уменьшившихся, но все еще сохраняющихся приступов стенокардии. В связи с этим прирост по шкале качества жизни составил в данной группе лишь 7,2% и был единственным из всех изучаемых показателей, не достигшим достоверных изменений после терапии (P = 0,054).

Изучение качества жизни у больных, получавших на фоне протокольного медикаментозного комплекса омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, показало достоверные изменения после лечения по всем шкалам Сиэттлского опросника и визуальной аналоговой шкалы. Отмечалось некоторое несоответствие степени увеличения показателей физической активности и качества жизни при более выраженном уменьшении симптомов стенокардии, что может объясняться отсутствием психологической адаптации больного к возможности расширения своей физической нагрузки. Направленность изменений в данной группе была сходна с контролем, однако прирост показателей более выражен, включая и показатель качества жизни (рис. 2, 3), увеличившийся достоверно на 8,6% ($P = 9{,}2 \cdot 10^{-3}$; рис. 3), тогда как в контроле его прирост составил 7,2%, не достигнув уровня значимости (P = 0,054; рис. 2). Несмотря на это, достоверной разницы по показателям после лечения между группами не отмечено ($P_{1–2} > 0{,}05$), что свидетельствует об отсутствии значительного влияния омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на качество жизни больных стабильной стенокардией. Наряду с общеизвестными данными о гиполипидемическом, антигипертензивном, антиаритмическом свойствах омега-3 ПНЖК (Saravanan et al., 2010; Lizogub et al., 2010; De Caterina, 2011), существуют немногочисленные сообщения о наличии у них антиангинального действия, заключавшегося в уменьшении количества ишемических эпизодов, по данным холтеровского мониторирования (Mihin and Mal'tseva, 2013), а также способности улучшать физическую толерантность больных ишемической болезнью сердца согласно тесту 6-минутной ходьбы (Sin'kova et al., 2014). По нашим данным, достоверного уменьшения ангинозных приступов на фоне приема омега-3 полиненасыщенных кислот не отмечено, хотя наблюдалась общая положительная тенденция по показателям данной и других шкал (P > 0,05). Подобные результаты, возможно, обусловлены различиями в исходной характеристике больных, а также гораздо большим периодом приема препарата.

Магнитотерапия является одним из самых эффективных и безвредных физиотерапевтических факторов (Serdiuk, 2004; Zolotarova and Panigrahi, 2008), причем оптимальным воздействием на сердечно-сосудистую систему обладают, в первую очередь, переменное и синусоидальное магнитные поля (анальгезирующий, гипотензивный, антикоагулянтный и другие эффекты) (Sysoeva, 2005). Описанная выше методика позволяет их одновременное использование, причем с разной индуктивностью (14 и 20 мТл), что дает возможность оптимизации всех перечисленных эффектов и, соответственно, возможного улучшения качества жизни. Необходимо учитывать и другие известные свойства магнитотерапии: седативное действие, повышение синтеза эндорфинов, ослабление эмоционального напряжения, а также усиление под его воздействием эффектов медикаментозных средств (Ulashik, 2001; Sysoeva, 2005). Они также могут позитивно влиять на качество жизни не только при сердечно-сосудистых, но и при других заболеваниях. В нашем исследовании при совместном использовании омега-3 полинасыщенных жирных кислот и магнитотерапии эффект воздействия на все показатели качества жизни был максимальным, что подтверждается наибольшим достоверным приростом в данной группе после лечения (рис. 4). Подобное значительное увеличение исследуемых показателей свидетельствует о том, что большинство больных данной группы испытывали ангинозные приступы значительно реже, чем до лечения либо вообще не испытывали их за последние четыре недели. Помимо этого, больные ощущали значительно меньшие трудности в связи с необходимостью приема лекарственных препаратов и в меньшей степени задумывались о возможности возникновения у них инфаркта миокарда или внезапной смерти, что свидетельствует об уменьшении эмоциональной напряженности под воздействием данного медикаментозно-физиотерапевтического комплекса. Разница с контрольной группой по всем показателям достоверна ($P_{1–3}$ = 0,006 и ниже – табл. 2), а при анализе с группой ώ-3 достоверность отмечена по трем из шести показателей (стабильность течения стенокардии, частота приступов и качество жизни: $P_{2–3}$ = 0,03, 0,01 и 0,04 соответственно). На наш взгляд, это обусловлено большим влиянием магнитотерапии на ангинозные приступы на фоне приблизительно равнозначных с ώ-3 ПНЖК эффектов по снижению гипертензии и выраженности хронической сердечной недостаточности. Следует учитывать также седативное действие магнитотерапии и ее эффекты по снижению эмоционального напряжения (Sysoeva, 2005), что как раз является необходимым для больных с боязнью увеличить свою физическую активность, несмотря на уменьшившуюся частоту приступов. Таким образом, кроме дополнительного анальгетического эффекта, магнитотерапия способна положительно влиять на показатели физической активности и восприятия болезни, что в итоге улучшает качество жизни больных стенокардией напряжения.

Немаловажную роль играет потенцирующее действие магнитотерапии, способной усиливать эффекты медикаментозных средств (Ulashik, 2001), возможно, в том числе и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, что может служить предметом дальнейших исследований.

Выводы

Представленные данные свидетельствуют о значительном негативном влиянии стабильной стенокардии напряжения на качество жизни больных и оценку ими своего самочувствия. При использовании протокольного медикаментозного комплекса все показатели качества жизни улучшились достоверно, однако по шкалам ангинозных болей значительно, а по шкалам физической активности, оценки самочувствия и восприятия болезни – менее выраженно. При присоединении к терапии омега-3 полиненасыщенных жирных кислот отмечена слабая тенденция к улучшению показателей качества жизни, достоверно не отличающаяся от контроля. Применение комбинированной терапии с включением одновременно омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и магнитотерапии позволило значительно и достоверно улучшить качество жизни, причем не только по шкалам, отражающим болевой компонент, но также и по показателям, которые характеризуют психологический вклад в качество жизни (удовлетворенность лечением и качество жизни (восприятие болезни)). Значительное улучшение показателей качества жизни при использовании магнитотерапии на фоне отсутствия таких влияний при самостоятельном использовании омега-3 полиненасыщенных жирных кислот обусловлено большим антиангинальным влиянием магнитотерапии, ее седативным и снимающим эмоциональное напряжение действием, а также способностью усиливать эффекты медикаментозных средств.

References

De Caterina, R. (2011). N-3 fatty acids in cardiovascular diseases. The New England Journal of Medicine, 364(9), 2439–2450.

Dougherty, C. M., Dewhurst, T., Nichol, W. P., & Spertus, J. (1998). Comparison of three quality of life instruments in stable angina pectoris. Journal of Clinical Epidemiology, 51(7), 569–575.

Kovalenko, V. M., Lutai, M. Y., Syrenko, I. M., & Sychov, O. S. (2016). Sertsevo-sudynni zakhvoriuvannia. Klasyfikatsiia, standarty diagnostyky ta likuvannia [Cardiovascular diseases. Classification, standards of diagnosis and treatment]. Morion, Kyiv (in Ukrainian).

Lizohub, V. H., Zavalska, T. V., Horna, O. O., Pliskevych, D. A., & Savchenko, O. V. (2010). Metabolizm polinenasychenykh zhyrnykh kyslot ta yoho znachennia dlia orhanizmu liudyny [Metabolism of polyunsaturated fatty acids and its significance for the human body]. Likarska Sprava, 7–8, 21–28 (in Ukrainian).

Marcevich, S. Y., Kutishenko, N. P., & Deev, A. D. (2016). Izuchenie vlijanija nikorandila na kachestvo zhizni patsientov so stabil'noj stenokardiej v ramkah issledovanija "KVAZAR" [The assessment of Nicorandil effect on the quality of life in patients with stable angina in the "KVAZAR" study]. Racional'naja Farmakoterapija v Kardiologii, 12(6), 654–660 (in Russian).

Mihin, V. P., & Mal'ceva, L. S. (2013). Vlijanie omakora na variabel'nost' serdechnogo ritma i ishemicheskie izmenenija v miokarde u bol'nyh hronicheskoj ishemicheskoj bolezn'ju serdca v sochetanii s saharnym diabetom 2 tipa. [Influence of omacor on of heart rate variability and ischemic changes in the myocardium in patients with chronic ischemic heart disease in conjunction with diabetes mellitus type 2]. Arhiv Vnutrennej Mediciny, 9, 25–32 (in Russian).

Müller-Nordhorn, J., Binting, S., Roll, S., & Willich, S. N. (2008). An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. European Heart Journal, 29(10), 1316–1326.

Osipov, D. A., Rozhdestvenskaja, T. V., Krom, I. L., & Rebrov, A. P. (2011). Sootnoshenie prediktorov prognoza kachestva zhizni bol'nyh ishemicheskoj bolezn'ju serdca [Correlation of predictors of life quality prognosis of patients with coronary heart disease]. Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal, 7(2), 426–429 (in Russian).

Rector, T., & Cohn, J. (1992). Assessment of patient outcome with the Minnesota living with heart failure questionnaire: Reliability and validity during a randomized, double-mind, placebo-controlled trial of pimobendan. American Heart Journal, 124(4), 1017–1025.

Saravanan, P., Davidson, N. C., Schmidt, E. B., & Calder, P. C. (2010). Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. The Lancet, 376(9740), 540–550.

Serdiuk, V. V. (2004). Magnitoterapiya – proshloe, nystoiashchee, budushchee [Magnetotherapy – past, present, future]. Azymut – Ukraina, Kyiv (in Russian).

Sin'kova, M. N., Pepelyaeva, T. V., Isakov, L. K., Tarasov, N. I., & Teplyakov, A. T. (2014). Otdalennye effekty vlijanija omega-3 polinenasyshhennyh zhirnyh kislot na techenie ishemicheskoj bolezni serdca u bol'nyh, perenesshih infarkt miokarda s podjemom segmenta ST na fone mnogososudistogo stenozirujushhego ateroskleroza koronarnyh arterij [Long-term effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the course of ischemic heart disease in patients after ST-elevation myocardial infarction at the background of multiple-vessel lesion coronary atherosclerosis]. Kardiovaskulyarnaja Terapija i Profilaktika, 13(6), 32–37 (in Russian).

Sizova, Z. M., Zaharova, V. L., Kozlova, N. V., & Kuchkina, T. S. (2016). Vlijanie aktivatora kalievyh kanalov nikorandila na kachestvo zhizni bol'nyh ishemicheskoj bolezn'ju serdca so stabil'noj stenokardiej naprjazhenija [Influence of the potassium channels activator nicorandil to the quality of life in patients with ishemic heart disease and stable angina pectoris]. Kardiologija, 56(6), 26–31 (in Russian).

Soboleva, M. S., & Slobodenjuk, E. V. (2013). Ocenka vlijanija priverzhennosti k lecheniju, kachestva zhizni i zatrat pacientov na effektivnost' antigipertenzivnoj terapii [Estimating effects of medical treatment adherence, life quality and patients' expenditures for efficiency of antihypertensive therapy]. Tihookeanskij Medicinskij Zhurnal, 2, 9–13 (in Russian).

Spertus, J. A., Jones, P., McDonell, M., Fan, V., & Fihn, S. (2002). Health status predicts long-term outcome in outpatients with coronary disease. Circulation, 106(1), 43–49.

Spertus, J. A., Winder, J. A., Dewhurst, T. A., Deyo, R. A., Prodzinski, J., McDonnell, M., & Fihn, S. D. (1995). Development and evaluation of the Seattle Angina Questionnaire: A new functional status measure for coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology, 25(2), 333–341.

Sysoeva, I. V. (2005). Sovremennoe predstavlenie o biologicheskom dejstvii magnitnyh polej i ih primenenie v medicine [Modern understanding of the biological effect of magnetic fields and their application in medicine]. Medicinskie Novosti, 4, 21–28 (in Russian).

Tavazzi, L., Maggioni, A. P., & Marchioli, R. (2008). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet, 372(9645), 1223–1230.

Tendera, M., Chassany, O., Ferrari, R., Ford, I., Steg, P. G., Tardif, J. C., & Fox, K. (2016). Quality of life with ivabradine in patients with angina pectoris. Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes, 9, 31–38.

Ulashik, V. S. (2001). Sovremennye napravlenija razvitija magnitoterapii [Modern directions of the development of the magnetotherapy]. Vestnik Fizioterapii i Kurortologii, 7(3), 9–15 (in Russian).

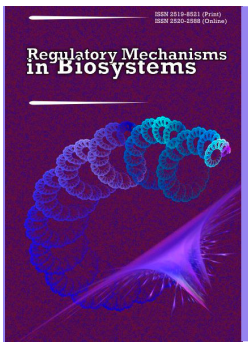
Ulashik, V. S., Pletnev, A. S., Vojchenko, N. V., & Pletnev, S. V. (2015). Magnitoterapija: Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie [Magnetotherapy: Theoretical basis and practical application]. Belarusskaja nauka, Minsk (in Russian).

Ware, J. E., & Sherbourne, C. D. (1992). The MOS 36-item short form health survey (SF-36): Conceptual framework and item selection. Medical Care, 30, 473–483.

Zholdasbekova, A. S., Kalmatayeva, Z. A., Nurbakyt, A. N., & Absatarova, K. S. (2016). Izuchenie kachestva zhizni pacientov ishemicheskoj bolezn'ju serdca, perenesshih operacii po revaskuliarizacii miokarda [The study of quality of life in patients with coronary artery disease after operations of myocardial revascularization]. Vestnik Kazahskogo Nacional'nogo Medicinskogo Universiteta, 1, 654–656 (in Russian).

Zolotarova, N. A., & Panigrahi, P. K. (2008). Sostojanie sistemy gemostaza u bol'nyh posle trombolizisa i kursa geparinoterapii i metody ego korrekcii s ispol'zovaniem magnitoterapii [The state of the hemostatic system in patients after thrombolysis and the course of heparin therapy and methods of its correction with the use of magnetotherapy]. Ukrainskyi Terapevtychnyi Zhurnal, 2, 37–41 (in Russian).

Zolotarova, N. A., & Petrosjan, A. P. (2004). Biologicheskie effekty razlichnyh vidov magnitnyh polej i ih ispol'zovanie v lechenii IBS i degenerativnyh zabolevanij sustavov [Biological effects of different types of magnetic fields and their use in the treatment of IHD and degenerative joint diseases]. Medicinskaja Reabilitacia, Kurortologija i Fizioterapija, 39, 41–43 (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 554–558
doi: 10.15421/021785

The thyroid status of a conditionally healthy adult population of Prydniprovia

I. Y. Arzhanov, M. R. Buniatov, G. A. Ushakova

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 24.10.2017
Received in revised form 12.11.2017
Accepted 17.11.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-096-999-12-88
E-mail:ivanarzhanov@i.ua

Arzhanov, I. Y., Buniatov, M. R., & Ushakova, G. A. (2017). The thyroid status of a conditionally healthy adult population of Prydniprovia. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 554–558. doi:10.15421/021785

Pathologies of the thyroid gland are one of the most common diseases in endocrinology today. Hormones of the thyroid gland carry out hormonal regulation of the cell cycle, the physiological and post-traumatic repair of cells. The hormones of the thyroid gland secrete and enhance the oxidative processes and control the heat production, which can affect the mental state and the ability of the body to adapt to adverse environmental factors. In the case of a lack or almost complete absence of thyroid hormones, normal development and function of any functional system in the body is not possible. In the context of an increase in the incidence of thyroid gland pathology in Ukraine , this article presents an analysis of the thyroid status of the conditionally healthy population of Prydniprovia, related to age and gender. For the study, 120 patients of both sexes aged between 20 to 70 were selected. All patients were divided into 3 age groups of 40 people. Each age group was divided into 2 subgroups – male and female, with 20 people in each subgroup. Patients who, in the past and during the experiment, had no cases of thyroid gland disease were selected for accurate and reliable results. The study of thyroid status of the population showed that most of the adult and healthy population of Prydniprovia was not severely affected. All indicators were included in the age and gender limits of the norm, which are established by the preanalytical requirements of the independent laboratory Invitro (Dnipro, Ukraine). In women aged 50–70 years, there is an increased risk of hypothyroidism, which is confirmed by low levels of free thyroxine and triiodothyronine in the blood against the background of increased thyroid stimulating hormone and thyroglobulin levels. In the adult, conditionally healthy population of the Dnipro region aged between 20–70 years, the following correlation relations were observed between thyroid stimulating and thyroid hormones: at a younger age for men, the relationship between TSH and fT4 was –0.97, for TSH and fT3 –0.96, women also had a negative interdependence between these hormones (–0.95 and -0.98 respectively). The age of the men who underwent the test did not change this dependence but in women after 50 years, the Pearson correlation coefficient decreased between the studied hormones TTG and fT4 and fT3 to –0.94 and –0.93, respectively. Indicators of total thyroxine and total triiodothyronine in the blood serum are not indicative for determining the risk of hypothyroidism.

Keywords: thyroid gland; thyroid-stimulating hormone; thyroxine; triiodothyronine; thyroglobulin; parathyroid hormone; calcitonin

Тиреоїдний статус умовно здорового дорослого населення Придніпров'я

І. Ю. Аржанов, М. Р. Бунятов, Г. О. Ушакова

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Патології щитоподібної залози нині одні з найрозповсюдженіших ендокринологічних захворювань. Завдяки гормонам щитоподібної залози відбувається гормональна регуляція клітинного циклу, їх фізіологічна та посттравматична репарація. Гормони щитоподібної залози забезпечують і посилюють окисні процеси, контролюють теплопродукцію, здатні впливати на психічний стан і здатність організму адаптуватись до несприятливих факторів довкілля. У разі нестачі або майже повної відсутності тиреоїдних гормонів, нормальний розвиток і працездатність будь-якої функціональної системи організму не можливі. У зв'язку з підвищенням рівня захворюваності щитоподібної залози в Україні проаналізовано тиреоїдний статус умовно здорового населення Придніпров'я залежно від віку та статі. У більшості дорослих до 50 років здорових людей Придніпров'я серйозних порушень тиреоїдного статусу не спостерігали. Всі показники входили до меж вікових і статевих норм, установлених преаналітичними вимогами незалежної лабораторії Інвітро в Україні, м. Дніпро. У жінок віком 50–70 років підвищений ризик розвитку гіпотиреозу, що підтверджується зниженим вмістом у крові вільного тироксину та трийодтироніну на тлі зростання концентрації тиреотропного гормону та тиреоглобуліну. Показники загального тироксину та загального трийодтироніну не показові для визначення ризику розвитку гіпотиреозу.

Ключові слова: щитоподібна залоза; тиреотропний гормон; тироксин; трийодтиронін; тиреоглобулін; паратгормон; кальцитонін

Вступ

Висока зацікавленість проблемою тиреоїдної патології останніми роками викликана її різкою поширеністю серед населення України. Одне з розповсюджених захворювань в ендокринології – захворювання саме щитоподібної залози, на них припадає 47,3% усіх ендокринних хвороб. Головні причини, що зумовлюють зростання частоти тиреоїдних захворювань, – погіршення загальної

екологічної обстановки, несприятливі фактори довкілля, що викликають різке зниження імунологічного захисту організму. Після Чорнобильської аварії з усіх органів ендокринної системи найсильніший радіаційний вплив припав саме на щитоподібну залозу через поглинання радіоізотопів йоду. Накопичення саме цих радіоізотопів йоду у щитоподібній залозі індукувало можливість розвитку патологічних процесів, таких як папілярна карцинома щитоподібної залози, не тільки у найближчі, а й у віддалені строки після опромінення, та зниження стійкості тиреоїдного статусу населення України (Selmansberger et al., 2015). Зі збільшенням кількості людей з онкологічною патологією щитоподібної залози в радіаційно забрудненій зоні спостерігається збільшення кількості пацієнтів з аутоімунними захворюваннями (Kimura et al., 2015).

За останні десять років кількість людей, яким діагностували гіпотиреоз, збільшилась на 38,9%. Зниження рівня тиреотропного гормону можна вважати наслідком розвитку інших захворювань, пов'язаних із щитоподібною залозою, такими як тиреотоксикоз, рак щитоподібної залози, вузловий зоб (Horodynska and Bobyriova, 2016).

Щитоподібна залоза – один із найбільших непарних органів ендокринної секреції. Вона складається із двох часток, рудиментарної пірамідальної частки та перешийка. У людей вага здорової щитоподібної залози становить 15–20 г, а тироїдний об'єм – до 25 мл у чоловіків та 18 мл у жінок. Щитоподібна залоза характеризується високим темпом кровопостачання, який може досягати 5 мл/г/хв. Зовні щитоподібна залоза вкрита сполучнотканинною капсулою, від неї, безпосередньо, в сам орган відходять перегородки, що ділять щитоподібну залозу на часточки. Строма часточок складається з пухкої волокнистої сполучної тканини. В ній міститься густа сітка капілярів синусоїдного типу. Щитоподібна залоза складається з фолікул або тиреоцитів – структурно-функціональних одиниць, заповнених колоїдом, основний компонент якого – тиреоглобулін. Головна функція тиреоглобуліну – синтез тиреоїдних гормонів та їх депонування. У структуру щитоподібної залози входять С-клітини, функція яких полягає у секреції кальцитоніну, який бере участь у регуляції кальцієвого обміну та виступає антагоністом паратгормону.

Завдяки тиреоїдним гормонам в організмі ссавців відбувається регуляція тканинного дихання та підтримання основних процесів обміну через стимуляцію рецепторів тиреоїдних гормонів, які, у свою чергу, змінюють експресію генів із необхідними метаболічними ефектами (Shin et al., 2014). На ембріональному етапі розвитку головна функція тиреоїдних гормонів – диференціація тканин (зокрема, нервової, опорно-рухової, серцево-судинної). Зміна рівня тиреоїдних гормонів, викликана дисфункцією щитоподібної залози, впливала на тиреоїдні рецептори, що викликало їх порушення у пухлинних клітинах, впливало на проліферацію клітин, диференціювання, виживання та інвазію різних новоутворень (Goemann et al., 2017).

У разі нестачі або майже повної відсутності тиреоїдних гормонів нормальний розвиток будь-якої функціональної системи в організмі не можливий (Tognini et al., 2014). Завдяки гормонам щитоподібної залози відбувається гормональна регуляція клітинного циклу, їх фізіологічна та посттравматична репарація. Завдяки регуляції експресії генів тиреоїдні гормони забезпечують реалізацію генотипу у фенотипі. Жодна спадкова інформація, одержана нащадками від предків, не зможе реалізуватись без тиреоїдних гормонів (Nilsson and Fagman, 2017). Гормони щитоподібної залози забезпечують і посилюють окисні процеси та контролюють теплопродукцію, здатні впливати на психічний стан і здатність організму адаптуватись до несприятливих факторів довкілля.

Тиреотропний гормон секретується в передній долі гіпофіза та стимулює в щитоподібній залозі синтез гормонів тироксину та трийодтироніну. За біохімічним походженням тиреотропний гормон – глікопротеїд, який складається з α і β субодиниць. Основні рецептори до тиреотропного гормону розташовані на поверхні епітеліальних клітин щитоподібної залози (Bernal and Morte, 2013). Механізм синтезу тиреотропного гормону полягає в позитивному та негативному зворотному зв'язку з тиреоїдними гормонами. За підвищення концентрації тироксину та трийодтироніну рівень тиреотропного гормону знижується. Синтез тироксину відбувається з амінокислоти тирозину, яка йодується, та двох молекул дийодтирозину, від яких відщеплюється аланін. Після ферментативного розщеплення тиреоглобуліну тироксин потрапляє у кров, де з'єднується з білками плазми, такими як транстиретин, альбумін, тироксинзв'язувальний глобулін. У лабораторній діагностиці такі форми тироксину називаються загальним тироксином. У сироватці крові циркулюють два види тироксину: загальний та вільний. Їх головна відмінність полягає в тому, що загальний тироксин зв'язується з транспортними білками, вільний тироксин – майже ні. Концентрація загального тироксину в сироватці крові більша, ніж концентрація вільного тироксину.

Ще один високоактивний йодумісний гормон щитоподібної залози – трийодтиронін. На рівні з тироксином він бере участь у процесах регуляції та обміну, які відбуваються в організмі. Синтезується трийодтиронін із молекули тиреоглобуліну під час її протеолізу. Порівняно з тироксином, трийодтиронін здатний набагато легше проникати в клітини-мішені. В нормі співвідношення тироксину до трийодтироніну складає 1 : 4. Біологічна дія трийодтироніну аналогічна дії тироксину. Як і тироксин, у сироватці крові циркулює загальний трийодтиронін, з'єднаний із білками плазми та вільний. Зниження концентрації трийодтироніну спостерігається у людей не лише із захворюваннями щитоподібної залози, а й із серцево-судинними захворюваннями. Найчастіше рівень трийодтироніну різко знижується саме після операцій на серці (Marwali et al., 2013).

Попередник тироксину та трийодтироніну – глікопротеїн тиреоглобулін. Він продукується лише у щитоподібній залозі. Щитоподібна залоза складається з фолікул, у середині яких міститься колоїд, що складається переважно з тиреоглобуліну. Під час ферментативного розщеплення тиреоглобуліну відбувається його розпад на тирозин і атоми йоду. Тиреоглобулін може виступати маркером новоутворення або аутоімунних захворювань (Zheng and Sheila, 2014).

Також до гормонів щитоподібної залози відносять кальцитонін, що секретується в парафолікулярних (С-клітинах) клітинах щитоподібної залози та бере участь у регуляції обміну кальцію в організмі. Його основна функція – зниження концентрації кальцію у крові. За високої концентрації кальцитонін може також виступати онкомаркером медулярного раку щитоподібної залози (Valenciaga et al., 2017). Антагоністом кальцитоніну виступає паратиреоїдний гормон, який підвищує концентрацію кальцію крові (відомий як паратгормон), секретується головними клітинами паращитовидної залози. Паратгормон стимулює резорбцію кісткової тканини, тим самим посилюючи надходження кальцію в кров, знижує ниркову екскрецію кальцію, а також активує синтез вітаміну D. Визначення паратгормону важливе у клінічній діагностиці, оскільки завдяки ньому можна спрогнозувати розвиток гіперкальціємії у пацієнтів після операції на щитоподібній залозі (Bähler et al., 2017).

У зв'язку з підвищенням захворюваності щитоподібної залози в Україні мета цієї статті – оцінити тиреоїдний статус умовно здорового населення Придніпров'я залежно від віку та статі.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення дослідження відібрано 120 пацієнтів віком 20–70 років чоловічої та жіночої статі. Усіх пацієнтів поділили на три вікові групи (по 40 чоловік). Кожна вікова група ділилась ще на дві підгрупи: чоловічу та жіночу (по 20 чоловік у кожній). Першу групу (молодого віку) склали пацієнти 20–30 років, другу (середнього віку) – 31–50, третю (похилого віку) – 51–70 років. Для отримання точних результатів, відбирали пацієнтів, які в минулому та під час проведення експерименту не мали випадків захворювань щитоподібної залози. Відбирання венозної

крові та отримання сироватки крові проводили у стандартних умовах клініко-діагностичної лабораторії Invitro (м. Дніпро). Усі зразки взяті з добровільної згоди пацієнтів.

Для визначення тиреоїдного статусу дорослого населення досліджували такі показники: тиреотропний гормон (ТТГ), вільний і загальний тироксин ($вT_4$ та $зT_4$), вільний і загальний трийодтиронін ($вT_3$ та $зT_3$), тиреоглобулін (ТГ), інтактний паратгормон (іПГ), кальцитонін (КЦ). Використовували сироватку пацієнтів. Усі дослідження проведено на авторизованому, високочутливому твердофазному хемілюмінесцентному імуноферментному аналізаторі Siemens Immulite 2000XPi (США). До складу тест-систем входили набори з твердими (скляні кульки, покриті моноклональними мишачими антитілами до ТТГ, $вT_4$, $вT_3$, T_3, T_4, іПГ, КЦ або антилігандом для ТГ) і рідкими кон'югатами з поліклональними антитілами до ТТГ, $вT_4$, $вT_3$, T_3, T_4, лужної фосфатази у буфері з консервантом або мічені лігандом моноклональні мишачі антитіла до іПГ, КЦ, ТГ і кон'югати лужної фосфатази з поліклональними антитілами до іПГ, КЦ та ТГ вівці (Siemens, Англія). Схема проведення дослідження для всіх показників стандартна, згідно з інструкцією виробника наборів.

Досліджені параметри наведені як середнє значення вибірки та стандартне відхилення (x ± SD). Показники норми враховували згідно з преаналітичними вимогами незалежної лабораторії Інвітро. Статистичну обробку результатів проведено у програмі Statwin, використовуючи однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). Вірогідним вважали відмінності за $P < 0,05$.

Результати

Найвищий рівень тиреотропного гормону реєстрували в чоловіків віком 20–30 років (2,74 ± 1,47 мОд./л), найнижчий – у чоловіків віком 31–50 років (2,56 ± 1,26 мОд./л, рис. 1). У жінок спостерігали іншу динаміку змін кількості тиреотропного гормону у крові протягом старіння: найнижчий рівень – у жінок віком 20–30 років (2,30 ± 1,27 мОд./л), найвищий – у 51–70-річних (5,31 ± 2,87 мОд./л) за референтного нормального рівня – 0,4–4,0 мОд./л.

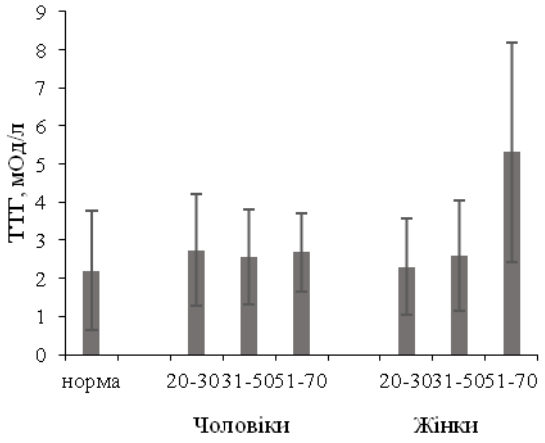


Рис. 1. Вміст тиреотропного гормону в крові чоловіків та жінок 20–70 років (x ± SD, n = 20)

Рівень вільного тироксину як у чоловіків, так і у жінок віком 20–50 років, які не мали будь-яких ускладнень щодо щитоподібної залози, коливався в межах референтної норми (13–19 пмоль/л), але після 50 років визначено статистично не значиму, але спрямовану тенденцію до зниження рівня цього гормону, особливо у жінок (до 11,7 ± 2,87 пмоль/л, рис. 2).

Показники загального тироксину, який відображає загальну концентрацію в крові вільного та зв'язаного з білками гормону умовно здорового населення Придніпров'я, вірогідно не змінювалися протягом дорослого життя як у чоловіків, так і жінок (80–110 нмоль/л, рис. 3).

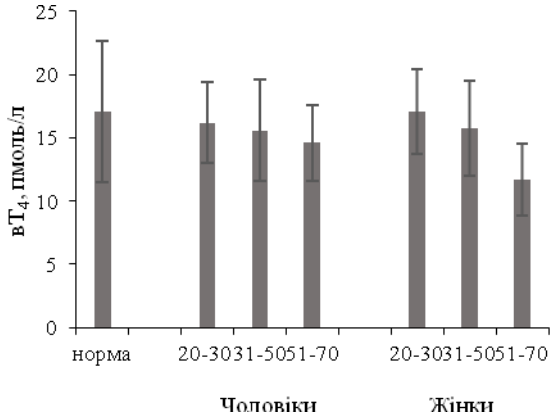


Рис. 2. Вміст вільного тироксину в крові чоловіків та жінок 20–70 років (x ± SD, n = 20)

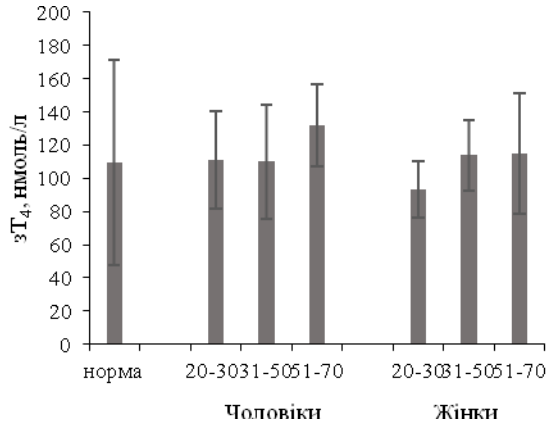


Рис. 3. Вміст загального тироксину в крові чоловіків та жінок 20–70 років (x ± SD, n = 20)

Концентрація вільного трийодтироніну в дорослої чоловічої частини населення зберігалась у межах референтної норми (4,2–5,1 пмоль/л, рис. 4). У жінок спостерігали дещо іншу ситуацію. У 20–50 років рівень трийодтироніну перебував у межах норми (4,8 ± 1,5 пмоль/л), а починаючи з 50 років знижувався (до 2,6 ± 1,2 пмоль/л).

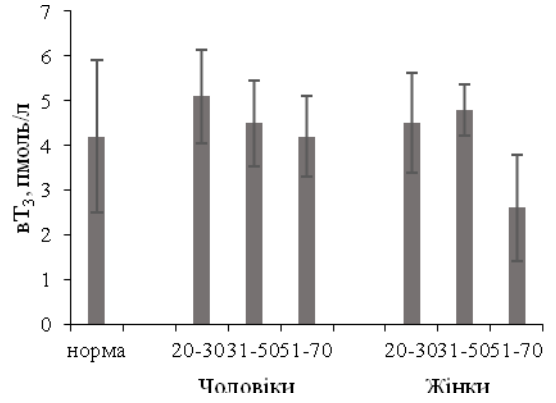


Рис. 4. Вміст вільного трийодтироніну в крові чоловіків та жінок 20–70 років(x ± SD, n = 20)

Концентрація загального трийодтироніну набагато нижча за концентрацію загального тироксину, однак вона – один з обов'язкових показників тиреоїдного статусу населення. Рівень загального трийодтироніну у дорослого населення Придніпров'я віком 20–70 років коливався від 1,9 до 2,2 нмоль/л в межах норми (рис. 5).

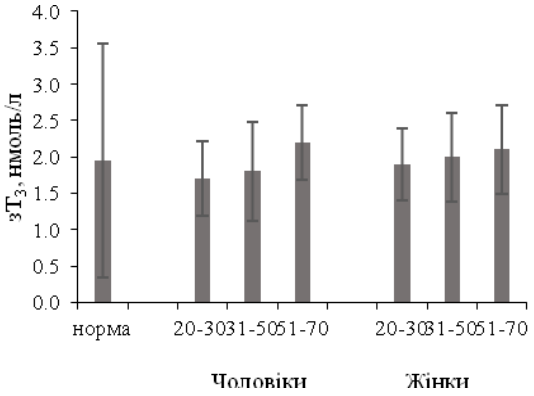


Рис. 5. Вміст загального трийодтироніну у крові чоловіків та жінок 20–70 років (x ± SD, n = 20)

Тироксин та трийодтиронін – кінцеві форми гормонів щитоподібної залози, які утворюються з тиреоглобуліну. Частіше аналіз ТГ застосовують для діагностики двох видів пухлин залози (папілярного та фолікулярного раку), особливо для контролю за успішністю лікування та раннього виявлення метастазів у лімфатичних вузлах та інших органах (легенях, кістках, головному мозку). В умовно здорової чоловічої частини населення концентрація тиреоглобудіну впродовж 20–70 років життя майже не змінюється (9,2–11,3 нг/мл, рис. 6). У жінок 50–70 років відмічено тенденцію до збільшення продукції тиреоглобуліну удвічі, але цей показник залишився в межах референтної норми.

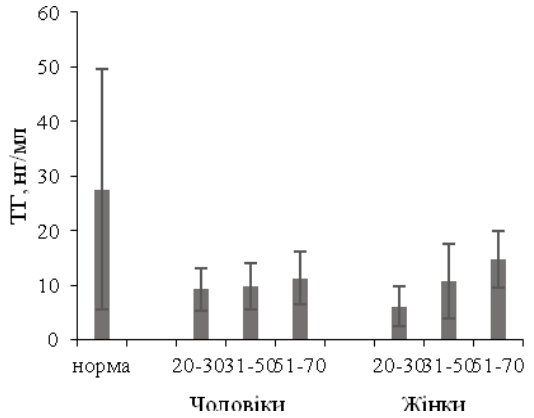


Рис. 6. Вміст тиреоглобуліну в крові чоловіків та жінок 20–70 років(x ± SD, n = 20)

Щитоподібна залоза продукує інтактний паратгормон, який регулює підвищення концентрації кальцію в плазмі крові. У ході дослідження виявлено незмінний рівень інтактного паратгормону в умовно здорового дорослого населення віком 20–70 років як у чоловіків, так і у жінок: в межах 3,2–5,0 пмоль/л (рис. 7).

Антагоніст інтактного паратгормону – кальцитонін; його основна функція – зниження рівня кальцію в плазмі крові. У чоловіків молодого віку зареєстровано низький рівень кальцитоніну – 2,0 ± 1,4 пг/мл ($P < 0,01$), який стабілізується після 30 років і суттєво не змінюється до 70 років (рис. 8).

Нормальна концентрація кальцитоніну в чоловіків будь-якого віку складала до 8,4 пг/мл. У жінок 20–70 років рівень кальцитоніну зберігався в межах референтної норми.

Обговорення

Отримані результати вказують на стабільний тиреоїдний статус в умовно здорового населення Придніпров'я 20–50 років. У чоловіків 20–70 років та жінок до 50 років рівень тиреотропного гормону, тиреоглобуліну, вільного тироксину та трийодтироніну залишався в межах норми. У жінок після 50 років спостерігали тенденцію до високого ризику розвитку гіпотиреозу, що, скоріше за все, пов'язано з віковими змінами загального гормонального статусу жінок (Cooper and Laurberg, 2013). У жінок після 50 років концентрація вільного тироксину та трийодтироніну мала тенденцію до зменшення на тлі збільшеної продукції тиреотропного гормону та тиреоглобуліну.

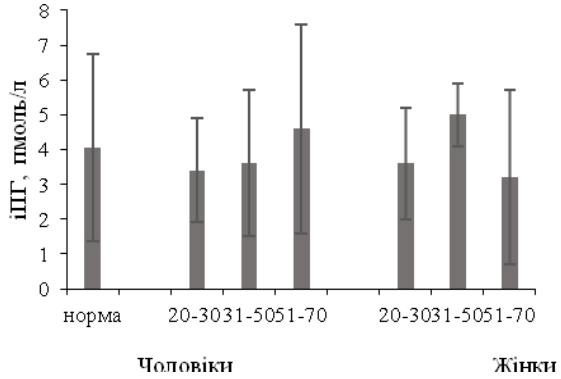


Рис. 7. Вміст інтактного паратгормону в крові чоловіків та жінок 20–70 років (x ± SD, n = 20)

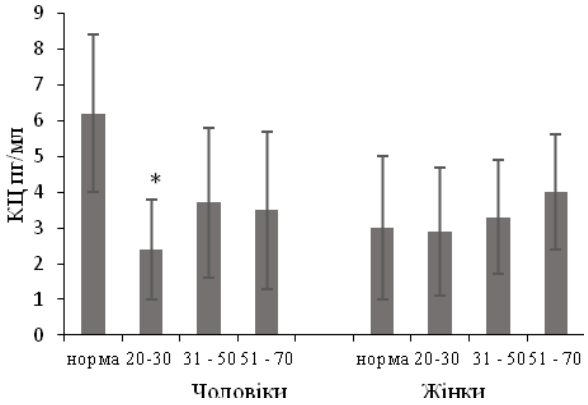


Рис. 8. Вміст кальцитоніну в крові чоловіків та жінок 20–70 років (x ± SD; n = 20; * – $P < 0,01$)

Синтез тереоїдних гормонів тироксину та трийодтироніну прямо залежить від тиреотропного гормону, який секретується гіпофізом. Такий зв'язок характеризується від'ємним кореляційним співвідношенням, оскільки тиреотропний гормон реагує на концентрацію тироксину та трийодтироніну в крові. Якщо в організмі низький рівень тиреоїдних гормонів, для підвищення їх концентрації стимулюється секреція тиреотропного гормону, і його концентрація в крові підвищується. У дорослого умовно здорового населення Придніпров'я 20–70 років спостерігали такі кореляційні зв'язки між тиреотропним та тиреоїдними гормонами: у молодому віці для чоловіків зв'язок між ТТГ та $вT_4$ становив –0,97 ($P < 0,001$), для ТТГ та в T_3 – 0,96 ($P < 0,001$). У жінок також установлено від'ємну взаємозалежність між цими гормонами: –0,95 ($P < 0,005$) та –0,98 ($P < 0,001$), відповідно. З віком у чоловіків, що проходили обстеження, ця залежність не змінювалася, але у жінок після 50 років зареєстровано зниження кореляційного коефіцієнта Пірсона між досліджуваними гормонами ТТГ та $вT_4$ і $вT_3$ до –0,94 ($P < 0,01$) та –0,93 ($P < 0,01$), відповідно.

Останні дослідження свідчать, що розвиток гіпотиреозу в літніх людей може нести негативні наслідки для організму: атеросклероз, гіперхолестеринемія та цереброваскулярні захворювання. Клінічний гіпотиреоз поширений більше ніж у 20% пацієнтів із цереброваскулярними захворюваннями, але не з нейропатологією типу хвороби Альцгеймера (Brenowitz et al., 2017). Розвиток захворювань щитоподібної залози тісно пов'я-

заний із захворюваннями метаболічного обміну. Традиційно гормони щитоподібної залози використовують для корекції функцій щитоподібної системи. Проте вони характеризуються багатьма побічними ефектами, такими як їх негативний вплив на серцево-судинну систему, а також здатність тиреоїдних гормонів підвищувати інсулінорезистентність і порушувати функцію, що виробляє інсулін підшлункової залози, тим самим загострюючи діабетичну патологію (Shpakov, 2017). Порушення функцій щитоподібної залози може викликати зміни ліпідного обміну. Розвиток гіпотиреозу може спричинити ожиріння (Poddar et al., 2017).

У дорослому мозку нервові стовбурові клітини, розташовані в субвентрикулярній зоні, розвиваються як у нейрональні, так і гліальні клітини. Гормони щитоподібної залози регулюють диференціацію дорослих нервових стовбурових клітин у бік нейронального фенотипу та відіграють важливу роль у метаболізмі мітохондрій. Тривалий гіпотиреоз здатен зменшити не тільки кількість нейробластів, а й їх мітохондріальну активність (Gothié et al., 2017), що, у свою чергу, може провокувати когнітивні порушення.

Тиреоглобулін – одна зі складових, необхідна для синтезу гормонів щитоподібної залози: тироксину та трийодтироніну. Папілярна карцинома щитоподібної залози становить близько 80% випадків захворювання на рак щитоподібної залози. Регулярне спостереження за сироватковим тиреоглобуліном і медичною візуалізацією – поточна практика для контролю прогресування захворювання пацієнтів (Lin et al., 2016). Тиреоглобулін використовують як надійний прогностичний післяопераційний маркер диференційованого раку щитоподібної залози (папілярний та фолікулярний патгістологічні типи) та хвороби Грейвса (Aoyama et al., 2017). Високий рівень тиреоглобуліну асоціюється з наявністю захворювання щитоподібної залози у популяціях, де екологічні фактори впливають на іонізуючу радіацію, і на людей, які живуть у регіонах з ендемічним слабким і середнім вмістом йоду у воді (Peters et al., 2017).

Гормони кальцитонін та інтактний паратгормон між собою також пов'язані. Кальцитонін відповідає в організмі за зниження рівня кальцію, а його біологічне значення в кальцієвому гомеостазі не дуже значне. Проте він може виступати онкомаркером медулярного раку щитоподібної залози, який розвивається у парафолікулярних клітинах і продукує кальцитонін (Verburg et al., 2013). На відміну від кальцитоніну, інтактний паратгормон підвищує рівень кальцію в організмі. Нормальна секреція інтактного паратгормону важлива для дітей і людей похилого віку, оскільки за його низької концентрації або повної відсутності можуть розвиватися різні захворювання пов'язані з опорно-руховою системою. Особливо небезпечне у літніх людей таке захворювання як остеопороз (Cho et al., 2017). У дорослого умовно здорового населення Придніпров'я рівень інтактного паратгормону коливався в межах норми, проте у чоловіків віком 20–70 років та у жінок 20–50 років рівень паратгормону з віком підвищувався, на відміну від жінок віком 51–70 років, для яких реєстрували зниження рівня паратгормону. Такі особливості, скоріше за все, пов'язані саме з віковими та гормональними особливостями. Незважаючи на те, що нормальний рівень кальцитоніну у чоловіків та жінок різний, значних відхилень від референтних показників не зареєстровано.

Висновки

У більшості дорослих 20–50 років у Придніпров'ї серйозних порушень тиреоїдного статусу не виявлено. Всі показники входили у вікові та статеві межі норми, встановлені преаналітичними вимогами незалежної лабораторії Інвітро (Дніпро, Україна). У жінок 50–70 років підвищений ризик розвитку гіпотиреозу, підтверджений зниженим вмістом у крові вільного тироксину та трийодтироніну на тлі зростання концентрації тиреотропного гормону та тиреоглобуліну. Показники загального тироксину та загального трийодтироніну не показові для визначення ризику розвитку гіпотиреозу.

References

Aoyama, M., Takizawa, H., Tsuboi, M., Nakagawa, Y., & Tangoku, A. (2017). A case of metastatic follicular thyroid carcinoma complicated with Graves' disease after total thyroidectomy. Endocrine Journal, 17, 1–5.

Bähler, S., Müller, W., Linder, T., Frotzler, A., Fischli, S., Aqtashi, B., Elmas, F., & Nader, A. (2017). Intraoperative parathyroid hormone measurement is the best predictor of postoperative symptomatic hypocalcemia. HNO, 65(9), 1–7.

Bernal, J., & Morte, B. (2013). Thyroid hormone receptor activity in the absence of ligand: Physiological and developmental implications. Biochimica et Biophysica Acta, 1830(7), 3893–3899.

Brenowitz, W. D., Han, F., Kukull, W. A., & Nelson, P. T. (2017). Treated hypothyroidism is associated with cerebrovascular disease but not Alzheimer's disease pathology in older adults. Neurobiology of Aging, 3(62), 64–71.

Cho, M., Han, S., Kim, H., Kim, K. S., & Hahn, S. K. (2017). Hyaluronate-parathyroid hormone peptide conjugate for transdermal treatment of osteoporosis. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 28(19), 1–21.

Cooper, D. S., & Laurberg, P. (2013). Hyperthyroidism in pregnancy. The Lancet Diabetes and Endocrinology, 1(3), 238–249.

Goemann, I. M., Romitti, M., Meyer, E. L. S., Wajner, S. M., & Maia, A. L. (2017). Role of thyroid hormones in the neoplastic process: An overview. Endocrine Related Cancer, 24(11), 367–385.

Gothié, J. D., Sébillot, A., Luongo, C., Legendre, M., Nguyen, V. C., LeBlay, K., Perret-Jeanneret, M., Remaud, S., & Demeneix, B. A. (2017). Adult neural stem cell fate is determined by thyroid hormone activation of mitochondrial metabolism. Molecular Metabolism, 6(11), 1551–1561.

Horodynska, O. Y., & Bobyriova, L. Y. (2016). Prohnostychna kharakterystyka poshyrenosti hipotyreozu v Poltavs′kiy oblasti ta v Ukrayini v tsilomu za umovy odnoho defitsytu. [Prognostic characteristics of hypothyroidism prevalence in the Poltava region and in Ukraine under conditions of iodine deficiency]. Mezdunarodnyj Endocrynologychesky Jurnal, 74, 44–49.

Kimura, Y., Hayashida, N., Takahashi, J., Rafalsky, R., Saiko, A., Gutevich, A., Chorniy, S., Kudo, T., & Takamura, N. (2016). Evaluation of thyroid antibodies and benign disease prevalence among young adults exposed to ^{131}I more than 25 years after the accident at the Chernobyl Nuclear Power Plant. PeerJ, 4, 1–12.

Lin, H. C., Liou, M. J., Hsu, H. L., Hsieh, J. C., Chen, Y. A., Tseng, C. P., & Lin, J. D. (2016). Combined analysis of circulating epithelial cells and serum thyroglobulin for distinguishing disease status of the patients with papillary thyroid carcinoma. Oncotarget, 7(13), 17242–17253.

Marwali, E. M., Boom, C. E., Sakidjan, I., Santoso, A., Fakhri, D., Kartini, A., Kekalih, A., Schwartz, S. M., & Haas, N. A. (2013). Oral triiodothyronine normalizes triiodothyronine levels after surgery for pediatric congenital heart disease. Pediatric Critical Care Medicine, 14(7), 701–708.

Nilsson, M., & Fagman, H. (2017). Development of the thyroid gland. Development, 144(12), 2123–2140.

Peters, K. O., Tronko, M., Hatch, M., Oliynyk, V., Terekhova, G., Pfeiffer, R. M., Shpak, V. M., McConnell, R. J., Drozdovitch, V., Little, M. P., Zablotska, L. B., Mabuchi, K., Brenner, A. V., & Cahoon, E. K. (2017). Factors associated with serum thyroglobulinin a Ukrainian cohort exposed to iodine-131 from the accident at the Chernobyl Nuclear Plant. Environmental Research. 156, 801–809.

Poddar, M., Chetty, Y., & Chetty, V. T. (2017). How does obesity affect the endocrine system? A narrative review. Clinical Obesity, 7(3), 136–144.

Selmansberger, M., Braselmann, H., Hess, J., Bogdanova, T., Abend, M., Tronko, M., Brenner, A., Zitzelsberger, H., & Unger, K. (2015). Genomic copy number analysis of Chernobyl papillary thyroid carcinoma in the Ukrainian – American Cohort. Carcinogenesis, 36(11), 1381–1387.

Shin, J. A., Mo, E., Kim, E. S., Moon, S. D., & Han, F. H. (2014). Association between lower normal free thyroxine concentrations and obesity phenotype in healthy euthyroid subjects. International Journal of Endocrinology, 104318, 1–8.

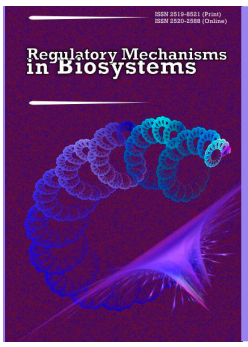
Shpakov, A. O. (2017). Farmakologicheskiye podkhody dlya korrektsii disfunktsiy shchitovidnoy zhelezy v usloviyakh sakharnogo diabeta [Pharmacological approaches for correction of thyroid dysfunctionsin diabet esmellitus]. Biomeditsinskaia Khimiia, 63(3), 219–231 (in Russian).

Tognini, S., Pasqualetti, G., Calsolaro, V., Polini, A., & Monzani, F. (2014). Cognitive function and quality of life in mild thyroid hormone deficiency. Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery, 8(2), 124–134.

Valenciaga, A., Grubbs., E. G., Porter, K., Wakely, P. E. Jr., Williams, M. D., Cote, G. J., Vasko, V. V., Saji, M., & Ringel, M. D. (2017). Reduced retinoblastoma protein expression is associated with decreased patient survival in medullary thyroid cancer. Thyroid, 27.

Verburg, F. A., Reiners, C., Grelle, I., Barth, H., Fassnacht, M., & Luster, M. (2013). Calcium stimulate dcalcitonin measurement: A procedural proposal. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 121(5), 318–320.

Zheng, F. M., & Sheila, A. S. (2014). Thyroglobulin as a biomarker of iodine deficiency. Thyroid, 24(8), 1195–1209.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 559–563
doi: 10.15421/021786

Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine

O. M. Berhilevych*, V. V. Kasianchuk*, M. D. Kukhtyn**,
I. M. Lotskin***, T. O. Garkavenko****, P. A. Shubin*

**Sumy State University, Sumy, Ukraine*
***Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine*
****Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine*
*****State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine*

Article info

Received 28.09.2017
Received in revised form 07.11.2017
Accepted 12.11.2017

Sumy State University, Sanatorna st., 31, Sumy, 40018, Ukraine. Tel.: +38-067-903-89-96 E-mail: o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Rus'ka st., 56, Ternopil, 46001, Ukraine.

Sumy National Agrarian University, Gerasym Kondrat'ev st., 160, Sumy, 40000, Ukraine.

State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Donetska st., 30, Kyiv, 03151, Ukraine.

Berhilevych, O. M., Kasianchuk, V. V., Kukhtyn, M. D., Lotskin, I. M., Garkavenko, T. O., & Shubin, P. A. (2017). Characteristics of antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus isolated from dairy farms in Ukraine. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 559–563. doi:10.15421/021786

Staphylococcus aureus is one of the most important microorganism in the process of raw milk production and has significance for people's health as it causes dangerous microbial contamination of dairy production. Furthermore, raw milk and the environment of livestock farms may be potential vehicles for distribution of antibiotic-resistant strains of *S. aureus*. The aim of the present study was to establish antibiotic sensitivity profiles of *S. aureus* depending on its origin from dairy farms, with a special focus on methicillin-resistant isolates. A total of 165 samples were collected for investigation in the period 2014–2016 from 5 dairy farms in Ukraine. All samples were analyzed for the presence of *S. aureus* using the Baird Parker Agar with Egg Yolk Tellurite Emulsion. Typical staphylococcal colonies were examined morphologically and for presence of coagulase and hemolysin activities. From these, positive samples for *S. aureus* were 62 (37.6%): 4 (6.5%) raw milk, 17 (77.4%) swabs of udder skin, 18 (29.0%) milk from cows with subclinical mastitis and 21 (33.9%) environmental samples. The standard disk diffusion method was used to determine sensitivity of *S. aureus* isolates to 10 antibiotics. The antimicrobial sensitivity profiles of *S. aureus* isolates showed differences between them, which depends on the origin of the isolates. Our results demonstrated that most of *S. aureus* isolates were resistant to penicillin, oxacillin and vancomycin. Of the 62 *S.aureus* isolates, 20 (32.3%) and 5 (8.1%) were found to be multiresistant to 3 different antibiotics, 6 (9.8%) isolates to 4 antibiotics, 12 (19.4%) and 3 (4.8%) to 5 antibiotics (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, L^{10}, TE^{30} and P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, CIP^{10}, TE^{30} respectively). All isolates resistant to penicillin and oxacillin were typed by mec A gene in PCR with two primers (MecA147-F and MecA147-R). The results show that 66.7% of these isolates yielded a mecA product. The information obtained from this study is useful for understanding the prevalence of *S. aureus* and its antibiotic sensitivity in dairy farms and can be useful for local and national monitoring or for designing specific control programs of methicillin- and multiresistance isolates present in the food chain of milk production.

Keywords: raw milk; objects of dairy farms; antibiotic sensitivity profiles; MRSA; mecA gene

Introduction

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen of human or animal skin and mucosal surfaces. It is well known that this microorganism can cause a wide range of infections such as skin infection (abscesses, carbuncle, furuncle and impetigo), pneumonia, osteomyelitis, endocarditis, sepsis and toxic shock syndrome. Also, it is common knowledge that *S. aureus* can be an agente responsible for food poisoning in people with severe vomiting and diarrhea. Most often poisoning is caused by the enterotoxins of *S. aureus* that are accumulated in milk or dairy products as result of multiplication of this type of microorganism (Bhunia, 2008; Wang et al., 2014; Brennan et al., 2016).

Therefore *S. aureus* has become an important problem in raw milk production and the dairy industry all over the world (Li et al., 2009; Ateba et al., 2010; Szweda et al., 2014; Carfora et al., 2015). There are many ways in which staphylococci enter raw milk and dairy products during their production. First of all, *S. aureus* can live on the surface of the skin of cow udders or even in the teat canals and, under certain conditions, causes subclinical and clinical mastitis in dairy cows. In this case, infected mammary glands are the main reservoir of contamination of raw cows' milk, dairy equipment and the dairy farm environment by these microorganisms (Febler et al., 2010; Basanisi et al., 2017; Hamid et al., 2017). Secondly, *S. aureus* can survive and persist in these objects for a long time and contaminate raw milk again. Few researchers have published information about biofilm formation by *S. aureus* on dairy equipment, from which bacteria penetrate raw milk, reducing the time of its shelf life and also cause poisoning of consumers (Kirmusaoglu, 2017; Kukhtyn et al., 2017).

But, the big problem of *S. aureus* in milk production is aggravated by the fact that the microorganism can quickly adapt to environmental conditions including antibiotics, which are used in livestock for treatment or as additives for animal feed. The long-term use of antibiotics on dairy farms has increased *S. aureus* resistance to antibiotics and particular to β-lactams (MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*) (Keefe, 2012; Al-Ashmawy et al., 2016; Doulgeraki et al., 2017). The methicillin resistance characteristic in *S. aureus* is due to the presence of altered

penicillin binding protein (PBP2a) in the cell wall that has a reduced binding affinity to β-lactam antibiotics. PBP2a is encoded by mecA gene that is located in the large chromosomal cassette called staphylococcal chromosome cassette mec element (SCCmec) (Zhang and McClure, 2005; Ganai et al., 2016; Rahim et al., 2017).

Epidemiologically MRSA which were isolated from livestock animals, from workers in animal farms or the food production chain equipment and from the products of animal origin indicate as LA-MRSA (livestock-associated MRSA). In recent years, many studies have been published on the isolation and distribution of antibiotic resistance among *S. aureus* isolates from different sources of dairy farms depending on the geographical localization where each investigation was conducted. According to this data, wide variation in MRSA prevalence has been observed (Pu et al., 2014; Mehli et al., 2017; Sergelidis and Angelidis, 2017).

Moreover, MRSA has the ability to resist different antibiotics and become a multidrug-resistant microorganism (Thaker et al., 2013; Ateba et al., 2016). Thus, this pathogen has become a major concern in the livestock industry as well as a public health hazard (Jihasz-Kaszanytzky et al., 2007; Sergelidis and Angelidis, 2017).

However, there has been little discussion in the literature about antibiotic sensitivity of *S. aureus* isolated from raw milk and dairy farms environments in Ukraine. Against this background, the present paper aims to identify the prevalence of *S. aureus* on dairy farm facilities and milk samples from raw cows, to establish their antimicrobial sensitivity profiles with a special focus on methicillin-resistant isolates. The following tasks were pursued in this study: (i) isolation of *S. aureus* from samples (ii) study of their antimicrobial sensitivity depending on their origin (iii) typing methicillin-resistant isolates by mec A gene in PCR.

Materials and methods

Samples collection. A total of 165 samples: 32 samples of raw milk, 38 swabs of udder skin, 38 samples of milk from cows with subclinical mastitis and 57 environmental samples (10 swabs of milking machines, 13 swabs of milk tanks, 10 samples of animal feed, 24 swabs from floors of farm buildings) were collected for investigation in the period from 2014 till 2016 from 5 dairy farms in Sumy Region, Ukraine. The herd structure was characterized by medium-holder state-owned dairy farms with lactating cows from 1,500 to 1,000 per herd. All farms had similar breeding and milking systems. The cows were milked twice a day using milking machine.

The raw milk samples to the amount of 250 ml were taken in sterile bottles directly from milk tanks. The milk from cows with subclinical mastitis was collected after indicating it by using the Rapid California Mastitis Test (CMT, DeLaval). Swabs from the surface of udder skin of cows and swabs from milking machines, milk tanks and from floors were taken using cotton-tipped swabs. All samples were transported to the laboratory in containers with ice and then were immediately analyzed within 24 hours.

Methods of isolation and identification *S. aureus* from samples. For detection of staphylococci, all samples were inoculated onto Baird-Parker Agar with Egg Yolk Tellurite Emulsion (Himedia, India) and cultivated at 35–37 ºC for 24–48 h aerobically. Typical staphylococcal colonies (black, convex, shiny colonies surrounded by clear zones) were used for microscopic examination, and the coagulase test with rabbit plasma and for production of hemolysin on Blood Agar to distinguish *S. aureus* from other staphylococci. On microscopic examination, all the *S. aureus* isolates were found to be Gram positive, non-spore forming, nonmotile cocci, giving a clustered bunch of grape (Bhunia, 2008).

Antimicrobial susceptibility testing. Ten antimicrobial agents (Oxoid, UK): penicillin (10 IU/disk), oxacillin (1 μg/disk), gentamicin (10 μg/disk), streptomycin (10 μg/disk), vancomycin (5 μg/disk), enrofloxacin (10 μg/disk), ciprofloxacin (10 μg/disk), lincomycin (10 μg), erythromycin (15 mkg/disk), tetracycline (30 μg/disk) were tested in this study. Antibiotic sensitivity of *S. aureus* isolates was tested by the standard disk diffusion method on Mueller – Hinton Agar (Oxoid, UK) according to the guide. Based on the inhibition zone size, results were recorded as "Susceptible," "Intermediate," or "Resistant" according to the interpretive criteria specified in CLSI (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 2012).

mec A PCR typing. The mecA PCR typing was carried out with two primers according to technique described by Zhang and McClure (2005). MecA147-F (GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT) and MecA147-R (ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T) were used for it. In brief, DNA isolation of *S. aureus* was performed by the following steps: a colony of pure culture was suspended in a test tube with 0.5 cm^3 of sterile deionized water, then was heated for 10 minutes at 99 °C, after centrifugation at 30,000 g for 1 min, 2 μl of the supernatant was used as template in a 25 μl PCR. Polymerase chain reaction was performed in termocycles "Tertsyk" (DNA technology, Russia) and "T1" (Biometra, Germany). Thermal cycling parameters were as follows: 95 °C for 4 min (1 cycle), followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; and a terminal extension step of 72 °C for 7 min.

Results

Isolation of *S. aureus* from samples. A total of 62 (37.6%) *S. aureus* isolates from 165 investigated samples were detected. As can be seen in Table 1, the highest percentage of samples, from which *S. aureus* was isolated, were from farm 4 (58.1% positive samples) and from farm 2 (51.5% positive samples). And conversely, the smallest number of positive samples was determined from farms 3 and 5 (21.6% and 29.0% respectively). The results also show that *S. aureus* was isolated from 2.4% (4/165) samples of raw milk, from 10.3% (17/165) of samples of swabs from the surface of udder skin and from 10.9% (18/165) of samples of milk from cows with subclinical mastitis. A total of 57 environmental samples were examined and 21 were positive (12.7% from all investigated samples).

Antibiotic susceptibility testing of *S. aureus* isolates. Antibiotic susceptibility testing of 62 *S. aureus* isolates from 5 farms was done by the disk diffusion method on Mueller – Hinton Agar using disks of 10 antibiotics. The results of the testing of all *S. aureus* isolates are shown in Table 2. It has been found that the level of antimicrobial sensitivity of the investigated *S. aureus* isolates was different in each farm. But, interestingly, that a significaly higher number of resistant *S. aureus* isolates were detected from farm 2. Twelve *S. aureus* isolates from 17 investigated (82.4%) were resistant to 5 (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, L^{10}, TE^{30}) of 10 tested antibiotics. Interestingly, that the same situation was found with isolates from farm 4, but relating to resistance to other antibiotics (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, CIP^{10}, TE^{30}). And conversely, a low number of samples with resistant *S. aureus* were found from farms 1 and 3. Isolates showed resistance to 2–3 antibiotics.

Table 1
Results of *S. aureus* isolates detection from samples (n = 165)

Samples	Farm 1			Farm 2			Farm 3			Farm 4			Farm 5		
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%
Raw milk	5	0	0.0	7	2	28.6	5	0	0.0	8	2	25.0	7	0	0.0
Swabs of udder skin	8	3	37.5	8	4	37.5	10	2	20.0	5	4	80.0	7	4	57.1
Milk from cows with subclinical mastitis	8	3	37.5	8	5	62.5	10	3	30.0	7	5	71.4	5	2	40.0
Environmental samples	12	4	33.3	10	6	60.0	12	3	25.0	11	5	45.6	12	3	25.0
Total	33	10	30.3	33	17	51.5	37	8	21.6	31	18	58.1	31	9	29.0

Note: N – number of investigated samples, n – number of positive samples, % – percentages of positive samples.

Table 2
Antibiotic sensitivity of *S. aureus* isolates from dairy farms (n = 62)

Antibiotics	No. (%) of *S. aureus* isolates from														
	Farm 1 (n = 10)			Farm 2 (n = 17)			Farm 3 (n = 8)			Farm 4 (n = 18)			Farm 5 (n = 9)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
P^{10}	0	2 (20.0)	8 (80.0)	0	0	17 (100.0)	0	0	8 (100.0)	2 (11.2)	8 (44.4)	8 (44.4)	0	0	9 (100.0)
OX^{1}	3 (30.0)	1 (10.0)	6 (60.0)	0	5 (29.4)	12 (70.6)	0	2 (25.0)	6 (75.0)	12 (66.6)	3 (16.7)	3 (16.7)	3 (33.3)	0	6 (66.7)
GEN^{10}	10 (100.0)	0	0	12 (70.6)	3 (17.6)	2 (11.8)	8 (100.0)	0	0	18 (100.0)	0	0	9 (100.0)	0	0
S^{10}	7 (70.0)	2 (20.0)	0	11 (64.8)	3 (17.6)	3 (17.6)	8 (100.0)	0	0	15 (83.3)	3 (16.7)	0	6 (66.7)	3 (33.3)	0
VA^{5}	4 (40.0)	1 (10.0)	5 (50.0)	2 (11.8)	3 (17.6)	12 (70.6)	5 (62.5)	3 (37.5)	0	15 (83.3)	0	3 (16.7)	9 (100.0)	0	0
EX^{10}	8 (80.0)	2 (20.0)	0	13 (76.6)	2 (11.8)	2 (11.8)	8 (100.0)	0	0	18 (100.0)	0	0	9 (100.0)	0	0
CIP^{10}	9 (90.0)	1 (10.0)	0	12 (70.6)	3 (17.6)	2 (11.8)	9 (87.5)	1 (12.5)	0	12 (66.6)	3 (16.7)	3 (16.7)	6 (66.7)	3 (33.3)	0
L^{10}	8 (80.0)	2 (20.0)	0	3 (17.6)	2 (11.8)	12 (70.6)	5 (62.5)	3 (37.5)	0	15 (83.3)	3 (16.7)	0	5 (55.6)	0	4 (44.4)
E^{15}	10 (100.0)	0	0	5 (29.6)	12 (70.6)	0	5 (62.5)	3 (37.5)	0	14 (77.8)	4 (22.2)	0	7 (77.8)		2 (22.2)
TE^{30}	6 (60.0)	4 (40.0)	0	2 (11.8)	3 (17.6)	12 (70.6)	5 (62.5)	3 (37.5)	0	10 (55.6)	2 (11.1)	6 (33.3)	9 (100.0)	0	0

Note: P^{10} – penicillin (10 IU/disk), OX^{1} – oxacillin (1 μg/disk), GEN^{10} – gentamicin (10 μg/disk), S^{10} – streptomycin (10 μg/disk), VA^{5} – vancomycin (5 μg/disk), EX^{10} – enrofloxacin (10 μg/disk), CIP^{10} – ciprofloxacin (10 μg/disk), L^{10} – lincomycin (10 μg), E^{15} – erythromycin (15 mkg/disk), TE^{30} – tetracycline (30 μg/disk); interpretive criteria for antimicrobial sensitivity of *S. aureus* isolates: S – susceptible, I – intermediate, R – resistant.

The highest percentage of resistance among investigated isolates was observed in the case of β-lactam antibiotics: penicillin (n = 50, 80.6%) and oxacillin (n = 33, 53.2%). Despite this, 20 isolates (32.3%) that were resistant to penicillin and oxacillin were also resistant to vancomycin. It has been found that, the high resistance was also observed in the case of lincomycin (n = 16, 25.8%) and tetracycline (n = 18, 29.0%). The rates of resistance to ciprofloxacin and streptomycin were 9.9% (6/62) and 4.8% (3/62), respectively. Gentamicin, enrofloxacin and erythromycin were active against most of tested isolates.

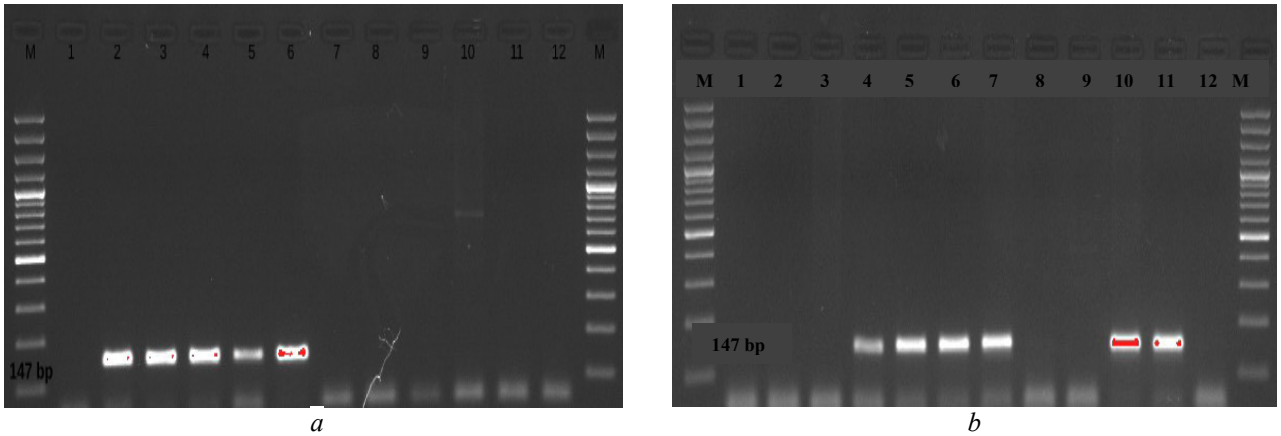
Antimicrobial resistance varied among *S. aureus* isolates, isolated from the different sources. The antimicrobial resistance of *S. aureus* isolates from swabs of udder skin from cows and samples of milk from cows with subclinical mastitis were higher in comparison to other samples. A significant difference in antimicrobial resistance was observed between the abovementioned isolates and isolates obtained from environmental samples.

Table 3 demonstrates antibiotic resistance profiles of isolates. Of the 62 *S. aureus* isolates, 20 (32.3%) and 5 (8.1%) were found as multiresistant to 3 antibiotics. Also, the analysis indicates that 6 (9.8%) isolates were resistant to 4 antibiotics. As mentioned above, 12 *S. aureus* isolates were resistant to 5 antibiotics (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, L^{10}, TE^{30}) and the 3 isolates were resistant to another 5 antibiotics (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, CIP^{10}, TE^{30}).

Table 3
The antibiotic resistance profiles of *S. aureus* isolates (n = 62)

Combination of antibiotic	Number of isolates	Percentage of isolates, %
P^{10},OX^{1}	33	53.2
P^{10},OX^{1}, VA^{5}	20	32.3
P^{10},OX^{1}, L^{10}	5	8.1
P^{10},OX^{1}, TE^{30}	6	9.8
P^{10},OX^{1}, VA^{5}, TE^{30}	6	9.8
P^{10},OX^{1}, L^{10}, TE^{30}	7	11.3
P^{10},OX^{1}, VA^{5}, L^{10}, TE^{30}	12	19.4
P^{10},OX^{1}, VA^{5}, CIP^{10}, TE^{30}	3	4.8

PCR typing. Initially, 15 isolates (3 from raw milk, 3 from swabs of udder skin and 9 from environmental samples) were identified as suspected isolates with typical cultural and antibiotic resistance (to β-lactams) properties. Conclusive statement concerning methicillin-resistant isolates was performed by detection of mecA gene in isolates by PCR method (Fig. 1).



a *b*

Fig. 1. PCR amplification of the mecA gene in selected *S. aureus* isolates: *a*: M – 100 bp molecular weight marker, 1 – negative control, 2 – positive control, 3–6 – amplified product of 147 bp of mecA gene, 7–12 – no amplified products of mecA gene; *b*: M – 100 bp molecular weight marker, 4–7, 10, 11 – amplified product of 147 bp of mecA gene, 1–3, 8, 9, 12 – no amplified products of mecA gene

The results show that 10 (66.7%) from 15 isolates of *S. aureus* yielded a mecA product.

Discussion

In the last few decades the number of publications about antibiotic resistance of microorganisms has increased and it is one of the most serious problem for human and animal health in the world (Normanno et al., 2007; Li et al., 2009; Gopal and Divya, 2017). In this paper we study antimicrobial sensitivity profiles of *Staphylococcus aureus* from 5 dairy farms in Ukraine with a special focus on methicillin-resistant isolates. Despite the fact that similar studies have been conducted by other authors in different regions of the world (İkiz et al., 2013; Szweda et al., 2014; Abebe et al., 2016), this is the first study in Ukraine concerning antimicrobial sensitivity profiles of *S. aureus* isolates from dairy farms, genetic typing of methicillin-resistant isolates by mec A gene in PCR and identifying of multiresistance.

We started our investigation with isolation of *S. aureus* from 165 collected samples. *S. aureus* isolates were detected in 37.6% of these. But we indicated 2 farms with the highest percentage (58.1% and

51.5%) of samples from which *S. aureus* was isolated and 1 farm with the smallest number of positive samples (21.6%). Our results also show that the higher prevalence of *S. aureus* was found from environmental samples (12.7%) and the lowest in raw milk (2.4%). Other studies report different rates of raw milk contamination with *S. aureus*: 35.0% in Egypt (Al-Ashmawy et al., 2016), 17.9–35.4% in South Africa (Ateba et al., 2010), 12.9% in South Italy (Basanisi et al., 2017). But other potential sources of contamination of raw milk with *S. aureus* also can be the surface of udder skin (10.3% positive samples) and milk from cows with subclinical mastitis (10.9% positive samples). These results can be found in other studies (İkiz et al., 2013; Bardiau et al., 2013; Pu et al., 2014; Szweda et al., 2014).

But, the main task of this study was to characterize of antibiotic sensitivity of *S. aureus* isolates. In this study, 10 antibiotics for testing were selected based on 3 main factors: (i) state recommendation of use in veterinary practice, (ii) after establishing their real use on each farm and (iii) use in medicine important for humans (penicillin, oxacillin, vancomycin). The results show a resistance of *S. aureus* isolates to a variety of antibiotics (vancomycin, tetracycline, lincomycin), and most for β-lactams (penicillin and oxacillin). Similar to studies of other authors from different regions of the world, the highest rate of resistance was detected for β-lactam antibiotics. The resistance to other tested agents was less common, which is also in agreement with the general trend observed worldwide (Li et al., 2009; Abebe et al., 2016; Kirmusaoglu, 2017).

In the last few years, there has been a growing interest in multiresistance (resistant to other antibiotics as well as β-lactams) of *S. aureus* (Brennan et al., 2016; Ganai et al., 2016; Gopal et al., 2017). It has been found that multiresistance of tested *S. aureus* isolates was to between 3 to 5 antimicrobial agents. Twenty isolates (32.3%) that were resistant to penicillin and oxacillin were also resistant to vancomycin, twelve isolates (19.4%) were resistant to 5 antibiotics (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, L^{10}, TE^{30}) and 3 isolates (4.8%) were resistant to another 5 antibiotics (P^{10}, OX^{1}, VA^{5}, CIP^{10}, TE^{30}). We associate these results with the level of use of antimicrobial agents on each farm.

According to the scientific literature, MRSA is primarily mediated by the mecA gene carried on a mobile genetic element (MGE), the staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) (Zhang et al., 2005). Several scientific studies conducted in several countries have shown the wide distribution of mecA gene in the world (Pu et al., 2014; Ganai et al., 2016). Our results show that 10 (66.7%) from 15 isolates of *S. aureus* yielded a mecA product.

Conclusion

The information obtained from this study is useful for understanding the prevalence of *S. aureus* and its antibiotic sensitivity in dairy farms and can be useful for local and national monitoring or for designing specific control programs of methicillin-resistant and multiresistance isolates present in the food chain of milk production. Also, study of antibiotic resistance among *S. aureus* isolates on each farm is very important, especially for the successful treatment of staphylococcal infections of animals. The presence of isolates resistant to antibiotics, including MRSA, in the raw milk of cows and on dairy farms can be a potential risk in the food chain. The improving of hygienic conditions on dairy farms may reduce the high level of *S. aureus* in environments of farms and in raw milk.

References

Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed. South Ethiopia. BMC Veterinary Research, 12, 270–279.

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.

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.

Bhunia, A. K. (2008). Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis. Springer Science + Business Media, NY, USA.

Brennan, G. I., Abbott, Y., Burn, A., Leonard, F., McManus, B. A., O'Connell, B., Coleman, D. C., & Shore, A. C. (2016). The emergence and spread of multiple livestock-associated clonal complex 398 methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains among animals and humans in the Republic of Ireland, 2010–2014. PLoS One, 11, 1–11.

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.

Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friderich, A. W., Bruggeman, C. A., & Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection, 13, 222–235.

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.

Ganai, A. W., Kotwal, S. K., Wani, N., Malik, M. A., Jeelani, R., Kour, S., & Zargar, R. (2016). Detection of mecA gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by PCR assay from raw milk. Indian Journal of Animal Sciences, 86(5), 508–511.

Gopal, S., & Divya, K. C. (2017). Can methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence from dairy cows in India act as potential risk for community-associated infections?: A review. Veterinary World, 10(3), 311–318.

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.

İkiz, S., Basaran, B., Bingol, E. B., Çetin, Ö., Kasikci, G., Özgur, N. Y., Ucmak, M., Yilmaz, Ö., Gunduz, M. C., & Sabuncu, A. (2013). Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) isolated from milks of dairy cows with subclinical mastitis. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 37, 569–574.

Jihasz-Kaszanytzky, E., Janosi, S., Somogyi, P., Dan, A., Van Der Graaf-Van Bloois, L., Van Duijkeren, E., & Wangenaar, J. A. (2007). MRSA transmission between cows and humans. Emerging Infectious Diseases,13, 630–632.

Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 28, 203–216.

Kirmusaoglu, S. (2017). MRSA and MSSA: The mechanism of methicillin resistance and the influence of methicillin resistance on biofilm phenotype of *Staphylococcus aureus*. In: The rise of virulence and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. InTech.

Kukhtyn, M. D., Berhilevych, O. M., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y. V., & Semaniuk, N. (2017). Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. Eastern-European Journal of Eenterprise Technologies, 89, 26–33.

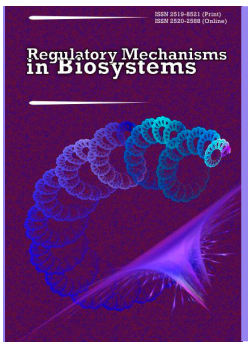
Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. (2017). Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(3), 384–388.

Li, J., Zhou, H., Yuan, L., He, T., & Hu, S. (2009). Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. Journal of Zheijang University SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), 10(10), 753–760.

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., Salandra, G. L., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., & Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Stap-*

hylococcus aureus isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, 115(3), 290–296.
Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (2012). Approved Standard, CLSI, USA.
Pu, W., Su, Y., Li, J., Li, C., Yang, Z., Deng, H., & Ni, C. (2014). High incidence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. PLoS One, 9(2), 88–134.
Rahim, A., Rachman, A., Suhaili, Z., & Desa, M. N. (2017). The evolution and dissemination of methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. In: The rise of virulence and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. InTech.
Sergelidis, D., & Angelidis, A. S. (2017). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A controversial food borne pathogen. Letters in Applied Microbiology, 64(6), 409–418.
Szweda, P., Schielmann, M., Frankowska, A., Kot, B., & Zalewska, M. (2014). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: Lysostaphin, nisin and polymyxin B. Journal of Veterinary Medical Science, 76(3), 355–362.
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, 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.
Zhang, K., & McClure, J.-A. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec Types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 43(10), 5026–5033.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 564–568
doi: 10.15421/021787

Biochemical markers of safety of nano-particles of metals on the model of isolated subcultural fractions of eukaryotes

M. Y. Roman'ko

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 28.09.2017
Received in revised form 04.11.2017
Accepted 09.11.2017

Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Pushkinska st., 83, Kharkiv, 61000, Ukraine.
Tel. +38-057-707-20-02.
E-mail: marina_biochem@ukr.net

Roman'ko, M. Y. (2017). Biochemical markers of safety of nano-particles of metals on the model of isolated subcultural fractions of eukaryotes. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 564–568. doi:10.15421/021787

Unique sizes and a high level of bioavailability allow nanoparticles of metals (NPMe) to come into direct contact with biological systems, with infectious agents, toxins, as well as with different chemical compounds and separate cell structures (proteins, lipids, nucleic acids). Other biological effects, including less toxicity than in microscopic substances, require attention to be paid to the study of the potential risk of using nanoparticles of each type in a particular way, therefore scientific support is absolutely necessary in this direction. It is believed that the cytotoxicity of nanomaterials is due to genomic and mutagenic effects, but the mechanical forces of interaction of NPMe with cells, obviously, will change not only cytological but also their metabolic reactions. Therefore, the purpose of this research was to determine the biochemical markers of safety (potential toxicity) of NPMe (Au, Ag, Cu, Fe, Co, GFCo, Zn, MnO_2) on the model of isolated membrane and cytosolic fractions of eukaryotic test cells of CHO-K1 and U937 lines. Under conditions of preincubation of experimental samples of NPMe at a final concentration of 1 μg/cm^3 by the metal with preparations of subcellular fractions of CHO-K1 and U937 (in the final amount of protein 150–200 μg/cm^3) for 3 minutes at 37 ± 1 ºC, there was determined the magnitude of membrane ATP-ase and cytosolic LDH-ase activity compared to intact cells ("control"). According to the results of the research, colloidal dispersions of NPAg average size ~30 nm, NPFe ~100 nm, NPCu ~70 nm, and NPMnO_2 ~50 nm are safe and biocompatible by their membranotropic effect on subcellular fractions of eukaryotic test cells, as evidenced by an increase in the level of membrane ATPase and cytosolic LDHase of test-cells CHO-K1, and the experimental samples NPCo, NPGFCo and NPZn average size of ~100 nm are membrane-toxic, that is, dangerous. By the nature of the changes in the enzymatic activity of the test cells U937, the discrete dimensions of the membranotropic action of NPAu have been demonstrated: nanoparticles of size ~10 nm caused the inhibition of the membrane Na^+,K^+-ATPase, and the size of ~30 nm and ~45 nm – its induction; nanoparticles of size ~10, ~20 and ~30 nm induced cytosolic LDHase and the size of ~45 nm – its inhibition relative to the control level of enzymes, so NPAu ~10 and ~45 nm can be considered membrane toxic, and size ~30 nm – safe and biocompatible for eukaryotic cells. Based on the hypothesis about the involvement of metabolism-dependent mechanisms of contact interaction of colloidal dispersions of experimental samples of NPMe with cells through membranotropic properties, the study of their potential danger or biocompatibility in further research can be carried out by determining the intensity of oxidation of the main structural components of biomembranes of cells – lipids and proteins and indicators of their AO-regulation.

Keywords: nanoparticles of metals; membrane ATPase; cytosolic LDHase; safety; biocompatibility; eukaryotic cell

Біохімічні маркери безпечності наночастинок металів на моделі ізольованих субклітинних фракцій еукаріотів

М. Є. Романько

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН, Харків, Україна

Унікальні розміри та значний рівень біодоступності дозволяють наночастинкам металів (NPMe) вступати в прямий контакт із біологічними системами, з інфекційними агентами, токсинами, а також із різними хімічними сполуками та окремими структурами клітин (протеїнами, ліпідами, нуклеїновими кислотами). Інші біологічні ефекти, у тому числі – менша токсичність, ніж у речовин у макророзмірному стані, вимагають приділяти увагу вивченню потенційного ризику використання наночастинок кожного виду окремим чином, тому науковий супровід цього напряму абсолютно необхідний. Мета досліджень – визначити біохімічні маркери безпечності (потенційної токсичності) NPMe (Au, Ag, Cu, Fe, GFCo, Co, Zn, MnO_2) на моделі ізольованих мембранної та цитозольної фракцій еукаріотичних тест-клітин ліній CHO-K1 та U937. За преінкубації дослідних зразків NPMe у кінцевій концентрації 1 мкг/см^3 за металом із препаратами субклітинних фракцій CHO-K1 і U937 (у кінцевій кількості білка 150–200 мкг/см^3) упродовж 3 хвилин за температури 37 ºС визначали мембранну АТР-азну та цитозольну ЛДГ-азну активність порівняно з показниками інтактних клітин (контроль). Колоїдні

дисперсії NPAg середнього розміру 30 нм, NPFe 100 нм, NPCu 70 нм та $NPMnO_2$ 50 нм безпечні та біосумісні за їх мембранотропної дії щодо субклітинних фракцій еукаріотичних тест-клітин, про що свідчить підвищення рівня мембранної АТР-ази та цитозольної ЛДГ-ази тест-клітин CHO-K1, а дослідні зразки NPCo, NPGFCo і NPZn розміром 100 нм – мембранотоксичні, тобто небезпечні. За характером змін ферментативної активності в ізольованих мембранах тест-клітин U937 доведено дискретні розміри мембранотропної дії NPAu: наночастинки металу розміром 10 нм викликали інгібування мембранної активності Na^+,K^+-АТР-ази, а розміром 30 і 45 нм – її індукцію; наночастинки металу розміром 10, 20 і 30 нм індукували активність цитозольної ЛДГ-ази, а розміром 45 нм – її пригнічення відносно контрольного рівня ензимів, тому NPAu розміром 10 і 45 нм можна вважати мембранотоксичними, а розміром 30 нм – безпечними та біосумісними для еукаріотичних клітин.

Ключові слова: наночастинки металів; мембранна АТР-аза; цитозольна ЛДГ-аза; безпечність; біосумісність; еукаріотична клітина

Вступ

Унікальні розміри та значний рівень біодоступності дозволяють наночастинкам, зокрема наночастинкам металів (NPMe), вступати у прямий контакт із біологічними системами, з інфекційними агентами, токсинами, а також із різними хімічними сполуками та окремими структурами клітин (протеїнами, ліпідами, нуклеїновими кислотами) (Elder et al., 2002; Silva, 2004; Oberdörster et al., 2005; Yan et al., 2007; Dutta et al., 2007; Owino et al., 2008; Xu et al., 2008; Cardinal et al., 2008). Інші біологічні ефекти, у тому числі менша токсичність (Kagan et al., 2005; Kabanov 2006; Lewinski et al., 2008; Jahnen-Dechent and Simon, 2008), ніж у речовин у макророзмірному стані, вимагають приділяти увагу вивченню потенційного ризику використання наночастинок кожного виду окремим чином, тому науковий супровід у цьому напрямку абсолютно необхідний.

Відомі наукові праці присвячені уявленню цитотоксичної дії наночастинок взагалі на рівні культур клітин або стосовно інших видів – карбонових нанотрубок, фулеренів, модифікованих наноалмазів (Weyermann et al., 2005; Chen et al., 2006, 2008; Powers et al., 2006). Цитотоксичність наноматеріалів зумовлена гено- та мутагенними ефектами (Jia et al., 2005; Brunner et al., 2006; Lynch et al., 2007), але механічні сили взаємодії NPMe з клітинами, очевидно, будуть змінювати не лише цитологічні, а й метаболічні реакції.

Існують розбіжності між поглядами вчених щодо небезпечності наночастинок ауруму (NPAu): одні визначають їх нетоксичними через інертність металу в діапазоні 0,5–100 нм, а інші – цитотоксичними (Goodman et al., 2004; Connor et al., 2005; Shukla et al., 2005). Токсичні ефекти наночастинок аргентуму (NPAg), навпаки, вважають очевидними через відому їх біоцидну дію відносно клітин мікроорганізмів (Egorova et al., 2001; Alt et al., 2004; Borysevych and Borysevych, 2010); бракує досліджень *in vitro*. Токсичність наночастинок купруму (NPCu) і феруму (NPFe) в основному досліджена в системі *in vivo* за різними шляхами введення та проявляє чітку розмірну залежність (Gupta and Gupta, 2005; Zhu et al., 2008; Sljunjaeva, 2012). Публікації щодо біологічних ефектів наночастинок інших металів обмежені за кількістю, не вистачає ґрунтовного розуміння біохімічних механізмів їх природи.

Отже, визначення особливостей модуляції NPMe біохімічних процесів у клітині в цілому та її окремих структурах відкриває нові перспективи у фундаментальному розумінні їх впливу на стан і функціональну активність мікроорганізмів. Саме тому мета наших досліджень – визначити біохімічні маркери безпечності (потенційної токсичності) наночастинок металів (Au, Ag, Cu, Fe, GFCo, Co, Zn, MnO_2) на моделі ізольованих мембранної та цитозольної фракцій еукаріотичних тест-клітин ліній CHO-K1 та U937.

Матеріал і методи досліджень

Як біологічні моделі використовували лінії пухлинних клітин гістіоцитарної лімфоми людини U937 та лінії клітин яєчника китайського хом'ячка CHO-K1.

Тест-клітини лінії U937 культивували у стандартному середовищі RPMI 1640, що містить 10% ембріональної сироватки ВРХ, а CHO-K1 – у середовищі F10, що містить 5% ембріональної сироватки ВРХ, за температури 37,0 ± 1,0 ºС у CO_2-інкубаторі в атмосфері 5% CO_2 до титру $5 \cdot 10^6$ кл./см^3.

Життєздатність клітин оцінювали за допомогою фарбування з використанням 0,3% розчину трипанового синього. Кількість живих клітин складала не менше 90%.

Виділення цитозольної та мембранної фракцій еукаріотичних тест-клітин проводили, як описано Maianski et al. (2004): клітини відмивали від живильного середовища ФСБ, ресуспендували у буфері для екстракції цитозолю (250 мМ сахароза, 70 мМ KCl, 250 мкг/мл дигітонін, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ ЕДТА на ФСБ-буфері, pH 7,4) упродовж 20 хвилин за температури 40 ºС за постійного перемішування, центрифугували за 1 000 об./хв, надосад збирали як цитозольну фракцію клітин; осад ресуспендували у середовищі (50 мМ Трис-HCl, 10 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 2 мМ ЕДТА, 1% тритон X100, 10% гліцерин, pH 7,5) упродовж 10 хвилин, постійно перемішуючи, центрифугували за 10 000 g та отримували осад – сумарну мембранну фракцію (СМФ) клітин.

Препарати субклітинних фракцій характеризували за вмістом білка методом (Lowry et al., 1951) та зберігали за температури –20 ± 1 ºС; повторного заморожування не допускали. Як стандартний білок для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA).

У дослідженні використані такі колоїдні розчини NPMe: наночастинки ауруму (NPAu) середнього розміру 10, 20, 30 та 45 нм із вихідною концентрацією за металом 38,6 мкг/см^3 та у діапазоні розведень 0,12–1,40 мкг/см^3; наночастинки аргентуму (NPAg) 30 нм із концентрацією 86,4 мкг/см^3; наночастинки феруму (NPFe) 100 нм із концентрацією 3174,0 мкг/см^3; наночастинки гексаціаноферату кобальту (NPGFCo) 100 нм із концентрацією 2 489 мкг/см^3; наночастинки кобальту (NPCo) 100 нм із концернтрацією 1 992 мкг/см^3; наночастинки купруму (NPCu) 70 нм із концентрацією 2 679 мкг/см^3; наночастинки цинку (NPZn) 100 нм із концернтрацією 2 407 мкг/см^3; наночастинки двоокису мангану ($NPMnO_2$) 50 нм із концентрацією 2 785 мкг/см^3.

Колоїдні розчини NPMe отримували методом хімічної конденсації шляхом відновлення відповідних солей металів у водному середовищі (Percov, 1976), який дозволяє отримувати стійкі водні дисперсії наночастинок певного розміру. Середній розмір NPMe обчислювали методом лазерно-кореляційної спектрометрії (Zetasizer–3; Malvern Instruments Ltd, Великобританія), що дозволяє з високою точністю визначити константи швидкості дифузії частинок і обчислити їх гідродинамічний діаметр, виходячи з припущення щодо їх сферичної геометрії (Rawle, 1994).

За преінкубації дослідних зразків NPMe у кінцевій концентрації 1 мкг/см^3 за металом із препаратами субклітинних фракцій CHO-K1 і U937 (у кінцевій кількості білка 150–200 мкг/см^3) упродовж 3 хвилин за температури 37 ± 1 ºС визначали мембранну АТР-азну та цитозольну ЛДГ-азну активність порівняно з показниками інтактних клітин (контроль). У контрольну пробу замість NPMe додавали Трис-HCl буфер або ФСБ.

Активність питомої АТРази (КФ 3.6.3.6) у СМФ тест-клітин визначали спектрофотометрично, як описано Prohorova (1982), за швидкістю накопичення неорганічного фосфору в результаті гідролізу АТР у середовищі інкубації (10 мМ трис-HCl, 3 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АТР, pH 7,5) упродовж 10 хвилин; виражали у відносних одиницях A/A_0. Реакцію ініціювали уведенням до середовища інкубації 0,1 см^3 дослідної проби (кількість мембранного білка – 15–20 мкг/см^3). Контролем на неферментативний гідроліз АТР слугувало середовище інкубації за відсутності в ньому СМФ; контролем на ендогенний P_i – середовище, що містило лише СМФ у водному розчині.

Активність ЛДГази (КФ 1.1.1.27) у цитозольній фракції тест-клітин визначали спектрофотометрично за швидкістю окиснення NADH за довжини хвилі 340 нм, як описано Prohorova (1982), у середовищі інкубації (50 мМ К-фосфатний буфер, 0,3 мМ Na-піруват, 9 мМ NADH, pH 7,5); виражали у відносних одиницях A/A_0.

Реакцію ініціювали внесенням до середовища інкубації 0,1 $см^3$ дослідної проби цитозольної фракції. Реєстрацію показника проводили кожні 30 секунд упродовж 3–5 хвилин, розраховуючи середнє значення зміни оптичної густини проби упродовж 1 хвилини. Токсичними вважали зразки NPMe у випадку інгібування активності АТРази дослідної проби за взаємодії з такими не менше ніж на 20%, та у випадку стимуляції активності ЛДГази дослідної проби за взаємодії з такими не менше ніж на 50%, порівняно з рівнем ферментативної активності у контрольній пробі. Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента після перевірки нормальності розподілу показників. Для одержання статистично вірогідних результатів під час виконання досліджень на культурах клітин і субклітинних фракціях, визначення параметрів проводили у 5-кратній повторності з трьома пробами.

Результати

Результати (рис. 1), свідчать, що за впливу дослідних зразків NPAg, NPFe, NPCu та $NPMnO_2$ не реєстрували вірогідного гальмування активності мембранної АТР-ази відносно її значень у фракціях інтактних тест-клітин СНО-К1 (контроль). Але за контактної взаємодії ізольованих СМФ тест-клітин із NPCo і NPGFCo, навпаки, визначали вірогідне зниження активності АТРази у середньому на 22,3% та 26,1%, а за впливу NPZn – лише тенденцію до зниження активності цього ензиму, що складало 10,8% відносно її значень у контролі (СМФ інтактних клітин). Внаслідок преінкубації ізольованих цитозольних фракцій тест-клітин СНО-К1 із дослідними зразками всіх видів NPMe не реєстрували вірогідних змін активності ЛДГази відносно її значень в інтактних клітин (контроль) (рис. 1). Виняток складало збільшення рівня ЛДГазної активності за взаємодії з NPGFCo та NPCu в середньому на 19,4% та 38,9% ($P < 0,05$), відповідно.

Під час визначення впливу NPAu у діапазоні розмірних значень на активність мембранної Na^+,K^+-АТРази тест-клітин U937 встановлено (рис. 2), що NPMe в усьому концентраційному діапазоні середнього розміру (10 нм) інгібували ферментативну активність у середньому на 70%, а розміром 30 і 45 нм індукували її у межах 20–40% ($P < 0,05$), відповідно, відносно рівня активності цього ензиму у СМФ інтактних клітин (контроль). Виняток складало зниження ($P < 0,05$) активності цього ензиму у СМФ клітин за впливу NPAu середнього розміру (20 нм) у концентрації 0,30 $мкг/см^3$ за металом.

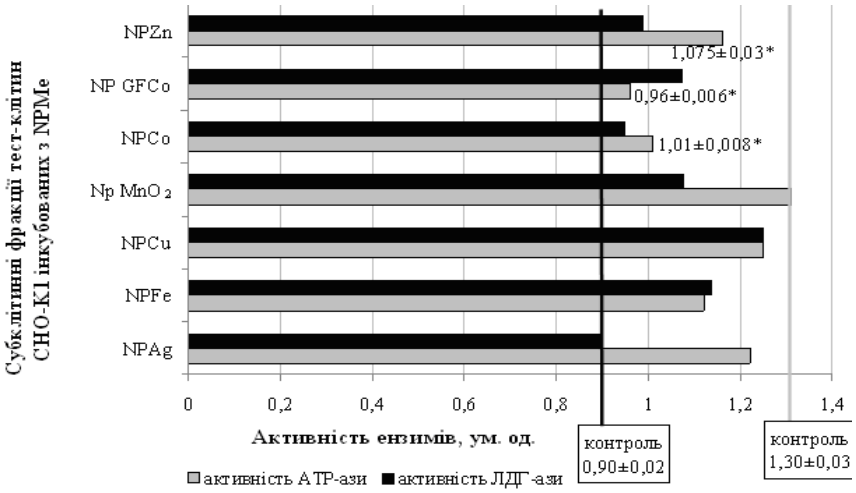


Рис. 1. Активність мембранної АТРази та цитозольної ЛДГази тест-клітин СНО-К1 за контактної взаємодії з NPMe (ум. од.): M ± m; n = 5; $P < 0,05$ відносно контролю (СМФ інтактних клітин)

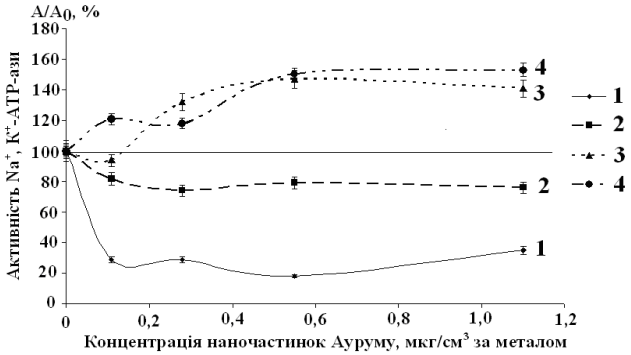


Рис. 2. Активність мембранної Na^+,K^+-АТРази (A/A_0, %) тест-клітин U937 за контактної взаємодії з NPAu середнього розміру: *1* – 10 нм, *2* – 20 нм, *3* – 30 нм, *4* – 45 нм (n = 5, $P < 0,05$ – відносно контролю (СМФ інтактних клітин) – A_0): за 100% прийнято величину АТРазної активності СМФ інтактних клітин лінії U937 (контроль) за відсутності впливу NPAu

Дослідження впливу дослідних NPAu на активність ЛДГази цитозольної фракції тест-клітин U937 показало (рис. 3), що NPMe викликають підвищення її активності у діапазоні концентрацій 0,20–1,20 $мкг/см^3$ (NPAu розміром 10 нм) у середньому складало 4,0–4,5 раза, у концентраціях 0,18–0,70 $мкг/см^3$ за металом (NPAu розміром 20 і 30 нм) – 1,5–2,0 раза ($P < 0,05$) відповідно відносно її контрольного рівня.

За впливу NPAu середнього розміру 45 нм у концентраційному діапазоні 0,20–0,60 $мкг/см^3$ за металом, навпаки, реєстрували інгібування активності цитозольної ЛДГази, зниження значень склало в середньому 5,0 раза ($P < 0,05$) відносно її базового рівня (контроль).

Обговорення

Еукаріотичні клітини мають вищу організацію порівняно з прокаріотичними, що знаходить відображення в їх метаболічних процесах (Artjuhov and Nakvasina, 2000). АТРаза – один із ключових ферментів енергетичного метаболізму клітини, завдяки якому відбувається формування різниці електрохімічних потенціалів на мембрані (Basnak'jan et al., 1981; Ulberg, 2005; Danylovych et al., 2007). Фермент локалізується у плазматичній мембрані клітини таким чином, що його субодиниці експоновані як до цитоплазми, так і до зовнішнього середовища, тому активність може бути використана як індикатор стресового впливу будь-якого фактора ризику.

Поряд із десятьма цитозольними ферментами, які перетворюють глюкозу на піруват, ЛДГазі у тому числі властиво забезпечувати синтез АТР за відсутності оксигену, в анаеробних умовах (Artjuhov and Nakvasina, 2000). При цьому акцептором гідрогену слугує піровиноградна кислота, яка перетворюється на лактат, що виконує функцію резервуара відновлених еквівалентів.

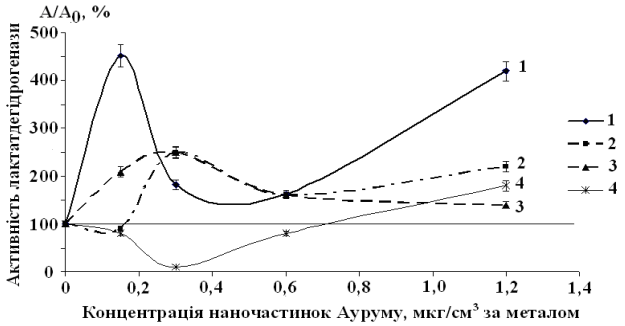


Рис. 3. Активність цитозольної ЛДГази (A/A_0, %) тест-клітин U937 за контактної взаємодії з NPAu середнього розміру: *1* – 10 нм, *2* – 20 нм, *3* – 30 нм, *4* – 45 нм ($n = 5$, $P < 0,05$ – відносно контролю (цитозольна фракція інтактних клітин) – A_0): за 100% прийнято ЛДГазну активність цитозольної фракції інтактних клітин лінії U937 (контроль) за відсутності впливу NPAu

Виходячи з того, що цитоплазматична мембрана клітин ушкоджується у першу чергу, оскільки вона слугує бар'єром між поза- та внутрішньоклітинним оточенням і забезпечує селективний транспорт речовин (Rapoport et al., 1982; Ivanytsia and Rakhimova, 2002; Kharchuk, 2005), установлені нами зміни активності АТРази та ЛДГази у субклітинних фракціях еукаріотичних тест-клітин за контактної взаємодії з дослідними зразками NPMe дозволяють використовувати ферментативну активність як системний біохімічний маркер під час тестування безпечності та біосумісності *in vitro*. Отримані результати щодо мембранотоксичної дії колоїдних дисперсій NPCo, NPGFCo і NPZn розміром 100 нм та NPAu розміром 10 і 45 нм вимагають відповідального підходу під час їх використання у сучасних біотехнологіях, а з іншого боку – подальшого вивчення механізмів потенційної небезпечності та біосумісності NPMe із залученням інших маркерів тестування як у системі *in vitro*, так і *in vivo*. Колоїдні дисперсії NPAg 30 нм, NPFe 100 нм, NPCu 70 нм та $NPMnO_2$ 50 нм, навпаки, слід вважати безпечними та біосумісними за мембранотропною дією щодо субклітинних фракцій еукаріотичних тест-клітин, про що вказує підвищення рівня мембранної АТРази та цитозольної ЛДГази ($P < 0,05$) СНО-К1.

Низка авторів (Yamakoshi et al., 2003; Li et al., 2003; Shvedova et al., 2004; Garcon et al., 2006) вважає, що механізми цитотоксичних ефектів наноматеріалів різного походження (карбонових нанотрубок, NPMe, фулеренів, нанопорошків тощо) пов'язані з формуванням окиснювального стресу та накопиченням токсичних продуктів ліпопероксидації, тому вважаємо за доцільне у подальших експериментах зосередитися на визначенні впливу дослідних зразків NPMe на структурно-функціональний стан основних компонентів біомембран клітин – ліпідів і протеїнів.

Висновки

За результатами досліджень установлено, що колоїдні дисперсії NPAg 30 нм, NPFe 100 нм, NPCu 70 нм та $NPMnO_2$ 50 нм безпечні та біосумісні за мембранотропною дією щодо субклітинних фракцій еукаріотичних тест-клітин, про що свідчить підвищення рівня мембранної АТРази та цитозольної ЛДГази ($P < 0,05$) СНО-К1, а дослідні зразки NPCo, NPGFCo і NPZn розміром 100 нм – мембранотоксичні, тобто небезпечні.

За характером змін ферментативної активності у субклітинних фракціях U937 доведені дискретні розміри мембранотропної дії NPAu: наночастинки розміром 10 нм викликали інгібування мембранної Na^+,K^+-АТРази, а розміром 30 і 45 нм – її індукцію; наночастинки розміром 10, 20 і 30 нм справляли індукцію цитозольної ЛДГази, а розміром 45 нм – її пригнічення відносно контрольного рівня. Тому NPAu розміром 10 і 45 нм можна вважати мембранотоксичними, а 30 нм – безпечними та біосумісними для еукаріотичних клітин.

Спираючись на висунуту гіпотезу щодо участі метаболізм-залежних механізмів контактної взаємодії колоїдних зразків NPMe з клітинами через мембранотропні властивості, стан їх потенційної небезпечності або біосумісності у подальших дослідженнях може бути з'ясований через визначення інтенсивності окиснення основних компонентів біомембран клітин – ліпідів та білків, а також показників їх АО-регуляції.

Автор висловлює подяку канд. біол. наук Т. Г. Грузіній і канд. біол. наук Л. С. Рєзніченко (Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України) за допомогу в синтезі наночастинок металів.

References

Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Dormann, E., & Schnettler, R. (2004). An *in vitro* assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials, 25(18), 4383–4391.

Artjuhov, V. G., & Nakvasina, M. A. (2000). Biologicheskie membrany: Strukturnaja organizacija, funkcii, modifikacija fiziko-himicheskimi agentami [Biological membranes: Structural organization, functions, modification to physicochemical agents]. Izdatel'stvo Voronezhskogo Universiteta, Voronezh (in Russian).

Basnak'jan, I. A., Borovkova, V. M., & Kuz'min, S. I. (1981). Patologija i fiziologija mikrobov [Pathology and physiology of microbes]. Zhurnal Mikrobiologii, Jepidemiologii i Immunobiologii, 9, 14–19 (in Russian).

Borysevych, V. B., & Borysevych, B. V. (2010). Antibacterial properties and chemotherapeutic activity of nanoacquachelates of metals [Antybakterialni vlastyvosti ta khimioterapevtychna aktyvnist nanoakvakhelativ metaliv]. In: Borysevych, V. B., & Kaplunenko, V. H. (Eds.). Nanomaterials in biology. Basic nanoveterinary [Nanomaterialy v biolohii. Osnovy nanoveterynarii]. Avitsena, Kyiv. pp. 27–33 (in Ukrainian).

Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., & Stark, W. J. (2006). *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environmental Science and Technology, 40(14), 4374–4381.

Cardinal, J., Klune, J. R., Chory, E., Jeyabalan, G., Kanzius, J. S., Nalesnik, M., & Geller, D. A. (2008). Non-invasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles. Surgery, 144(2), 125–132.

Chen, P. C., Mwakwari, S. C., & Oyelere, A. K. (2008). Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. Nanotechnology, Science and Applications, 1, 45–65.

Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B., & Wan, L. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. Toxicology Letters, 163(2), 109–120.

Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. Small, 1(3), 325–327.

Danylovych, G. V., Gruzina, T. G., Ulberg, Z. R., & Kosterin, S. O. (2007). Vplyv ionnoho ta koloidnoho zolota na ATR-hidrolazni fermentni systemy v membrani mikroorhanizmiv *Bacillus* sp. B4253 ta *Bacillus* sp. V4851 [Effect of ionic and colloid gold on ATP-hydrolase fermentative systems in membrane of *Bacillus* sp. B4253 and *Bacillus* sp. B4851]. Ukrainskyi Biokhimichnyi Zhurnal, 79(4), 46–51 (in Ukrainian).

Dutta, D., Sundaram, S. K., Teeguarden, J. G., Riley, B. J., Fifield, L. S., Jacobs, J. M., Addleman, S. R., Kaysen, G. A., Moudgil, B. M., & Weber, T. J. (2007). Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. Toxicological Sciences, 100, 303–315.

Egorova, E. M., Revina, A. A., Rostovshhikova, T. N., & Kiseleva, O. I. (2001). Baktericidnye i katalicheskie svojstva stabil'nyh metallicheskih nanochastic v obratnyh micellah [Bactericidal and catalytic properties of stable metallic nanoparticles in inverse micelles]. Vestnik Moskovskogo universiteta. Serija 2: Himija, 42(5), 332–338 (in Russian).

Elder, A. C. P., Gelein, R., Azadniv, M., Frampton, M., Finkelstein, J., & Oberdörster, G. (2002). Systemic interactions between inhaled ultrafine particles and endotoxin. The Annals of Occupational Hygiene, 46(s1), 231–234.

Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., & Shirali, P. (2006). Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. Toxicology in Vitro, 20(4), 519–528.

Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., & Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. Bioconjugate Chemistry, 15(4), 897–900.

Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 26(18), 3995–4021.

Ivanytsia, V. I., & Rakhimova, E. L. (2002). Zhiznesposobnost' liofilizirovannyh kletok *Myxococcus xanthus* UCM 10041 i *Polyangium cellulosum* UCM 10043 v prisutstvii razlichnyh antioksidantov [The viability of lyophilized *Myxococcus xanthus* cells UCM 10041 and *Polyangium cellulosum* UCM 10043 in the presence of various antioxidants]. Mikrobiologichny Zhurnal, 64(5), 3–9 (in Russian).

Jahnen-Dechent, W., & Simon, U. (2008). Function follows form: Shape complementarity and nanoparticle toxicity. Nanomedicine, 3(5), 601–603.

Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., & Guo, X. (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. Environmental Science and Technology, 39(5), 1378–1383.

Kabanov, A. V. (2006). Polymer genomics: An insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. Advanced Drug Delivery Reviews, 58(15), 1597–1621.

Kagan, V. E., Bayir, H., & Shvedova, A. A. (2005). Nanomedicine and nanotoxicology: Two sides of the same coin. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 1(4), 313–316.

Kharchuk, I. A. (2005). Anabioz: Osnovne ponjatija i soprovozhdajushhie ego processy (obzor) [Anabiosis: Laws and accompanying its processes (Review)]. Jekologija Morja, 70, 62–78 (in Russian).

Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. Small, 4(1), 26–49.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., & Nel, A. (2002). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environmental Health Perspectives, 111(4), 455–460.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193(1), 265–275.

Lynch, I., Cedervall, T., Lundqvist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., & Dawson, K. A. (2007). The nanoparticle-protein complex as a biological entity; A complex fluids and surface science challenge for the 21st century. Advances in Colloid and Interface Science, 134–135, 167–174.

Maianski, N. A., Blink, E., Roos, D., & Kuijpers, T. (2004). Rol' Omi/HtrA2 v kaspazonezavisimoj kletochnoj gibeli nejtrofilov cheloveka [Role of Omi/HtrA2 in a caspase-independent cell death of human neutrophils]. Citokiny i Vospalenie, 3(2), 47–51 (in Russian).

Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives, 113(7), 823–839.

Owino, J. H., Arotiba, O. A., Hendricks, N., Songa, E. A., Jahed, N., Waryo, T. T., Ngece, R. F., Baker, P. G. L., & Iwuoha, E. I. (2008). Electrochemical immunosensor based on polythionine/gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1. Sensors (Basel), 8(12), 8262–8274.

Percov, A. V. (Ed.). (1976). Metodicheskie razrabotki k praktikumu po kolloidnoj himii [Methodical developments for the workshop on colloid chemistry]. Izdatel'stvo Moskovskogo Universiteta, Moscow (in Russian).

Powers, K. W., Brown, S. C., Krishna, V. B., Wasdo, S. C., Moudgil, B. M., & Roberts, S. M. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. Toxicological Sciences, 90(2), 296–303.

Prohorova, M. I. (Ed.). (1982). Metody biohimicheskih issledovanij (lipidnyj i jenergeticheskij obmen) [Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism)] Izdatel'stvo Leningradskogo Universiteta, Leningrad (in Russian).

Rapoport, A. I., Markovskij, A. B., & Beker, M. E. (1982). O povyshenii pronicaemosti vnutrikletochnyh membran pri obezvozhivanii-regidratacii drozhzhej *Sacharomyces cerevisiae* [On increasing the permeability of intracellular membranes during dehydration-yeast rehydration *Sacharomyces cerevisiae*]. Mikrobiologija, 51(6), 901–904 (in Russian).

Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. Langmuir, 21(23), 10644–10654.

Shvedova, A. A., Kisin, E., & Murray, A. R. (2004). Exposure of human bronchial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress cytotoxicity. Proceedings of the Society for Free Radical Research Meeting. European Section (Ioannina, Greece, 26–29 June 2003), 91–103.

Shvedova, A. A., Kisin, E., Keshava, N., Murray, A. R., Gorelik, O., Arepalli, S., Gandelsman, V. Z., & Castranova, V. (2004). Cytotoxic and genotoxic effects of single wall carbon nanotube exposure on human keratinocytes and bronchial epithelial cells. The 227th American Chemistry Society National Meeting (Anaheim, CA, 28 March–1 April 2004): Abstracts.

Silva, G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. Surgical Neurology, 61(3), 216–220.

Sljunjaeva, M. K. (2012). Izmenenie aktivnosti indikatornyh fermentov syvorotki krovi pri podkozhnom vvedenii nanochastic zheleza [Change in the activity of indicator serum enzymes with subcutaneous injection of iron nanoparticles]. Bjulleten' Medicinskih Internet-Konferencij, 2(4), 181 (in Russian).

Ulberg, Z. R. (2005). Kolloidno-himicheskie svojstva biologicheskih nanosistem. Biomembrany [Colloid-chemical properties of biological nanosystems. Biomembranes]. In: Ulberg, Z. R. (Ed.). Kolloidno-himicheskie osnovy nanonauki [Colloid-chemical fundamentals of nanoscience] Akademperiodika, Kiev. pp. 199–237 (in Russian).

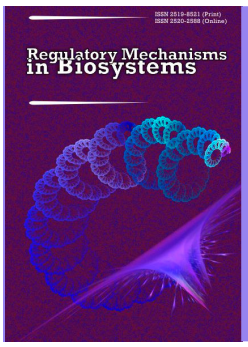
Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. International Journal of Pharmaceutics, 288(2), 369–376.

Xu, C., Tung, G. A., & Sun, S. (2008). Size and concentration effect of gold nanoparticles on X-ray attenuation as measured on computed tomography. Chemistry of Materials, 20(13), 4167–4169.

Yamakoshi, Y., Umezawa, N., Ryu, A., Arakane, K., Miyata, N., Goda, Y., Masumizu, T., & Nagano, T. (2003). Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C_{60}) as potential medicines: $O_2^{-\bullet}$ versus $^1O_2$. Journal of the American Chemical Society, 125(42), 12803–12809.

Yan, F., Chen, J., & Ju, H. (2007). Immobilization and electrochemical behavior of gold nanoparticles modified leukemia K562 cells and application in drug sensitivity test. Electrochemistry Communications, 9(2), 293–298.

Zhu, M.-T., Feng, W.-Y., Wang, B., Wang, T.-C., Gu, Y.-Q., Wang, M., Wang, Y., Ouyang, H., Zhao, Y. L., & Chai, Z.-F. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. Toxicology, 247(2–3), 102–111.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 569–576
doi: 10.15421/021788

Hysto-ultrastructure of the facial nerve and mimic muscles in the norm and in the conditions of experimental neuropathy

V. Myhailiuk*, I. Mykhailiuk*, M. Hembarovskyi*, O. Lebid*, K. Duda*, L. Patskan*, N. Shovkova**

**I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine*
***Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

Article info

Received 30.09.2017
Received in revised form 08.11.2017
Accepted 10.11.2017

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Chekhov st., 3, Ternopil, 46003, Ukraine.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Galitcka st., 2, Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine.
Tel. +38-067-415-60-87
E-mail: luch1959@ukr.net

Myhailiuk, V., Mykhailiuk, I., Hembarovskyi, M., Lebid, O., Duda, K., Patskan, L., & Shovkova, N. (2017). Hysto-ultrastructure of the facial nerve and mimic muscles in the norm and in the conditions of experimental neuropathy. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 569–576. doi:10.15421/021788

We studied the structural components of the facial nerve in the norm and with cold neuropathy, indicating morphological changes in neuromuscular endings and muscle fibers at 10, 15, 30 and 60 days from the beginning of the simulation of experimental neuropathy, which was caused by local supercooling of the projection portions of the extracranial parts of the facial nerve on the background of the preliminary introduction of Freud's complete adjuvant. We established that the pathomorphological changes in the endonevral microcirculatory bed have a phase character: the initial spasm (up to 10 days) changes in paralytic vasodilation, and its residual effects remain until the end of the experiment (60 days). Changes in hemomicrocirculation conditions lead to marked disturbances in the structure of myelinic nerve fibers, which have the character of segmental demyelination with signs of delay in axonal transport and reactive restructuring of neuromuscular endings. The change in the metric composition of myelinated nerve fibers is due to an increase in the number of nerve fibers of medium and large diameters (up to 30 days) and small diameter (after 30 days). In different periods of the experiment, a decrease in the branching area of the terminal branches of the motor axon is observed in the nerve cells, local edema of the endonevria, degenerative changes in a part of the nerve fibers develop. Due to the fine-grained decay of the final nerve branches, degeneration of the motor endings took place two weeks after the start of the experiment. Neuropathy for 30 days caused a pronounced inhibition of spotting in the peripheral parts of the motor nerve fibers. After 60 days of experiment, a large number of muscle fibers underwent destructive changes. The size of a significant part of the neuromuscular endings was reduced. In all terms of cold neuropathy, neurolematocytes reacted in the same way: cytoplasm was swollen, argyrophilic grains appeared in the nuclei, fine-grained decay of individual nuclei occurred.

Keywords: facial nerve; mimic muscles; nerve fibers; nerve-muscle endings; muscular fibers; cold neuropathy; microcirculatory network

Гісто-ультраструктура лицевого нерва та мімічних м'язів у нормі та в умовах експериментальної нейропатії

В. М. Михайлюк*, І. А. Михайлюк*, М. В. Гембаровський*,
О. І. Лебідь*, К. М. Дуда*, Л. О. Пацкань*, Н. І. Шовкова**

**Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна*
***Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна*

Проведено дослідження структурних компонентів лицевого нерва в нормі та за холодової нейропатії, що вказує на морфологічні зміни в нервово-м'язових закінченнях і м'язових волокнах через 10, 15, 30 і 60 діб від початку моделювання експериментальної нейропатії, яку викликали локальним переохолодженням ділянки проекції позачерепної частини лицевого нерва на фоні попереднього введення повного ад'юванта Фрейда. Патоморфологічні зміни ендоневрального мікроциркуляторного русла мають фазовий характер: початковий спазм (до 10-ї доби) змінюється паралітичною вазодилятацією, а її залишкові явища зберігаються до кінця експерименту (60-та доба). Зміни умов гемомікроциркуляції викликають виражені порушення структури мієлінових нервових волокон, які мають характер сегментарної демієлінізації з ознаками затримання аксонного транспорту та реактивної перебудови нервово-м'язових закінчень. Зміна метричного складу мієлінових нервових волокон, відбувається внаслідок збільшення кількості нервових волокон середнього та великого діаметрів (до 30-ї доби) та дрібного діаметра (після 30-ї доби). У різні терміни експерименту в нервових елементах спостерігається зменшення площі розгалуження термінальних гілок рухового аксона, локальний набряк ендоневрію, розвиваються дегенеративні зміни частини нервових волокон. Унаслідок дрібнозернистого розпаду кінцевих нервових гілочок через два тижні після початку експерименту відбувається

дегенерація моторних закінчень. Нейропатія протягом 30 діб викликає виражене гальмування спраутингу у периферичних відділах рухових нервових волокон. Через 60 діб експерименту велика кількість м'язових волокон піддається деструктивним змінам. Розміри значної частини нервово-м'язових закінчень зменшуються. В усі терміни холодової нейропатії нейролемоцити реагують однотипно: спостерігається набряк цитоплазми, в ядрах з'являються аргірофільні зерна, відбувається дрібнозернистий розпад окремих ядер.

Ключові слова: лицевий нерв; нервові волокна; нервово-м'язові закінчення; м'язові волокна; холодова нейропатія; мікроциркуляторне русло

Вступ

Труднощі в лікуванні нейропатій черепних і периферичних нервів вимагають від морфологів комплексного вивчення їх компонентів (нервових волокон, мікросудин і сполучнотканинних елементів) як у нормі, так і за патології (Gitik et al., 2011; Ali et al., 2015; Hamel and Logigian, 2017). При цьому вивчення гісто-ультраструктури лицевого нерва посідає одне з провідних місць у нейроморфології (Reina et al., 2015), оскільки його нейропатії складають 2–3% всіх захворювань периферичної нервової системи (Mumtaz and Jensen, 2014) і зустрічаються найчастіше серед уражень черепних нервів (Fayad and Linthicum, 2014; Azizzadeh et al., 2014).

Для сучасної медицини значний теоретичний і практичний інтерес становлять також дані про перебудову структури периферійного нервово-м'язового апарату за нейропатій різного генезу (Popel', 2017), а також під час переходу процесу у хронічне рецидивування, яке зустрічається у 40% пацієнтів із нейропатією лицевого нерва (Fayad and Linthicum, 2014; Watanabe and Suzuki, 2016). Розкриття причин цих процесів створює передумови для дослідження способів їх лікування та корекції з метою підтримання на достатньому рівні функціонального стану нервових і м'язових волокон і запобігання можливим рецидивам (Boissaud-Cooke et al., 2015; Lemaster et al., 2017).

У літературі існує протиріччя щодо характеру патологічних змін у мієлінових нервових волокнах за холодової нейропатії (Nawaz et al., 2013; Mumtaz and Jensen, 2014; Cohen et al., 2015). Одні дослідники відносять ці зміни до первинних, визнаючи при цьому виражений характер деструкції, швидкоплинність і зворотність процесів (Achiron and Miron, 2007). Інші вважають їх вторинними, які розвиваються внаслідок по-рушення місцевого кровообігу (Zheng et al., 2012; Tuhrim, 2016). Треті притримуються теорії порушення нейрогуморальної регуляції місцевого метаболізму мієлінових нервових волокон (Nanba et al., 2010). Донині не встановлено наявності у структурі лицевого нерва безмієлінових нервових волокон, а стосовно їх реакції на локальний вплив холоду взагалі не проведено досліджень. У літературі відсутні також дані про перебудову рухових нервових закінчень мімічних м'язів за нейропатії лицевого нерва (Popel', 2017), тоді як у світлі сучасних запитів практичної нейростоматології вивчення механізмів адаптивних змін у компонентах лицевого нерва та його термінальних нервово-м'язових закінченнях за впливу місцевого охолодження становлять значний інтерес (Smith et al., 2012).

Мета статті – виявити особливості нейро-вазо-десмальних взаємовідношень у лицевому нерві в нормі та за експериментальної холодової нейропатії.

Матеріал і методи досліджень

Будова нервових провідників та нервово-м'язових закінчень лицевого нерва вивчена поряд з особливостями мікроциркуляторного русла в нормі (5 кролів) та за холодової нейропатії (30 кролів), яку моделювали за запропонованою методикою на кафедрі анатомії людини Івано-Франківського національного медичного університету (рац. пропозиція № 32/2049 МОЗ України від 05.11.91 р.). Для дослідження нервових і м'язових волокон використовували такі методи: 1) тонкої ін'єкції судин хлороформно-ефірною сумішшю паризької синьої з наступним просвітленням препаратів і метилметакрилатом для приготування корозійних препаратів та вивчення у сканувальному електронному мікроскопі JEOL-25A-T3225 (Японія); 2) імпрегнації судин в епіневрії за Купріяновим; 3) виявлення нервових волокон за Кульчицьким, Масон і Ренсон із наступним обчисленням індексу *g* (співвідношення діаметра аксона до діаметра цілого мієлінового нервового волокна); 4) виявлення продуктів розпаду мієліну за Маркі; 5) одночасного виявлення на поперечному перерізі нервового стовбура нервових волокон і кровоносних судин із застосуванням морфометрії; 6) імпрегнації рухових нервових закінчень у мімічних м'язах за Більшовським – Грос; 7) трансмісивної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-100К (Selmi, Україна) та 8) морфометричного, кореляційного та інформаційного аналізу.

Тварин виводили з експерименту на 10, 15, 30, 45 і 60-ту добу згідно з «Правилами гуманного поводження з експериментальними тваринами» та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах».

Паралельно з лицевим нервом вивчали м'язи верхньої та нижньої губи, які піддавали гістологічному дослідженню. Після фіксації шматочків мімічних м'язів у 12% нейтральному формаліні та поміщення в парафінові блоки їх зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, пікрофуксином, імпрегнували азотнокислим сріблом за Більшовським і Більшовським – Гросс.

Діаметр нервових волокон, розміри нервово-м'язових закінчень і капілярів визначали за допомогою комп'ютерної програми Biovision 4.01. Отримані дані обробляли методами непараметричної статистики з використанням показника Манна – Уїтні. Комп'ютерне опрацювання даних проводили за допомогою статистичного пакета Statistica 6 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Використовували непараметричні методи дослідження (критерій Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Вибіркові параметри, наведені далі в таблицях і тексті, мають такі позначення: x – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Статистичні зміни вважали достовірними тоді, коли отриманий рівень вірогідності для тестової статистики був меншим прийнятого рівня достовірності ($P < 0,05$).

Результати

На площі 1 мм^2 поперечного перерізу позачерепного відділу лицевого нерва нараховано 9187 ± 593 (91,3%) мієлінових нервових волокон та 615 ± 23 (8,7%) безмієлінових нервових волокон, а певні коливання їх кількості визначаються неоднаковою щільністю розташування в ендоневрії. При цьому кількість мієлінових нервових волокон різних груп варіює: дрібних (1,0–4,0 мкм) – 580–998 (13–21%), середніх (4,1–7,0 мкм) – 2987–3859 (22–32%) і великих (понад 7,0 мкм) – 4022–6110 (52–61%). Великих волокон завжди більше, ніж середніх та дрібних, що визначає унімодальний розподіл мієлінових нервових волокон на гістограмах. При цьому діаметр осьового циліндра дрібних волокон коливається від 0,4 до 1,2 мкм, середніх – від 1,3 до 2,9 мкм і великих – від 4,1 до 8,6 мкм, а показник g становить відповідно 0,28, 0,43 і 0,50. Такі незначні його коливання в усіх розмірних групах мієлінових нервових волокон вказують на прямопропорційну залежність між діаметром аксона та товщиною мієлінової оболонки.

Кровоносне русло лицевого нерва складається із двох взаємозв'язаних судинних сіток: епі- та ендоневральної, які мають різну просторову архітектоніку. Магістральні епіневральні судини – джерело артеріол, які проникають у товщу нервового стовбура, поступово розгалужуються та утворюють п'ятикомпонентне ендоневральне гемомікроциркуляторне русло. При цьому внутрішньостовбурові капіляри діаметром 2–10 мкм формують петлі ромбоподібної або полігональної форми, розмір яких варіює у широких межах: від 320,0–540,0 в довжину до 40,0–75,0 мкм в ширину. На площі 1 мм^2 поперечного перерізу нерва нараховується 140,0 ± 9,4 капілярів, сумарна ємність яких

складає 18 664 мкм^3. Капіляри діаметром 1,0–4,0 мкм (12,6%), 4,1–7,0 мкм (56,4%) і більше 7,0 мкм (31,0%) розміщуються у сполучнотканинних прошарках між нервовими волокнами різного діаметра на відстані 42,0–86,0 мкм один від одного. Кожний капіляр забезпечує живлення певної групи нервових волокон разом з їх сполучнотканинним оточенням у радіусі 47,5–67,1 мкм. «Зони васкуляризації» капілярів становлять 6 230,0 мкм^2 і перекривають одна одну, за рахунок чого створюються надійні умови кровопостачання цих груп нервових волокон, особливо тих, які розташовані на віддалі від основного джерела живлення.

На площі васкуляризації кожного гемокапіляра міститься в середньому 68–89 мієлінових і 4–12 безмієлінових нервових волокон. Між кількістю нервових волокон і капілярів існує тісний позитивний кореляційний взаємозв'язок (r = 0,83), який вказує на зростання кількості капілярів за збільшення кількості мієлінових нервових волокон і навпаки.

На 10-ту добу після локального охолодження ділянки проекції лицевого нерва у позачерепній частині окремі мієлінові нервові волокна дрібного та середнього діаметра зазнають периаксональних змін: спостерігається нерівномірність їх фарбування ванслідок набряку та часткового руйнування мієлінової оболонки (рис. 1). Підтвердження цього – їх метричний перерозподіл (зменшення кількості дрібних нервових волокон і збільшення кількості середніх і великих) та зменшення показника g. У претермінальних ділянках рухових аксонів утворюються локальні звуження та варикозні розширення, зменшується площа їх термінальних розгалужень (рис. 2). Під час електронномікроскопічного дослідження виявляється зменшення ширини та довжини активних зон пресинаптичної мембрани, довжини синаптичних контактів, кількості постсинаптичних складок і синаптичних пухирців. Переважна більшість безмієлінових нервових волокон у складі лицевого нерва при цьому залишається інтактною.

У кровоносному руслі у цей термін спостерігається звуження просвіту артеріальних і розширення венозних судин, збільшення кількості функціонуючих артеріоло-венозних анастомозів. Через це зменшується кількість внутрішньостовбурових капілярів та їх сумарна ємкість відповідно на 46,7% (P < 0,001) та 24,3% (P < 0,001), тоді як площа «зон васкуляризації» одним внутрішньостовбуровим капіляром збільшується в середньому на 24,7% (P < 0,001). Це зумовлює збільшення кількості нервових волокон (в 1,4 раза), які припадають на один капіляр; у 2,6 раза збільшується кількість мієлінових нервових волокон, розташованих у цих «зонах».

На 15-ту добу експерименту структурні зміни в ділянці охолодження лицевого нерва поглиблюються. У більшості мієлінових нервових волокон спостерігається виражений набряк мієлінової оболонки, порушення її дрібнокоміркової структури та забарвлення, локальна вакуолізація та деструкція – причина варикозних розширень і оголення аксонів (рис. 3), що підтверджується також електронномікроскопічно.

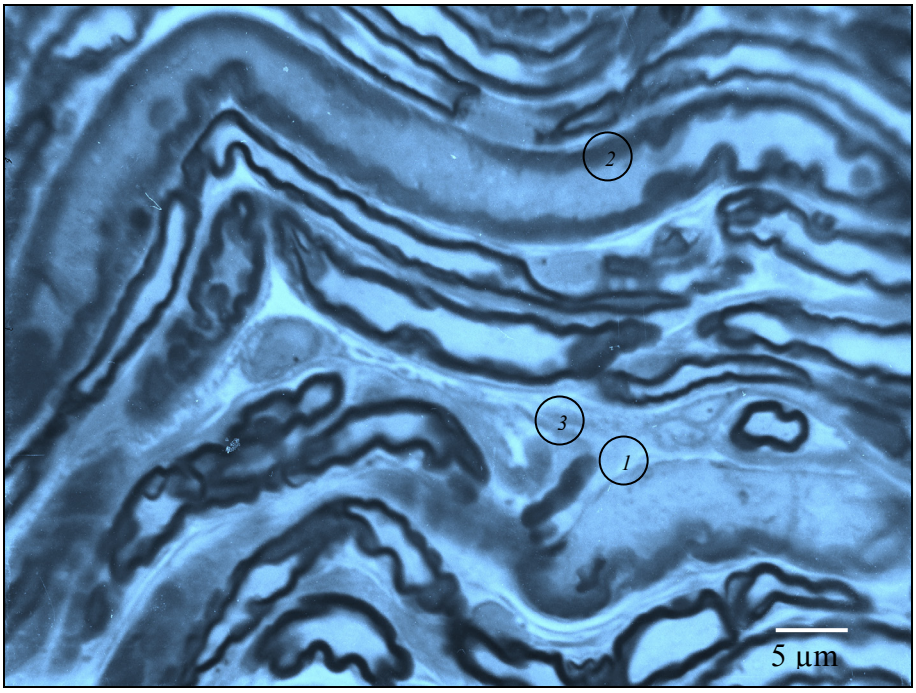


Рис. 1. Патоморфологічні зміни нервових волокон на 10-ту добу експериментальної нейропатії: спостерігаються сегментарна демієлінізація (*1*), розволокнення та варикозні розширення мієлінової оболонки (*2*), локальний набряк ендоневрія (*3*); забарвлення за Кульчицьким

Виявляється помітний набряк і нерівномірна імпрегнація осьових циліндрів не тільки в мієлінових, а й у безмієлінових нервових волокнах. У набряклому ендоневрії методом Маркі виявляються продукти деградації мієліну (ельцгольцівські тільця). Такі зміни гістоструктури нервових волокон більше виражені у пучках, які розміщуються поверхнево. Порівняно з попереднім терміном дослідження ці явища спричиняють ще більше «перекалібрування» метричного розподілу мієлінових нервових волокон: зменшується кількість дрібних і середніх, збільшується – великих мієлінових нервових волокон, за зменшення показника g. Наслідок демієлінізації окремих осьових циліндрів – зменшення загальної кількості мієлінових нервових волокон на площі 1 мм^2 поперечного перерізу нерва (на препаратах, забарвлених за Кульчицьким), тоді як число безмієлінових нервових волокон не змінюється. У претермінальних і термінальних відділах рухових аксонів лицевого нерва також відбувається поглиблення дезінтеграційних процесів. Спостерігаються варикозні розширення та фрагментація окремих претерміналей, на 42,6% зменшується периметр терміналей, тоді як довжина синаптичної щілини зменшується на 73,3%, при цьому руйнуються окремі нервово-м'язові закінчення. Під час електронномікроскопічного дослідження виявляється розширення синаптичної щілини та «вклинювання» цитоплазматичних відростків кінцевих нейролемоцитів, зменшується кількість синаптичних пухирців в аксоплазмі терміналей, частково фрагментується пресинаптична мембрана, а також частково дезінтегруються окремі складки постсинаптичної мембрани.

У цей термін відбувається згущення гемомікроциркуляторної сітки нерва за рахунок розвитку постхолодової паралітичної вазодилятації. При цьому капілярні петлі зменшуються в розмірах до 65–160 х 45–60 мкм, тоді як кількість внутрішньостовбурових гемокапілярів на площі 1 мм^2 поперечного перерізу лицевого нерва збільшується до 156,0 ± 5,3 (P < 0,05). Діаметр просвіту складових частин мікроциркуляторного русла збільшується на 4–20 мкм. У зв'язку з цим відбувається певний метричний перерозподіл внутрішньостовбурових капілярів: значно зменшується кількість дрібних та збільшується – мікросудин середнього та великого діаметра.

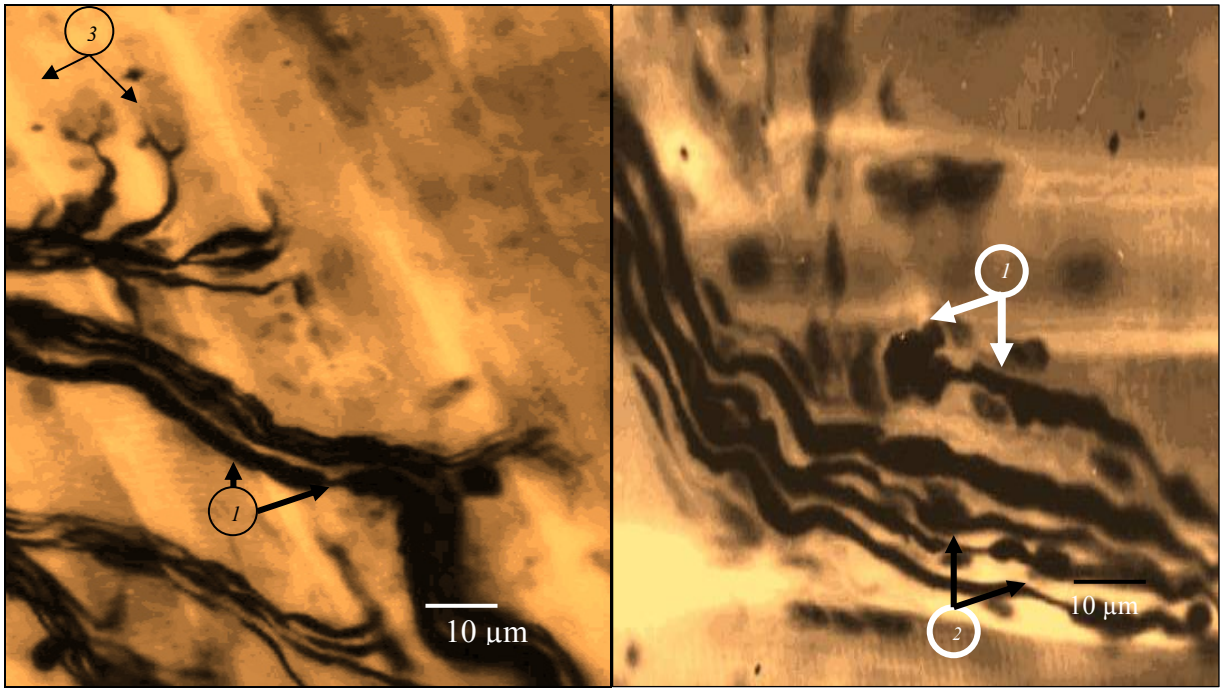


Рис. 2. Патоморфологічні зміни у претермінальних ділянках аксонів на 10-ту (*а*) та 15-ту (*б*) добу експерименту: варикозні розширення (*1*), локальні звуження (*2*), зменшення довжини та площі розгалуження термінальних гілок рухових аксонів (*3*); імпрегнація за Більшовським – Гросс

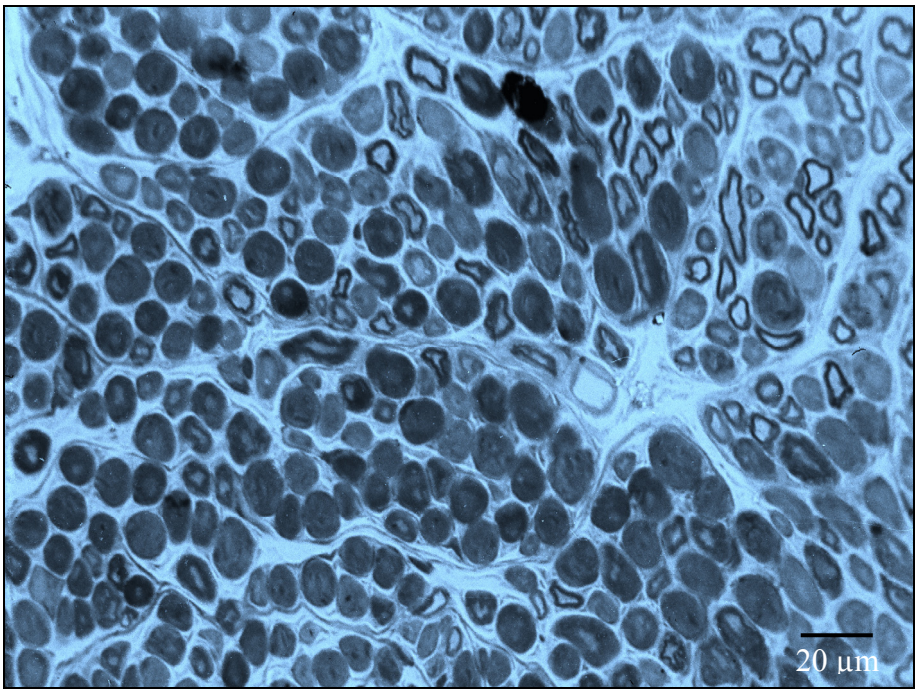


Рис. 3. Патоморфологічні зміни нервових волокон на 15-ту добу експериментальної нейропатії: виражений набряк, розволокнення та дисхромія мієлінової оболонки; забарвлення: за Кульчицьким

Через 30 діб після початку моделювання холодової нейропатії характерне поєднання деструктивних і початкових репаративних процесів у мієлінових нервових волокнах лицевого нерва: мієлінова оболонка більшості з них має різне забарвлення за рахунок чергування ділянок гіпер- і гіпохромної інтенсивності, ламели мієліну розволокнені, виявляються широкі ділянки сегментарної демієлінізації нервових волокон із накопиченням у цитоплазмі нейролемоцитів та ендоневральних макрофагів продуктів розпаду мієліну. Під час електронномікроскопічного дослідження виявляються ділянки оголеної аксолеми, тоді як аксоплазма має підвищену електронну щільність. У цитоплазмі нейролемоцитів спостерігаються фагосоми та

зруйнований мієлін у вигляді π-гранул. Поряд із цим спостерігаються аксони мієлінових нервових волокон, оточені поодинокими шарами мієліну, які свідчать про початок ремієлінізувальних процесів. У цитоплазмі нейролемоцитів, які оточують такі нервові волокна, виявляється збільшена кількість мітохондрій з електроннощільним матриксом і упорядкованими кристами, чітко структурована гранулярна ендоплазматична сітка з великою кількістю прикріплених до її поверхні цистерн рибосом. Більшість безмієлінових нервових волокон, як і в попередні терміни, залишаються інтактними. Під час кількісного та морфометричного аналізу мієлінових нервових волокон виявляється зменшення їх загальної кількості та збільшення серед них числа великих за діаметром волокон, тоді як дрібні та середні волокна ще більше зменшуються порівняно з нормою, а їх кількість зростає порівняно з попереднім терміном ($P < 0,05$). Показник g для дрібних волокон збільшується, однак порівняно з попереднім терміном практично не змінюється для середніх і великих нервових волокон.

У цей термін у претермінальних і термінальних ділянках аксонів відбуваються незначні зрушення: вони майже не відрізняються від структури, яка виявлялася у попередньому терміні досліджень. При цьому аксони мають локальні потоншення, ділянки гіперімпрегнації, варикозні розширення та часткову фрагментацію. Однак зменшується кількість синаптичних пухирців у ділянках активних зон, довжина синаптичних щілин і периметр синаптичних контактів у термінальних відділах аксонів. Синаптичні пухирці концентруються, як правило, поряд із пресинаптичною мембраною, субсинаптична зона містить кристалоподібні включення, тоді як у центральній частині терміналі спостерігається значна кількість нейрофіламентів у стані агрегації. Поряд із цим у мітохондріях пре- та субсинаптичних зон проявляються різні за напрямком адаптаційні зміни: окремі з них мають електроннощільний матрикс і добре контуровані кристи, інші – з просвітленим матриксом і дезінтегрованими кристами. В ядрах окремих нейролемоцитів відбувається каріопікноз.

Основна риса мікроциркуляторного русла лицевого нерва через 30 діб після початку моделювання експериментальної нейропатії – зменшення діаметра просвіту всіх мікросудин, внаслідок чого розріджується ангіоархітектоніка. При цьому відбувається «перекалібрування» внутрішньостовбурових капілярів: збільшується кількість мікросудин середнього калібру і розмір петель гемокапілярної сітки (до 110–230 х 55–80 мкм) та зменшується сумарна ємкість капілярного русла (до 10 295 мм^3). Середній радіус «зони васкуляризації» кожного капіляра становить 42,3 мкм, що на 14,5% менше, ніж до початку експерименту.

На 45-ту добу після локальної холодової травми лицевого нерва відбувається активація відновних процесів: у більшості мієлінових нервових волокон відсутній набряк мієлінової оболонки, вони рівномірно забарвлюються, мають рівні контури, упорядковуються ламели, насічки та вузли (нодуси) мієліну, в ендоневральних макрофагах і цитоплазмі нейролемоцитів виявляється менша кількість продуктів розпаду мієліну, збільшується число ремієлінізованих аксонів, аксоплазма яких містить активовані мітохондрії та упорядковані мікротрубочки. Загальна кількість нервових волокон на площі 1 мм^2 поперечного перерізу нерва підвищується порівняно з попереднім терміном, але все ще залишається нижчою за норму. Відбуваються зміни у метричному складі мієлінових нервових волокон: підвищується кількість дрібних нервових волокон і, навпаки, зменшується кількість великих нервових волокон. Підтвердження цьому – збільшення показника g, особливо у групі дрібних і середніх волокон. Переважна більшість безмієлінових нервових волокон залишається інтактною.

Претермінальні та термінальні ділянки рухових аксонів лицевого нерва у цей термін характеризуються поєднанням деструктивних і репаративних явищ, коли поряд із частково або повністю деструктуризованими нервово-м'язовими закінченнями виявляються заново сформовані закінчення з тонкою структурою їх елементів. На ультраструктурному рівні такі нервово-м'язові закінчення мають відновлені елементи пресинаптичної мембрани, поглиблені складки постсинаптичної мембрани, рівномірне розташування синаптичних пухирців у кінцевих відділах аксоплазми, впорядковані мікротрубочки, сформовані активні синаптичні зони. Для них характерні численні нові функціонально активні аксоплазматичні та саркоплазматичні мітохондрії, відновлення структури кінцевих нейролемоцитів.

Кровоносне русло лицевого нерва у цей термін ще більше розріджується, зменшується, наближається до норми діаметр просвіту мікросудин, особливо артеріальної частини. Через це продовжує збільшуватись кількість дрібних і середніх внутрішньостовбурових капілярів, тоді як число великих зменшується. Збільшуються відстань між сусідніми капілярами та площа їх «зон васкуляризації», розміри капілярних петель також збільшуються. Все це зумовлює зменшення сумарної ємності кровоносного русла нерва, кількості нервових волокон, які розташовані в кожній «зоні васкуляризації» і які припадають на один капіляр ($P < 0,05$).

Через 60 діб із початку моделювання експериментальної нейропатії лицевого нерва його мієло- та ангіоархітектоніка наближаються до таких у нормі. При цьому загальна кількість мієлінових нервових волокон (хоча і не вірогідно – $P > 0,05$) все ж залишається меншою. Менше порівняно з нормою нараховується нервових волокон великого діаметра, тоді як кількість дрібних із тонкою мієліновою оболонкою – більша. Це підтверджує продовження процесів ремієлінізації. Показник g збільшується в усіх розмірних групах нервових волокон. Нейролемоцити таких нервових волокон містять дещо більших розмірів ядро з дисперсно розподіленим хроматином, упорядковані цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки та складові частини пластинчастого апарату Гольджі, функціонально активні мітохондрії, велику кількість рибосом і полісом. В аксоплазмі виявляються збільшена кількість мітохондрій, чітко упорядковані мікротрубочки та нейрофіламенти. Спостерігаються поодинокі мієлінові нервові волокна з розволокненою, войлокоподібною, частково зруйнованою або фрагментованою мієліновою оболонкою, з вираженими «натіканнями» аксоплазми – ознака затримування аксотоку. На ультраструктурному рівні це проявляється дисоціацією ламел мієліну, його гомогенізацією та розпадом. Продукти розпаду накопичуються у фаголізосомах нейролемоцитів і ендоневральних макрофагах. Помітні вакуолізація цитоплазми нейролемоцитів, патологічні зміни їх органел, підвищення осміофільності аксоплазми, виражена дезорієнтація мікротрубочок.

Як і у попередній термін, у товщі мімічних м'язів поряд із деструктивно зміненими пре- та термінальними відділами рухових аксонів лицевого нерва виявляються новоутворені закінчення, кількість яких порівняно з попереднім терміном збільшується. Зростає також площа таких нервово-м'язових закінчень, але вона менша на 25–30% за нормальні величини цих структур. На електронномікроскопічному рівні композиція таких новоутворених нервово-м'язових закінчень не відрізняється від норми, але все ще менша довжина пресинаптичної мембрани, кількість і глибина складок постсинаптичної мембрани, число синаптичних пухирців, ще не повністю сформовані активні зони синапсів.

У кровоносному руслі лицевого нерва у цей термін зберігається тенденція до зменшення просвіту його складових частин. При цьому діаметр просвіту судин артеріальної частини не вірогідно відрізняється від норми, тоді як його венозна частина залишається ще розширеною. Морфометрично встановлено зменшення кількості великих та збільшення дрібних і середніх внутрішньостовбурових капілярів, збільшення середнього радіуса та площі зони кровопостачання кожного з них, зменшення сумарної ємкості кровоносного русла. При цьому кількість нервових волокон, які припадають на один гемокапіляр, та їх

число, яке розміщується в кожній із «зон васкуляризації», наближається до норми. Між кількісним і якісним складом нервових волокон і капілярів відновлюється тісний кореляційний зв'язок (r = 0,75–0,82), що свідчить про наближення основних характеристик мієло- та ангіоархітектоніки до вихідних показників.

Отже, в ранні терміни після локальної холодової травми (10–30-та доба) у структурних компонентах (нервовопровідниковому та судинному) лицевого нерва та нервово-м'язових закінченнях у мімічних м'язах переважають набрякові та дистрофічно-деструктивні процеси, а у віддалені терміни (45–60-та доба) у цих структурах превалюють регенераційно-відновні явища. У м'язових волокнах також відбуваються патоморфологічні зміни, які підтверджуються кількісними показниками. Морфометричний аналіз показав, що на площі 1 мм^2 препаратів мімічних м'язів збільшується загальна кількість капілярів середнього (d = 4–7 мкм) та великого (d > 7 мкм) діаметрів: відповідно на 45,1% і 52,3% (P < 0,05). За рахунок розкриття резервних капілярів стає густішим внутрішньом'язове кровоносне русло. У відповідь на це підвищується площа поперечного перерізу сполучнотканинних прошарків, збільшується кількість гістіоцитів і тканинних базофілів.

Одночасно зменшується площа розгалужень термінальних гілок рухового аксона, які утворюють пресинаптичний полюс нервово-м'язових закінчень (табл.).

Таблиця

Зміна площі розгалуження термінальних гілок рухового аксона в різні терміни від початку моделювання нейропатії лицевого нерва (x ± SE)

Тривалість експерименту, діб	Площа розгалужень, мкм^2		P	%
	контроль	експеримент		
10	239,6 ± 3,8	206,3 ± 10,2*	<0,001	14,1
15	366,1 ± 1,8	297,1 ± 11,3*	<0,01	18,8
30	573,7 ± 36,3	198,2 ± 21,5**	<0,01	65,4
60	386,5 ± 10,2	156,7 ± 18,6*	<0,01	59,4

Примітки: * – P < 0,05, ** – P < 0.01 вірогідність показників порівняно з попереднім етапом експерименту; P – відмінності між експериментом і контролем.

Обговорення

Комплексний аналіз будови нервових волокон і васкуляризації лицевого нерва кроля в нормі та під час холодової нейропатії дав можливість виявити назку загальних, морфометрично обґрунтованих, структурних і морфофункціональних рис, які мають теоретико-практичне значення. Співставляючи дані наших досліджень і відомості літератури, слід зауважити, що кількість нервових волокон на різних рівнях лицевого нерва пов'язана, перш за все, з ускладненням його плексусної будови, онто- та філогенетично зумовлена (Cohen et al., 2015; Craig and Stone, 2015). Ми встановили, що в лицевому нерві кроля число мієлінових нервових волокон коливається; це спостерігали також інші дослідники, які вивчали мієлоархітектоніку лицевого нерва та інших периферичних нервів тварин і людини (Azizzadeh et al., 2014; Fayad and Linthicum, 2014; Reina et al., 2015).

Обчисливши показник g (співвідношення діаметра аксона до товщини цілого мієлінового волокна) в усіх групах нервових волокон, ми відзначили їх зменшення відповідно до зростання діаметра волокна (0,52–0,56 для дрібних і 0,38–0,48 для великих нервових волокон). Це свідчить про прямо пропорційний зв'язок між діаметром аксона та товщиною мієлінової оболонки, на що вказують також інші автори (Popel', 2017).

Для розкриття патоморфологічних механізмів формування пошкоджень на тканинному та клітинному рівні значний інтерес являє вивчення адаптаційних реакцій організму за допомогою інформаційного аналізу (Craig and Stone, 2015). Тільки окремі автори присвятили свої дослідження вивченню інформаційних показників нервових волокон під час пошкодження периферичних нервів (Popel', 2017). Провівши інформаційний аналіз метричного розподілу нервових волокон і внутрішньостовбурових капілярів на матеріалі власного дослідження, ми встановили, що дві інформаційні підсистеми (нервоволоконна та гемокапілярна) перебувають у тісному позитивному кореляційному взаємозв'язку та взаємозалежності (r = 0,86), що свідчить про взаємозумовленість мієло- та ангіоархітектоніки лицевого нерва.

Це проявляється закономірними змінами кровоносного русла вже на ранніх термінах експерименту, коли спостерігається звуження просвіту артеріальних і розширення венозних судин, збільшення кількості функціональних артеріо-венозних анастомозів. Як і інші автори (Tuhrim, 2016; Hamel and Logigian, 2017), ми стверджуємо, що спазм артерій викликає зменшення кількості внутрішньостовбурових капілярів, що стає причиною зменшення сумарної ємності кровоносного русла.

Зміни, які відбуваються в основних компонентах нервового стовбура за дії локального охолодження, мають фазовий характер, що підтверджує відомості, отримані Feuerstein (2008).

У першій фазі (до 10 діб) відбувається спазм усіх ланок МЦР як епі-, так і ендоневрія, який змінюється у подальшому різким розширенням переважно капілярів і венулярного відділу МЦР. Враховуючи думку Plotnikov et al. (2016), механізм цих змін можна пояснити таким чином: холод, діючи на рецепторні закінчення шкіри, викликає біль, який, у свою чергу, спричинює спазм судин. Власне спазм судин зумовлює виникнення ішемії, що викликає спазм і біль. Таким чином, коло замикається, а постійна аферентна імпульсація досягає підкоркової ділянки, яка, відповідаючи виділенням надлишку адреналіноподібних речовин, викликає негайний спазм судин, тим самим підтримуючи ішемічний стан тканин. Гостре охолодження спричиняє також мобілізацію ендогенних катехоламінів (Keith, 2007). У другій фазі відбуваються порушення окисно-відновних процесів, дистрофічні зміни тканин і параліч вазомоторного апарату, що проявляється різким розширенням просвіту судин, втратою тонусу їх стінки. Патофізіологічними дослідженнями доведено, що за ішемії та гіпоксії судинна стінка стає дуже податливою (Abramowitz and Gertz, 2007; Boissaud-Cooke et al., 2015; Lemaster et al., 2017). Третя фаза стійкіша, зумовлена повільними темпами відновних процесів. Popel' (2017) показав, що на такому фоні площа «зон васкуляризації» одним внутрішньостовбуровим капіляром, навпаки, збільшується, що, за нашими даними, викликає збільшення в 1,4 раза кількості нервових волокон, які припадають на один капіляр, і в 2,6 раза – волокон, розташованих у цих «зонах васкуляризації». На думку Zheng et al. (2012), збільшення чисельності функціонуючих артеріо-венозних анастомозів зумовлене дією вазоактивних речовин (неспецифічні метаболіти, гістамін, серотонін, кінини), що у великій кількості утворюються під час холодової травми (Keith, 2007).

За даними Wagner et al. (2008) і Tracz et al. (2015), підвищене скидання артеріальної крові у вени через артеріо-венулярні анастомози спричиняє зменшення артеріо-венозного градієнта концентрації кисню, порушення окисно-відновних процесів і розвиток ацидозу в навколишніх тканинах, до якого чутливіші мієлінові порівняно з безмієліновими нервовими волокнами.

Таким чином, найбільше виражений компонент реакції на холод – судинна реакція зі змінами стану гістогематичного бар'єру. Як вказують Abramowitz and Gertz (2007), через зменшення тонусу судинної стінки судини мікроциркуляторного русла переповнюються кров'ю, що зумовлює виникнення венозно-капілярного стазу. Це може відбуватися під час зміни реологічних властивостей крові за рахунок підвищення в'язкості крові та зниження дисперсності еритроцитарного потоку за підвищеної фільтрації фракції дрібномолекулярних білків. Порушення проникності судинної стінки, як відомо з праць Aman et al. (2016) і Popel' (2017), – найперший і один із ранніх проявів патології периферичних нервів. У зв'язку зі збільшенням кількості внутрішьостовбурових капілярів відстань між

ними та радіус їх кровопостачання зменшуються, що викликає звуження «зон васкуляризації» кожного з них і зменшення числа нервових волокон у їх межах. Такі перетворення, на нашу думку, через підвищений стаз крові погіршують трофіку нервових волокон.

Зміни в ангіоархітектоніці нерва, пов'язані зі зменшенням на 14,5% середнього радіуса «зони васкуляризації» кожного капіляра, викликають зменшення кількості нервових волокон, які припадають на один капіляр і розташовуються в зоні їх васкуляризації. Тривала венозна гіперемія та стаз зумовлені, на думку багатьох авторів (Achiron and Miron, 2007; Gitik et al., 2011; Zheng et al., 2012), затриманням продуктів розпаду мієліну та закисленням середовища. При цьому виявляється закономірне підвищення концентрації кінінів, які викликають парез аретріол, підвищення проникності судин, порушують місцеві ферментативні системи та підвищують чутливість тканин до кисневого голодування (Aman et al., 2016). За словами В. П. Котельникова (Popel', 2017), «трагедія тканин у ділянці охолодження полягає в тому, що вони не утилізують навіть той кисень, який до них надходить». Саме це пояснює весь спектр морфологічної перебудови, що відбувається у мієлінових нервових волокнах до 30-ї доби експерименту.

Виявлені зміни, що відбуваються у метричному складі мієлінових нервових волокон (підвищення кількості дрібних нервових волокон), можна пояснити не тільки усуненням набряку через 45 діб після початку моделювання експериментальної нейропатії, а й активацією ремієлінізувальних процесів, тоді як зниження числа великих нервових волокон відбувається внаслідок зменшення їх набряку. Подібні результати знаходимо у працях інших авторів (Hellwig, 2002; Cohen et al., 2015; Popel', 2017), які досліджували метричний розподіл мієлінових нервових волокон за нейропатій в інших периферичних нервах.

Поряд із нервовими волокнами через 10 діб після початку експерименту в мімічних м'язах спостерігається розширення артеріол, прекапілярів і капілярів, пов'язане, на думку окремих дослідників (Zheng et al., 2012; Lomako et al., 2016; Plotnikov et al., 2016), із розвитком паралітичної вазодилатації після холодової травми. За ходом нервових волокон спостерігаються варикозоподібні потовщення, що чергуються з потоншеннями.

Такі зміни нервових волокон, як це доведено Mumtaz and Jensen (2014), Tuhrim (2016), Hamel and Logigian (2017), – результат не тільки їх безпосереднього ушкодження холодовим фактором, а й впливу механічного подразнення (компресія розширеними кровоносними судинами та навколишніми тканинами, які перебувають у стані локального набряку, а також внаслідок розтягування та розшарування міжм'язових сполучнотканинних прошарків). Оскільки тварин цієї серії досліду досліджували в ранній термін, в який ще не могло відбутися суттєвих органічних змін внутрішньої структури нервових волокон, виникнення їх локальних потовщень і потоншень у даному випадку можна розглядати як результат дії на нерв винятково змін, що відбуваються в навколишніх м'язах (Popel', 2017). При цьому частина нервових волокон за впливу набряку переміщується в менш стиснені ділянки нерва. Перебудови нервово-м'язових закінчень у цих тварин ще не спостерігається.

Через 15 діб після початку моделювання експериментальної нейропатії у м'язових і нервових елементах мімічних м'язів відбуваються значні структурні зміни, а їх різноманіття, характер і ступінь вираженості окремі автори (Plotnikov et al., 2016) пояснюють неоднаковою стійкістю різних нервово-м'язових елементів до холодової травми. У кінцевих гілках лицевого нерва, які інневрвують мімічні м'язи за впливу локального набряку, розвиваються три процеси: явище подразнення, структурна перебудова за типом деструкції та дегенеративні зміни частини нервових волокон (Smith et al., 2012). Ознаки подразнення нерва, як і в попередній термін досліду, відбуваються в результаті компресії та розтягування, які, за даними Hamel and Logigian (2017), закономірно розвиваються у паралізованих м'язах.

Крім цього, явища локального подразнення викликають також продукти метаболізму, які нагромаджуються у м'язах (Achiron and Miron, 2007; Keith, 2010). За значно вираженої дії цих чинників може відбуватися не тільки переміщення нейроплазми в менше стиснені місця та утворення тут сегментарних потовщень і натікань, не виключається також, що це деякою мірою спричинює дегенерацію термінальних ділянок. Підтвердження цьому – експерименти, які проводив Popel' (2017). За тривалої гіпокінезії та нейропатії він спостерігав однотипні зміни у вигляді дрібнозернистого розпаду терміналей нервових волокон і дегенерацію нервово-м'язових закінчень.

За вимушеної фізичної бездіяльності – гіпотрофія м'язових волокон, поздовжнє розщеплювання м'язових пучків I і II порядку, зміна хімізму мімічних м'язів та їх кровообігу (Boissaud-Cooke et al., 2015; Lemaster et al., 2017), а також сам факт холодової дії стають поштовхом до спраутингу складових елементів нервової системи м'язів.

Необхідність кращого проведення нервових імпульсів на м'яз під час деінервaційної гіпокінезії реалізується різними шляхами. Перш за все, перебудовуються претермінальні ділянки нервових волокон, які, як відомо з праці Ali et al. (2015), стають найлабільнішою частиною аксона. Відбувається набухання претерміналей, що супроводжується погіршенням проведення імпульсу та полегшує функцію центральної нервової системи. Крім того, змінені нервово-м'язові закінчення не здатні реалізувати медіатор, що акумулюється у претермінальній ділянці, чим і пояснюється виникнення у претермінальних ділянках сильновираженних натікань аксоплазми. Це, у свою чергу, також стимулює деструкцію рухових нервових закінчень. Під час мікроскопічного дослідження нервово-м'язових закінчень кругового м'яза рота через 15 діб експерименту встановлено, що у претермінальних ділянках утворюються варикозні розширення мієлінових нервових волокон. Змінюється також площа розгалуження термінальних гілочок рухового аксона (табл.).

Через 30 діб після початку моделювання нейропатії лицевого нерва спостерігається проліферація кінцевих елементів існуючих рухових нервових закінчень, яка здійснюється за двома типами: примітивнішому – телодендрій і досконалому – нервово-м'язових закінчень. У першому випадку спостерігається сильне розростання терміналей уздовж м'язових волокон, де вони утворюють досить розгалужені сплетення. Часто в таких випадках на кінцях терміналей зустрічаються колби росту. Проліферація рухових нервових закінчень другого типу полягає у тому, що збільшується кількість термінальних гілочок і ядер шванівських клітин (нейролемоцитів). Іноді в таких нервово-м'язових закінченнях виявляють 15 і більше ядер. Ядра мають різний ступінь забарвлення від ясно-жовтого до темно-коричневого та навіть чорного кольору (якщо не проводилося золочення препарату), що свідчить про їх різну зрілість (Popel', 2017). Отже, нервові елементи, менш імпрегновані, молодші порівняно із сильніше імпрегнованими структурами, що зустрічаються на цьому ж препараті.

Часто ми спостерігали також іннервацію одного м'язового волокна двома різними руховими нервовими волокнами, що дещо рідше зустрічаються в нормі (Hellwig, 2002; Reina et al., 2015).

У низці випадків спостерігали двократний дихотомічний спраутинг нервового волокна у претермінальній ділянці, внаслідок чого нервове волокно іннервує два, три та навіть чотири м'язові волокна. Факт іннервації одним нейроном великої кількості м'язових волокон відомий. Але в цьому випадку бачимо перебудову претермінальної ділянки нервового волокна за денервaційної бездіяльності. Доказ цього – наявність ще не цілком сформованих рухових нервових закінчень і колб росту на кінцях деяких колатеральних гілок. Зустрічалися також випадки, коли на одному м'язовому волокні руйнувалися власні нервово-м'язові закінчення, і до нього направлялася термінальна гілочка, яка проростала за його межі від сусіднього м'язового волокна. Тут вона утворювала нове рухове нервове закінчення.

Якщо зміни у нервових волокнах тривають 60 діб, то велика кількість м'язових волокон піддається деструкції, а розміри значної частини нервово-м'язових закінчень зменшуються (табл.). Деякі з них зменшуються в розмірах, їх ядра сильно імпрегнуються. Часто зустрічається гіперімпрегнація нервово-м'язових закінчень, а деякі з них піддаються деструкції, до якої залучається також частина нервових волокон. Щодо стану нейролемоцитів в умовах нейропатії, вони проявляють свою реакцію досить одноманітно. Цитоплазма цих клітин набухає. В ядрах виявляються аргірофільні зерна, які іноді розплавляються, в результаті чого все ядро набуває суцільного темного забарвлення. Лише у випадках важкої хронічної нейропатії відбувається грудочковий розпад ядер окремих нейролемоцитів.

Оцінюючи питому вагу прогресивних і регресивних морфологічних перетворень у м'язах і наявність стійких структурних змін під час експериментальної нейропатії (включаючи випадки важкого хронічного рецидивування), можна відзначити деяку перевагу регресивних явищ. За нашими даними та результатами досліджень інших авторів (Azizzadeh et al., 2014; Fayad and Linthicum, 2014; Popel', 2017), під час тривалого деструктивного процесу в м'язових волокнах ми можемо стверджувати, що за таких умов відбувається не тільки перебудова, а й адаптація до нових умов діяльності всіх нервових і судинних елементів периферичного нерва.

Погіршення умов утилізації кисню та тканинного метаболізму – причина тривалого субкритичного набряку ендоневрія, сповільненого відновлення структури мієлінових нервових волокон та їх кінцевих закінчень – субстрату для можливих рецидивів нейропатії лицевого нерва (Zheng et al., 2012).

Висновки

За морфометричними параметрами лицевий нерв кроля складається з 2–6 основних пучків із середнім вмістом 9 278 ± 341 нервове волокно. Волоконний склад пучків на всіх рівнях схильний до значних індивідуальних коливань. Більшість мієлінових нервових волокон (54,6%) належить до групи великих волокон (d > 7,0 мкм) з унімодальним характером розподілу. Кількість капілярів складає в середньому 140,0 ± 3,9. У ділянці локального охолодження лицевого нерва відбуваються фазові зміни компонентів внутрішньостовбурового мікроциркуляторного русла та структури мієлінових нервових волокон із порушенням будови компонентів сполучнотканинних оболонок нерва. Виділено три фази динаміки холодової нейропатії: а) реактивно-дистрофічних змін із максимальною вираженістю на 10-ту добу досліду; б) деструктивно-відновних процесів, що починаються з 15-ї доби досліду; в) компенсаторно-адаптаційна із залишковими явищами, яка розвивається після 30-ї доби досліду. Вплив локального переохолодження знаходить певний морфологічний прояв у зміні структури всіх компонентів нейромоторних одиниць мімічних м'язів, які характеризуються якісними та гістометричними змінами. У процесі розвитку експериментальної холодової нейропатії відбувається структурно-пристосувальна перебудова нервово-м'язових закінчень, яка залежить від терміну спостереження та відображає функціонування мімічного м'яза.

References

Abramowitz, H. B., & Gertz, S. D. (2007). Guideline for prevention of venous stasis. AORN Journal, 85(3), 607–624.

Abramowitz, H. B., & Gertz, S. D. (2007). Venous stasis, deep venous thrombosis and airline flight: Can the seat be fixed? May Annals of Vascular Surgery, 21(3), 267–271.

Achiron, A., & Miron, S. (2007). Myelin associated antibodies: Myelin-associated glycoprotein autoantibodies, myelin basic protein autoantibodies and myelin proteolipid autoantibodies in neurologic diseases. Autoantibodies, 619–626.

Ali, Z. S., Heuer, G. G., & Zager, E. L. (2015). Nerve compression / entrapment sites of the upper limb. In: Nerves and nerve injuries. Raven Press, New York. pp. 725–753.

Aman, J., Weijers, E. M., Amerongen, G. P. van N., Malik, A. B., & van Hinsbergh, V. W. M. (2016). Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities Amerian Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 311(2), 453–466.

Azizzadeh, B., Kulbersh, J. S., & O'Connell, B. P. (2014). Facial nerve paralysis examination. In: The facial nerve. Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart. pp. 345–367.

Boissaud-Cooke, M., Pidgeon, T. E., & Tunstall, R. (2015). The microcirculation of peripheral nerves. In: Nerves and nerve injuries. Raven Press, New York. pp. 507–523.

Cohen, J. A., Guardia, C. F., Mowchun, J. J., & Stommel, E. W. (2015). Demyelinating diseases of the peripheral nerves. In: Nerves and nerve injuries. Raven Press, New York. pp. 895–934.

Craig, W., & Stone, J. (2015). Information and phylogenetic systematic analysis. Information, 6(4), 811–832.

Fayad, J. N., & Linthicum Jr., F. H. (2014). Histopathology of facial nerve disorders. In: The facial nerve. Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart. pp. 22–25.

Feuerstein, T. J. (2008). Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. Handbook of Experimental Pharmacology, 289–338.

Gitik, M., Liraz-Zaltsman, S., Oldenborg, P. A., Reichert, F., & Rotshenker, S. (2011). Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD_{47} on myelin and SIRPα (signal regulatory protein-α) on phagocytes. Journal of Neuroinflammation, 8(24), 344–352.

Hamel, J., & Logigian, E. L. (2017). Acute nutritional axonal neuropathy. Muscle and Nerve, 122(7), 34–39.

Hellwig, B. (2002). Cyto- and myeloarchitectonics. Conceptual advances in brain research. In: Nerves and nerve injuries. Raven Press, New York. pp. 15–28.

Keith, J. M. (2007). Dual serotonin transporter / histamine H_3 ligands: Optimization of the H_3 pharmacophore. ChemInform, 38(22).

Keith, J. M. (2010). Serotonin (5-HT2A) receptor; histamine H_1 receptor (HRH1). Science-Business eXchange, 3(43).

Lemaster, M., Pidgeon, T. E., & Tunstall, R. (2015). The microcirculation of peripheral nerves. In: Nerves and nerve injuries. Raven Press, New York. pp. 507–523.

Lomako, V., Shylo, A., Babijchuk, G., Samokhina, L., & Malaya, L. T. (2016). Craniocerebral hypothermia stimulates reactions of limited proteolysis in rat tissues. Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 26(3), 238–248.

Mumtaz, S., & Jensen, M. B. (2014). Facial neuropathy with imaging enhancement of the facial nerve: A case report. Future Neurology, 9(6), 571–576.

Nanba, R., Fujita, N., & Nagata, S. (2010). Structure and expression of myelin basic protein gene products in *Xenopus laevis*. Gene, 459, 32–38.

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.

Plotnikov, G. P., Galimzyanov, D. M., Shukevich, D. L., Matveeva, V. G., & Grigoriev, E. V. (2016). Therapeutic hypothermia as a method for prevention of multiple organ failure in critically ill patient. Fundamental and Clinical Medicine, 1(3), 14–23.

Popel', S. L. (2017). Structural changes in skeletal muscles in hypokinesia and physical loading in the posthypokinetic period of rats organism restoration. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 58–65.

Reina, M. A., Sala-Blanch, X., Arriazu, R., & Machés, F. (2015). Microscopic morphology and ultrastructure of human peripheral nerves. In: Nerves and nerve injuries. Raven Press, New York. pp. 91–106.

Smith, P. M., Gonçalves, R., & McConnell, J. F. (2012). Sensitivity and specificity of MRI for detecting facial nerve abnormalities in dogs with facial neuropathy. Veterinary Record, 171(14), 349–349.

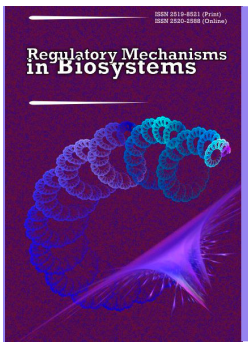
Tracz, E., Zamojska, E., Modrzejewski, A., Zaborski, D., & Grzesiak, W. (2015). Quality of life in patients with venous stasis ulcers and others with advanced venous insufficiency. Holistic Nursing Practice, 29(2), 96–102.

Tuhrim, S. (2016). Vascular diseases. In: Mount Sinai Expert Guides: Neurology. John Wiley & Sons, Ltd., 220–240.

Wagner, O. F., Nowotny, P., Vierhapper, H., & Waldhäusl, W. (2008). Plasma concentrations of endothelin in man: Arterio-venous differences and release during venous stasis. Clinical Investigation, 20(5), 502–505.

Watanabe, T., & Suzuki, M. (2016). Equilibrium test findings in patients with Bell's palsy. Auris Nasus Larynx, 33(2), 143–147.

Zheng, Y., Chen, J., Craven, M., Choi, N. W., Totorica, S., Diaz-Santana, A., Kermani, P., Hempstead, B., Fischbach-Teschl, C., López, J. A., & Stroock, A. D. (2012). *In vitro* microvasculature network model. Science-Business eXchange, 5(25), 111–120.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 577–582
doi: 10.15421/021789

The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures

I. M. Kozlovska*, N. Y. Romanjuk**, L. M. Romanjuk**,
M. D. Kukhtyn***, Y. V. Horiuk****, G. V. Karpyk***

**Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine*
***I. Y. Horbachevsky Ternopil State Medical Universi, Ternopil, Ukraine*
****Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine*
*****State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Ukraine*

Article info

Received 08.10.2017
Received in revised form 14.11.2017
Accepted 16.11.2017

Bukovinian State Medical University, Theatralna sq., 2, Chernivtsi, 58002, Ukraine.
Tel.: +38-050-670-59-13
E-mail: irkakim5@gmail.com

I. Horbachevsky Ternopyl State Medical University, m. Voli, 1, Ternopil, 46001, Ukraine.
Tel.: +38-097-854-87-81
E-mail: fedchyshyn@tdmu.edu.ua

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ruska st., 56, Ternopil, 46001, Ukraine.
Tel.: +38-097-239-20-57
E-mail: kuchtynnic@gmail.com

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Schevchenko st., 13, Kamianets-Podilskyi, 32300, Ukraine.
Tel.: +38-097-661-79-64
E-mail: goruky@ukr.net

Kozlovska, I. M., Romanjuk, N. Y., Romanjuk, L. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Karpyk, G. V. (2017). The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 577–582. doi:10.15421/021789

The microorganisms that are formed in biofilm cause about 60% of chronic and recurrent diseases, and as a consequence, traditional etiotropic antibacterial therapy is ineffective. Chronic anal fissures are also a disease which is caused by biofilm forms of bacteria, has a chronic course and is difficult to treat. The sensitivity of planktonic and biofilm forms of bacteria isolated from chronic anal fissures to antibacterial drugs was determined and the method of degradation of biofilm by electrophoresis for the effective treatment of fissures was developed. It was found that the most effective antibiotics against planktonic forms of bacteria were cephalosporins III and IV generations: cefepime, cefoperazone and ceftazidime. Exceptionally, only bacteria of the genus *Enterococcus*, which were sensitive to ceftazidime, were found to be 38.9%. The sensitivity of the bacteria to Furamag was from 60.0% to 100.0%, and only *P. aeruginosa* exhibited resistance in 100.0% of the studied cultures. The number of sensitive to gatifloxacin strains of *P. aeruginosa* and *Enterobacter* spp. was 71.4%, all other isolated bacteria were sensitive to this preparation from 77.8% to 100.0%. Among the five studied antiseptics (chlorhexidine, decasan, octinisept, povidone iodine, dioxidine), the greatest antimicrobial activity was found in dioxidine and betadine (povidone iodine) solutions, the sensitivity of the microflora was from 60.0% to 100.0%. We found that the most protected biofilm matrix was *P. aeruginosa* and *Enterococcus* spp. We found that the antibiotic which had the best effect on cells in biofilm was fluoroquinoione gatifloxacin. After its influence on the biofilm *P. aeruginosa* and *Enterococcus* spp., the number of living cells didn't exceed lg 1.5 ± 0.02 CFU/cm^2 in the area of the biofilm, and *S. aureus* and *E. coli* cells were completely inactivated. After the influence of other antibiotics, the number of microbial cells that survived in the biofilm did not exceed lg 2.9 ± 1.6 CFU/cm^2 of the area. It was found that after the action of dioxin, the amount of viable microbial cells was up to lg 2.9 ± 1.7 CFU/cm^2 of biofilm area. Antiseptics: octine septum, ranopost, decaSan and chlorhexidine exhibited less strong bactericidal action on cells in biofilms, and the number of bacteria that survived after their action ranged from 2.9 ± 1.8 to lg 3.7 ± 2.1 CFU/cm^2 of biofilm area. We propose using solution "Dioxysol-Darnitsa" (active substance dioxidine) for local treatment of patients with chronic anal fissures for intracutaneous electrophoresis of the fissure. We established that under the influence of electrophoresis at a current of 0.05–0.10 mA/cm^2 of the area of the biofilm with dioxidine, bacteria were not isolated. This indicates on the destruction of the matrix and the effective contact of dioxidine with microbial cells and the manifestation of bactericidal action. Consequently, laboratory microbiological studies indicate that the use of electrophoresis with dioxysole in the treatment of chronic anal fissures is promising.

Keywords: antibiotics; antiseptics; sensitivity; biofilm; electrophoresis; anal fissures

Вплив антимікробних препаратів на планктонні та біоплівкові форми бактерій, виділені з хронічних анальних тріщин

І. М. Козловська*, Н. Є. Романюк**, Л. М. Романюк**,
М. Д. Кухтин***, Ю. В. Горюк****, Г. В. Карпик***

**Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна*
***Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна*
****Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя, Тернопіль, Україна*
*****Подільський державний аграрно-технічний університет, Кам'янець-Подільський, Україна*

Визначено чутливість планктонних та біоплівкових форм бактерій, виділених із хронічних анальних тріщин, до антибактеріальних препаратів, розроблено спосіб деградації біоплівки електрофорезом для ефективного лікування дефекту слизової оболонки. Найефективнішими з антибіотиків на планктонні форми бактерій виявилися цефалоспорини III і IV покоління: цефепім, цефоперазон і цефтазидим. Із п'яти досліджених антисептиків виявлено найбільшу протимікробну дію розчину діоксидину та розчину бетадину (повідонйод): чутливість мікрофлори становила 60–100%. Із досліджених антибіотиків найкраще впливає на клітини біоплівки гатифлоксацин. Після його дії на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterococcus* spp. кількість живих клітин не перевищувала lg 1,5 ± 0,02 КУО/см^2 площі біоплівки, а клітини *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* повністю інактивовані. Після впливу інших антибіотиків кількість мікробних клітин, що вижили у біоплівці, не перевищувала lg 2,9 ± 1,6 КУО/см^2 площі. Після дії діоксидину кількість життєздатних мікробних клітин становила до lg 2,9 ± 1,7 КУО/см^2 площі біоплівки. Запропоновано для місцевого лікування хворих на хронічні анальні тріщини та для внутрішньотканинного електрофорезу тріщин використовувати розчин «Діоксизоль-Дарниця» (діюча речовина діоксидин). Під час електрофорезу силою струму 0,05−0,10 мА/см^2 площі біоплівки з діоксидином бактерій не виділено. Це вказує на руйнування матриксу та добрий контакт діоксидину з мікробними клітинами та прояв бактерицидної дії.

Ключові слова: антибіотики; антисептики; чутливість; біоплівка; електрофорез; анальні тріщини

Вступ

Нині проблема боротьби із септичними запальними захворюваннями, які мають хронічний перебіг, досить актуальна, оскільки вони спричиняються мікроорганізмами у біоплівці, а традиційна етіотропна антибактеріальна терапія малоефективна (Zhao et al., 2013; Penesyan et al., 2015; Banin et al., 2017; Vorobey et al., 2017). Це пов'язано з тим, що мікроорганізми у біоплівці в 10–100 разів стійкіші до антибактеріальних препаратів за свої планктонні форми (Hoiby et al., 2010; Fuente-Nunez et al., 2013; Manavathu et al., 2014; Kukhtyn et al., 2017). У науковій літературі описано низку чинників, які відповідають за резистентність біоплівкових форм бактерій до антибіотиків. Бактерії у біоплівці мають знижений метаболізм і сповільнену швидкість росту клітин, внаслідок чого антимікробні препарати дифундують із біоплівки швидше, ніж досягається їх дія (Weigel et al., 2007; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). У біоплівці відбувається інактивація антибіотиків позаклітинними полімерами та ензимами та формування за впливом антимікробних препаратів клітин-персистерів (Gostev and Sidorenko, 2010). Також бактерії у біоплівці можуть обмінюватися плазмідами, які містять гени, що відповідають за їх резистентність до антибіотиків (Hall-Stoodley et al., 2004; Atkinson and Williams, 2009; Flemming and Wingender, 2010; Van Acker et al., 2014). Екзополісахариди матриксу біоплівки перешкоджають фагоцитарній активності макрофагів, внаслідок чого фагоцити не діють на бактерії, сформовані у біоплівки (Mah and O'Toole, 2001; Percival et al., 2012; Soto, 2013).

Нині достовірно встановлено роль біоплівок у розвитку понад 60% хронічних або рецидивуючих захворювань, в патогенезі яких бере участь мікробний чинник (Sanchez et al., 2013). Для мікроорганізмів перебування у стані біоплівки, який характеризується прикріпленням до будь-якої поверхні, що омивається – базова властивість, яка виробилася впродовж мільйонів років за впливу природного відбору та змінних екологічних чинників (Atkinson and Williams, 2009; Bessa et al., 2015). Тому нині науковці вважають, що ефективність будь-якого антимікробного препарату чи способу лікування слід перевіряти на адгезованих мікроорганізмах і вважати ефективними ті концентрації (дози), які діють бактерицидно на більшість бактерій у біоплівках, а не на планктонні їх форми (Levis, 2001; Cooper et al., 2014; Kukhtyn et al., 2017).

До захворювань, які мають хронічний перебіг і важко лікуються, відносять хронічні анальні тріщини (ХАТ) (Ebinger et al., 2017; Stewart et al., 2017; Wienert et al., 2017). Проте наразі дослідники недостатньо звертають увагу на роль біоплівкових форм бактерій у виникненні ХАТ. Тому вивчення видового складу мікрофлори ХАТ, здатність ізольованих бактерій формувати біоплівки та розроблення ефективних методів терапевтичного впливу на біоплівки – ключові питання лікування цієї патології.

Мета дослідження – визначити чутливість планктонних і біоплівкових форм бактерій, виділених із ХАТ, до антибактеріальних препаратів і розробити спосіб деградації біоплівки електрофорезом для ефективного лікування тріщин.

Матеріал і методи досліджень

Виділення та ідентифікація мікроорганізмів. Для виділення стафілококів змиви з ХАТ засівали на середовище – жовтково-сольовий м'ясопептонний агар. Виділення ентерококів проводили на середовищі Bile Esculin Azide Agar, стрептококів – Streptococcus Selective Agar (HiMedia). Ентеробактерії (ешерихії, протеї, клебсієли та інші) вирощували на середовищах Ендо, Левіна та Плоскірєва (Фармактив). Виділення *Pseudomonas aeruginosa* проводили на середовищі Pseudomonas Isolation Agar (HiMedia). Ідентифікацію виділених чистих культур проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями та ознаками патогенності. Посіви інкубували в термостаті за температури 37 ºС упродовж 24–48 годин. Ідентифікацію чистих культур проводили, враховуючи біохімічні тести, описані у визначнику бактерій Берджі (Vos et al., 2011).

Визначення щільності утворених біоплівок. У стерильні одноразові пластикові чашки Петрі вносили 5 см^3 м'ясопептонного бульйону та 1 см^3 добової тест-культури мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*) у концентрації 10^5 КУО/см^3 та інкубували за температури 37 ºС упродовж 24–48 годин. Після інкубації чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером, висушували та фіксували утворені біоплівки 96º етиловим спиртом упродовж 10 хвилин. Потім забарвлювали 0,1% розчином кристалічного фіолетового впродовж 10 хвилин. У чашки Петрі додавали 3,0 см^3 96º етилового спирту та залишали на 20–30 хвилин, періодично струшуючи. Вимірювали оптичну густину спиртового розчину спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нМ (Stepanovic et al., 2000). За густини промивного розчину з біоплівок до 0,50 од. щільність сформованих біоплівок вважали низькою, від 0,51 до 1,00 од. – середньою та за густини розчину понад 1,01 од. – високою (Kukhtyn et al., 2017).

Визначення чутливості мікроорганізмів, що перебувають у біоплівковій формі, до антибіотиків і антисептиків проводили на добових мікробних біоплівках, вирощених у пластикових чашках Петрі. Після 24 годин інкубації культур чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером і вносили 5 см^3 свіжоприготовлених антибіотиків або антисептиків. Після експозиції антибіотики та антисептики зливали, чашки триразово промивали стерильним фосфатним буфером, вносили 5 см^3 стерильного 0,9% розчину натрію хлориду та стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1,0 см^3 суспензії, готували низку десятикратних розведень, проводили посів 1,0 см^3 кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37 ºС упродовж 24–48 годин для визначення кількості бактерій (Cucarella et al., 2004).

Визначення чутливості планктонних мікроорганізмів, виділених із хронічних ран, до антибіотиків проводили класичним диск-дифузійним методом Кірбі – Бауера. Визначення чутливості планктонних мікроорганізмів до антисептиків проводили таким способом. Готували суспензії з чистих культур, висівали суспензії в чашки Петрі з МПА, виготовляли в МПА лунки за

допомогою пробійника № 10, заповнювали лунки антисептиками. Чашки Петрі інкубували в термостаті упродовж 24 годин, потім оцінювали результат за діаметром затримання росту мікроорганізмів навколо лунки. Діаметр до 15 мм – мікроорганізми нечутливі до антисептиків, від 16 до 20 мм – мікроорганізми помірно чутливі до антисептиків, від 21 до 25 мм – мікроорганізми чутливі до антисептиків, від 26 мм і більше – мікроорганізми високочутливі до антисептиків (Kukhtyn et al., 2014).

Вивчення впливу електрофорезу різної сили струму на бактерій, які перебувають у біоплівковій формі, проводили за власною методикою. Вирощували мікробні біоплівки у стерильних одноразових чашках Петрі. Після відмивання планктонних клітин фосфатним буфером вносили у чашки з біоплівками 5 $см^3$ стерильного 0,9% розчину натрію хлориду, вставляли електроди та підключали прилад «Поток-1». Тривалість дії – 60 хвилин, сила струму – 0,025–0,100 $мА/см^2$ площі чашки Петрі. Після закінчення дії електрофорезу з чашок Петрі зливали фізрозчин і змивали відшаровані мікробні біоплівки стерильним фосфатним буфером. Потім вносили 5 $см^3$ стерильного 0,9% розчину натрію хлориду та стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1,0 $см^3$ суспензії, готували десятикратні розведення, висівали 1,0 $см^3$ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37 ºС упродовж 48 годин для визначення кількості бактерій. Для визначення впливу електрофорезу з антисептиком діоксизолем на мікробні біоплівки дослідження проводили аналогічно, тільки електроди занурювали в чашки Петрі з біоплівками не у фізрозчин, а в діоксизоль.

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Визначали середнє арифметичне (x), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати

Проведено порівняльні дослідження чутливості виділених бактерій, які перебувають у планктонному стані (табл. 1) та у сформованих біоплівках (табл. 2), до антимікробних препаратів.

Таблиця 1

Чутливість (%) планктонних форм бактерій, виділених із хронічних анальних тріщин до антимікробних препаратів

Антимікробні препарати, кількість діючої речовини	Досліджені бактерії						
	P. aeruginosa, n = 7	*E. coli*, n = 34	*S. aureus*, n = 6	*Enterococcus* spp., n = 18	*Proteus* spp., n = 10	*Enterobacter* spp., n = 3	*Citrobacter* spp., n = 3
Цефепім, 30 мкг	87,7	91,2	83,3	83,3	100,0	100,0	100,0
Цефтазидим, 30 мкг	100,0	91,2	100,0	38,9	100,0	100,0	100,0
Цефоперазон, 75 мкг	71,4	91,2	100,0	88,9	100,0	100,0	100,0
Цефтриаксон, 30 мкг	42,8	67,6	83,3	44,4	0,0	66,7	33,3
Цефуроксим, 30 мкг	71,4	82,3	83,3	77,8	30,0	33,3	66,7
Гентаміцин, 10 мкг	87,7	88,2	83,3	72,2	100,0	100,0	100,0
Доксициклін, 10 мкг	0,0	76,5	50,0	38,9	60,0	33,3	66,7
Фурамаг, 300 од.	0,0	97,0	83,3	83,3	60,0	66,7	100,0
Гатифлоксацин, 5 мкг	71,4	97,0	83,3	77,8	100,0	66,7	100,0
Ципрофлоксацин, 5 мкг	71,4	91,2	66,7	72,2	100,0	100,0	100,0
Діоксизоль (діоксидин)	87,7	88,2	100,0	88,9	60,0	66,7	100,0
Октенісепт, 1 : 1	42,8	76,5	100,0	83,3	30,0	66,7	66,7
Бетадин, 10%	71,4	88,2	100,0	88,9	100,0	100,0	100,0
Декасан, 0,02%	42,8	67,6	50,0	72,2	30,0	66,7	33,7
Хлоргексидин, 0,05%	57,1	58,8	50,0	77,8	60,0	66,7	66,7

Найефективнішими серед досліджених антибіотиків виявилися цефалоспорини III і IV покоління: цефепім, цефоперазон і цефтазидим. Ці антибіотики проявляли бактерицидну дію на всі виділені бактерії з ХАТ. Винятком виявилися лише бактерії роду *Enterococcus* spp., які чутливі до цефтазидиму в 38,9%. Протимікробна активність інших цефалоспоринів хоча й була висока, але значно менша, ніж у цефоперазону та цефтазидиму. Чутливість планктонних форм бактерій до цефтриаксону коливалася у межах 33,3–83,3%, а *Proteus* spp. узагалі стійкі до цього препарату. Чутливість виділених бактерій до препарату нітрофуранового ряду – фурамагу – також висока (60–100%), лише *P. aeruginosa* проявляла стійкість у 100% досліджуваних культур.

Аміноглікозид гентаміцин проявляв стабільну бактерицидну дію на всі виділені бактерії, чутливість їх становила 72,2–100,0%. Ефективність антибіотиків тетрациклінового ряду, зокрема, доксицикліну, низька. Слід відмітити досить високу протимікробну активність у препаратів фторхінолонового ряду гатифлоксацину та ципрофлоксацину. Кількість чутливих до гатифлоксацину штамів *P. aeruginosa* та *Enterobacter* spp. становила 71,4%, всі інші виділені бактерії чутливіші до цього препарату (77,8–100,0%). Найвища чутливість до ципрофлоксацину була в ентеробактерій – 91,2–100,0%, найменша – у стафілококів і ентерококів – 66,7–72,2%. Отже, результати визначення чутливості виділеної мікрофлори до антибіотиків мають велике клінічне значення, оскільки дозволяють обгрунтувати вибір раціональної схеми антибіотикотерапії.

Для місцевого лікування хронічних анальних тріщин з антимікробних препаратів найчастіше використовують антисептики. Ми визначили чутливість виділеної мікрофлори до антисептиків. Із п'яти досліджених антисептиків виявлено найбільшу протимікробну дію у розчинів діоксидину та бетадину (повідонйод), чутливість мікрофлори становила 60,0–100,0%. Найменш активний відносно виділеної мікрофлори антисептик декасан: чутливість бактерій – 30,0–72,2%. Враховуючи антимікробну дію антисептиків для місцевого лікування хворих на ХАТ і для внутрішньотканинного електрофорезу тріщин ми використовували розчин «Діоксизоль-Дарниця» (діюча речовина діоксидин).

Мікроорганізми здебільшого перебувають у біоплівках, а планктонна форма призначена для колонізації інших локалізацій. Результати досліджень впливу антимікробних препаратів на бактерії, які сформовані у біоплівки, наведено в таблиці 2. У дослід відібрано штами бактерій, планктонні форми яких чутливі до визначених у досліді антибіотиків у диск-дифузному методі Кірбі – Бауера та антисептиків у луночковому методі.

Як видно з даних таблиці 2, антимікробні препарати (антибіотики та антисептики) проявляли бактерицидну дію до мікроорганізмів у мікробній біоплівці, проте мікробні клітини виявлялися життєздатними на рівні вище «порогу інфікованості». Найбільше захищені біоплівкою виявилися клітини *P. aeruginosa* та *Enterococcus* spp. Із досліджених антимікробних засобів найкраще впливає на клітини в біоплівці гатифлоксацин. Після дії гатифлоксацину на біоплівки *P. aeruginosa* та *Enterococcus* spp. кількість живих клітин не перевищувала lg 1,5 ± 0,1 $КУО/см^2$ площі біоплівки, а клітини *S. aureus* і *E. coli* повністю інактивовані. За дії інших антибіотиків кількість мікробних клітин, що вижили, не перевищувала lg 2,9 ± 1,6 $КУО/см^2$ площі біоплівки. З антисептиків на бактерії у

біоплівках найкраще діяв діоксидин: кількість життєздатних мікробних клітин становила lg 2,9 ± 1,7 КУО/см^2 площі біоплівки. Інші антисептики (октенісепт, декасан і хлоргексидин) проявляли меншу бактерицидну дію на клітини у біоплівках, кількість бактерій, що вижили після їх дії, становила від lg 2,9 ± 1,8 до lg 3,7 ± 2,2 КУО/см^2 площі біоплівки.

Таблиця 2

Вплив антимікробних препаратів на бактерії у складі біоплівки (lg КУО/см^2, x ± SE)

Антимікробні препарати, кількість діючої речовини	Кількість клітин *P. aeruginosa* у біоплівці, n = 4		Кількість клітин *E. coli* у біоплівці, n = 12		Кількість клітин *S. aureus* у біоплівці, n = 3		Кількість клітин *Enterococcus* spp. у біоплівці, n = 5	
	до дії препарату	після дії препарату	до дії препарату	після дії препарату	до дії препарату	після дії препарату	до дії препарату	після дії препарату
Цефепім, 30 мг/л	6,6 ± 4,1	2,8 ± 1,3	6,5 ± 4,1	2,8 ± 1,5	6,7 ± 4,2	2,8 ± 1,3	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,3
Цефтазидим, 30 мг/л	6,6 ± 4,1	2,3 ± 1,3	6,5 ± 4,1	2,2 ± 1,2	6,7 ± 4,2	2,3 ± 1,2	6,7 ± 4,3	2,8 ± 1,5
Цефтриаксон, 30 мг/л	6,6 ± 4,1	2,1 ± 1,2	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,3	6,7 ± 4,2	2,7 ± 1,4	6,7 ± 4,3	2,8 ± 1,5
Гентаміцин, 10 мг/л	6,6 ± 4,1	2,5 ± 1,4	6,5 ± 4,1	2,3 ± 1,9	6,7 ± 4,2	2,9 ± 1,5	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,6
Гатифлоксацин, 5 мг/л	6,6 ± 4,1	1,5 ± 0,1	6,5 ± 4,1	0	6,7 ± 4,2	0	6,7 ± 4,3	1,4 ± 0,2
Діоксизоль	6,6 ± 4,1	2,8 ± 1,6	6,5 ± 4,1	2,8 ± 1,6	6,7 ± 4,2	2,8 ± 1,5	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,7
Октенісепт, 1 : 1	6,6 ± 4,1	3,4 ± 1,9	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,8	6,7 ± 4,2	2,9 ± 1,8	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,7
Бетадин, 10%	6,6 ± 4,1	3,7 ± 2,0	6,5 ± 4,1	3,3 ± 1,9	6,7 ± 4,2	3,0 ± 2,0	6,7 ± 4,3	3,2 ± 2,1
Декасан, 0,02%	6,6 ± 4,1	3,7 ± 2,2	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,3	6,7 ± 4,2	3,1 ± 1,6	6,7 ± 4,3	3,2 ± 2,1
Хлоргексидин, 0,05%	6,6 ± 4,1	3,5 ± 1,7	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,3	6,7 ± 4,2	3,0 ± 1,6	6,7 ± 4,3	3,0 ± 2,1

Отже, бактерії у біоплівках стійкіші до антимікробних препаратів, ніж їх планктонні форми. Оскільки, за даними різних авторів (Iftodij et al., 2014; Ebinger et al., 2017; Stewart et al., 2017; Wienert et al., 2017), хронічні рани здебільшого загоюються упродовж тривалого часу, можна стверджувати, що мікроорганізми, що виділяються з цих ран, перебувають у біоплівці та ускладнюють протимікробну терапію.

Із метою обґрунтування ефективності лікування ХАТ за допомогою внутрішньотканинного електрофорезу з діоксизолем вивчали вплив різної сили струму на деградацію біоплівки (табл. 3). За дії електрофорезу силою струму 0,05 мА/см^2 площі біоплівки, їх щільність зменшувалася в середньому в 1,6–2,0 раза (P > 0,05). Із підвищенням сили струму до 0,1 мА/см^2 площі щільність біоплівки суттєво зменшувалася, що вказує на руйнування екзополісахаридного матриксу. Найсильніша деградація біоплівки відбулася в *Enterobacter* spp.: зменшення відбулося у 2,8 раза (P > 0,05), порівняно з контролем. У *S. aureus*, *E. coli* та *Enterococcus* spp. щільність біоплівок знизилася в 2,4–2,5 раза (P > 0,05). Найстійкішими до дії електрофорезу 0,1 мА/см^2 площі біоплівки виявилися бактерії виду *P. aeruginosa* – щільність біоплівок зменшилася в 1,9 раза.

Для лікування ХАТ із метою руйнування мікробної біоплівки та кращого бактерицидного впливу лікарських засобів проведено гальванізацію з розчином «Діоксизоль-Дарниця». Результати досліджень впливу електрофорезу з діоксизолем за різної сили струму на мікробні біоплівки наведено в таблиці 4. У дослід взято штами бактерій, планктонні форми яких чутливі до діоксизолю у луночковому методі.

Таблиця 3

Вплив електрофорезу силою струму 0,05–0,1 мА/см^2 площі чашки Петрі та тривалістю 60 хвилин на мікробні біоплівки (x ± SE; n = 27)

Вид бактерій	Щільність мікробних біоплівок			
	до дії електрофорезу, од. (контроль)	після дії електрофорезу силою струму 0,05 мА/см^2 площі біоплівки, од.	до дії електрофорезу, од. (контроль)	після дії електрофорезу силою струму 0,1 мА/см^2 площі біоплівки, од.
P. aeruginosa, n = 4	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,04*	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,04*
S. aureus, n = 3	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,04*	1,7 ± 0,1	0,7 ± 0,03*
E. coli, n = 12	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,05*	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,03*
Enterococcus spp., n = 5	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,03*	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,03*
Enterobacter spp., n = 3	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,04*	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,02*

Примітка: * – P > 0,05, щодо контолю.

Таблиця 4

Кількість бактерій у біоплівці до та після дії електрофорезу з діоксизолем із різною силою струму (lg КУО/см^2, x ± SE; n = 27)

Вид бактерій	Кількість бактерій на 1 см^2 площі біоплівки до електрофорезу	Кількість бактерій після дії силою струму 0,025 мА/см^2 площі біоплівки	Кількість бактерій після дії силою струму 0,05 мА/см^2 площі біоплівки	Кількість бактерій після дії силою струму 0,1 мА/см^2 площі біоплівки
P. aeruginosa, n = 4	6,7 ± 5,2	2,3 ± 1,2*	не виділено	не виділено
S. aureus, n = 3	6,8 ± 5,3	1,4 ± 0,3*	не виділено	не виділено
E. coli, n = 12	6,6 ± 5,2	1,5 ± 0,3*	не виділено	не виділено
Enterococcus spp., n = 5	6,7 ± 5,2	2,2 ± 0,9*	не виділено	не виділено
Enterobacter spp., n = 3	6,4 ± 5,1	не виділено	не виділено	не виділено

Примітка: див. табл. 3.

Із таблиці 4 видно, що застосування електрофорезу з антисептиком діоксидином на мікробні біоплівки досить дієвий. За сили струму 0,05–0,10 мА/см^2 площі біоплівки бактерій не виділено. Це вказує на руйнування біоплівки також добрий контакт діоксидину з мікробними клітинами та прояв бактерицидної дії.

Обговорення

Нині достеменно з'ясовано, що хронічні гнійно-запальні процеси спричиняються мікроорганізмами у біоплівці, та традиційна етіотропна антибактеріальна терапія малоефективна (Penesyan et al., 2015; Banin et al., 2017). Тому науковці провадять пошук дієвих методів і засобів впливу на бактерії у біоплівках із метою ефективного лікування запальних процесів. Наші дослідження виявили, що чутливість планктонних форм бактерій, виділених із ХАТ, до антибіотиків цефалоспоринів: цефепім, цефоперазон і цефтазидим становила 71,4–100,0%. Тільки ентерококи були стійкими до цефтазидиму (чутливість – 38,9%). Чутливість виділених бактерій до гентаміцину також була високою (72,4–100,0%), як і до фторхінолонів (гатифлоксацину та ципрофлоксацину – 66,7–100,0%). У дослідженнях (Hidijatov et al., 2012; Wienert et al., 2017) також вказується на високу чутливість (73,4–100,0%) мікрофлори ХАТ до антибіотиків цефалоспоринів і аміноглікозидів. Незважаючи на значну

чутливість планктонних форм бактерій, виділених із ХАТ, до антибіотиків, не завжди досягається позитивний результат під час лікування (Castillo and Margolin, 2004; Ebinger et al., 2017; Stewart et al., 2017), оскільки в патогенезі ХАТ провідна роль належить біоплівковим формам бактерій (Iftodij et al., 2014; Nedashkivs'ka et al., 2016). Ці дослідження збігаються з численними даними про необхідність визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків під час лікування гнійно-запальних процесів. За нашими даними, антисептики менш дієві на планктонні форми бактерій, ніж антибіотики, що ймовірно пов'язано з частішим застосуванням їх для місцевого лікування ХАТ. Чутливість планктонних форм бактерій до антисептиків діоксидину та бетадину становила 60,0–100,0%, до розчинів октенісепту, декасану та хлоргексидину – 33,7–83,3%.

Під час визначеня впливу антибіотиків і антисептиків на біоплівкові форми бактерій встановлено, що клітини у біоплівці стійкіші до антибактеріальних препаратів. Із досліджених антибіотиків найкраще діяв гатифлоксацин ймовірно завдяки його низькій молекулярній масі та здатності проникати через пори та канали біоплівки до мікробних клітин. Після дії гатифлоксацину на біоплівки *P. aeruginosa* та *E. feacalis* кількість живих клітин не перевищувала lg 1,5 ± 0,02 КУО/см^2 змиву, а клітини *S. aureus* і *E. coli* повністю інактивовані. Про те, що фторхінолони легко дифундують через біоплівку та ефективно знижують її ріст і бактерицидно діють на мікробні клітини, повідомляють також автори, які проводили досліди *in vitro* (Brooun et al., 2000; Stepanovic et al., 2000; Lewis, 2001). Також про підвищену стійкість бактерій у біоплівці, виділених із хронічних ран, до антибіотиків повідомляють дослідження інших авторів (Flemming and Wingender 2010; Sanchez et al., 2013; Sanchez-Vizuete et al., 2015).

Із досліджених нами антисептиків найкраще діяв на бактерії у біоплівках «Діоксизоль-Дарниця» – кількість життєздатних мікробних клітин зменшувалася до lg 2,9 ± 1,6 на см^2 площі біоплівки. Бар'єрну функцію екзополісахаридного матриксу щодо антисептиків, зокрема, перекису водню, описано у дослідженнях (Elkins et al., 1999; Hassett et al., 1999), які вказують, що планктонні клітини гинули за концентрації 50 мкМ, а бактерії у біоплівці ефективно захищені, оскільки доза, яка доходила до клітин біоплівки, була нижчою бактерицидного рівня. Це дає змогу стверджувати, що саме здатність бактерій, виділених зі слизової оболонки ХАТ, формувати біоплівку високої щільності ускладнює ефективність протимікробної терапії хвороби та визначає хронічний характер її перебігу. Тому, з метою обгрунтування ефективності лікування ХАТ за допомогою внутрішньотканинного електрофорезу з діоксизолем, ми вивчали вплив різної сили струму на бактерії у біоплівках і деградацію біоплівки.

За дії електрофорезу силою струму 0,025–0,100 мА/см^2 площі відбулося руйнування матриксу біоплівки та його щільність зменшувалася з високої до низької. Однак за дії сили струму 0,025 мА/см^2 площі біоплівки та діоксидину ще виділялися життєздатні клітини з біоплівки, що вказує на часткове руйнування матриксу. Підвищення сили струму до 0,05–0,10 мА/см^2 площі біоплівки спричиняло загибель клітин бактерій. Деградація матриксу біоплівки електрофорезом позбавляє мікробні клітини захисту, а застосування препарату «Діоксизоль-Дарниця» забезпечує бактерицидний ефект. Del Pozo et al. (2009) також вказують на ефективність і перспективність використання фізичних методів для боротьби з бактеріями, які перебувають у біоплівці. Електричні поля низької напруги підвищували ефективність антисептиків, їх бактерицидна концентрація на біоплівкові форми бактерій нижча, ніж мінімальна бактерицидна концентрація для планктонних форм. Дослідники (Huang et al., 1996) продемонстрували ефективність ультразвуку щодо біоплівок *P. aeruginosa* – обробка підвищувала дію гентаміцину відносно тих самих біоплівок. Таким чином, лабораторні мікробіологічні дослідження вказують, що використання електрофорезу з діоксизолем для лікування ХАТ перспективне та актуальне.

Висновки

Із ХАТ виділяються умовно-патогенні бактерії, планктонні форми яких чутливі до антибіотиків цефалоспоринів III–IV покоління та фторхінолонів (66,7–100,0%). Чутливість цієї мікрофлори до антисептиків діоксидину та бетадину становила 60,0–100,0%, а до антисептиків октинісепту, декасану та хлоргексидину – 33,7–83,3%. Біоплівкові форми бактерій, виділені з ХАТ, стійкіші до антибіотиків і антисептиків, ніж їх планктонні форми. Із досліджених антибіотиків найкраще діяв на бактерії у біоплівках гатифлоксацин, після його впливу на біоплівки *P. aeruginosa* та *E. feacalis* кількість клітин не перевищувала lg 1,5 ± 0,02 КУО/см^2 змиву, а бактерії *S. aureus* і *E. coli* повністю інактивовані. Із п'яти досліджених антисептиків найефективніше діяв на бактерії у біоплівці діоксидин. Після його впливу кількість мікробних клітин не перевищувала lg 2,9 ± 1,7 КУО/см^2 площі біоплівки.

За дії електрофорезу силою струму 0,05 мА/см^2 площі біоплівки їх щільність зменшувалася в середньому в 1,6–2,0 раза, а за дії силою 0,1 мА/см^2 площі в 2,4–2,8 раза, що вказує на значну деградацію біоплівки. Завдяки застосуванню електрофорезу силою струму 0,05–0,10 мА/см^2 площі біоплівки з діоксидином відбувається руйнування біоплівки та прояв бактерицидної дії антисептика. Враховуючи отримані дані, у комплексному лікуванні ХАТ рекомендовано проводити внутрішньотканинний електрофорез силою струму 0,05–0,10 мА/см^2 з антисептиком і призначати антибактеріальну терапію, попередньо визначивши чутливість до антибіотиків і антисептиків, виділених із тріщини мікроорганізмів.

References

Atkinson, S., & Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. Journal of the Royal Society Interface, 6, 959–978.

Banin, E., Hughes, D., & Kuipers, O. P. (2017). Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews, 41(3), 450–452.

Bessa, L. J., Fazii, P., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2015). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. International Wound Journal, 12(1), 47–52.

Brooun, A., Liu, S., & Lewis, K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(3), 640–646.

Castillo, E., & Margolin, D. A. (2004). Anal fissures: Diagnosis and management. Techniques in Gastrointestinal Endoscopy, 6(1), 12–16.

Cooper, R. A., Bjarnsholt, T., & Alhede, M. (2014). Biofilms in wounds: A review of present knowledge. Journal of Wound Care, 23(11), 570–582.

Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., & Penades, J. R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity, 72(4), 2177–2185.

Del Pozo, J. L., Rouse, M. S., Mandrekar, J. N., Sampedro, M. F., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2009). Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(1), 35–40.

Ebinger, S. M., Hardt, J., Warschkow, R., Schmied, B. M., Herold, A., Post, S., & Marti, L. (2017). Operative and medical treatment of chronic anal fissures – A review and network meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Gastroenterology, 52(6), 663–676.

Elkins, J. G., Hassett, D. J., Stewart, P. S., Schweizer, H. P., & McDermott, T. R. (1999). Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. Applied and Environmental Microbiology, 65(10), 4594–4600.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8(9), 623–633.

Fuente-Nunez, C., Reffuveille, F., Fernandez, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Current Opinion in Microbiology, 16(5), 580–589.

Gostev, V. V., & Sidorenko, S. V. (2010). Bakterial'nye bioplenki i infekcii [Bacterial biofilms and infections]. Zhurnal Infektologii, 2(3), 4–15 (in Russian).

Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. Cellular Microbiology, 11(7), 1034–1043.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology, 2(2), 95–108.

Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E., Huang, C. T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. Molecular Microbiology, 34(5), 1082–1093.

Hidijatov, I. I., Adiev, R. F., Strizhkov, A. E., Kazakov, M. V., & Nurimanov, R. Z. (2012). Rezul'taty kompleksnogo obsledovanija i hirurgicheskogo lechenija bol'nyh s hronicheskoj anal'noj treshhinoj [The results of complex examination and surgical treatment of patients with chronic anal fissure]. Astrahanskij Medicinskij Zhurnal, 7(4), 256–259 (in Russian).

Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents, 35(4), 322–332.

Huang, C. T., James, G., Pitt, W. G., & Stewart, P. S. (1996). Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 6(4–5), 235–242.

Iftodij, A. G., Kozlovska, I. M., Olenovich, O. A., Bilik, O. V., & Brodovskij S. P. (2014). Vpliv mikroflori kishechniku na patogenez perebigu hronichnih uskladnenih anal'nih trishhin [Influence of intestinal microflora on the pathogenesis of chronic complicated anal fissures]. Bukovinskij Medichnij Visnik, 18(3), 78–82 (in Ukrainian).

Kukhtyn, M., Berhilevych, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. Eastern-European Journal of Enterprise Technologies, 5(11), 26–33.

Kukhtyn, M., Berhilevych, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). The influence of disinfectants on microbial biofilms of dairy equipment. Eureka: Life Sciences, 5, 11–17.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(4), 999–1007.

Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 9(1), 34–39.

Manavathu, E. K., Vager, D. L., & Vazquez, J. A. (2014). Development and antimicrobial susceptibility studies of *in vitro* monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiology, 14(1), 53.

Nedashkivska, V. V., Dronova, M. L., & Vrinchanu, N. O. (2016). Bioplivki ta jih rol' v infekcijnyh zahvorjuvanniah [Biofilms and their role in infectious diseases]. Ukrajins'kij Naukovo-Medychnij Molodizhnyj Zhurnal, 98, 10–19 (in Ukrainian).

Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. Molecules, 20(4), 5286–5298.

Percival, S. L., Hill, K. E., Williams, D. W., Hooper, S. J., Thomas, D. W., & Costerton, J. W. (2012). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. Wound Repair and Regeneration, 20(5), 647–657.

Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C., & Murray, C. K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infectious Diseases, 13(1), 47.

Sanchez-Vizuete, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., & Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. Frontiers in Microbiology, 6, 1–12.

Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence, 4(3), 223–229.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40(2), 175–179.

Stewart Sr, D. B., Gaertner, W., Glasgow, S., Migaly, J., Feingold, D., & Steele, S. R. (2017). Clinical practice guideline for the management of anal fissures. Diseases of the Colon and Rectum, 60(1), 7–14.

Van Acker, H., Van Dijck, P., & Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. Trends in Microbiology, 22(6), 326–333.

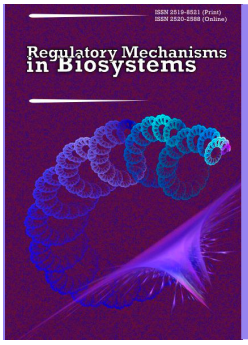
Vorobey, E. S., Voronkova, O. S., & Vinnikov, A. I. (2017). Korekcija dysbiozu pihvy myshej, vyklykanogo plivkotvirnym shtamom *Staphylococcus aureus*, za dopomogoju bakteriofagiv i probiotykiv [Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a filmforming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics]. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 252–258 (in Ukrainian).

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., & Whitman, W. (Eds.). (2011). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media.

Weigel, L. M., Donlan, R. M., Shin, D. H., Jensen, B., Clark, N. C., McDougal, L. K., Zhu, W., Musser, K. A., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., Dumas, N., Limberger, R. J., & Patel, J. B. (2007). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(1), 231–238.

Wienert, V., Raulf, F., & Mlitz, H. (2017). Anal fissure: Symptoms, diagnosis and therapies. Springer.

Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Biofilms and inflammation in chronic wounds. Advances in Wound Care, 2(7), 389–399.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 583–595
doi: 10.15421/021790

Levosalbutamol as alternative to drugs on the basis of racemic salbutamol: Review of the results of pre-clinical research

A. G. Miroshnichenko, Y. S. Bulgakova, V. Y. Perfiliev, N. G. Bazarnova

Altai State University, Barnaul, Russia

Article info

Received 10.10.2017
Received in revised form 14.11.2017
Accepted 17.11.2017

Altai State University, Lenin ave., 61, Barnaul, 656049, Russian Federation. Tel.: +7-385-229-12-09. E-mail ag.miro@yandex.ru

Miroshnichenko, A. G., Bulgakova, Y. S., Perfiliev, V. Y., & Bazarnova, N. G. (2017). Levosalbutamol as alternative to drugs on the basis of racemic salbutamol: Review of the results of pre-clinical research. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 583–595. doi:10.15421/021790

The aim of the work is to conduct an analytical review of the results of preclinical studies of levosalbutamol. The review discusses the pharmacodynamic features of the R-stereoisomer of salbutamol *in vitro*. The chemical bases of interaction of levosalbutamol with β_2-adrenoreceptors, intracellular signaling cascades associated with β_2-adrenoreceptors, and structural features of clinically significant ligands of β_2-adrenoreceptors are presented. Broncholytic activity, influence on the contractility of the diaphragmatic muscles, mucociliary clearance of R-salbutamol in comparison with racemic salbutamol are described. The data presented indicate that all known β_2-adrenergic receptor-dependent effects of racemic salbutamol, including bronchodilation, are realized by its R-enantiomer. There is evidence that the regular inhalation administration of racemic salbutamol is accompanied by a partial decrease in the bronchoprotective effect and an increase in airway hyperreactivity in response to the action of provocative factors. It was found that the development of hyperreactivity of the respiratory tract is excluded in the case of regular inhalation of levosalbutamol. Possible mechanisms of the paradoxical bronchoconstrictor effect of the salbutamol dystomer are described. This article shows the beneficial effect of levosalbutamol on mucociliary clearance, its anti-inflammatory activity and antiallergic effect. The image data are compared between the enantiomers and the racemate of salbutamol. Special attention is paid to the pharmacokinetics of enantiomers of salbutamol. The data presented from the preclinical studies provide evidence of chiral inversion of stereoisomers of salbutamol.

Keywords: R-salbutamol; β_2-agonist; chirality; enantioselectivity; pharmacodynamics

Левосальбутамол как альтернатива лекарственным препаратам на основе рацемического сальбутамола: обзор результатов доклинических исследований

А. Г. Мирошниченко, Я. С. Булгакова, В. Ю. Перфильев, Н. Г. Базарнова

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Проанализированы результаты доклинических исследований лекарственного средства левосальбутамол. Обсуждаются фармакодинамические особенности R-стереоизомера сальбутамола *in vitro*. Представлены химические основы взаимодействия левосальбутамола с β_2-адренорецепторами, внутриклеточные сигнальные каскады, ассоциированные с β_2-адренорецепторами, а также структурные особенности клинически значимых лигандов β_2-адренорецепторов. Описана бронхолитическая активность, влияние на контрактильность диафрагмальных мышц, мукоцилиарный клиренс R-сальбутамола по сравнению с рацемическим сальбутамолом. Приведены данные, которые указывают на то, что все известные β_2-адренорецепторзависимые эффекты рацемического сальбутамола, включая бронходилатацию, реализуются за счет его R-энантиомера. Имеются свидетельства того, что регулярное ингаляционное введение рацемического сальбутамола сопровождается парциальным снижением бронхопротективного эффекта и увеличением гиперреактивности дыхательных путей в ответ на действие провокационных факторов. При этом развитие гиперреактивности дыхательных путей исключено в случае регулярного ингаляционного введения левосальбутамола. Описаны возможные механизмы парадоксального бронхоконстрикторного действия дистомера сальбутамола. Отмечено благоприятное влияние левосальбутамола на мукоцилиарный клиренс, его противовоспалительная активность и антиаллергическое действие. Данные эффекты сравниваются между энантиомерами и рацематом сальбутамола. Отдельное внимание уделено фармакокинетике энантиомеров сальбутамола. Представлены данные доклинических исследований, свидетельствующие о хиральной инверсии стереоизомеров сальбутамола.

Ключевые слова: R-сальбутамол; β_2-агонист; энантиоселективность; фармакокинетика; фармакодинамика

Введение

Значительное число синтетических лекарственных средств, доступных в настоящее время для клинического применения, разработано на основе фармакологически активных субстанций, молекулы которых включают, как минимум, один хиральный центр (Calcaterra and D'Acquarica, 2017), представленный в большинстве случаев асимметричным атомом углерода. Присутствие таких

атомов обусловливает способность молекул одного и того же вещества к разнонаправленному вращению в плоскополяризованном свете и формированию право- и левовращающих оптических изомеров, называемых S- и R-энантиомерами, соответственно. Таким образом, энантиомеры – оптические изомеры молекул вещества, характеризующиеся наличием идентичной молекулярной формулы, сходными характеристиками межатомных взаимодействий, аналогичными физическими и химическими свойствами, но обладающие отличной пространственной конфигурацией, обусловленной различием их оптической активности. Эквимолярные смеси (50/50) S- и R-энантиомеров веществ, лишенные оптической активности, получили название рацемических.

В настоящее время молекулярная стереохимия является одним из фундаментальных направлений в сфере поиска и разработки лекарственных средств. Изучение хиральных свойств фармакологически активных субстанций обеспечивает глубокое понимание механизмов их взаимодействия с биологическими мишенями (Zhang et al., 2005), что, в свою очередь, ассоциируется с увеличением эффективности поиска «лидеров» с сопутствующим снижением риска неудач на промежуточных этапах разработки лекарственных средств. По данным анализа причин досрочного прекращения клинических исследований II/III фазы впервые предлагаемых лекарственных средств и лекарственных средств, предлагаемых по новым показаниям, почти в трети случаев являлось несоответствие исходов фармакотерапии критериям эффективности (Arrowsmith, 2011).

Эффекты фармакологически активных субстанций реализуются путем их взаимодействия с биологическими мишенями, в качестве которых в случае применения низкомолекулярных веществ выступают, главным образом, протеины, принадлежащие к семействам энзимов, экстраклеточных и ядерных рецепторов (транскрипционных факторов), ионных каналов, транспортных протеинов, и, конечно, рецепторы, ассоциированные с G-протеинами. Последние являются главной молекулярной мишенью фармакологических эффектов антигипертензивных и противоаллергических средств (Gashaw et al., 2012). Взаимодействия лекарственных веществ с таргетными протеинами имитируют динамику связывания эндогенных лигандов с активными сайтами этих протеинов, нередко называемых в литературе «карманами» (binding pockets). Такие карманы формируются определенными последовательностями аминокислотных остатков и детерминируются их физико-химическими характеристиками, что определяет структуру, локализацию и функциональность сайтов связывания с лигандом (Stank et al., 2016).

В настоящее время уже не подвергается сомнению, что эффективность взаимодействия с биологической макромолекулой – мишенью детерминируется геометрическим соответствием молекулы лиганда и активного сайта, то есть их комплементарностью (Kubinyi, 2003). Аминокислоты, за исключением глицина, характеризуются хиральными свойствами, в связи с чем активные сайты связывания в составе протеинов являются асимметричными, а значит, помимо комплементарности, важным условием эффективного взаимодействия с лигандом, обладающим хиральными свойствами, является пространственная конфигурация его энантиомеров. Последняя, в свою очередь, определяет существенные различия аффинитета связывания R- и S-энантиомеров хиральных лекарственных субстанций (Burke and Henderson, 2002; Kubinyi, 2003) и лежит в основе феномена энантиоселективности их фармакокинетики или фармакодинамики (Barnette et al., 2017; Kuchay and Mithal, 2017; Noguchi et al., 2017; Välitalo et al., 2017). Удаление из лекарственного препарата энантиомера, лишенного фармакологической активности или обладающего неоптимальными фармакодинамическими или фармакокинетическими свойствами, может ассоциироваться с повышением клинической эффективности лекарственных средств, в том числе ранее одобренных для клинического применения, минимизировать фармакодинамическую и фармакокинетическую вариабельность ответов на лечение и, возможно, снизить вероятность развития нежелательных событий, ассоциированных с фармакотерапией рацематами.

В настоящее время в фармацевтической индустрии распространен термин «racemic switch», обозначающий процесс вытеснения ранее одобренных лекарственных средств на основе рацематов их энантиомерно чистыми «аналогами» (Milgrom, 2006). Фактически процесс такого вытеснения может квалифицироваться как один из способов расширения перечня инновационных лекарственных препаратов (Blin, 2004), во многом ставший возможным для реализации за счет все большей доступности высокочувствительных методов энантиосепарации и молекулярного моделирования, базирующихся на хиральных различиях энантиомеров и энергии их связывания с полимерными селекторами, чаще всего представленными дериватами β-декстрина или энантиомер-селективными протеинами (Liu et al., 2016; Gutierrez-Climente, et al., 2017; Li et al., 2017; Sardella et al., 2017). Между тем, при рассмотрении вопроса о целесообразности такого вытеснения критически важно оценить не только выполнимость процесса получения интересующей энантиомерно чистой фармакологически активной субстанции и наличие маркетинговых преимуществ лекарственного средства на ее основе, но и наличие клинических преимуществ в сравнении с рацемическим «прототипом» (Milgrom, 2006), тем более, что к настоящему времени в научных публикациях приводятся примеры, указывающие на отсутствие таковых (Gaskell et al., 2017). Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что критически важным этапом в разработке таких лекарственных средств должна являться взвешенная объективная оценка их фармакокинетики, эффективности и безопасности в рамках хорошо спланированных доклинических и клинических исследований с применением современных валидированных научных методов по сравнению с референтными (рацемическими) лекарственными препаратами.

Бронходилататоры – терапевтические агенты, широко применяемые с целью терапии пациентов с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Расширение бронхов достигается, в первую очередь, посредством локального повышения активности симпатической нервной системы в бронхах, то есть активацией β_2-адренорецепторов, либо подавлением парасимпатических влияний на фоне блокады М-холинергических рецепторов. На протяжении последних двадцати лет общая концепция механизмов реализации бронхолитического действия не менялась (Günay et al., 2016). Между тем, в качестве адъювантной фармакологической активности рассматривается потенциальное противовоспалительное действие, обусловленное стабилизацией тучных клеток и подавлением их дегрануляции с выбросом провоспалительных и бронхоконстрикторных медиаторов. Другие потенциальные эффекты включают улучшение мукоцилиарного клиренса и подавление экстравазации протеинов плазмы крови, лежащей в основе экссудации и отека (Broadley, 2006).

Агонисты β_2-адренорецепторы, такие как сальбутамол, тербуталин, а также их аналоги длительного действия сальметерол и формотерол являются хиральными агентами и традиционно производятся в форме рацемических смесей, включающих фармакологически активный эутомер и неактивный дистомер. Несмотря на очевидный терапевтический потенциал и широкое клиническое применение, применение β_2-агонистов довольно противоречиво и ассоциируется с увеличением риска смертности в популяции пациентов с бронхообструктивными заболеваниями, ухудшением контроля заболевания, причины которого остаются в высшей степени трудны для понимания. В качестве клинического аспекта фармакологии β_2-адренорецепторов признано значение генетического полиморфизма рецепторов и его возможная связь с развитием толерантности к бронходилатации. Противоречивость применения β_2-адреномиметиков усиливается их стереоизомеризмом и присутствием в составе всех доступных в настоящее время препаратов агонистов β_2-адренорецепторов фармакологически неактивного S-энантиомеров, обладающих потенциально неблагоприят-

ными эффектами (Broadley, 2006). Токсичность, присущая дистомерам β_2-адренорецепторов, активно обсуждается, что является триггером вытеснения рацемических препаратов агонистов β_2-адренорецепторов препаратами энантиомерно чистых субстанций. Этот процесс достиг своей кульминации в разработке и активном внедрении в клиническую практику, начиная с конца 1990-х годов препаратов на основе левовращающего изомера сальбутамола – левосальбутамола (Boulton and Fawcett, 2002; Jantikar et al., 2007), презентируемого в качестве альтернативного эффективного и безопасного терапевтического средства для лечения пациентов с бронхиальной астмой и ХОБЛ (Nowak, 2003). Berger (2003) опубликовал обзор по данным оригинальных публикаций в рецензируемых журналах, результатов профессиональных обсуждений, а также информации, представленной производителем препарата Xopenex® (Sepracor Inc., США), с целью обоснования применения левосальбутамола в лечении взрослых пациентов и детей с бронхиальной астмой. Автором показано, что по сравнению с рацематом левосальбутамол обладает преимуществами по эффективности и безопасности у пациентов, страдающих бронхиальной астмой, а также характеризуется позитивным балансом «затраты – эффективность». Однако, по мнению Berger (2003), требуются дополнительные научные доказательства преимуществ левосальбутамола при бронхообструктивных заболеваниях. Таким образом, целью настоящего обзора является представление результатов доклинических исследований специфической фармакологической активности и фармакокинетики левосальбутамола *in vitro* по сравнению с сальбутамолом, являющихся важнейшим этапом разработки лекарственных средств в контексте их прогностического значения для оценки эффективности у человека.

Фармакодинамика

Взаимодействие с β_2-адренорецепторами. У животных и человека бронхоконстрикция устраняется R-эпинефрином, продуцируемым мозговым веществом надпочечников (Handley, 1999; Page and Morley, 1999; Ameredes and Calhoun, 2006). Молекулярной мишенью бронходилатирующего действия R-эпинефрина являются β_2-адренорецепторы, составляющие около 70% всей популяции β-адренорецепторов в легких. β_2-Адренорецепторы экспрессируются в гладкомышечных клетках дыхательных путей (главным образом, мелких), эпителиоцитах, гладкомышечных стенках сосудов и субмукозных железах. β_2-Адренорецепторы детектируются во многих провоспалительных и иммунных клетках, в том числе макрофагах, нейтрофилах, лимфоцитах, эозинофилах, тучных и альвеолярных клетках I и II типов. β_2-Адренорецепторы относятся к крупному семейству серпентинных, или 7TM-трансмембранных рецепторов, α-спираль которых ассоциирована с G-протеинами. 413-аминокислотная последовательность α-спирали β_2-адренорецепторов имеет большое значение для эффективного связывания с их физиологическим лигандом R-эпинефрином. В частности установлено, что эссенциальные аминокислотные остатки, необходимые для высокоаффинного связывания рецептора с лигандом, локализованы внутри третьей (Asp113), пятой (Ser204 и Ser207) и шестой (Phe259 и Phe290) петель α-спирали, а их пространственная ориентация в структуре трансмембранно локализованной α-спирали скоординирована с комплементарными сайтами молекулы эпинефрина. По этой причине обязательным требованием для высокоаффинного связывания с R-эпинефрином является 3D-конформация протеина β_2-адренорецептора, организованная по типу «кармана», в котором остаток Asp ответственен за связывание с атомом азота в структуре лиганда, в то время как два остатка Ser связывают гидроксильные группы его фенольного кольца.

По этой причине все клинически значимые агонисты β_2-адренорецепторов содержат в своей молекуле бензольный цикл с боковой двухуглеродной цепью и концевой (замещенной) аминогруппой, а также нередко в положениях 3 и 4 бензольного цикла свободные гидроксильные группы, что делает их максимально похожими на катехоламины, как в случае с изопротеренолом, являющимся наиболее мощным агонистом β_1/β_2-адренорецепторов. В случае перепозиционирования гидроксильной группы в бензольном цикле, как, например, в молекуле сальбутамола, или замещения аминогруппы агонист приобретает меньший потенциал по сравнению с изопротеренолом, но вместе с тем приобретает резистентность к деградации под действием КОМТ и меньший аффинитет к β_1-адренорецепторам (Cazzola et al., 2012). Как видно из рисунка 1, структура молекулы сальбутамола соответствует всем требованиям эффективного связывания с активными сайтами β_2-адренорецепторов.

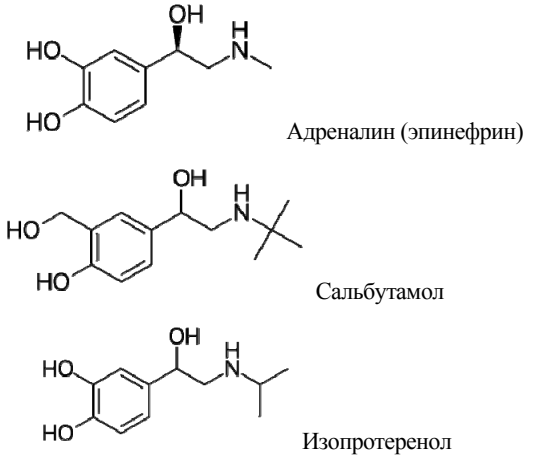


Рис. 1. Структура лигандов β_2-адренорецепторов – адреналина, изопреналина и сальбутамола

В эксперименте *in vitro* аффинитет в отношении β-адренорецепторов, экспрессируемых в предсердиях и трахеях у морских свинок, выраженный в логарифмических единицах, составляет 1,86 и 2,19 соответственно. В ходе анализа тканевой селективности установлено, что R-сальбутамол почти в 24 раза интенсивнее связывается с трахеей, чем с предсердиями. По сравнению с R-изопротеренолом сальбутамол проявил несколько больший потенциал связывания с рецепторами в трахее. Soriano-Ursúa et al. (2010) с применением метода молекулярного докинга подтвердили наличие большего аффинитета R-энантиомеров (эутомеров) бронхолитиков и их способности активировать β_2-адренорецепторы по сравнению с S-энантиомерами (дистомерами). В исследовании *in vitro* с применением культуры клеток, экспрессирующих β_2-адренорецепторы человека, R-сальбутамол продемонстрировал в 90–100 раз больший аффинитет в отношении β_1- и β_2-адренорецепторов по сравнению с дистомером, что ассоциировалось с 23-кратным увеличением внутриклеточного уровня цАМФ, в то время как рацемический сальбутамол увеличивал концентрацию цАМФ в 24 раза (Penn et al., 1996; Page and Morley, 1999).

Внутриклеточные сигнальные каскады, ассоциированные с β_2-адренорецепторами. Связывание лиганда с активными сайтами β_2-адренорецепторов индуцирует конформационные изменения G-белка, сцепленного с внутриклеточным доменом α-спирали. После таких конформационных изменений G-протеин приобретает функции триггера, запускающего обмен гуаниновых нуклеотидов (guanine nucleotide exchange factor, или GEF): от α-субъединицы G-белка отщепляется ГДФ, а вместо него присоединяется ГТФ, что приводит к полной диссоциации комплекса «рецептор – G-белок», при этом фрагменты этого комплекса, а именно G_α-ГТФ и $G_{\beta\gamma}$, активируют эффекторные протеины, главным из которых является фермент аденилатциклаза. Активация аденилатциклазы приводит к гидролизу АТФ и накоплению в цитоплазме клетки циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который, в свою очередь, индуцирует протеинкиназу А, фосфорилирующую ряд таргетных

протеинов клетки, приводящих к снижению внутриклеточного уровня ионов кальция, подавлению гидролиза фосфоинозитида и снижению продукции инозитолтрифосфата (ИТВ), ингибированию киназы легких цепей миозина, открытию кальций-зависимых калиевых каналов, приводящих к реполяризации клетки и секвестрации ионов кальция во внутриклеточные хранилища и, в конечном итоге, релаксации гладкомышечных клеток (Cazzola et al., 2012; Theron et al., 2013).

Бронхолитическая активность. По данным Lemoine et al. (1992), сальбутамол и R-изопреналин индуцируют максимальную релаксацию гладких мышц трахеи морских свинок на фоне парциальной и максимальной контрактильности, индуцированной различными дозами карбахола, причем активность рацемического сальбутамола, как предположили исследователи, обусловлена R-энантиомером. Delmotte and Sanderson (2008) изучили эффекты сальбутамола и его энантиомеров на сократительную способность гладкомышечных клеток дыхательных путей и Ca^{2+}-зависимую сигнализацию в срезах легких мышей с применением фазоконтрастной и конфокальной микроскопии. R-сальбутамол индуцировал дозозависимую релаксацию гладкомышечных клеток на фоне метахолин-индуцированного сокращения, в то время как S-сальбутамол не оказывал значимых эффектов. Релаксирующий эффект эутомера был сходен с таковым у рацемического сальбутамола, вводившегося в экспериментальную систему в два раза большей концентрации.

Метахолин-индуцированная контрактильность клеток коррелировала с увеличением внутриклеточных токов ионов кальция, интенсивность которых снижалась в присутствии R-энантиомера и рацемата в сходных концентрациях. В то же время эутомер проявил более выраженную активность в снижении чувствительности к Ca^{2+} гладкомышечных клеток. S-энантиомер не влиял на кальциевые токи и чувствительность к кальцию в обеих моделях. Исследователи заключили, что R-энантиомер сальбутамола индуцирует более выраженную релаксацию гладкомышечных клеток дыхательных путей по сравнению с рацематом, в то время как S-энантиомер может быть ответственен за редуцирование его эффектов. Приведенные данные указывают на то, что все известные β_2-адренорецептор-зависимые эффекты рацемического сальбутамола, включая бронходилатацию, реализуются за счет его R-энантиомера. Westerhof et al. (2005) изучили бронхопротективные эффекты сальбутамола и его энантиомеров у морских свинок на фоне их ингаляционного введения в терапевтически релевантных дозах. Базальная реактивность дыхательных путей экспериментальных животных в ответ на введение гистамина редуцировалась по прошествии 30 минут после ингаляции рацемата и его R-энантиомера. Бронхопротективное действие нивелировалось через 3 ч после инициирования эксперимента. На фоне ингаляционного введения за 30 минут до и 5,5 ч после нагрузки аллергеном рацемат и его эутомер подавляли аллерген-индуцированную гиперреактивность дыхательных путей на введение гистамина, полностью устраняя раннюю астматическую реакцию и проявляя тенденцию к супрессии поздней астматической реакции. При этом интенсивность подавления поздней реакции (на пятый час эксперимента) более выражена у животных, получавших R-сальбутамол. Введение S-сальбутамола не ассоциировалось со значимыми изменениями базальной реактивности или аллерген-индуцированной бронхоконстрикции. Ни рацемат, ни отдельные энантиомеры не влияли на интенсивность инфильтрации дыхательных путей воспалительными клетками. Таким образом, ингаляционное введение рацемического сальбутамола и его R-энантиомера в эквипотентных дозах эффективно подавляет ранние и поздние астматические реакции у морских свинок, индуцированные введением аллергена, при этом эутомер проявляет немногим более выраженное бронхопротективное действие. S-сальбутамол не оказывает неблагоприятных эффектов.

В рамках рандомизированного, перекрестного исследования Arroyo et al. (2016) проводилась сравнительная оценка эффектов сальбутамола и левосальбутамола у лошадей с рекуррентной обструкцией дыхательных путей на фоне их ингаляционного введения с помощью небулайзера. Продолжительность действия сальбутамола составила 60, а левосальбутамола 120 минут. При этом значения эффективной дозы (ED_{max}) обоих бронхолитиков отличались незначимо и составляли в среднем 125 и 188 мкг соответственно ($P = 0,068$). Бронхолитическая активность сальбутамола и левосальбутамола также значимо не различалась в группах животных: максимальное изменение транспульмонарного давления (DP_{max}) составило 61,1% и 59,9% соответственно ($P = 0,860$). Таким образом, у лошадей с бронхолегочной обструкцией эффективность левосальбутамола эквивалентна таковой у сальбутамола, в то время как продолжительность действия энантиомерно чистой субстанции как минимум в два раза выше по сравнению с рацематом.

Влияние на контрактильность диафрагмальных мышц. Хроническая обструкция дыхательных путей, в частности, при ХОБЛ, ассоциируется с дисфункцией респираторных мышц, обусловленной хронической гипоксией и гиперкапническим ацидозом (Esau, 1989; Xu et al., 2006; Angulo et al., 2009). Селективные агонисты β_2-адренорецепторов могут оказывать прямое инотропное действие, выражающееся в улучшении контрактильности диафраграмальных мышц, тем самым препятствуя прогрессированию респираторной недостаточности (Ito et al., 2006; Uzuki et al., 2006; Uzuki et al., 2007). Angulo et al. (2009) в эксперименте на крысах линии Sprague-Dawley установили, что обструкция дыхательных путей, индуцированная перевязкой трахеи, сопровождается значимым снижением артериального pH и увеличением парциального давления углекислого газа ($PaCO_2$) и уровня бикарбоната по сравнению со здоровыми животными ($P < 0,05$) на фоне значимого редуцирования пикового напряжения и контрактильности диафрагмальных мышц. Указанные неблагоприятные эффекты нивелировались у крыс, получавших острое и длительное лечение сальбутамолом. В рамках исследования Píriz et al. (2008), проводившегося на крысах с индуцированным перитонеальным сепсисом, введение сальбутамола ассоциировалось со значимым увеличением аортального кровотока и повышением ЧСС на фоне сопутствующего снижения АД, повышения силы диафрагмального сокращения.

Ранее в эксперименте *in vitro* Van Der Heijden et al. (1997) подтвердили способность сальбутамола оказывать позитивное инотропное действие на диафрагмальные мышцы. Данный эффект устранялся блокатором рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулума, что указывает на то, что контрактильные эффекты бронхолитика реализуются за счет увеличения выброса внутриклеточного кальция (Van Der Heijden et al., 1997). По данным других групп исследователей, у собак, в отличие от ряда иных агонистов β_2-адренорецепторов, сальбутамол ни в одной из тестировавшихся доз не оказывает значимого влияния на трансдиафрагмальное давление, генерируемое супрамаксимальной электрической стимуляцией диафрагмального нерва на фоне внутривенного болюсного или инфузионного введения лекарственного средства, что указывает на отсутствие значимой инотропной активности бронхолитика у данного вида лабораторных животных (Derom et al., 1997). Видимо, у человека сальбутамол также лишен клинически значимого инотропного потенциала (Javaheri et al., 1988).

Гиперреактивность дыхательных путей – обратная сторона бронхолитического действия агонистов β_2-адренорецепторов

Имеются свидетельства того, что регулярное ингаляционное введение рацемического сальбутамола в кумулятивных дозах ассоциируется с парадоксальными реакциями у некоторых пациентов с бронхообструктивными заболеваниями (Page and Morley, 1999), выражающимися в парциальном снижении бронхопротективного эффекта и увеличении гиперреактивности дыхательных путей в ответ на действие провокативных

факторов (Cockcroft et al., 1999; Nelson, 1999). Подобный феномен вряд ли ассоциирован с активацией β_2-адренергических рецепторов, в силу чего возникло предположение о возможной роли S-энантиомера в развитии данной реакции (Page and Morley, 1999). Handley et al. (1998) указывают на то, что развитие гиперреактивности дыхательных путей исключено в случае регулярного ингаляционного введения левосальбутамола.

В этой связи обращает на себя внимание исследование Matera et al. (2011), где в эксперименте *in vitro* с применением бронхов, изолированных у здоровых лошадей и животных с рекуррентной обструкцией дыхательных путей, установлено, что ни один из энантиомеров сальбутамола не оказывает релаксирующего действия на фоне субмаксимального плато контрактильности, индуцированной карбахолом, но при этом по сравнению с контролем и R- и S-сальбутамол оказывали слабое, но значимое контрактильное действие ($P < 0,05$). В то же время эутомер индуцировал значимую релаксацию мышц на фоне гистамин-индуцированного сокращения (бронхи здоровых лошадей – 92,1 ± 2,0%, бронхи лошадей с обструкцией – 100,2 ± 4,0%, $P < 0,01$), а дистомер оказывал лишь слабое релаксирующее действие (бронхи здоровых лошадей – 15,8 ± 5,7%, бронхи лошадей с обструкцией – 12,4 ± 5,2%) по сравнению с папаверином. Инкубирование с R- или S-сальбутамолом ассоциировалось со смещением кривой контрактильности мышц здоровых животных в ответ на карбахол вправо относительно контроля ($P < 0,001$) и с отсутствием значимых изменений в эксперименте с применением бронхов лошадей с обструкцией.

В нормальных бронхах R-сальбутамол приводил к значимому снижению E_{max} (6,36 ± 0,21 против 9,07 ± 0,68 г в контроле, $P < 0,01$) и редуцировал активность потенциала в отношении мышц животных с обструкцией (EC_{50} 7,10 ± 0,35 мкмоль, $P < 0,001$). В случае применения S-сальбутамола кривая концентрации гистамина смещалась влево для бронхов здоровых животных (2,25 ± 0,19 мкмоль против контроля 7,00 ± 0,29 мкмоль, $P < 0,001$) и лошадей с обструкцией (1,50 ± 0,80 мкмоль против контроля 2,80 ± 0,26 мкмоль, $P < 0,05$). Таким образом, S-сальбутамол у лошадей умеренно потенцирует контрактильность гладкомышечных стенок дыхательных путей, индуцированную карбахолом, а также вызывает гиперреактивность на фоне введения гистамина. Эти данные подтверждают способность S-энантиомера сальбутамола потенцировать контрактильные ответы спазмогенов.

Примером того, что S-энантиомеру сальбутамола присущ ряд фармакологических свойств, не связанных с его β_2-адренергическим потенциалом, может служить работа Keir et al. (2002). Они в эксперименте на овальбумин-сенсибилизированных морских свинках, получавших в течение 10-дневного периода посредством длительной подкожной инфузии (RS)-, R- или S-сальбутамола (1 мг/кг·день) установили, что регулярное введение рацемата или S-энантиомера ассоциируется со значимым увеличением реактивности дыхательных путей на различные провокационные стимулы, при этом сопутствующее введение капсаицина предупреждает этот эффект. Интересно, что броходилатирующая активность рацемата после его острого внутривенного введения животным, получавшим R,S-, R- или S-сальбутамол, не снижалась по сравнению с животными, получавшими плацебо. В итоге, Keir et al. (2002) пришли к выводу, что толерантность к бронхолитическим эффектам R,S-, R- или S-сальбутамола, развивающаяся при длительном введении, скорее всего, не связана с оккупацией β_2-адренорецепторов или их десенситизацией, а, как минимум частично, со снижением восприимчивости капсаицин-чувствительных нервов.

По данным другого эксперимента с аналогичным дизайном также сделаны подобные выводы. У морских свинок подкожное введение рацемического сальбутамола в дозе 0,2 мг/кг·день в течение 10 суток также ассоциировалось с частичным увеличением бронхореактивности на введение гистамина, метахолина и бомбезина. Последующее острое внутривенное введение сальбутамола подавляло бомбезин-индуцированную бронхоконстрикцию. С учетом того, что сальбутамол сохраняет свои бронходилатирующие эффекты, десенситизация β_2-адренорецепторов, возможно, не является основной причиной развития толерантности к бронхолитику при его регулярном применении (Buchheit et al., 1995). S-сальбутамол метаболизируется значительно медленнее по сравнению с эутомером и сохраняется преференциально в верхних дыхательных путях, что может стать триггером парадоксальных эффектов при регулярном применении рацемата в высоких дозах (Page and Morley, 1999). Это указывает на то, что дистомеры агонистов β_2-адреномиметиков могут являться причиной повышения заболеваемости и смертности у пациентов с бронхиальной астмой (Handley et al., 1998; Ameredes and Calhoun, 2010). В эксперименте Mazzoni et al. (1994) острое подкожное инфузионное введение рацемического сальбутамола (0,69 мкг/кг·мин в течение менее 1 ч) ассоциировалось с полным подавлением аллергического бронхоспазма у сенситизированных морских свинок. Более длительное введение приводило к прогрессивному повышению чувствительности животных к антигену в условиях его ингаляционного введения, при этом через 48 ч после ингаляции в группах экспериментальных животных регистрировались случаи развития коллапса и смерти. Между тем, острая инфузия рацемата в дозе 1,67 мкг/кг·мин подавляла обструкцию дыхательных путей, что, вероятно, обусловлено активацией β_2-адренорецепторов R-сальбутамолом, в то время как внутривенное введение S-энантиомера в аналогичной дозе индуцировало гиперреактивность к гистамину без сопутствующего изменения калибра дыхательных путей. Результаты этих наблюдений указывают на то, что при подкожном инфузионном введении рацемический сальбутамол первоначально предотвращает бронхоконстрикторные ответы на антиген в силу доминирования бронходилатирующей активности эутомера над способностью дистомера индуцировать гиперреактивность. Конверсия протективного действия на повышение чувствительности к антигену не связана с редуцированием пула β_2-адренорецепторов или интенсивности их стимуляции, поскольку в эксперименте подкожное введение рацемата или ингаляция рацемического изопреналина оказывали протективные эффекты против летальных доз антигена. Прогрессивное снижение эффективности R-сальбутамола может являться следствием диспропорциональной кумуляции дистомера у животных подобно человеку в силу стереоселективности метаболизма R-сальбутамола.

Для того, чтобы внести ясность в возможные механизмы парадоксального бронхоконстрикторного действия дистомера сальбутамола, обратим внимание на работу Mitra et al. (1998), которые изучили эффекты S-сальбутамола на внутриклеточный уровень кальция Ca^{2+} в культуре диссоциированных гладкомышечных клеток бычьей трахеи. Так, S-сальбутамол в концентрациях выше 1 пмоль и рацемат в концентрации 1 нмоль индуцировали увеличение Ca^{2+} на 150 и 100 нмоль соответственно, что строго контрастировало с R-энантимером, индуцировавшим снижение концентрации ионов. Увеличение Ca^{2+} блокировалось в присутствии атропина и 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидина, но интенсифицировалось на фоне ICI-118551 – блокатора β_2-адренорецепторов. При 30-секундной экспозиции дистомером в клетках регистрировали увеличение уровня инозитолтрифосфата в среднем на 213,0 ± 34,4%. Отсутствие значимых изменений Ca^{2+} в среде, свободной от ионов кальция, указывает на то, что эффекты S-сальбутамола обусловлены увеличением внутриклеточных токов ионов. Исследователи заключили, что S-сальбутамол может перекрестно реагировать с мускариновыми рецепторами. При этом, Bosak et al. (2017) в эксперименте с применением трех вариантов бутирилхолинэстеразы (BChE), выделенной из плазмы донорской крови, а также рекомбинантной AChE человека, установили, что β_2-адреномиметики, в том числе сальбутамол, обладают свойствами обратимых ингибиторов холиэстеразы. При этом ингибиторная активность сальбутамола в отношении AChE (K_i 2,0 ± 0,2 ммоль) почти в два раза превышает таковую у тербу-

талина (4,8 ± 0,2 ммоль). В отношении типичной BChE активность сальбутамола увеличивается в 28 раз (0,071 ± 0,006 ммоль). Связывание с активными центрами холинэстераз не является стереоселективным. Так, значения K_i R-сальбутамола для AChE и BChE составили 4,0 ± 0,3 и 0,19 ± 0,04 ммоль, S-сальбутамола – 1,8 ± 0,1 и 0,31 ± 0,05 ммоль, соответственно. С учетом приведенных данных можно предположить, что в условиях экспозиции оба энантиомера могут индуцировать локальное повышение активности холинергической системы, в том числе за счет подавления активности AChE в синаптической щели холинергических синапсов, увеличивая тем самым уровень медиатора ацетилхолина и косвенно интенсифицируя его бронхоконстрикторное действие.

Agrawal et al. (2004) сравнили клеточные эффекты сальбутамола и его энантиомеров на внутриклеточную сигнализацию, вовлекаемую в констрикторные и воспалительные ответы гладкомышечных клеток бронхов человека. В первичной культуре миоцитов S-энантиомер значимо и дозозависимо индуцировал увеличение экспрессии и активности $G_{i\alpha}$-протеина и снижение экспрессии G_s-протеина адренорецепторов. Рецептор-независимая активация аденилатциклазы форсколином устранялась в присутствии S-сальбутамола. По прошествии 24 ч инкубирования с дистомером в клетках отмечали увеличение Ca^{2+} в ответ на стимуляцию метахолином. Эффекты S-сальбутамола полностью противоположны таковым у R-энантиомера, а активность рацемического сальбутамола по некоторым параметрам сходна с таковой у дистомера. S-сальбутамол индуцировал активацию PI3-киназы и NF-κB в гладкомышечных клетках. Таким образом, экспериментально установлено, что S-сальбутамол может вызывать up-регуляцию экспрессии и активности проконстрикторных путей с участием $G_{i\alpha}$-протеина, Ca^{2+}, а также снижать активность бронходилатирующих механизмов с участием G_s-протеина. Дистомер также индуцирует провоспалительные каскады с участием PI3-киназы и NF-κB. С учетом того, что S-сальбутамол метаболизируется в 10 раз медленней по сравнению с эутомером, и его $T_{1/2}$ более продолжителен, очевидно, что гладкомышечные клетки могут подвергаться длительной экспозиции S-сальбутамолом, что увеличивает риск его неблагоприятных провоспалительных и констрикторных эффектов в случае систематического приема рацемического сальбутамола при хронических заболеваниях, в том числе при бронхиальной астме. По данным других исследователей, устранение из рацемата S-сальбутамола, обладающего провоспалительными свойствами, может элиминировать персистирующую обструкцию бронхов и снижать их эластичность, ассоциированную с увеличением интенсивности воспаления, уменьшением отека и подавлением активации лейкоцитов при ХОБЛ (Costello, 1999).

Некоторые исследователи все же не исключают, что развитие гиперреактивности дыхательных путей и снижение бронхопротекторного действия сальбутамола на молекулярном уровне может объясняться функциональной десентиситизацией (down-регуляция) β_2-адренорецепторов, экспрессируемых в гладкомышечных клетках дыхательных путей с сопутствующим повышением активности ассоциированной с ними аденилатциклазы (Herepath and Broadley, 1992; Hauck et al., 1997; Boskabady and Aslani, 2007). Cooper and Panettieri (2008) в эксперименте с применением тонких срезов легкого человека, содержащих фрагменты дыхательных путей, установили, что сальбутамол стимулирует время- и дозозависимое снижение изопротеренол-индуцированой релаксации, достигающей 45,0% (P = 0,011). Это указывает на способность бронхолитика в условиях длительной экспозиции десенситизировать β_2-адренорецепторы за счет активации протеинкиназы А. Указанный эффект сальбутамола нивелировался в присутствии дексаметазона. Позднее подтверждена роль глюкокортикостероидов в превентировании и реверсировании толерантности β_2-адренорецепторов на фоне десенситизирующих эффектов длительнодействующих β_2-адреномиметиков (Cooper et al., 2011). Это указывает на то, что десенситизация рецепторов дыхательных путей является класс-специфическим эффектом агонистов β_2-адренорецепторов. После связывания с агонистом β_2-адренорецепторы подвергаются быстрой интернализации с последующим перераспределением (эндоцитозом) рецепторов из плазматической мембраны в цитозольные везикулы.

Дополнительные благоприятные эффекты β_2-агонистов

Влияние на мукоцилиарный клиренс. Важным эффектом агонистов β_2-адренорецепторов является увеличение частоты биения ресничек мерцательного эпителия, интегрального показателя мукоцилиарного клиренса. По данным Sabater et al. (2005), у овец сальбутамол (180 мкг) и сальмотерол (42 мкг) значимо интенсифицируют обмен трахеальной слизи (tracheal mucus velocity (TMV) в течение 6-часов после ингаляционного введения, а также нивелируют неблагоприятные эффекты ингаляционного введения эластазы нейтрофилов человека, выражающиеся в снижении мукоцилиарного клиренса. В эксперименте с применением овечьих эпителиоцитов дыхательных путей и метода цифровой видеомикроскопии Frohock et al. (2002) подтвердили способность R-энантиомера рацемического сальбутамола дозозависимо стимулировать повышение активности ресничек мерцательного эпителия на 24,4 ± 5,4% в сравнении с базальным уровнем (7,2 ± 0,2%), в то время как рацемат – всего на 12,8 ± 3,6%, что значимо меньше в сравнении с энантиомером, несмотря на его присутствие в рацемате в эквипотентной концентрации.

По данным регистрации внутриклеточных токов кальция в отдельных клетках установлено, что стимулирующий эффект R-сальбутамола ассоциирован со стимуляцией β_2-адренорецепторов и активацией протеинкиназы А по Ca^{2+}-зависимому и Ca^{2+}-независимому механизмам. Дистомер индуцировал лишь ничтожно малые изменения активности ресничек эпителиоцитов и не изменял концентрацию внутриклеточного кальция. Таким образом, позитивные эффекты рацемического сальбутамола на цилиарный клиренс обусловлены присутствием в его составе R-энантиомера.

McAuley et al. (2004) в рамках проспективного, рандомизированного исследования на лабораторных крысах с нормальной легочной функцией и с экспериментально индуцированным повреждением легких установили, что рацемический сальбутамол (10^{-5} моль) и изопротеренол (10^{-6} моль) стимулируют повышение клиренса альвеолярной жидкости до уровня, сравнимого с максимальным при введении дибутирил-цАМФ (32,9 ± 10,9%/ч против базального 7,6 ± 2,2%/ч, P < 0,05). По сравнению с базальным уровнем и рацемический сальбутамол (10^{-6} моль) и его эутомер (10^{-6}) вызывают сходное увеличение клиренса альвеолярной жидкости (14,5 ± 3,0% (P < 0,05) и 15,0 ± 4,6% (P < 0,05) без значимых различий между группами. Таким образом, в клинически релевантных концентрациях сальбутамол и его эутомер стимулируют в здоровых легких цАМФ-зависимое повышение альвеолярного клиренса и редуцируют легочный отек в условиях легочного повреждения за счет увеличения альвеолярного клиренса и снижения эндотелиальной проницаемости. Данные исследований *in vitro* указывают на то, что S-энантиомер сальбутамола может индуцировать мукоцилиарную дисфункцию.

Противовоспалительная активность. В настоящее время имеются доказательства наличия у агонистов β_2-адренорецепторов не только бронходилатирующей активности, но и широкого спектра противовоспалительных эффектов, потенциально увеличивающих их клиническое значение в лечении пациентов с бронхообструктивными заболеваниями, имеющими воспалительный компонент. Reinero et al. (2009) в рандомизированном перекрестном эксперименте на здоровых кошках и животных с экспериментально индуцированной бронхиальной астмой, получавших длительно ингаляционно рацемический сальбутамол или один из его энантиомеров, установили, что в обеих группах рацемат и S-сальбутамол статистически значи-

мо увеличивают клеточность бронхоальвеолярного лаважа (P = 0,04 и P = 0,02) по сравнению с животными, получавшими R-сальбутамол или плацебо. При этом число эозинофилов в лаваже и активность TNF-α были значимо выше у кошек с бронхиальной астмой, чем у животных, получавших другие исследуемые виды терапии (P = 0,03 и P = 0,004). У здоровых животных число нейтрофилов в лаваже повышалось на фоне введения рацемата и S-сальбутамола (P = 0,04). Таким образом, регулярное ингаляционное введение рацемического сальбутамола или его дистомера, в отличие от R-сальбутамола, у здоровых кошек и животных с бронхиальной астмой ассоциируется с развитием воспалительного процесса.

В экспериментах на мышах с острым IgG- или ЛПС-индуцированным повреждением легких S-сальбутамол значимо (P < 0,01 и P < 0,05, соответственно) снижал выход альбумина в бронхоальвеолярную жидкость, в то время как R-энантиомер в эквипотентной концентрации оказывал лишь статистически незначимое влияние. Эффект S-сальбутамола сочетался с почти 70% снижением уровня полимофоядерных клеток в бронхоальвеолярной жидкости (P < 0,001 и P < 0,01), а также ряда цитокинов, включая CXCL1, MCP-1 (CCL2), TNF-α (P < 0,05), играющих ключевую роль в патогенезе острого легочного IgG-индуцированного повреждения. В эксперименте *in vitro* в ЛПС-стимулированных макрофагах перитонеального экссудата, выделенного у мышей, S-сальбутамол значимо редуцировал уровни интерлейкина 6 (IL-6), IL-12, KC, MCP-1, MIP-1α, TNF-α и IFN-γ на фоне сопутствующего 31% снижения уровня фосфорилированной JNK. В дополнительном эксперименте установлено, что снижение продукции TNF-α может быть связано как раз с подавлением активации JNK в макрофагах. Подтверждена способность S-сальбутамола почти в два раза стимулировать выброс IL-10 ЛПС-стимулированными макрофагами, известного своей способностью ингибировать экспрессию цитокинов в активированных макрофагах. По данным гистопатологического исследования, у мышей, получавших S-сальбутамол, в некоторых альвеолярных пространствах отмечалось значимо меньшее отложение фибрина и числа эритроцитов (Bosmann et al., 2012).

Также известно, что цАМФ-зависимая сигнальная трансдукция, в том числе ассоциированная с активацией β_2-адренорецепторов, оказывает негативное модулирующее действие на дегрануляцию эозинофилов человека, активируемую IgG или секреторным IgA. Подавление активации эозинофилов β_2-агонистами может иметь большое клиническое значение за счет подавления выброса эозинофильных цитотоксических протеинов, промотирующих развитие аллергии и воспаления *in vivo* (Momose et al., 1998). В связи с этим отметим экспериментальную работу Ferrada et al. (2008), в которой установлено, что у мышей с аллергическим воспалением легких, индуцированным сенсибилизацией животных овальбумином, получавших посредством подкожной инфузии R-сальбутамол (200 мкг/100 мкл), отмечалось выраженное, хотя и не значимое по сравнению с контролем, снижение уровней эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже и сывороточного IgE. В активированных спленоцитах мышей только энантиомер индуцировал значимое снижение экспрессии мРНК IL-2 и IL-13, без значимых различий в группах по уровню IL-6. В митоген-активированных Т-клетках в присутствии R-энантиомера снижались уровни мРНК IL-2, IL-13 (значимо), IL-6 (незначимо) и активность NF-κB (незначимо). В другом исследовании у мышей с экспериментально индуцированной бронхиальной астмой R-сальбутамол значимо редуцировал выход эозинофилов в бронхоальвеолярную жидкость и ткани дыхательных путей, подавлял гиперплазию гоблетовских клеток и слизистую окклюзию, а также снижал уровни IL-4 в бронхоальвеолярном лаваже и овальбумин-специфического IgE в плазме крови. Несмотря на наличие некоторых из этих позитивных эффектов, S-сальбутамол интенсифицировал отек и реактивность дыхательных путей у животных в ответ на введение метахолина, в то время как эутомер не оказывал влияния на легочную механику и развитие отека. Вероятно, оба энантиомера сальбутамола редуцируют траффик эозинофилов в верхних дыхательных путях и гиперсекрецию слизи у мышей с бронхиальной астмой, но S-сальбутамол потенцирует развитие отека и гиперреактивность, что может лимитировать клиническую эффективность рацемического сальбутамола (Henderson et al., 2005). Volcheck et al. (2005), в свою очередь, подтвердили наличие у R-сальбутамола противовоспалительной активности. Так, *in vitro* рацемический сальбутамол ингибировал IL-5-активированную продукцию супероксидных радикалов эозинофилами человека. Указанный эффект усиливался в присутствии IBMX – ингибитора фосфодиэстеразы и реверсировался на фоне ICI 118, 551 – селективного антагониста β_2-адренорецепторов. При обработке клеток только R-энантиомером отмечался аналогичный эффект, достигавший максимума через 60 минут, но исчезавший при более длительном инкубировании. Интересно, что S-сальбутамол в присутствии IBMX не влиял на секрецию супероксида IL-5-активированными клетками в первые 60 мин инкубирования, но значимо ее усиливал в последующий период. S-сальбутамол не оказывал модифицирующего влияния на ингибиторную активность R-энантиомера в составе рацемата. Таким образом, при изолированном применении энантиомеры оказывают разнонаправленные эффекты на выброс провоспалительных медиаторов из активированных эозинофилов человека. Кинетика этих эффектов различна и в случае одновременного введения в составе рацемата, вероятно, активность R-сальбутамола имеет преференциальное значение.

Чуть ранее Baramki et al. (2002) высказали предположение о том, что противовоспалительные эффекты R-энантиомера, реализуемые посредством активации β_2-адренорецепторов Т-лимфоцитов, могут маскироваться в присутствии S-сальбутамола, в случае введения рацемата *in vivo*. В эксперименте с применением антиген-специфических Т-клеточных линий, обработанных рекомбинантным IL-2 человека и столбнячным токсином, R-сальбутамол значимо ингибировал пролиферацию Т-клеток: в концентрации 10^{-8} моль/л – на 77,0 ± 9,7% и в концентрации 10^{-7} моль/л – на 61,1 ± 9,0% по сравнению с контролем. S-сальбутамол при его изолированном применении не оказывал влияния, но в сочетании с эутомером индуцировал дозозависимое увеличение пролиферации клеток. В эквивалентных концентрациях обоих изомеров пролиферация не изменялась по сравнению с контролем, но в концентрации 10^{-6} моль/л S-сальбутамол увеличивал пролиферацию. Антипролиферативное действие эутомера и стимулирующие эффекты комбинации энантиомеров блокировались в присутствии пропранолола. R-сальбутамол в концентрации 10^{-8} подавлял продукцию IL-2 и IFN-γ, но комбинация энантиомеров (10^{-8}/энантиомер) не оказывала влияния на секрецию цитокинов. При сочетанном применении R-энантиомера в концентрации 10^{-8} моль/л с S-сальбутамолом в концентрации 10^{-6} моль/л увеличивалась продукция IL-2 и IL-13. Приведенные данные подтверждают наличие противовоспалительных эффектов R-энантиомера, обусловленных активацией β_2-адренорецепторов, в то время как рацемат проявляет лишь минимальное влияние на пролиферацию или продукцию цитокинов Т-клетками. Избыточное присутствие S-сальбутамола ассоциируется с его провоспалительными эффектами. Возможно, последний проявляет свойства обратного агониста, переключающего функции β_2-адренорецепторов.

При этом Chorley et al. (2006) предположили, что острая стимуляция эпителиальных клеток дыхательных путей сальбутамолом может подавлять продукцию и высвобождение провоспалительных медиаторов, в том числе GM-CSF посредством активации iNOS-зависимых каскадов. Исследователи провели эксперимент, в котором первичные культуры клеток бронхиального эпителия подверглись экспозиции коктейлем из цитокинов, включавшем IFN-γ и IL-2β, с целью индуцирования экспрессии iNOS, после чего в экспериментальную

систему добавлялись R- и S-сальбутамол в качестве рацемической смеси. Экспрессия iNOS значимо и концентрацие-зависимо усиливалась в присутствии R-энантиомера с сопутствующим подавлением цитокин-индуцированной экспрессии мРНК и протеина GM-CSF, в то время как дистомер не оказывал влияния. В то же время для интенсификации эффектов iNOS требуется протеинкиназа С (ПКС), индуцирующая транскрипцию iNOS, в частности, ее PKCδ-изоформа. R-сальбутамол активировал экспрессию PKCδ лишь частично и первоначально с последующим снижением уровня энзима по прошествии 6 ч инкубирования, что указывает на активацию iNOS по PKCδ-независимому пути.

Auais et al. (2005) установили, что инфекция дыхательных путей, вызванная респираторным синцитиальным вирусом, у крыс сопровождается развитием нейрогенного воспаления в нижнем сегменте респираторного тракта. В другом эксперименте на инфицированных крысах исследователи установили, что экстравазация альбумина, вызванная стимуляцией сенсорных нервов капсаицином, подавляется на фоне ингаляционного введения рацемического сальбутамола в дозе 0,63 мг, в то время как в более высоких дозах бронхолитик проявляет лишь минимальный аддитивный эффект. Противовоспалительный эффект R-энантиомера значимо более выражен даже в случае его введения в меньшей дозе (0,31 мг), а в случае введения в высоких дозах нейрогенная экссудация полностью подавляется. S-сальбутамол не оказывает значимого противовоспалительного действия даже в дозе 1,25 мг, а с повышением дозы проявляет лишь минимальный ингибиторный эффект. Противовоспалительное действие R-сальбутамола реализуется независимо от экспрессии рецепторов substance P neurokinin 1, что указывает на его прямое действие на сосудистую стенку.

Ibe et al. (2008) в эксперименте *in vitro* с применением гладкомышечных клеток человека установили, что, подобно фактору роста тромбоцитов (PDGF) и фактору активации тромбоцитов (PAF), S-сальбутамол стимулирует клеточную пролиферацию, в то время как R-сальбутамол – наоборот. Поскольку PDGF и S-сальбутамол не оказывали аддитивного влияния на эффекты друг друга, вероятно, их пролиферативная активность реализуется посредством разных механизмов. По сравнению с R-энантиомером S-сальбутамол более выраженно индуцировал экспрессию NF-κB, IκBα, циклин-зависимых киназ 2 и 4, IL-6, протеина ретинобластомы (pRb) и протеина рецепторов PAF. В присутствии дистомера отмечалось увеличение секреции IL-6, а также устранение ингибиторного влияния эутомера на секрецию цитокина. Приведенные данные подтверждают способность S-сальбутамола стимулировать пролиферацию гладкомышечных клеток посредством интенсификации экспрессии и фосфорилирования внутриклеточных митогенных протеинов и стимуляции секреции IL-6. Индуцирование экспрессии белка PAF-рецепторов доказывает, что S-сальбутамол может оказывать неблагоприятные эффекты посредством связывания с G-протеин-ассоциированными рецепторами, такими, как PAF-рецептор. Позднее упомянутой группой исследователей установлено, что S-сальбутамол может время-зависимо увеличивать связывание PAF с рецептором, коррелирующее с выбросом инозитолтрифосфата, в то время как левосальбутамол и рацемат не оказывают значимых эффектов. Более того, S-сальбутамол интенсифицирует синтез PAF и подавляет его катаболизм (Bae et al., 2012). PAF является важнейшим провоспалительным липидным медиатором, активно вовлекающимся в процессы развития аллергии и воспаления в легких (Roth et al., 1996; Honda et al., 2002). Левосальбутамол в малых концентрациях ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток дыхательных путей человека с сопутствующей активацией цАМФ/ПКА-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов. В присутствии дистомера ингибиторный эффект R-энантиомера устраняется с 65%-снижением продукции цАМФ. Левосальбутамол подавляет экспрессию NF-κB и pRb. Этот эффект устраняется в присутствии ICI-118551 – селективного блокатора β_2-адренорецепторов, в то время как селективный антагонист PAF-рецепторов CV-3988 подавляет пролиферативные эффекты S-сальбутамола и не влияет на активность левосальбутамола, что указывает на различие молекулярных мишеней и разные фармакологические эффекты энантиомеров (Ibe et al., 2006).

Как неоднократно показано в экспериментах, β_2-адреномиметики, в том числе сальбутамол, могут модулировать функции эпителиоцитов и гладкомышечных клеток дыхательных путей, включая продукцию цитокинов и TGF-β. Последний ассоциируется ремоделированием, up-регуляцией синтеза фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и стимуляцией дифференциации фибробластов в миофибробласты. Frieri and Capetandes (2008) предположили, что S-сальбутамол может индуцировать в микрофибробластах экспрессию VEGF и фибронектина в присутствии экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*. В эксперименте культуру нормальных легочных фибробластов человека стимулировали IL-1β, TGF-β и экстрактом *D. pteronyssinus* и далее инкубировали с энантиомерами сальбутамола. В присутствии R-сальбутамола (10^{-7} моль) секреция VEGF фибробластами возрастала почти в два раза по сравнению с S-сальбутамолом ($P < 0,05$). Секреция VEGF миофибробластами также возрастала в два раза, но без значимых различий между энантиомерами. S-сальбутамол в концентрациях 10^{-8}–10^{-4} моль дозозависимо индуцировал повышение уровня мРНК VEGF с параллельным увеличением его секреции. По сравнению с R-энантиомером S-сальбутамол в концентрации 10^{-5} моль индуцировал продукцию фибронектина в миофибробластах, но не в фибробластах, активированную рекомбинантным IL-1β человека и *D. pteronyssinus*, а в концентрации 10^{-6} – увеличение основного фактора роста фибробластов (bFGF). Таким образом, в концентрации 10^{-6} моль S-сальбутамол, но не R-сальбутамол, может промотировать ангиогенез, увеличивать продукцию фибронектина или bFGF, что, в свою очередь, запускает процесс отложения матрикса и ремоделирования, в частности – при бронхиальной астме.

Противоаллергическое действие. Толерантность клеток-мишеней к β_2-адренорецептор-зависимым эффектам бронхолитиков обусловлена фосфорилированием β_2-адренорецепторов, катализируемым цАМФ-зависимой ПКА, а также фосфорилированием под действием киназы G-протеин-ассоциированных рецепторов (GRK), которое, в свою очередь, ведет к присоединению белка β-аррестина и интернализации рецептора (Tran et al., 2004).

Тучные клетки, локализуемые в легких и периферической крови человека, экспрессируют Ca^{2+}-активируемые калиевые каналы (iKCa1), которые активируются по IgE-зависимому пути с развитием гиперполяризации клетки, потенцируемой внутриклеточными токами ионов кальция. Активация β_2-адренорецепторов, в частности, сальбутамолом (1^{-10} мкмоль), ассоциируется с подавлением токов iKCa1, индуцируемых анти-IgE и блокаторов рецепторов ICI 118551. Экспериментально установлено, что активность каналов iKCa1 регулируется $G_{\alpha s}$-протеин-ассоциированными β_2-адренорецепторами, активация которых в присутствии специфических агонистов оказывает мембраностабилизирующее действие на тучные клетки (Duffy et al., 2005; Wang and Lau, 2006). Chong et al. (2003) установили, что длительная экспозиция тучных клеток сальбутамолом ассоциируется с десенситизацией β_2-адренорецептор-зависимых ответов тучных клеток легких человека, в конечном итоге, приводящих к выбросу гистамина. Причем указанный эффект сальбутамола более выражен по сравнению с таковым у тербуталина, несмотря на эквивалентное редуцирование плотности мембранных β_2-адренорецепторов, достигающее примерно 25% ($P > 0,05$). Десенситизирующая активность в отношении тучных клеток присуща и длительно действующим агонистам β_2-адренорецепторов (Scola et al., 2004).

Фармакокинетика

Абсорбция и биодоступность. У кроликов после перорального и ректального введения биодоступность сальбута-

мола не превышает 9% и 17%, соответственно, что указывает на наличие более высокой биодоступности сальбутамола при ректальном введении и ее снижение в случае введения вещества *per os*, возможно, связанным с эффектом первого пассажа (Kurosawa et al., 1993). Сальбутамол подвергается полной локальной абсорбции в двенадцатиперстной кишке, после чего частично метаболизируется в эпителиоцитах слизистой (около 20%), а в последующем – в печени (около 80%). В то же время при ректальном введении у кроликов сальбутамол абсорбируется слабо, подвергается минимальному метаболизму в слизистой (4%), а его концентрация в ректальном венозном кровотоке достигает примерно 40% с последующим прохождением вещества через печень (Kurosawa et al., 1993).

У собак в условиях ингаляционного введения R-сальбутамола с помощью небулайзера регистрируется два четко выраженных пика концентрации энантиомера в плазме крови (C_{max}), при этом около 67% R-сальбутамола от ингаляционной дозы поступает из кишечника. Таким образом, у собак абсорбция R-энантиомера носит двухфазный характер, обусловленный первичным всасыванием энантиомера из кишечника и позднее – из легких (Auclair et al., 2000).

Распределение и связывание с протеинами плазмы крови. Это связывание с протеинами плазмы крови и тканевое распределение хиральных субстанций носит стереоселективный характер, что, в конечном итоге, может оказывать существенное влияние не только на их общий фармакокинетический профиль, но и на характер фармакологических эффектов (Shen et al., 2013). Еще до недавнего времени отсутствовали данные об энантиоселективности фармакокинетики изомеров сальбутамола в легочной ткани. Jacobson et al. (2017) провели исследование, в рамках которого с применением техники тандемной сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией оценили концентрации энантиомеров сальбутамола по прошествии 2, 5, 10 и 15 минут, в центральных (эндоскопия бронхов) и периферических сегментах легких (чрескожная легочная биопсия) у лошадей (n = 12) через 20 и 25 мин после ингаляционного введения рацемата в дозе 1000 мкг соответственно, а также в образцах плазмы крови. Концентрация сальбутамола в бронхоальвеолярной жидкости составила в среднем 57 ± 10 мг (ДИ 95%), в то время как начальные средние уровни R- и S-сальбутамола – 389 ± 189 и 378 ± 177 нг/г соответственно, которые снижались почти на 50% по прошествии 15 мин после ингаляции. Средние значения концентраций R- и S-сальбутамола в центральном сегменте легких были значимо выше в сравнении с таковыми периферической части и составили соответственно 875 ± 945 против 49 ± 12 нг/г и 877 ± 955 против 51 ± 12 нг/г. Энантиоспецифичность фармакокинетического профиля сальбутамола характерна при его распределении в бронхоальвеолярном лаваже и в тканях центральной части легких, а минимальная (~2%) энантиоселективность характерна для периферических сегментов легких. Наличие энантиоселективности фармакокинетики сальбутамола подтверждено при распределении сальбутамола в плазме крови: соотношения S- и R-сальбутамола при определении параметров $AUC_{0\text{-}25\ мин}$ и C_{max} составили 1,25 и 1,14 соответственно.

Биотрансформация. Mohammed et al. (2000) в эксперименте на морских свинках с гистамин-индуцированной бронхоконстрикцией установили, что способ введения бронхолитика имеет критическое значение для получения персистирующего терапевтического действия. После однократного ингаляционного введения бронхолитический эффект сальбутамола (1 мг/кг) у животных сохранялся в течение одного часа, а в случае внутривенного введения – не более 30 минут. Пролонгирование терапевтического эффекта сальбутамола в случае его ингаляционной доставки, как минимум, отчасти может быть обусловлено снижением «потерь» фармакологически активной субстанции в ходе метаболизма в печени, а также менее интенсивной биотрансформацией ее в тканях респираторной системы. В рамках сравнительного исследования, проводившегося Arroyo et al. (2016), у лошадей с рекуррентной обструкцией дыхательных путей в условиях ингаляционного введения с помощью небулайзера продолжительность бронходилатирующего действия сальбутамола составила 60 минут, левосальбутамола – 120 минут.

Eaton et al. (1996) изучили процесс сульфатирования сальбутамола и его энантиомеров в гомогенате клеток легких и бронхиальных эпителиоцитов (BEAS-2B) человека. Как оказалось, в легких внутренний клиренс (V_{max}/K_m) R-сальбутамола почти в 11 раз превышает таковой для S-сальбутамола (0,49 ± 0,32 мл/мин·г протеина против 0,046 ± 0,028 мл/мин·мг протеина), что обусловлено существенными различиями K_m, которые в 16 раз выше для S-энантиомера (1300 ± 170 против 83 ± 12 мкмоль). Кинетика метаболизма энантиомеров сальбутамола в клетках BEAS-2B аналогична, хотя в целом интенсивность сульфатирования ниже. В то же время, по данным Nakpheng et al. (2017), *in vitro* в экстраклеточной среде, внутриклеточной жидкости и лизате клеток легочной ткани метаболиты сальбутамола не детектируются, а значение соотношения S/R-энантиомеров во всех клеточных фракциях варьируют в пределах 0,99–1,10, независимо от фазы клеточного цикла и концентрации бронхолитика. Последнее указывает на отсутствие стереоселективного распределения и механизмов биотрансформации сальбутамола в легочной ткани.

В метаболизме сальбутамола главную роль играют цитозольные сульфотрансферазы (SULT), которые принадлежат семейству детоксицирующих энзимов II фазы и катализируют сульфатирование нативных и экзогенных гидрофобных молекул (Suiko et al., 2017). Флавоноиды могут выступать в качестве ингибиторов SULT1A1 и подавлять сульфатирование ксенобиотиков как в печени, так и в кишечнике, о чем следует иметь в виду в случае терапии сальбутамолом и левосальбутамолом с сопутствующим потреблением флавоноидсодержащих пищевых продуктов (De et al., 2000; Marchetti et al., 2001; De et al., 2002). Кверцетин ингибирует сульфатирование R-сальбутамола, причем интенсивность ингибиторного действия на один – два порядка выше в двенадцатиперстной кишке по сравнению с печенью (Pacifici, 2004). В результате S-сальбутамол более длительный период персистирует в организме и достигает значимо более высоких концентраций в плазме крови по сравнению с R-энантиомером (Sjöswärd et al., 2003). SULT1A3 относительно резистентен к ингибиторным эффектам мефенамовой кислоты, салициловой кислоты и кверцетина (Pacifici, 2004). Мефенамовая и салициловая кислоты также являются ингибиторами SULT1A1 (Vietri et al., 2001, 2002) и могут подавлять сульфатирование R-сальбутамола в печени (Vietri et al., 2000).

По данным Martin et al. (1971), ^{3}H-меченый сальбутамол подвергается быстрой гастроинтестинальной абсорбции у крыс, кроликов, собак и человека. При этом, в зависимости от вида, уровень радиоактивности в моче в течение 24 ч после однократного введения достигает 60–90%, из которых 70–90% у собак обусловлены неизмененным веществом, 90% у кроликов и 40% у крыс ^{3}H-сальбутамол-о-фенилглюкуронидом, не обладающим β_2-агонистической или β_2-антагонистической активностью. У крыс глюкуронид ^{3}H-сальбутамола, образуемый в печени, экскретируется также с желчью. Уровень экскреции глюкуронида с калом у крыс в течение 0–48 ч после введения может достигать 25–40% от введенной дозы радиоактивно меченого бронхолитика. С учетом данных анализа распределения у крыс и собак сальбутамол подвергается полной экскреции из организма, не проявляя способности к кумуляции. В условиях ингаляционного введения в форме аэрозоля у собак и человека ^{3}H-меченый сальбутамол медленно абсорбируется в системный кровоток из тканей легких и в конечном итоге элиминируется с мочой.

Согласно экспериментальным данным Klaassen et al. (1998), уровень экспрессии мРНК SULT1A1 в печени половозрелых крыс, играющий ключевую роль в метаболизме простых фенолов у животных и человека, почти в два раза выше у самцов,

чем у самок. Значимые различия уровня мРНК SULT1A1 обусловлены выраженным снижением ее экспрессии у самок после полового созревания. У животных обоего пола, подвергнутых гипофизэктомии, экспрессия мРНК снижается в равной степени, при этом заместительная терапия гормоном роста не ассоциируется с восстановлением экспрессии мРНК SULT1A1. Таким образом, приведенные данные могут указывать на наличие зависимости интенсивности метаболической биоконверсии сальбутамола от пола. Значимо более интенсивная экспрессия мРНК SULT1A1 у крыс-самцов регистрируется и в других тканях, включая головной мозг, легкие, сердце, кишечник, почки, надпочечники, тестикулы и селезенку. Интересно, что у крыс-самцов, подвергнутых парциальной гепатэктомии, отмечалась лишь тенденция к некоторому снижению экспрессии мРНК SULT1A1, сходная с изменениями регистрировавшимися в экспериментах с применением других быстро пролиферирующих тканей (в частности, злокачественных опухолей и тканей неполовозрелых животных) (Dunn et al., 1999).

Хиральная инверсия. Нередко при применении энантиомерно чистых субстанций в организме происходит их хиральная инверсия в соответствующие дистомеры, не только проявляющие иной фармакокинетический и фармакодинамический профиль, но и несущие токсический потенциал. Красноречивым примером хиральной инверсии и ее потенциально неблагоприятного клинического значения у человека является талидомид, энантиомеры которого быстро подвергаются рацемизации *in vivo* и ассоциируются с хорошо известными тератогенными эффектами талидомида (Zhou et al., 2015).

Ko et al. (2012) в эксперименте *in vitro* с применением культуры клеток гепатомы человека HepG2 подтвердили роль сульфатирования в печени как основного механизма биотрансформации сальбутамола у человека, оценивавшегося по интенсивности генерации ^{35}S-меченого сульфата. В ходе тестирования специфической активности 11 рекомбинантных изоформ SULT человека установлено, что SULT1A3 играет преференциальную роль в метаболизме и детоксикации сальбутамола. При этом сальбутамол оказывает концентрацие-зависимое ингибирование метаболизма дофамина. По мнению исследователей, в высоких дозах сальбутамол может интерферировать с гомеостазом дофамина и, возможно, других катехоламинов *in vivo*. В эксперименте с применением цитозольных и S_9 фракций, полученных из образцов тканей легких, печени, почек и сегмента тонкого кишечника человека, установлено, что скорость интестинальной биотрансформации максимальна по сравнению со скоростью в других тканях.

Ранее установлено, что при ингаляционном введении у собак и человека феномен взаимной хиральной инверсии энантиомеров для сальбутамола не характерен (Fried et al., 1998; Auclair et al., 2000). В то же время, по данным Boulton and Fawcett (2001), после перорального или ингаляционного введения энантиомерно чистого сальбутамола около 6% вещества подвергается конверсии в другой энантиомер, что, как предполагается, связано с рацемизацией, катализируемой кислой средой в желудке.

Экскреция. У кроликов после перорального и ректального введения общий уровень экскреции сальбутамола и его глюкуронида с мочой по прошествии 10 ч после введения составляет около 77% и 10%, соответственно (Kurosawa et al., 1993).

Выводы

Данные доклинических исследований указывают на преимущества R-энантиомера сальбутамола перед рацемическим сальбутамолом и его S-изомером. Это проявляется в значительно большем аффинитете (в 90–100 раз) левосальбутамола в отношении β_1- и β_2-адренорецепторов по сравнению с его дистомером. При этом эффективность левосальбутамола эквивалентна таковой у сальбутамола, в то время как продолжительность действия энантиомерно чистой субстанции R-сальбутамола как минимум в два раза выше по сравнению с рацематом.

Для R-сальбутамола не характерен феномен развития гиперреактивности дыхательных путей, который может развиваться при применении рацемического сальбутамола. Важно обратить внимание на то, что главную роль в аномальном, на первый взгляд, увеличении тонуса бронхов играет S-энантиомер сальбутамола. Важная способность рацемического сальбутамола – увеличивать мукоцилиарный клиренс – у левосальбутамола выражена практически в два раза сильнее. Это свидетельствует о том, что позитивные эффекты рацемического сальбутамола на мукоцилиарный клиренс обусловлены присутствием в его составе R-энантиомера. Левосальбутамол, в отличие от дистомера, способен оказывать противовоспалительное действие, которое выражается в уменьшении количества эозинофилов и нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже, уровня полимофоядерных клеток в бронхоальвеолярной жидкости и ряда цитокинов, включая CXCL1, MCP-1 (CCL2), TNF-α, играющих ключевую роль в патогенезе острого легочного IgG-индуцированного повреждения. R-сальбутамол способен подавлять гиперплазию гоблетовских клеток и слизистую окклюзию дыхательных путей, а также уменьшать уровни IL-4 в бронхоальвеолярном лаваже и овальбумин-специфического IgE в плазме крови экспериментальных животных. В свою очередь, S-сальбутамол проявляет противоположные свойства и способен усиливать воспалительную реакцию.

В связи с тем, что рацемический сальбутамол подвергается стереоселективному метаболизму с активным сульфатированием R-изомера и закономерным накоплением токсичного дистомера в организме, видится разумным применение гомохирального ингаляционного препарата на основе левосальбутамола. Таким образом, гомохиральные препараты на основе R-сальбутамола (левосальбутамола) могут быть более эффективными и безопасными в качестве бронхолитиков в сравнении с рацематом.

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» в рамках комплексного проекта «Создание высокотехнологичного производства жизненно важного лекарственного противоастматического препарата «Сальбутамол» в аэрозольной форме на основе энантиомерно чистой, микронизированной субстанции, получаемой с помощью сверхкритических флюидных технологий» (договор № 03.G25.31.0273 от 29 мая 2017 г.).

References

Agrawal, D., Ariyarathna, K., & Kelbe, P. (2004). S-Albuterol activates pro-constrictory and pro-inflammatory pathways in human bronchial smooth muscle cells. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 113(3), 503–510.

Ameredes, B. T., & Calhoun, W. J. (2006). R-Albuterol for asthma: Pro [a.k.a. S-Albuterol for Asthma: Con]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 174, 965–974.

Ameredes, B. T., & Calhoun, W. J. (2010). Albuterol enantiomers: Pre-clinical and clinical value? Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 2, 1081–1092.

Angulo, M., Taranto, E., Soto, J. P., Malacrida, L., Nin, N., Hurtado, F. J., & Píriz, H. (2009). Salbutamol improves diaphragmatic contractility in chronic airway obstruction. Archivos de Bronconeumología, 45(5), 230–234.

Arrowsmith, J. (2011). Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. Nature Reviews Drug Discovery, 10(5), 328–329.

Arrowsmith, J. (2011). Trial watch: Phase III and submission failures: 2007–2010. Nature Reviews Drug Discovery, 10(2), 87.

Arroyo, M., Couëtil, L., Nogradi, N., Kamarudin, M., & Ivester, K. (2016). Efficacy of inhaled levalbuterol compared to albuterol in horses with recurrent airway obstruction. Journal of Veterinary Internal Medicine, 30(4), 1333–1337.

Auais, A., Wedde-Beer, K., & Piedimonte, G. (2005). Anti-inflammatory effect of albuterol enantiomers during respiratory syncytial virus infection in rats. Pediatric Pulmonology, 40(3), 228–234.

Auclair, B., Wainer, I., Fried, K., Koch, P., Jerussi, T., & Ducharme, M. (2000). A population analysis of nebulized (R)-albuterol in dogs using a novel mixed gut-lung absorption PK-PD model. Pharmaceutical Research, 17(10), 1228–1235.

Bae, R., Arteaga, A., Raj, J., & Ibe, B. (2012). Albuterol isomers modulate platelet-activating factor synthesis and receptor signaling in human bronchial

smooth muscle cells. International Archives of Allergy and Immunology, 158(1), 18–26.
Baramki, D., Koester, J., Anderson, A., & Borish, L. (2002). Modulation of T-cell function by R- and S-isomers of albuterol: Anti-inflammatory influences of R-isomers are negated in the presence of the S-isomer. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 109(3), 449–454.
Barnette, D., Johnson, B., Pouncey, D., Nshimiyimana, R., Desrochers, L., Goodwin, T., & Miller, G. (2017). Stereospecific metabolism of R- and S-warfarin by human hepatic cytosolic reductases. Drug Metabolism and Disposition, 45(9), 1000–1007.
Berger, W. E. (2003). Levalbuterol: Pharmacologic properties and use in the treatment of pediatric and adult asthma. Annals of Allergy, Asthma and Immunology, 90(6), 583–591.
Blin, O. (2004). Chiral switch: Towards a better benefit-risk ratio? Therapie, 59(6), 625–628.
Bosak, A., Knežević, A., Gazić, S. I., Šinko, G., & Kovarik, Z. (2017). Resorcinol-, catechol- and saligenin-based bronchodilating β_2-agonists as inhibitors of human cholinesterase activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32(1), 789–797.
Boskabady, M. H., & Aslani, M. R. (2007). Influence of epithelium on β-adrenoceptor desensitization of guinea pig tracheal smooth muscle. Respiratory Physiology and Neurobiology, 156(1), 69–78.
Bosmann, M., Grailer, J., Zhu, K., Matthay, M., Sarma, J., Zetoune, F., & Ward, P. (2012). Anti-inflammatory effects of β_2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. The FASEB Journal, 26(5), 2137–2144.
Boulton, D. W., & Fawcett, J. P. (2001). The pharmacokinetics of levosalbutamol: What are the clinical implications? Clinical Pharmacokinetics, 40(1), 23–40.
Boulton, D. W., & Fawcett, J. P. (2002). B_2-agonist eutomers: A rational option for the treatment of asthma? American Journal of Respiratory Medicine, 1(5), 305–311.
Broadley, K. J. (2006). B-adrenoceptor responses of the airways: For better or worse? European Journal of Pharmacology, 533(1–3), 15–27.
Buchheit, K. H., Hofmann, A., & Fozard, J. R. (1995). Salbutamol-induced airway hyperreactivity in guinea pigs is not due to a loss of its bronchodilator effect. European Journal of Pharmacology, 287(1), 85–88.
Burke, D., & Henderson, D. J. (2002). Chirality: A blueprint for the future. British Journal of Anaesthesia, 88(4), 563–576.
Calcaterra, A., & D'Acquarica, I. (2017). The market of chiral drugs: Chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, S0731–7085(17), 31483-31488.
Cazzola, M., Page, C., Calzetta, L., & Matera, G. (2012). Pharmacology and therapeutics of bronchodilators. Pharmacological Reviews, 64, 450–504.
Chong, L., Suvarna, K., Chess-Williams, R., & Peachell, P. (2003). Desensitization of β_2-adrenoceptor-mediated responses by short-acting β_2-adrenoceptor agonists in human lung mast cells. British Journal of Pharmacology, 138(3), 512–520.
Chorley, B., Li, Y., Fang, S., Park, J., & Adler, K. (2006). R-albuterol elicits anti-inflammatory effects in human airway epithelial cells via iNOS. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 34(1), 119–127.
Cockcroft, D., Davis, B., Swystun, V., & Marciniuk, D. (1999). Tolerance to the bronchoprotective effect of β_2-agonists: Comparison of the enantiomers of salbutamol with racemic salbutamol and placebo. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 103(6), 1049–1053.
Cooper, P. R., & Panettieri, R. A. Jr. (2008). Steroids completely reverse albuterol-induced β(2)-adrenergic receptor tolerance in human small airways. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 122(4), 734–740.
Cooper, P., Kurten, R., Zhang, J., Nicholls, D., Dainty, I., & Panettieri, R. (2011). Formoterol and salmeterol induce a similar degree of β_2-adrenoceptor tolerance in human small airways but via different mechanisms. British Journal of Pharmacology, 163(3), 521–532.
Costello, J. (1999). Prospects for improved therapy in chronic obstructive pulmonary disease by the use of levalbuterol. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 104(2Pt2), S61–68.
De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F., Rane, A., & Pacifici, G. M. (2002). Inhibition of phenol sulfotransferase (SULT1A1) by quercetin in human adult and foetal livers. Xenobiotica, 32(5), 363–368.
De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2000). Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. Xenobiotica, 30(9), 857–866.
Delmotte, P., & Sanderson, M. J. (2008). Effects of albuterol isomers on the contraction and Ca^{2+} signaling of small airways in mouse lung slices. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 38, 524–531.
Derom, E., Gayan-Ramirez, G., Gurrieri, G., de Bock, V., & Decramer, M. (1997). Broxaterol increases force output of fatigued canine diaphragm more than salbutamol. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 155(1), 181–185.
Duffy, S., Cruse, G., Lawley, W., & Bradding, P. (2005). β_2-adrenoceptor regulation of the K^+ channel iKCa1 in human mast cells. The FASEB Journal, 19(8), 1006–1008.
Dunn, R., Kolaja, K., & Klaassen, C. (1999). Effect of partial hepatectomy on the expression of seven rat sulphotransferase mRNAs. Xenobiotica, 29(6), 583–593.
Eaton, E., Walle, U., Wilson, H., Aberg, G., & Walle, T. (1996). Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells. British Journal of Clinical Pharmacology, 41(3), 201–206.
Esau, S. A. (1989). Hypoxic, hypercapnic acidosis decreases tension and increases fatigue in hamster diaphragm muscle *in vitro*. The American Review of Respiratory Disease, 139(6), 1410–1417.
Ferrada, M., Gordon, E., Jen, K., He, H., Lu, X., Barone, L., & Finn, P. W. (2008). (R)-albuterol decreases immune responses: Role of activated T cells. Respiratory Research, 9(1), 3.
Fried, K., Koch, P., & Wainer, I. (1998). Determination of the enantiomers of albuterol in human and canine plasma by enantioselective high-performance liquid chromatography on a teicoplanin-based chiral stationary phase. Chirality, 10(5), 484–491.
Frieri, M., & Capetandes, A. (2008). The effect of enantiomers of β-agonists on myofibroblast-derived vascular endothelial growth factor and other matrix components in the presence of dust-mite extract. Allergy and Asthma Proceedings, 29(2), 182–188.
Frohock, J., Wijkstrom-Frei, C., & Salathe, M. (2002). Effects of albuterol enantiomers on ciliary beat frequency in ovine tracheal epithelial cells. Journal of Applied Physiology, 92(6), 2396–2402.
Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A., & Asadullah, K. (2012). What makes a good drug target? Drug Discovery Today, 17(Suppl.), S24–30.
Gaskell, H., Derry, S., Wiffen, P., & Moore, R. (2017). Single dose oral ketoprofen or dexketoprofen for acute postoperative pain in adults. The Cochrane Database of Systematic Reviews (CD007355).
Günay, S., Sarıaydın, M., & Yılmaz, D. N. (2016). New bronchodilators and combinations in COPD treatment. Tuberkuloz Ve Toraks, 64(3), 240–245.
Gutierrez-Climente, R., Gomez-Caballero, A., Guerreiro, A., Garcia-Mutio, D., Unceta, N., Goicolea, M., & Barrio, R. (2017). Molecularly imprinted nanoparticles grafted to porous silica as chiral selectors in liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1508, 53–64.
Handley, D. (1999). The asthma-like pharmacology and toxicology of S-isomers of β agonists. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 104(2Pt2), S69–76.
Handley, D. A., Morley, J., & Vaickus, L. (1998). Levalbuterol hydrochloride. Expert opinion on investigational drugs, 7(12), 2027–2041.
Handley, D., McCullough, J., Crowther, S., & Morley, J. (1998). Sympathomimetic enantiomers and asthma. Chirality, 10(3), 262–272.
Hauck, R., Harth, M., Schulz, C., Präuer, H., Böhm, M., & Schömig, A. (1997). Effects of β_2-agonist- and dexamethasone-treatment on relaxation and regulation of β-adrenoceptors in human bronchi and lung tissue. British Journal of Pharmacology, 121(8), 1523–1530.
Henderson, W., Banerjee, E., & Chi, E. (2005). Differential effects of S- and R-enantiomers of albuterol in a mouse asthma model. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 116(2), 332–340.
Herepath, M. L., & Broadley, K. J. (1992). Resistance of β_2-adrenoceptor-mediated responses of lung strips to desensitization by long-term agonist exposure-comparison with atrial β_1-adrenoceptor-mediated responses. European Journal of Pharmacology, 215(2–3), 209–219.
Honda, Z., Ishii, S., & Shimizu, T. (2002). Platelet-activating factor receptor. Journal of Biochemistry, 131(6), 773–779.
Ibe, B. O., Abdallah, M. F., & Raj, J. U. (2008). Mechanisms by which S-albuterol induces human bronchial smooth muscle cell proliferation. International Archives of Allergy and Immunology, 146(4), 321–333.
Ibe, B., Portugal, A., & Raj, J. (2006). Levalbuterol inhibits human airway smooth muscle cell proliferation: Therapeutic implications in the management of asthma. International Archives of Allergy and Immunology, 139(3), 225–236.
Ito, T., Fujimura, N., Omote, K., & Namiki, A. (2006). A selective β_2-adrenergic agonist, terbutaline, improves sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in the rat. Life Sciences, 79(9), 905–912.
Jacobson, G., Raidal, S., Robson, K., Narkowicz, C., Nichols, D., & Haydn, W. E. (2017). Bronchopulmonary pharmacokinetics of R-salbutamol and S-salbutamol enantiomers in pulmonary epithelial lining fluid and lung tissue of horses. British Journal of Clinical Pharmacology, 83(7), 1436–1445.
Jantikar, A., Brashier, B., Maganji, M., Raghupathy, A., Mahadik, P., Gokhale, P., & Salvi, S. (2007). Comparison of bronchodilator responses of levosalbutamol and salbutamol given via a pressurized metered dose inhaler: A randomized, double blind, single-dose, crossover study. Respiratory Medicine, 101(4), 845–849.
Javaheri, S., Smith, J., Thomas, J., Guilfoile, T., & Donovan, E. (1988). Albuterol has no effect on diaphragmatic fatigue in humans. The American Review of Respiratory Disease, 137(1), 197–201.

Keir, S., Page, C., & Spina, D. (2002). Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: Role of sensory nerves. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 110(3), 388–394.
Klaassen, C., Liu, L., & Dunn, R. (1998). Regulation of sulfotransferase mRNA expression in male and female rats of various ages. Chemico-Biological Interactions, 109, 299–313.
Ko, K., Kurogi, K., Davidson, G., Liu, M., Sakakibara, Y., Suiko, M., & Liu, M. (2012). Sulfation of ractopamine and salbutamol by the human cytosolic sulfotransferases. Journal of Biochemistry, 152(3), 275–283.
Kubinyi, H. (2002). Chemical similarity and biological activities. Journal of the Brazilian Chemical Society, 13(6), 717–726.
Kuchay, M. S., & Mithal, A. (2017). Levosulpiride and serum prolactin levels. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 21(2), 355.
Kurosawa, N., Morishima, S., Owada, E., & Ito, K. (1993). Comparison of bioavailability of salbutamol between oral and rectal administration in rabbits. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 113(4), 321–326.
Kurosawa, N., Owada, E., & Ito, K. (1993). Absorption and first-pass-effect of salbutamol after intraduodenal and intrarectal administration in rabbits. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 113(10), 698–704.
Lemoine, H., Overlack, C., Köhl, A., Worth, H., & Reinhardt, D. (1992). Formoterol, fenoterol, and salbutamol as partial agonists for relaxation of maximally contracted guinea pig tracheae: Comparison of relaxation with receptor binding. Lung, 170(3), 163–180.
Li, L., Cheng, B., Zhou, R., Cao, Z., Zeng, C., & Li, L. (2017). Preparation and evaluation of a novel N-benzyl-phenethylamino-β-cyclodextrin-bonded chiral stationary phase for HPLC. Talanta, 174, 179–191.
Li, L., Wu, C., Ma, Y., Zhou, S., Li, Z., & Sun, T. (2017). Effectively enhancing the enantioseparation ability of β-cyclodextrin derivatives by de novo design and molecular modeling. Analyst, 142(19), 3699–3706.
Liu, Y., Deng, M., Yu, J., Jiang, Z., & Guo, X. (2016). Capillary electrophoretic enantioseparation of basic drugs using a new single-isomer cyclodextrin derivative and theoretical study of the chiral recognition mechanism. Journal of Separation Science, 39(9), 1766–1775.
Marchetti, F., De, S. C., Vietri, M., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F. (2001). Differential inhibition of human liver and duodenum sulphotransferase activities by quercetin, a flavonoid present in vegetables, fruit and wine. Xenobiotica, 31(12), 841–847.
Martin, L., Hobson, J., Page, J., & Harrison, C. (1971). Metabolic studies of salbutamol-3H: A new bronchodilator, in rat, rabbit, dog and man. European Journal of Pharmacology, 14(2), 183–199.
Matera, M., Calzetta, L., Rogliani, P., Bardaro, F., Page, C., & Cazzola, M. (2011). Evaluation of the effects of the R- and S-enantiomers of salbutamol on equine isolated bronchi. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 24(2), 221–226.
Mazzoni, L., Naef, R., Chapman, I., & Morley, J. (1994). Hyperresponsiveness of the airways following exposure of guinea-pigs to racemic mixtures and distomers of β_2-selective sympathomimetics. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 7(6), 367–376.
McAuley, D., Frank, J., Fang, X., & Matthay, M. (2004). Clinically relevant concentrations of β_2-adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. Critical Care Medicine, 32(7), 1470–1476.
Milgrom, H. (2006). Levosalbutamol in the treatment of asthma. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 7(12), 1659–1668.
Mitra, S., Ugur, M., Ugur, O., Goodman, H., McCullough, J., & Yamaguchi, H. (1998). S-Albuterol increases intracellular free calcium by muscarinic receptor activation and a phospholipase C-dependent mechanism in airway smooth muscle. Molecular Pharmacology, 53(3), 347–354.
Mohammed, S. P., Taylor, C. V., Weyman-Jones, C. B., Mather, M. E., Vendy, K., Dougall, I. G., & Young, A. (2000). Duration of action of inhaled vs. intravenous β_2-adrenoceptor agonists in an anaesthetized guinea-pig model. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 13(6), 287–292.
Momose, T., Okubo, Y., Horie, S., Suzuki, J., Isobe, M., & Sekiguchi, M. (1998). Effects of intracellular cyclic AMP modulators on human eosinophil survival, degranulation and CD11b expression. International Archives of Allergy and Immunology, 117(2), 138–145.
Nakpheng, T., Songkarak, S., Suwandecha, T., Sritharadol, R., Chunhachaichana, C., & Srichana, T. (2017). Evidences for salbutamol metabolism by respiratory and liver cell lines. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 32(2), 127–134.
Nelson, H. S. (1999). Clinical experience with levalbuterol. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 104(2Pt2), S77–84.
Noguchi, S., Nishimura, T., Mukaida, S., Benet, L., Nakashima, E., & Tomi, M. (2017). Cellular uptake of levocetirizine by organic anion transporter 4. Journal of Pharmaceutical Sciences, 106(9), 2895–2898.
Nowak, R. (2003). Single-isomer levalbuterol: A review of the acute data. Current Allergy and Asthma Reports, 3(2), 172–178.
Pacifici, G. M. (2004). Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: A review of the literature. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 42(9), 488–495.
Page, C. P., & Morley, J. (1999). Contrasting properties of albuterol stereoisomers. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 104(2Pt2), S31–41.
Penn, R., Frielle, T., McCullough, J., Aberg, G., & Benovic, J. (1996). Comparison of R-, S-, and RS-albuterol interaction with human β_1- and β_2-adrenergic receptors. Clinical Reviews in Allergy and Immunology, 14(1), 37–45.
Píriz, H., Nin, N., Boggia, J., Angulo, M., & Hurtado, F. J. (2008). Salbutamol improves diaphragm force generation in experimental sepsis. Archivos de Bronconeumología (English Edition), 44(3), 135–139.
Reinero, C., Delgado, C., Spinka, C., DeClue, A., & Dhand, R. (2009). Enantiomer-specific effects of albuterol on airway inflammation in healthy and asthmatic cats. International Archives of Allergy and Immunology, 150(1), 43–50.
Roth, M., Nauck, M., Yousefi, S., Tamm, M., Blaser, K., Perruchoud, A. (1996). Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. The Journal of Experimental Medicine, 184(1), 191–201.
Sabater, J., Lee, T., & Abraham, W. (2005). Comparative effects of salmeterol, albuterol, and ipratropium on normal and impaired mucociliary function in sheep. Chest, 128(5), 3743–3749.
Sardella, R., Ianni, F., Di Michele, A., Di Capua, A., Carotti, A., Anzini, M., & Natalini, B. (2017). Enantioresolution and stereochemical characterization of two chiral sulfoxides endowed with COX-2 inhibitory activity. Chirality, 29(9), 536–540.
Scola, A., Chong, L., Suvarna, S., Chess-Williams, R., & Peachell, P. (2004). De-sensitisation of mast cell β_2-adrenoceptor-mediated responses by salmeterol and formoterol. British Journal of Pharmacology, 141(1), 163–171.
Shen, Q., Wang, L., Zhou, H., Jiang, H., Yu, L., & Zeng, S. (2013). Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. Acta Pharmacologica Sinica, 34(8), 998–1006.
Sjöswärd, K. N., Josefsson, M., Ahlner, J., Andersson, R. G., & Schmekel, B. (2003). Metabolism of salbutamol differs between asthmatic patients and healthy volunteers. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 92(1), 27–32.
Soriano-Ursúa, M., Trujillo-Ferrara, J., Alvarez-Cedillo, J., & Correa-Basurto, J. (2010). Docking studies on a refined human β(2) adrenoceptor model yield theoretical affinity values in function with experimental values for R-ligands, but not for S-antagonists. Journal of Molecular Modeling, 16(3), 401–409.
Stank, A., Kokh, D., Fuller, J., & Wade, R. (2016). Protein binding pocket dynamics. Accounts of Chemical Research, 49(5), 809–815.
Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., & Liu, M. (2017). Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 81(1), 63–72.
Theron, A., Steel, H., Tintinger, G., Feldman, C., & Anderson, R. (2013). Can the anti-inflammatory activities of β_2-agonists be harnessed in the clinical setting? Drug Design, Development and Therapy, 7, 1387–1398.
Tran, T., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R., & Clark, R. (2004). Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the β_2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. Molecular Pharmacology, 65(1), 196–206.
Uzuki, M., Yamakage, M., Fujimura, N., & Namiki, A. (2006). Preferable inotropic action of procaterol, a potent bronchodilator, on impaired diaphragmatic contractility in an intraabdominal septic model. Journal of Anesthesia, 20(2), 145–148.
Uzuki, M., Yamakage, M., Fujimura, N., & Namiki, A. (2007). Direct inotropic effect of the β-2 receptor agonist terbutaline on impaired diaphragmatic contractility in septic rats. Heart and Lung: The Journal of Acute and Critical Care, 36(2), 140–147.
Välitalo, P. A., Kemppainen, H., Kulo, A., Smits, A., Calsteren, K., Olkkola, K. T., & Allegaert, K. (2017). Body weight, gender and pregnancy affect enantiomer‐specific ketorolac pharmacokinetics. British Journal of Clinical Pharmacology, 83(9), 1966–1975.
Van der Heijden, H., Dekhuijzen, P., Folgering, H., & van Herwaarden, C. (1997). Inotropic effects of salbutamol on rat diaphragm contractility are potentiated by foreshortening. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 155(3), 1072–1079.
Vietri, M., Pietrabissa, A., Mosca, F., Rane, A., & Pacific, G. (2001). Human adult and foetal liver sulphotransferases: Inhibition by mefenamic acid and salicylic acid. Xenobiotica, 31(3), 153–161.
Vietri, M., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2000). Differential inhibition of hepatic and duodenal sulfation of (-)-salbutamol and minoxidil by mefenamic acid. European Journal of Clinical Pharmacology, 56(5–6), 477–479.

Vietri, M., Vaglini, F., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2002). Sulfation of R(-)-apomorphine in the human liver and duodenum, and its inhibition by mefenamic acid, salicylic acid and quercetin. Xenobiotica, 32(7), 587–594.

Volcheck, G., Kelkar, P., Bartemes, K., Gleich, G., & Kita, H. (2005). Effects of R- and S-isomers of β-adrenergic agonists on eosinophil response to interleukin-5. Clinical and Experimental Allergy, 35(10), 1341–1346.

Wang, X. S., & Lau, H. Y. (2006). β-adrenoceptor-mediated inhibition of mediator release from human peripheral blood-derived mast cells. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33(8), 746–750.

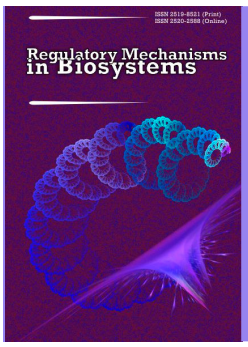
Westerhof, F., Zuidhof, A., Kok, L., Meurs, H., & Zaagsma, J. (2005). Effects of salbutamol and enantiomers on allergen-induced asthmatic reactions and airway hyperreactivity. European Respiratory Journal, 25, 864–872.

Xu, X., Zhou, J., Yang, Q., Fang, L., Xie, Q., & Shen, Y. (2006). An *in vitro* rat diaphragmatic fatigue model induced by combined hypoxic and hypercapnic acidosis and the effect of salmeterol. Pharmacological Research, 53(2), 171–176.

Yao, Y., Song, P., Wen, X., Deng, M., Wang, J., & Guo, X. (2017). Chiral separation of 12 pairs of enantiomers by capillary electrophoresis using heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)-β-cyclodextrin as the chiral selector and the elucidation of the chiral recognition mechanism by computational methods. Journal of Separation Science, 40(14), 2999–3007.

Zhang, Y., Wu, D., Wang-Iverson, D., & Tymiak, A. (2005). Enantioselective chromatography in drug discovery. Drug Discovery Today, 10(8), 571–577.

Zhou, T., Zeng, J., Liu, S., Zhao, T., Wu, J., Lai, W. (2015). Study on the determination and chiral inversion of R-salbutamol in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1002, 218–227.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 596–601
doi: 10.15421/021791

The arginase pathway of L-arginine metabolism of peripheral blood lymphocytes in patients with acne vulgaris

G. S. Lavryk, O. P. Korniychuk, A. S. Besedina, Z. D. Vorobets

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University Department of Microbiology, Lviv, Ukraine

Article info

Received 29.10.2017
Received in revised form 19.11.2017
Accepted 20.11.2017

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Pekarska St., 69, Lviv, 79010, Ukraine.
Tel.: +38-067-906-25-23.
E-mail: lavrykgal@gmail.com

Lavryk, G. S., Korniychuk, O. P., Besedina, A. S., & Vorobets, Z. D. (2017). The arginase pathway of L-arginine metabolism of peripheral blood lymphocytes in patients with acne vulgaris. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 596–601. doi:10.15421/021791

The mechanisms of development of the inflammatory process of the pilosebaceous apparatus in patients with acne vulgaris are not fully understood, and variations in bacterial colonization are one of the key elements of the inflammatory process. Under the pathological conditions caused by pus-forming cocci which induce the production of proinflammatory cytokines, there is an increase in arginase expression. The capacity for film formation in selected strains was determined by the cultural properties (increased viscosity of the colony biomass) and by differential interference contrast microscopy using a dark field condenser and fluorescence microscopy. Arginase activity (μmole urea/min•mg of protein) was determined spectrophotometrically at 520 nm on saponin-perimabilized lymphocytes of peripheral blood by the rate of urea formation. The cultures of film-forming and planktonic forms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* were isolated from purulent pustules of 44 patients, aged 18–30. 63.6% of clinical strains of film-forming staphylococci were isolated, out of which 15 strains (53.6%) were *S. aureus* and 13 strains (46.4%) *S. epidermidias*. It was found that the arginase activity in patients (film-forming *S. aureus*) was significantly higher than in practically healthy donors (control) and was equal to 0.262 ± 0.006 and 0.279 ± 0.005 (planktonic form of *S. aureus*) versus 0.087 ± 0.009 μmole urea / min·mg of protein in the control. The arginase activity in patients (film-forming *S. epidermidis*) was significantly higher than in practically healthy donors and was equal to 0.281 ± 0.009 and 0.297 ± 0.006 (planktonic form of *S. epidermidis*) versus 0.087 ± 0.009 μmol urea / min·mg of protein in the control. After the auto-vaccine therapy and the administration of the probiotic Lacidofil (Institut Rosell Inc., Canada), enzyme activity decreased significantly in both experiments, however it had not attained control levels. The enzyme activity decreased through the administration of a vaccine, which in turn has an immunomodulating and immunostimulating effect. In addition, comparing the data of the arginase activity after treatment in patients with *S. epidermidis*, there was a slight decrease in the enzyme activity. This result is probably due to the formed tolerance of the immune system to commensal microorganisms. It was found that all patients had a moderate dysbiosis, which was accompanied by a deficiency of the main normal symbionts of the intestine. After treatment, all patients experienced significant improvementst in the microbiocenosis of the intestine in the direction of normalization of parameters and improvement of the skin condition. Increase in arginase activity in patients with acne vulgaris indicates the competition of this enzyme with NO-synthases for the substrate L-arginine and the alteration of physiological reactions in the organism caused by staphylococci which induce the phagocytic response and the cytokines production of the humoral system.

Keywords: acne; arginase; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*

Неокисний шлях метаболізму L-аргініну лімфоцитів периферичної крові у хворих на acne vulgaris

Г .С. Лаврик, О. П. Корнійчук, А. С. Беседіна, З. Д. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Проведено аналіз джерел літератури, що стосуються ролі стафілококів в етіології *acne vulgaris*. Згідно із сучасними уявленнями про патогенез вугрової хвороби, остання – мультифакторне захворювання. Один із її чинників – проліферація умовно-патогенної мікрофлори шкіри, що сприяє вивільненню медіаторів запалення та розвитку запального процесу. Аргіназна активність лімфоцитів – важливий маркер, що вказує на гуморальну відповідь із боку імунної системи на антиген. Досліджено зміни ензиматичної активності аргінази лімфоцитів периферичної крові у хворих на вугрову хворобу, в яких захворювання супроводжувалося висіванням біоплівкових і планктонних форм стафілококів. Обстежено 44 хворих віком від 18–30 років з *acne vulgaris* та визначено аргіназну активність до та після лікування. Виявлено значне зростання аргінази лімфоцитів крові у хворих на вугрову хворобу, спричинених біоплівковими та планктонними формами стафілококів. Установлено помірний дисбіоз, який супроводжувався дефіцитом основних нормосимбіонтів кишечника. Після курсу лікування

автостафілококовою вакциною та біопрепаратом «Лацидофіл» (Institut Rosell Inc., Канада) значно знизилась активність ензиму, спостерігали тенденцію до нормалізації показників нормофлори кишечника та поліпшення стану шкіри (зникли почервоніння, набряк, запальні елементи).

Ключові слова: вугрова хвороба; аргіназа; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*

Вступ

Нині акне (*acne vulgaris*), або вугрова хвороба – одне з найпоширеніших уражень шкіри, які у пубертатному віці проявляються тією чи іншою мірою практично у 100% юнаків і 90% дівчат. Останніми роками спостерігається зростання рівня захворюваності на вугрову хворобу з тенденцією до збільшення частки жінок віком 25–40 років із пізніми формами акне (Colleir et al., 2008; Dumont-Wallon and Dreno, 2008; Goryachkina and Belousova, 2014). Захворювання набуває хронічного рецидивуючого перебігу з наростанням інтенсивності симптомів, стійкості до терапії (Barratt et al., 2008; Weller et al., 2008).

У розвитку вугрової хвороби не можна виділити один етіологічний чинник. Згідно з результатами останніх досліджень, у патогенезі акне як мультифакторного захворювання найважливіші генетична схильність, андрогено-індукована гіперсекреція шкірного сала, фолікулярна гіперкератизація, мікробна гіперколонізація з наступним розвитком запального процесу в сально-волосяних фолікулах (СВФ) і навколо них (Myadelets and Adaskevich, 2006; Elder et al., 2008; Fulton, 2009; Iinuma et al., 2009; Williams et al., 2012). Обтурація протоки СВФ і багате ліпідами шкірне сало створюють сприятливі умови для розмноження факультативних анаеробів (*Propionibacterium acnes*, *P. granulosum*), а також інших представників сапрофітної та умовно-патогенної мікрофлори (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) (Fulton, 2009). Ці мікроорганізми продукують ензим ліпазу, який розщеплює діацил- та тріацилгліцериди до гліцерину та вільних жирних кислот. Ці речовини разом з антигенами мікроорганізмів залучають із периферичної крові нейтрофіли та фагоцити, які продукують цитокіни ІЛ-1α, ІЛ-1β і ІЛ-8, ФНП-α. Ці прозапальні цитокіни активують ензим циклооксигеназу, який сприяє утворенню з арахідонової кислоти головного медіатора запалення – лейкотрієн В4. Він, у свою чергу, стимулює вивільнення гідролітичних ензимів і монооксиду азоту (NO) з нейтрофілів, Т-лімфоцитів, моноцитів та еозинофілів, що викликає руйнування стінки сальної залози, вихід її вмісту в дерму та розвиток запальної реакції у вигляді папуло-пустульозних і вузлувато-кістозних елементів (Jappe, 2002; Monakhov and Ivanov, 2010; Goryachkina and Belousova, 2014).

Хоча механізми хронічного запального захворювання пілосеборейного комплексу до кінця не з'ясовані, варіації бактеріальної колонізації – один з основних елементів його розвитку (Bojar and Holland, 2004). Один із патогенетичних факторів акне – проліферація нормальної мікробіоти, особливо *P. acnes*. Спостерігається високий ступінь кореляції гіперпродукції шкірного сала з кількістю *P. acnes*, що визначається створенням оптимального анаеробного середовища для їх росту. Проте чіткого зв'язку між кількістю *P. acnes* і ступенем тяжкості захворювання не встановлено, а також не визначено того порогу кількості *P. acnes*, що відокремлює здорову та проблемну шкіру, уражену акне (Yoshimoto et al., 1998).

Окрім *P. acnes*, розвитку запального процесу сприяють бактерії, що персистують на поверхні шкіри: *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermidis*, *Haemophilus* spp., *Escherichia coli* тощо. Навколо ураженого фолікула формується зона запалення, до якої мігрують нейтрофіли, макрофаги, Т-лімфоцити та інші імунокомпетентні клітини. *P. acnes* підтримує запальний процес шляхом активації специфічних Toll-подібних рецепторів (TLR) на мембранах імунокомпетентних клітин і себоцитів (Kalyujna et al., 2014). У хворих на акне виявили значну експресію TLR-2 на перифолікулярних і перибульбарних макрофагах, окрім того показано *in vivo* та *in vitro*, що існує позитивна кореляція між ступенем ураження акне та концентрацією клітин, що несуть на собі TLR-2 і TLR-4. Продукція цитокінів IL-6, IL-8 та IL-12 прямо залежить від взаємодії *P. acnes* і TLR-рецепторів (Kang et al., 2006; Lai and Gallo, 2008; Miller, 2008; Valins et al., 2010).

Однак TLR-2 – специфічний рецептор і для *S. aureus*. Mempel et al. (2003) показали стимуляцію кератиноцитів патогеном *S. aureus*, що викликало транслокацію ядерного транскрипційного фактора NF-kB, подальше підвищення продукції IL-8 і iNOS і швидку протективну відповідь. Ця запальна реакція залежна від TLR-2 (Mempel et al., 2003). Таким чином, доведено, що стимуляція молекулярними патернами різних мікроорганізмів (пептидоглікан, ліпопептиди) TLR-2 і TLR4 наростає, і як наслідок розвивається дисфункція в системі TLRs, що частково пояснює хронізацію та рецидивування вугрової хвороби в результаті порушення як вродженого, так і адаптивного імунітету (Sorokina, 2012).

Критика концепції, що розглядає *P. acnes* як єдину бактерію – «винуватця» запальних явищ за акне, ґрунтується не тільки на невдачах виявлення *P. acnes* у фолікулах і різних елементах акне (Zouboulis, 2009). Виявлено, що до 28% запальних елементів акне можуть розвиватися *de novo*, минаючи стадію комедонів, що дає більше підстав для взаємозв'язку запалення та присутності бактерій на поверхні шкіри (Do et al., 2008). Крім того, утворення біоплівок стафілококами викликає обтурацію потових залоз, що має значення у патогенезі атопічного дерматиту (Allen et al., 2014), і не можна виключити аналогічного впливу за акне (Burceva et al., 2013). Виробляючи дельта-токсин, що індукує дегрануляцію опасистих клітин, *S. aureus* може запускати місцеве запалення, стимулюючи як вроджений, так і адаптивний імунітет (Nakamura et al., 2013).

Адекватна модель для вивчення патологічних змін в організмі – лімфоцити периферичної крові, які знаходяться переважно в одній фазі клітинного циклу (G_0), у звичайних умовах не діляться, легко піддаються культивуванню (Buchinska et al., 2002). Внутрішньоклітинний метаболізм лімфоцитів ґрунтується на фізіологічно та біохімічно закріпленій здатності цих клітин швидко реагувати на будь-які порушення гомеостазу в організмі, а модуляція активності ензимів у лімфоцитах настає значно раніше, ніж змінюються їх морфологічні та біохімічні показники (Lugovskoy, 2002). Це дає змогу використовувати лімфоцити як «метаболічне дзеркало організму» (Yakubets et al., 2013).

Мета дослідження – оцінити активність аргінази лімфоцитів осіб з *acne vulgaris*, в яких захворювання супроводжувалося висіванням біоплівкових і планктонних форм стафілококів. Активність ензиму визначали до та після лікування.

Матеріал і методи досліджень

Досліджено 44 хворі віком від 18–30 років, із гнійних пустул яких ізольовано культури плівкотвірних і планктонних форм *S. aureus* та *S. epidermidis*. Виділення та ідентифікацію стафілококів проводили з використанням стандартних середовищ у лабораторії кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького відповідно до наказу (Birger, 1982; Vos et al., 2008). Референтний штам *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) отримано з музейної колекції бактеріологічної лабораторії Львівського обласного лабораторного центру для контрольного показника біоплівки.

Здатність до плівкоутворення у відібраних штамів визначено за культуральними властивостями (підвищена в'язкість біомаси колонії) та за допомогою диференціальної інтерференційно-контрастної мікроскопії (DIC) з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії.

Для цього біоплівки клінічних і стандартних ізолятів вирощували на стерильних покривних скельцях на дні пластикових чашок (Ø 50 мм). У кожну чашку вносили по 4 мл поживного бульйону («Фармактив», Україна) та по 10 мкл культури мутністю $1{,}5 \times 10^9$ кл./мл (що відповідає 5 од. за стандартом

McFarland), так, щоб суспензія рівномірно розподілилась на дні чашки. Чашки інкубували в термостаті 48 годин за температури 37 °С. Через 48 годин вміст чашок відбирали, щоб не зруйнувати сформовану біоплівку, та тричі відмивали дистильованою водою. Виявляли життєздатних бактерій подвійним прижиттєвим забарвленням за допомогою флуоресцентних барвників, а саме Hoechst-33258, який вільно проникає крізь клітинні мембрани, зв'язується у ядрі з ДНК на зовнішньому боці спіралі, зумовлюючи при цьому флуоресценцію (Hawley and Hawley, 2004). Пропідіум йодид проникає лише в некротичні клітини та зв'язується з ДНК, зумовлюючи флуоресценцію в червоній ділянці спектра (Schlegel and Fullekrug, 2002; Krysko et al., 2008).

Мікроскопію бактеріальних біоплівок проводили за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse (об'єктив 63x/1.4NA) методом інтерференційної (диференційно-інтерференційний контраст – DIC) мікроскопії з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії.

Лімфоцити виділяли зі свіжоотриманої периферичної гепаринізованої крові пацієнтів (до та після лікування) та в осіб групи контролю у градієнті густини фікол-тріумбрасту (ρ = 1,08 г/см^3). Групу контролю становили практично здорові особи (n = 9). Усім хворим проводили курс вакцинотерапії автостафілококовою вакциною та пробіотичним препаратом «Лацидофіл» (Institut Rosell Inc., Канада).

Активність аргінази визначали на пермеабілізованих сапоніном лімфоцитах периферичної крові за швидкістю утворення сечовини. Її вміст вимірювали за допомогою діагностичного набору фірми «Сімко» (Україна), згідно з інструкцією. Зразки спектрофотометрували за 520 нм проти контрольних проб, які містили дистильовану воду. Активність аргінази виражали в мікромолях сечовини, що утворилася протягом однієї хвилини у розрахунку на мг протеїну.

Визначали середнє арифметичне значення (x), похибку середнього арифметичного (m). Для оцінювання ступеня вірогідності результатів дослідження застосовували ANOVA. Вірогідність різниці вважали статистично достовірною за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Із гнійних пустул хворих (n = 44) виділено 28 штамів (63,6%) плівкотвірних стафілококів, із них 15 штамів (53,6%) складає *S. aureus* і 13 (46,4%) – *S. epidermidis*. Активність аргінази лімфоцитів крові у хворих (плівкотвірний *S. aureus*) була достовірно вищою за відповідний показник практично здорових осіб і становила 0,262 ± 0,006 та 0,279 ± 0,005 (планктонна форма *S. aureus*) проти 0,087 ± 0,009 мкмоль сечовини/хв·мг протеїну в контролі (рис. 1).

Рис. 1. Активність аргінази (мкмоль сечовини/хв·мг протеїну) лімфоцитів крові у пацієнтів, хворих на *acne vulgaris*, спричинену *S. aureus* (плівкотвірна форма, n = 15, планктонна форма, n = 9): * – $P < 0,001$ – зміни достовірні щодо величин в осіб групи контролю (практично здорові донори); # – $P < 0,001$ – зміни достовірні щодо величин у пацієнтів до лікування

Після проведеного курсу лікування активність ензиму значно знизилася до 0,099 ± 0,006 (плівкотвірний *S. aureus*) ($P < 0,001$) та до 0,184 ± 0,023 (планктонна форма *S. aureus*) ($P < 0,001$) мкмоль сечовини/хв·мг протеїну. Активність аргінази у хворих (плівкотвірний *S. epidermidis*) була достовірно вищою за відповідний показник контрольних осіб: 0,281 ± 0,009 та 0,297 ± 0,006 (планктонна форма *S. epidermidis*) проти 0,087 ± 0,009 мкмоль сечовини/хв·мг протеїну в контролі (рис. 2).

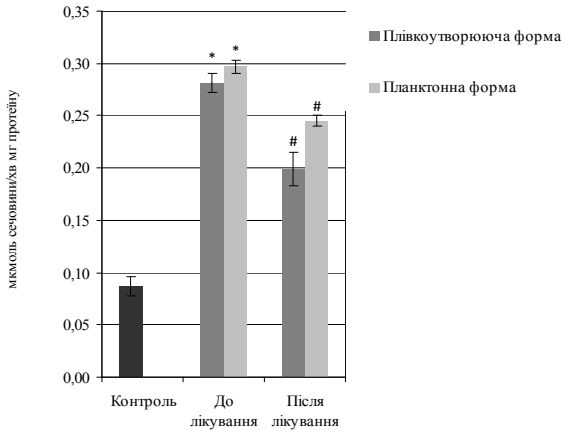


Рис. 2. Активність аргінази (мкмоль сечовини/хв·мг протеїну) лімфоцитів крові у пацієнтів, хворих на *acne vulgaris*, спричинену *S. epidermidis* (плівкотвірна форма, n = 13, планктонна форма, n = 7): * – $P < 0,001$ – зміни достовірні щодо величин в осіб групи контролю (практично здорові донори); # – $P < 0,001$ – зміни достовірні щодо величин у пацієнтів до лікування

Після курсу лікування активність ензиму значно знизилася до 0,199 ± 0,016 (плівкотвірний *S. epidermidis*) ($P < 0,001$) та до 0,245 ± 0,005 мкмоль сечовини/хв·мг протеїну (планктонна форма *S. epidermidis*) ($P < 0,001$).

Порівнюючи показники (рис. 1, 2) активності аргінази до та після лікування, спостерігали незначне зниження рівня експресії ензиму після лікування: в 1,4 раза (плівкотвірний *S. epidermidis*) проти 2,5 раза (плівкотвірний *S. aureus*).

Під час досліджень установлено дефіцит основних нормосимбіонтів кишечника (зниження кількісних рівнів біфідобактерій і лактобактерій до 10^{6-7} КУО/мл). У 65% пацієнтів виявлено зниження *E. coli* до 5×10^7 КУО/мл. За наявності у хворих закрепів зростала кількість гемолітичних форм кишкової палички.

Обговорення

Гуморальні протизапальні цитокіни IL-4, IL-10, IL-13 і TGF-β впливають на експресію аргінази, локалізованої як у цитозолі, так і в мітохондріях (Munder et al., 2005; Ochoa et al., 2007; Peretiatko and Sybirna, 2009) і яка конкурує з NO-синтазами за L-аргінін. Високий рівень експресії аргінази свідчить про гуморальну відповідь із боку імунної системи на антиген (Klasen et al., 2001; Barksdale et al., 2004; Holan et al., 2006). Під час досліджень виявлено значне зростання експресії аргінази у хворих на вугрову хворобу. Після лікування встановлено достовірне зниження активності аргінази, проте вона не досягла рівня контролю.

Аргіназа експресується не тільки у клітинах людського організму, а й у бактеріальних (таких, як *Pseudomonas aeruginosa* та *S. aureus*). Золотистий стафілокок – патоген, який несе власну аргіназу, здатний моделювати аргіназу господаря. Тому не виключений внесок бактеріальної аргінази до загальної активності аргінази (Grasemann et al., 2005).

Останніми роками описано низку механізмів, за допомогою яких стафілококи протистоять агресивному впливу макро-

організму та виживають на поверхні шкіри: стафілоксантини, системи розпізнавання антимікробних пептидів (ApsRS і GraRS), аргініновий катаболічний мобільний елемент (ACME), кардіоліпін та ін. (Coates et al., 2014). ACME кодує декілька генів, включаючи другу копію аргінін деімінази – ферменту, здатного перетворювати аргінін на орнітин. Оскільки аргінін – амінокислота в роговому шарі шкіри, яка потенційно може використовуватись для утворення оксиду азоту або для підкислення pH шкіри, виснаження пулу аргініну може оптимізувати умови росту для стафілококів (Otto, 2010). ACME був у штаму *S. aureus* USA300 горизонтально перенесений від *S. epidermidis*. Майже половина виділених *S. epidermidis* містить ACME, що закодований у speG (Diep et al., 2006; Miragaia et al., 2009). Цей шлях може бути одним із важливих механізмів уникнення стафілококами імунної відповіді хазяїна та переваги для росту на шкірі (Das et al., 2010; Scharschmidt and Fischbach, 2013). Незважаючи на наявність великої кількості доказів про метаболізм аргініну та його роль в імунології, вирішальний вибір шляху метаболізму аргініну патогенними мікроорганізмами залишається до кінця не з'ясованим (Das et al., 2010).

У проведеному дослідженні виділення стафілококів із гнійних пустул за акне доводить, що стафілококи відіграють важливу роль у розвитку запального процесу на шкірі. Результати показують, що концентрація стафілококів зростає у процесі наростання клінічних проявів акне (Burceva et al., 2013; Dreno et al., 2017).

Отримане у нашому експерименті незначне зниження експресії ензиму у хворих, із пустул яких виділено *S. epidermidis*, показує, що сила імунної відповіді менш виражена порівняно з реагуванням на активність золотистого стафілокока, оскільки епідермальний стафілокок – облігатний представник нормобіоценозу шкіри.

Формування адаптивних імунних реакцій на коменсали відбувається в неонатальний період (Nagao and Segre, 2015). В умовах оптимального функціонування імунної системи альянс із мікробіотою допускає індукцію захисних реакцій на патогени та підтримання регуляторних шляхів, пов'язаних зі збереженням толерантності до коменсалів. Поза тим, вони спричиняють серйозні інфекції в осіб в умовах імуносупресії та часто стають причиною нозокоміальних інфекцій, хронічних виразок діабетичних хворих, а також показниками коагулазо-негативних стафілококових інфекцій у медичних закладах (Grice and Segre, 2012; Sanford and Gallo, 2013; Belkaid and Hand, 2014). Це може бути частково зумовлено екзополімерами *S. epidermidis*, які захищають їх від розпізнавання антитілами. Крім того, еволюційний розвиток імунної системи передбачав уникнення надмірного реагування на коменсальні бактерії (Otto, 2009).

У загострення ранніх і пізніх акне особливу роль відіграє стійке специфічне порушення мікробіоценозу кишечника, яке зумовлює зміни складу шкірного сала зі зниженням його бактерицидних властивостей. У мікробіоті кишечника у пацієнтів з акне різко зменшується кількість *Lactobacillus*, підвищується активність *S. aureus*, зростає роль гемолітичних форм *E. coli* (Averina and Salamova, 2014; Clark et al., 2017), що спричинює загострення ранніх та пізніх акне. На основі наших досліджень установлено, що в усіх хворих спостерігався помірний дисбіоз, що збігається з даними цих досліджень.

Незважаючи на достатньо добре вивчені механізми розвитку вугрової хвороби та розроблені уніфіковані протоколи лікування, не втрачають актуальності питання підвищення ефективності терапії акне, досягнення швидшого регресу елементів акне, стійкої та тривалої ремісії, естетичного результату (Protsenko et al., 2015). З огляду на викладене вище, доцільно використовувати препарати, що нормалізують мікрофлору кишечника та підвищують імунітет шкіри (Volkova et al., 2001; Bowe, 2013; Korolenko, 2016). У зв'язку із цим усім пацієнтам проведено курс вакцинотерапії автостафілококовою вакциною та пробіотичним препаратом «Лацидофіл» (Institut Rosell Inc., Канада). Після корекції мікрофлори травного тракту пробіотичними препаратами відбулась нормалізація рівня показників основних нормосимбіонтів.

Доведено ефективність використання лактобактерій і біфідобактерій для лікування шкірних захворюваннях у вигляді препаратів місцевого застосування (Valdez et al., 2005; Peral et al., 2009; Gueniche et al., 2010; Peral et al., 2010; Lavryk et al., 2017). Як продемонстровано, пробіотичні штами лактобактерій можуть пригнічувати прилипання шкірного патогена *S. aureus* до кератиноцитів людини (Prince et al., 2012) та попереджувати їх розмноження. Пероральні пробіотики можуть регулювати вивільнення запальних цитокінів у шкірі (Hacini-Rachinel et al., 2009) та специфічно знижувати IL-1α (Cazzola et al., 2010). Підвищуючи проліферацію Т- і В-лімфоцитів та синтез IgA, пробіотичні препарати відновлюють місцевий імунітет. За умов нормалізації мікробного пейзажу стабілізується та підтримується імунна функція кишечника, що сприяє усуненню запальних симптомів акне та збільшує тривалість ремісії дерматозу (Protsenko et al., 2015). Після лікування практично зникли вугрові висипання, почервоніння та набряк навколо змінених запальною реакцією ділянок шкіри (рис. 3).

Рис. 3. Папуло-пустульозні елементи: *а* – до лікування; *б*, *в* – після лікування

Висновки

Задіяння механізмів протистояння вірулентному фактору шляхом продукції прозапальних цитокінів відбувається за зростання активності ензимів. Підвищення активності аргінази у хворих на *acne vulgaris* свідчить про конкуренцію цього ензиму з NO-синтазами за субстрат L-аргінін та альтерацію фізіологічних реакцій в організмі, спричинену дією стафілококів, які індукують фагоцитарну реакцію та продукцію цитокінів гуморальної ланки.

Після лікування активність ензиму все ще залишається високою, хоча зафіксовано достовірні зміни у бік нормалізації активності, завдяки уведенню вакцинного препарату, які, у свою чергу, мають імуномоделювальний ефект.

Планктонна форма стафілококів, як значно менш інтенсивний подразник, індукує слабшу активацію цитокінів та ензимів, що під час проведення імуномоделювальної терапії не дає змоги розраховувати на достатньо помітний ефект. У хворих на *acne vulgaris*, яке супроводжувалося висіванням *S. epidermidis*, активність аргі-

нази після лікування знизилася незначно, що може вказувати на імунну толерантність організму до «опортуністичних патогенів», що, у свою чергу, вимагає тривалішого лікування.

References

Allen, H. B., Vaze, N. D., Choi, C., Hailu, T., Tulbert, B. H., Cusack, C. A., & Joshi, S. G. (2014). The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis. JAMA Dermatology, 150(3), 260–265.

Averina, V. I, & Salamova, I. V. (2014). Sovremennyj podhod k terapii vozrastnogo akne u zhenshhin [Modern approach to the treatment of age-related acne in women]. Medicinskij Sovet, 7, 62–67 (in Russian).

Barksdale, A. R., Bernard, A. C., Maley, M. E., Gellin, G. L., Kearney, P. A., Boulanger, B. R., Tsuei, B. J., & Ochoa, J. B. (2004). Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. Surgery, 135(5), 527–535.

Barratt, H., Hamilton, F., Car, J., Lyons, C., Layton, A., & Majeed, A. (2009). Outcome measures in acne vulgaris: Systematic review. British Journal of Dermatology,160(1), 132–136.

Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell, 157(1), 121–141.

Benyacoub, J., Bosco, N., Blanchard, C., Demont, A., Philippe, D., Castiel-Higounenc, I., & Guéniche, A. (2013). Immune modulation property of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (ST11) strain and impact on skin defences. Beneficial Microbes, 5(2), 129–136.

Birger, M. I. (Ed.). (1982). Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovanija (Handbook on microbiological and virological research methods). Medicine, Moscow (in Russian).

Bojar, R. A., & Holland, K. T. (2004). Acne and *Propionibacterium acnes*. Clinics in Dermatology, 22(5), 375–379.

Bowe, W. P. (2013). Probiotics in acne and rosacea. Cutis, 92(1), 6.

Buchinska, L. G., Nesina, I. P., Tkachenko, N. I., & Polischuk, L. Z. (2002). Osoblyvosti jaderec' limfocytiv peryferychnoi' krovi hvoryh na rak tila matky [Peculiarities of peripheral blood lymphocyte nucleoli in patients with corpus uteri cancer]. Onkologija, 4(1), 18–20 (in Ukrainian).

Burceva, G. N., Sergeev, A. Y., Arzumanyan, V. G., & Sergeev, Y. Y. (2013). Perifollikuljarnaja mikrobiota kozhi pri akne. Chast' I. Obshhie harakteristiki kolonizacii i rezistentnost' k sistemnym antibiotikam. [Perifollicular cutaneous microbiota in acne patients. Part I. Common patterns of colonization and resistance to systemic antimicrobials]. Immunopatologija, Allergologija, Infektologija, 2, 84–87 (in Russian).

Cazzola, M., Tompkins, T. A., & Matera, M. G. (2010). Immunomodulatory impact of a synbiotic in Th1 and Th2 models of infection. Therapeutic Advances in Respiratory Disease, 4(5), 259–270.

Clark, A. K., Haas, K. N., & Sivamani, R. K. (2017). Edible plants and their influence on the gut microbiome and acne. International Journal of Molecular Sciences, 18(5), 1070.

Coates, R., Moran, J., & Horsburgh, M. J. (2014). Staphylococci: Colonizers and pathogens of human skin. Future Microbiology, 9(1), 75–91.

Collier, C. N., Harper, J. C., Cantrell, W. C., Wang, W., Foster, K. W., & Elewski, B. E. (2008). The prevalence of acne in adults 20 years and older. Journal of the American Academy of Dermatology, 58(1), 56–59.

Das, P., Lahiri, A., Lahiri, A., & Chakravortty, D. (2010). Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: A metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. PLoS Pathogens, 6(6), e1000899.

Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F., & Perdreau-Remington, F. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet, 367(9512), 731–739.

Do, T. T., Zarkhin, S., Orringer, J. S., Nemeth, S., Hamilton, T., Sachs, D., Voorhees, J. J., & Kang, S. (2008). Computer-assisted alignment and tracking of acne lesions indicate that most inflammatory lesions arise from comedones and *de novo*. Journal of the American Academy of Dermatology, 58(4), 603–608.

Dreno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J. B., Khammari, A., & Seité, S. (2017). Skin microbiome and acne vulgaris: *Staphylococcus*, a new actor in acne. Experimental Dermatology, 26(9), 798–803.

Dumont-Wallon, G., & Dréno, B. (2008). Specificity of acne in women older than 25 years. Presse Medicale (Paris, France: 1983), 37(4Pt1), 585–591.

Goryachkina, M. V., & Belousova, T. A. (2014). Kombinirovannaja terapija akne u zhenshhin: Poisk optimal'nyh reshenij [Combination therapy of acne in women: Searching for optimum solutions]. Vestnik Dermatologii i Venerologii, 2, 90–95 (in Russian).

Grasemann, H., Schwiertz, R., Matthiesen, S., Racké, K., & Ratjen, F. (2005). Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. American Journal of Respiratory and Critical care Medicine, 172(12), 1523–1528.

Grice, E. A., & Segre, J. A. (2012). Interaction of the microbiome with the innate immune response in chronic wounds. In: Current topics in innate immunity Vol. II. Springer, New York. pp. 55–68.

Guéniche, A., Bastien, P., Ovigne, J. M., Kermici, M., Courchay, G., Chevalier, V., Breton, L., & Castiel-Higounenc, I. (2010). *Bifidobacterium longum* lysate, a new ingredient for reactive skin. Experimental Dermatology, 19(8), e1–e8.

Hacini-Rachinel, F., Gheit, H., Le Luduec, J. B., Dif, F., Nancey, S., & Kaiserlian, D. (2009). Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. PLoS One, 4(3), e4903.

Hassanzadeh, P., Bahmani, M., & Mehrabani, D. (2008). Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: An *in vitro* study. Indian Journal of Dermatology, 53(3), 122.

Hawley, R., & Hawley, T. (2004). Flow cytometry protocols. Methods in Molecular Biology, 263, 34–37.

Holán, V., Pindjáková, J., Krulová, M., Neuwirth, A., Fric, J., & Zajícová, A. (2006). Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. Transplantation, 81(12), 1708–1715.

Iinuma, K., Sato, T., Akimoto, N., Noguchi, N., Sasatsu, M., Nishijima, S., Kurokawa, I., & Ito, A. (2009). Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands *in vivo* and *in vitro*. Journal of Investigative Dermatology, 129(9), 2113–2119.

Jappe, U., Ingham, E., Henwood, J., & Holland, K. T. (2002). *Propionibacterium acnes* and inflammation in acne; *P. acnes* has T-cell mitogenic activity. British Journal of Dermatology, 146(2), 202–209.

Jung, G. W., Tse, J. E., Guiha, I., & Rao, J. (2013). Prospective, randomized, open-label trial comparing the safety, efficacy, and tolerability of an acne treatment regimen with and without a probiotic supplement and minocycline in subjects with mild to moderate acne. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery, 17(2), 114–122.

Kalyujna, L. D., Grechanska, L. V., & Petrenko, A. V. (2014). Rol' rozsmoktuvalnoi terapii v likuvanni hvoryh na acne [The role of resorptive therapy for treatment of acne patients]. Klinichna Imunologiya. Alergologiya. Infektologiya, (8), 41–44 (in Ukrainian).

Kang, S. S., Kauls, L. S., & Gaspari, A. A. (2006). Toll-like receptors: Applications to dermatologic disease. Journal of the American Academy of Dermatology, 54(6), 951–983.

Klasen, S., Hammermann, R., Fuhrmann, M., Lindemann, D., Beck, K. F., Pfeilschifter, J., & Racké, K. (2001). Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. British Journal of Pharmacology, 132(6), 1349–1357.

Korolenko, V. V. (2016). Perspektyvni imunni mehanizmy likuvannja pacijentiv z akne [Perspective immune mechanisms of treatment of patients with acne]. Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology, 4, 79–81 (in Ukrainian).

Krysko, D. V., Berghe, T. V., Parthoens, E., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. Methods in Enzymology, 442, 307–341.

Lai, Y., & Gallo, R. L. (2008). Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. Infectious Disorders-Drug Targets, 8(3), 144–155.

Lavryk, G., Korniychuk, O., & Tymkiv, M. (2017). Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 98–103.

Lugovskoy, S. P. (2002). Zminy aktyvnosti fermentnogo spektra limfocytiv peryferijnoi' krovi pry svyncevij intoksykacii' (cytohimichne doslidzhennja) [Changes in the activity of the enzyme spectrum of peripheral blood lymphocytes upon lead intoxication (cytochemical study)]. Laboratorna Diagnostyka, (2), 29–32 (in Ukrainian).

Mempel, M., Voelcker, V., Köllisch, G., Plank, C., Rad, R., Gerhard, M., Schnopp, C., Fraunberger, P., Walli, A. K., Ring, J., Abeck, D., & Ollert, M. (2003). Toll-like receptor expression in human keratinocytes: Nuclear factor κB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is Toll-like receptor 2 but not Toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. Journal of Investigative Dermatology, 121(6), 1389–1396.

Miller, L. S. (2008). Toll-like receptors in skin. Advances in Dermatology, 24, 71–87.

Miragaia, M., de Lencastre, H., Perdreau-Remington, F., Chambers, H. F., Higashi, J., Sullam, P. M., Lin, J., Wong, K. I., King, K. A., Otto, M., Sensabaugh, G. F., & Diep, B. A. (2009). Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. PloS One, 4(11), e7722.

Monakhov, S. A., & Ivanov, O. L. (2012). Akne. Etiopatogenez, klinika, terapiya [Acne. Etiopatogenez, clinic, therapy]. Bayer HealthCare, Moscow (in Russian).

Munder, M., Mollinedo, F., Calafat, J., Canchado, J., Gil-Lamaignere, C., Fuentes, J. M., & Müller, F. M. (2005). Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. Blood, 105(6), 2549–2556.

Myadelets, O. D., & Adaskevich, V. P. (2006). Morfofunktcionalnaja dermatology [Morpho-functional dermatology]. Medicinskaja Literatura, Moscow (in Russian).

Nagao, K., & Segre, J. A. (2015). "Bringing up baby" to tolerate germs. Immunity, 43(5), 842–844.

Nakamura, Y., Oscherwitz, J., Cease, K. B., Chan, S. M., Mucoz-Planill, R., Hasegawa, M., Villaruz, A. E., Cheung, G.-Y. C., McGavin, M. J., Travers, J. B., Otto, M., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). *Staphylococcus* (dgr)-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. Nature, 503(7476), 397–401.

Numata, S., Akamatsu, H., Akaza, N., Yagami, A., Nakata, S., & Matsunaga, K. (2014). Analysis of facial skin-resident microbiota in Japanese acne patients. Dermatology, 228(1), 86–92.

Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C., & Rodriguez, P. C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. Clinical Cancer Research, 13(2), 721s–726s.

Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* – the accidental pathogen. Nature Reviews Microbiology, 7(8), 555–567.

Otto, M. (2010). Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annual Review of Microbiology, 64, 143–162.

Peral, M. C., Huaman Martinez, M. A., & Valdez, J. C. (2009). Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. International Wound Journal, 6(1), 73–81.

Peral, M. C., Rachid, M. M., Gobbato, N. M., Martinez, M. H., & Valdez, J. C. (2010). Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. Clinical Microbiology and Infection, 16(3), 281–286.

Peretiatko, Y. V., & Sybirna, N. O. (2009). Osoblyvosti arginaznogo ta NO-syntaznogo shljahiv metabolizmu L-argininu v lejkocytah peryferychnoi' krovi shhuriv za hronichnogo rentgenivs'kogo oprominennja [Particularities of arginase and NO-synthase pathways of L-arginine conversion in the leucocytes of peripheral blood under the X-ray radiation]. Ukrai'ns'kyj Biohimichnyj Zhurnal, 81(2), 40–48 (in Ukrainian).

Prince, T., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. (2012). *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. Applied and Environmental Microbiology, 78(15), 5119–5126.

Protsenko, T. V., Protsenko, O. A., Buturlinova, A. S., & Lukyanchenko, E. N. (2015). Innovacionnye aspekty v patogeneze i terapii akne [Innovative aspects in the pathogenesis and therapy of acne]. Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology, (4), 79–81 (in Ukrainian).

Sanford, J. A., & Gallo, R. L. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. Seminars in Immunology, 25(5), 370–377.

Scharschmidt, T. C., & Fischbach, M. A. (2013). What lives on our skin: Ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 10(3), e83–e89.

Schlegel, K., & Füllekrug, M. (2002). 50 years of schumann resonance. Physik in Unserer Zeit, 33(6), 256–264.

Sorokina, E. V. (2012). Toll-podobnye receptory i pervichnoe raspoznavanie patogena pri dermatozah infekcionnoj i neinfekcionnoj jetiologii [Toll-like receptors and primary pathogen recognition in infectious and non-infectious cutaneous pathology]. Immunopatologija, Allergologija, Infektologija, 2, 6–15 (in Russian).

Valdez, J. C., Peral, M. C., Rachid, M., Santana, M., & Perdigon, G. (2005). Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and in infected burns: The potential use of probiotics in wound treatment. Clinical Microbiology and Infection, 11(6), 472–479.

Valins, W., Amini, S., & Berman, B. (2010). The expression of Toll-like receptors in dermatological diseases and the therapeutic effect of current and newer topical Toll-like receptor modulators. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology, 3(9), 20–29.

Volkova, L. A., Khalifa, I. L., & Kabanova, I. N. (2001). Impact of the impaired intestinal microflora on the course of acne vulgaris. Klinicheskaia Meditsina, 79(6), 39–41.

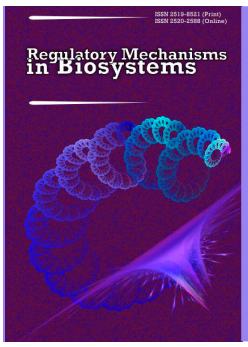
Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. (Eds.). (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes. Springer.

Williams, H. C., Dellavalle, R. P., & Garner, S. (2012). Acne vulgaris. The Lancet, 379(9813), 361–372.

Yakubets, O. I., Fafula, R. V., Vorobets, D. Z., & Vorobets, Z. D. (2013). Osoblyvosti arginaznogo ta NO-syntaznogo shljahiv metabolizmu L-argininu v limfocytah peryferychnoi' krovi hvoryh na rak jajechnyka [Peculiarities of arginase and no-synthase pathways of l-arginine metabolism in peripheral blood lymphocytes of patients with ovarian cancer]. Ukrai'ns'kyj Biohimichnyj Zhurnal, 85(5), 105–113 (in Ukrainian).

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S. I., Okamura, H., Akira, S., & Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: Synergism with IL-18 for IFN-γ production. The Journal of Immunology, 161(7), 3400–3407.

Zouboulis, C. C. (2009). *Propionibacterium acnes* and sebaceous lipogenesis: A love-hate relationship? Journal of Investigative Dermatology, 129(9), 2093–2096.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 602–610
doi: 10.15421/021792

Epidemiology, etiology and gene analysis of spike S protein of porcine epidemic diarrhea virus infection in Ukraine during 2016–2017

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 15.09.2017
Received in revised form 28.10.2017
Accepted 02.11.2017

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). Epidemiology, etiology and gene analysis of spike S protein of porcine epidemic diarrhea virus infection in Ukraine during 2016–2017. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 602–610. doi:10.15421/021792

The spread of PEDV of pigs continues in various countries and regions of the world. PED was first registered in several areas of Ukraine in 2014. At present, there is a limited number of publications on the characteristics of the spread of the virus infection in Ukraine. Moreover, obtained research data do not clarify the epizootic situation as a whole. Having regard to the state of pig farm industry and permanent growth of losses caused with PEDV infection, the study of PED in Ukraine is relevant and important. Therefore, the goal of the work was to clarify the epizootic situation of PED in various areas of Ukraine. We studied the epizootic state of PED with a typical course in pig farms and the made a primary assessment of the relation of genetic groups between identified pathogens from distinct regions of the country where the highest intensity of the epizootic process was determined. The work was carried out in the Biosafety Center (Ukraine). To determine the epizootic situation of PED during 2016–2017 we collected samples of the blood serum and biological materials from pigs from 105 agricultural enterprises that are located in 85 administrative regions of Ukraine. In total we tested 543 serum samples and 591 samples of pathological tissues. The detection of PEDV was performed by PCR-RT. Serological diagnostics were tested with ELISA. Sequence analysis was performed according to Sanger. The results of sequences were analyzed in the FinchTV / Chromas program. The analysis of the epizootic features of PED in different areas of Ukraine for 2016–2017 established that PEDV is the main causative agent of the infection. An infection circulates among sensitive animals in pig farms and induces PED, which is difficult to control and weakly managed as a particularly dangerous emergent infectious disease of pigs. In 2016, 6.5% of administrative districts located in 12 of the 25 regions of Ukraine were included in the study, and in 2017, 10.8% of administrative districts located in the 14 regions of the 25 regions of the country were investigated. In general, during 2016 and 2017 1134 samples of blood serum and animal tissue were collected from 105 agricultural enterprises from 17.3% of the administrative regions of Ukraine. The obtained results showed that in 2016 PED was registered in 7 administrative districts from 4 regions of Ukraine, and in 2017 the infection was registered in 2 regions. The results of RNA sequence analysis of the PED virus identified the characteristics of the PEDV genes which reflect a high degree of homology with the Chinese strain BJ-2011-1. The analysis of the obtained results revealled the relation of PEDV circulating in Ukraine to the strains identified in the USA. Moreover, the samples of PEDV from Ukrainian pig farms have the sequences that belong to the North American clade II from the group of 2 strains of the PED virus. However, the PEDV observed in Ukraine is different from them by at least one nucleotide replacement of the gene which codes a protein of the S domain. Based on the obtained results, it can be assumed that in Ukraine the PED virus could have spread from East Asia.

Key words: PEDV; Alphacoronavirus infection; epidemiology of PED in Ukraine; neonatal piglets; diarrhea syndrome

Эпидемиология, этиология и геномный анализ белка S домена вируса эпидемической диареи свиней в Украине за 2016–2017 годы

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

Выполнен анализ эпизоотической ситуации эпидемической диареи свиней (ЭДС) на территории Украины за 2016–2017 годы, который позволил установить, что возбудитель инфекции циркулирует среди чувствительных животных свиноводческих хозяйств и индуцирует ЭДС, которая является трудноконтролируемой и слабоуправляемой особо опасной эмерджентной заразной болезнью свиней. В 2016 году

обследовано 6,5% административных районов, территориально расположенных в 12 областях Украины, а за 2017 год исследовано 10,8% административных районов, расположенных на территории 14 из 25 областей страны. Методами ИФА и ПЦР исследовано 1 134 пробы сывороток крови и биологического материала, отобранных от 105 сельскохозяйственных предприятий из 17,3% административных районов Украины. За 2016 год ЭДС зарегистрирована на территории 7 областей (в Закарпатской, Львовской, Запорожской, Киевской, Винницкой, Днепропетровской и Черкасской), а в 2017-м инфекцию регистрировали в Запорожской и Днепропетровской областях. Результаты сиквенс-анализа РНК вируса ЭДС идентифицировали последовательность генома, которая имеет высокую степень гомологии с китайским штаммом BJ-2011-1. Обнаруженные последовательности относятся к североамериканской кладе II из группы 2 штаммов вируса ЭДС и отличаются от них по меньшей мере одной нуклеотидной заменой гена, белка домена S. На основании полученных результатов можно предположить, что в Украине вирус ЭДС мог распространиться из Восточной Азии.

Ключевые слова: PEDV; α-коронавирусная инфекция; эпидемиология PEDV; неонатальные поросята; диарейный синдром

Введение

Эпидемическая диарея свиней (ЭДС, PED) – особо опасная, эмерджентная, чрезвычайно контагиозная вирусная зоонозная болезнь свиней с фекально-оральным механизмом заражения и развитием летального диарейного синдрома у неимунных неонатальных поросят.

Возбудитель ЭДС – вирус эпидемической диареи свиней (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), род *Alphacoronavirus*, подсемейство Coronavirinae, семейство Coronaviridae, отряд Nidovirales. Различают два типа вируса: первый вызывает диарею свиней на откорме и у взрослых особей, второй – только у поросят-сосунов. Вирус не создает перекрестный иммунитет с другими кишечными коронавирусами, поражает только домашних свиней (Chen et al., 2015). Основной источник инфекции – больные и переболевшие свиньи, выделение вируса происходит в основном с фекалиями, заражение осуществляется фекально-оральным путем в результате прямого или косвенного контакта (факторы передачи) с возбудителем (Song and Park, 2012; Lee et al., 2015; Jung and Saif, 2015).

Восприимчивы к ЭДС свиньи всех возрастов, однако наиболее чувствительны неонатальные поросята: до 5-дневного возраста (погибает до 100% помета), к 10-му дню смертность уменьшается до 60%, к 15-му – до 30%; далее не превышает 1–3%. У свиней на откорме инфекционный процесс протекает по факторному типу, преимущественно доброкачественно, без тяжелых патофизиологических изменений с последующим освобождением макроорганизма от возбудителя. Персистенция и носительство PEDV среди инфицированных животных на откорме не зарегистрированы (Alvarez et al., 2015; Annamalai et al., 2015).

Заболевание у неонатальных поросят протекает по классическому типу инфекционного процесса. Инфекция проявляется исключительно тяжелым острым патогенезом и высокой летальностью, сопровождается непрерывной изнуряющей водянистой диареей, дегидратацией, интоксикацией, метаболическим ацидозом, депрессией, упорной рвотой, истощением при нарастающей слабости, тонико-клоническими судорогами, предсмертным ступором с полной прострацией (Alvarez et al., 2015).

Новорожденные поросята на подсосе, заболевшие в первые дни жизни, гибнут через 2–4 дня в результате значительных патофизиологических повреждений в слизистой оболочке кишечника и метаболических нарушений гомеостаза, индуцированных PEDV в процессе репродукции в энтероцитах. В такой ситуации вакцинация крайне неэффективна и единственный способ специфической защиты от заражения для неонатальных поросят может быть реализован с помощью местного лактогенного иммунитета (Jung et al., 2015; Langel et al., 2016).

Несмотря на многочисленные исследования, специфические средства иммунопрофилактики ЭДС на сегодняшний день отсутствуют. Существующие коммерческие биопрепараты с аттенуированным или инактивированным возбудителем не обеспечивают надежной защиты от циркуляции возбудителя и не прерывают эпизотический процесс в условиях реального ведения отрасли. Низкая биологическая протективная активность существующих средств защиты привела к глобальной экспансии PEDV на поголовье свиней и не останавливает распространения PEDV инфекции (Sun et al., 2016). Сложность девитализации вируса в инфицированном организме и эрадикации в среде содержания животных приводит к формированию стационарно неблагополучных очагов инфекции. Все эти факторы вместе обусловливают сложность противоинфекционных мероприятий и эмерджентность данного зооноза свиней (Stevenson et al., 2013; Stadler et al., 2015; Masiuk et al., 2017).

В неблагополучных очагах PEDV-инфекции происходят патогенетически критичные эволюционные процессы в межпопуляционных взаимоотношениях системы паразит – хозяин (Huang et al., 2013; Jarvis et al., 2016). Многоплодность свиней, быстрый рост потомства, интенсивная ротация поголовья в короткие сроки на ограниченной территории обеспечивают значительную вариабельность межпопуляционных отношений и индукцию биоразнообразия генетического потенциала вируса. Широкая вариабельность физиологических особенностей особей в хозяйстве вместе с иммуносупрессивным эффектом инфекции способствуют высокой частоте мутаций и генерации разнообразия вирусного генотипа (Bi et al., 2012; Marthaler et al., 2014; Grasland et al., 2015).

Клинико-эпизоотологические генетические модификации PEDV-популяций определяют изменения эпизоотических характеристик инфекционного процесса в разновозрастных группах поражаемых особей. Мутации PEDV ведут к увеличению вариабельности клинической симптоматики инфекционного процесса (Lin et al., 2017). В последние годы PEDV характеризуется расширением возрастного диапазона патогенного воздействия на более старшие возрастные группы с одновременным незначительным ослаблением тяжести патогенеза абдоминального синдрома, при этом неонатальные не иммунные поросята, по-прежнему остаются наиболее уязвимым звеном инфекционного генеза и подвержены массовой гибели (Stevenson et al., 2013; Dee et al., 2015).

В поддержании эпизоотологического процесса решающую роль играют механизмы резервации, поддержания и дальнейшей передачи инфекционного агента восприимчивым организмам для его воспроизводства и дальнейшего существования как определенного генотипа. Инфекционный процесс, индуцированный PEDV, реализуется у животных всех возрастных групп, но с широкой вариабельностью тяжести патогенеза, от классического типа инфекционного процесса на неимунных неонатальных поросятах с летальным диарейным синдромом до доброкачественного течения инфекции у физиологически половозрелых свиноматок с активно функционирующей иммунной системой (Goede and Morrison, 2015). В ходе инфекции персистенция PEDV, как правило, не выявляется у взрослых животных, которые, независимо от антиинфекционных мероприятий, освобождаются от возбудителя, что является важнейшей особенностью эпизоотического процесса PEDV в промышленных условиях. Во внешней среде свиноводческих комплексов биологических накопителей возбудителя также не обнаружено. Главным биоиндикатором циркуляции PEDV в экологической нише существования свиней являются неимунные неонатальные поросята, на которых возбудитель индуцирует классический тип инфекционного процесса с патогномонической картиной ЭДС: диарейный синдром с водянистым поносом и поголовной гибелью новорожденных поросят (Alvarez et al., 2015; Annamalai et al., 2015; Jung et al., 2015).

Наибольшую биологическую опасность представляет мутационный потенциал вирусной популяции PEDV при формировании эндемичных очагов инфекции, что приводит к постоянному рецидиву патогенеза и возобновлению симптомокомп-

лекса диарейного синдрома с интервалом 4–12 месяцев в стабилизированных очагах инфекции (Song et al., 2015; Annamalai et al., 2015). Тяжесть эпизоотологической ситуации усугубляется отсутствием эффективных, кардинально блокирующих эпизоотический процесс беспрерывной передачи возбудителя от заболевших к здоровым, специфических биопрепаратов против различных вариантов генотипа PEDV. Одними из наиболее проблемных являются так называемые «полевые» эпизоотические варианты возбудителя с оригинальными молекулярно-генетическими характеристиками генофонда вирусной популяции. Совокупность неблагоприятных противоэпизоотических факторов приводит к возможности бесконтрольного распространения популяции PEDV на восприимчивых животных и создает бесконтрольную ситуацию неуправляемой эмерджентной инфекции как в отдельных хозяйствах, так и в пределах регионов (Kim et al., 2007; Wang et al., 2015).

Глобальное распространение PEDV-инфекции на поголовье свиней в различных странах и регионах мира сопровождается интенсивным ростом числа неблагополучных хозяйств и регионов. В литературе описаны особенности течения и проявления эпизоотии ЭДС, выделены и охарактеризованы биологические свойства эпизоотических вариантов возбудителя, исследованы генетические свойства вируса и описаны сиквенсы геномов, созданы коллекции референтных штаммов китайского и северо-американского происхождения (Fan et al., 2012; Huang et al., 2013; Fablet et al., 2014). Организационные усилия и информационные ресурсы МЭБ и национальных служб ветеринарной медицины не в состоянии остановить распространение ЭДС на восприимчивой популяции животных. Ветеринарно-карантинные и иммунобиологические мероприятия по локализации вируса ЭДС и контролю за его распространением в настоящее время являются недостаточно эффективными (Goede et al., 2016).

Впервые на территории Украины ЭДС зарегистрирована в 2014 году (Dastjerdi et al., 2015). На данный момент встречаются отдельные публикации (Choudhury et al., 2016, Chaika et al., 2016), авторы которых указывают на распространение вирусной инфекции на территории страны и не отображают эпизоотический ситуацию в полном объеме. Генетическое разнообразие эпизоотических вариантов возбудителя и его биологические свойства, которые обуславливают контагиозность, вирулентность и патогенность вируса, остаются неизученными.

Массовая гибель заболевших неонатальных поросят при отсутствии надежных и эффективных мероприятий специфической профилактики и терапии приводит к невозможности иммунобиологической коррекции эпизоотического процесса и делают ее трудноуправляемой. При этом в качестве средств борьбы используют в основном организационно-хозяйственные и карантинно-ветеринарные методы. Низкая эффективность методологии противоэпизоотических мероприятий дает основание считать ЭДС особо опасной и эмерджентной инфекционной патологией в свиноводстве (Wicht et al., 2014; Okda et al., 2015).

Цель этой статьи – выяснить эпидемиологию ЭДС на территории Украины за 2016–2017 годы с использованием методов ИФА и ПЦР, изучить эпизоотическую ситуацию α-коронавирусной инфекции в свиноводческих хозяйствах с типическим течением ЭДС и провести первичную оценку генетической групповой принадлежности возбудителя инфекции, изолированного в регионе страны с наиболее высокой интенсивностью эпизоотического процесса.

Материал и методы исследований

Работа выполнена на базе Научно-исследовательского центра биобезопасности и экологического контроля ресурсов агропромышленного комплекса Днепровского государственного аграрно-экономического университета. Для проведения мониторинга с целью оценки распространения ЭДС на протяжении 2016–2017 годов отобраны образцы биологических субстратов (сыворотка крови, фекалии, фрагменты тонкого кишечника от павших животных) от свиней 105 сельскохозяйственных предприятий, расположенных в 85 административных районах Западного, Южного, Северного, Восточного и Центрального регионов Украины (табл. 1). Образцы отобраны от животных разных возрастных групп, у которых отмечали клинические проявления желудочно-кишечной патологии, сопровождающейся диарейным синдромом. Протестировано 543 образца сывороток крови и 591 образец биологического материала.

Таблица 1
Количество административных районов Украины, участвовавших в мониторинговых наблюдениях на протяжении 2016–2017 гг.

Название областей	Всего районов	2016				2017			
		ИФА		ПЦР		ИФА		ПЦР	
		районов	хозяйств	районов	хозяйств	районов	хозяйств	районов	хозяйств
Западный регион									
Волынская	16	–	–	1	1	2	2	–	–
Закарпатская	13	–	–	1	1	–	–	2	2
Ивано-Франковская	14	–	–	–	–	2	2	1	2
Львовская	20	–	–	1	1	2	2	–	–
Ривненская	16	–	–	–	–	–	–	–	–
Тернопольская	17	–	–	–	–	–	–	–	–
Хмельницкая	20	–	–	–	–	2	2	1	2
Черновицкая	11	–	–	–	–	–	–	–	–
Южный регион									
АР Крым	14	–	–	–	–	–	–	–	–
Запорожская	20	3	3	3	3	4	4	3	4
Николаевская	19	2	2	–	–	–	–	–	–
Одесская	26	–	–	–	–	2	2	2	2
Херсонская	18	–	–	1	1	–	–	–	–
Северный регион									
Житомирская	23	–	–	–	–	–	–	–	–
Киевская	25	–	–	–	–	–	–	2	2
Сумская	18	–	–	–	–	2	2	1	2
Черниговская	22	1	1	1	1	–	–	–	–
Восточный регион									
Донецкая	18	–	–	–	–	–	–	–	–
Луганская	18	–	–	–	–	–	–	–	–
Харьковская	27	–	–	–	–	2	2	2	4
Центральный регион									
Винницкая	27	–	–	1	1	–	–	–	–
Днепропетровская	22	5	5	5	6	4	4	4	10
Кировоградская	21	2	2	2	2	2	2	5	8
Полтавская	25	–	–	2	2	2	2	1	2
Черкасская	20	–	–	1	2	2	2	1	4

Примечание: «–» – не исследовано.

В 2016 году в Западном регионе с помощью ИФА и ПЦР исследован биологический материал от свиней трех свиноводческих комплексов из трех областей. За 2017 год исследовано 14 свиноводческих предприятий из 12 административных районов пяти областей Западного региона.

Результаты мониторинговых исследований Южного региона методами ИФА и ПЦР охватывают четыре из пяти имеющихся областей. В 2016 году исследован материал 9 свиноводческих предприятий, расположенных в 9 административных районах трех из пяти областей. За 2017 год исследовано 12 предприятий из 11 административных районов двух из пяти областей Южного региона Украины.

За 2016 год в Северном регионе с помощью иммунохимических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики исследован биологический материал от свиней двух свиноводческих ферм, расположенных в двух районах Черниговской области. В 2017 году исследованы пробы из шести сельскохозяйственных предприятий из пяти различных административных районов Украины, которые входят в состав двух областей Северного региона.

Клинико-эпизоотологический мониторинг Восточного региона Украины в 2016 году не проводился. В 2017 году проведены

ИФА и ПЦР исследования биологического материала и сывороток крови свиней шести свиноводческих фирм, расположенных в четырех административных районах Харьковской области.

Результаты мониторинговых исследований Центрального региона методами ИФА и ПЦР охватывают все пять областей. Анализировали биологический материал и сыворотки крови от свиней 20 сельскохозяйственных предприятий из 18 административных районов, распределенных во всех областях региона. В 2017 году исследовано 34 предприятия из 21 административного района в четырех из пяти областей Центрального региона Украины. Таким образом, в Центральном регионе Украины за 2016 год обследовано 15,7% административных районов, а за 2017 – 18,3% районов, располагающихся в четырех из пяти областей центральных территорий Украины.

Таким образом, клинико-эпизоотологическим мониторингом ЭДС в 2016 году охвачено 6,5% административных районов 12 из 25 областей Украины, в 2017 – 10,8% районов в 14 областях страны.

Исследования проводили с помощью серологических (ИФА) и молекулярно-генетических (ПЦР, секвенирование) методов лабораторной диагностики ЭДС.

Выявление и дифференциацию вируса ЭДС в биологическом материале осуществляли методом ПЦР с помощью тест-системы EZ-RED/TGE/PDCoV MPX 1.0 Realtime RT-PCR фирмы Tetracore (США). Амплификации и детекцию результатов проводили на приборе CFX 96 Real-TimeSystemfirms фирмы BioRad (США) с программным обеспечением к нему Bio-Rad CFX Manager.

Серологическую диагностику ЭДС проводили с помощью ИФА, используя тест-системы Swinecheck® PED фирмы Biove (Канада) и ID Screen® PEDV Indirect фирмы IDVet (Франция) на иммуноферментном анализаторе-фотометре BioTek ELx800 (США). Согласно инструкции к набору Swinecheck® PED, сыворотки считали положительными по ЭДС при значении расчетного показателя S/P в образце выше 0,4 ед., в разведении 1 : 200, а при использовании набора ID Screen® PEDV Indirect сыворотки считали положительными по ЭДС при значении расчетного показателя S/P в образце выше 60%, в разведении 1 : 10.

Для секвенирования положительные пробы, выявленные в ходе исследования наличия вируса ЭДС в образцах кишечника и фекалий, которые получены от больных животных, клонированы в вектор pGEM-T (производства фирмы Promega, США) методом TA-клонирования. Плазмиды, содержащие вставку, отбирали методом бело-голубой селекции на твердой среде с агаром, содержащим IPTG (изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид). Положительные клоны высевали в ночную культуру на жидкой среде, содержащую селективный антибиотик (ампициллин), из которой на следующий день выделяли плазмидную ДНК методом щелочного лизиса (Lee and Rasheed, 1990). Далее проводили двунаправленное секвенирование по Сэнгеру выделенных плазмид из праймеров, фланкирующих вставку (M13-forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' и M13_reverse: 5'-AACAGCTATGACCATG-3') на автоматическом секвенаторе 3500 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, FosterCity, CA) с использованием набора BigDye® Terminator v1.1 CycleSequencingKit (Applied Biosystems).

Полученные секвенограммы анализировали в программе FinchTV/Chromas. Индивидуальные последовательности, выявленные в ходе исследования, сравнивали с типовыми и хорошо охарактеризованными штаммами вируса эпидемической диареи свиней для множественного выравнивания, построения филогенетического древа и определения групповой принадлежности, идентификационные номера которых в базе данных GenBank приведены ниже: Z25483, AB548623, AB548624, AB548618, AB548622, AY167585, GU180142, GU180143, GU180144, GU180145, GU180146, GU180147, AY653204, EU031893, DQ985739, AJ271965, AF304460, AF353511, GU937797, JQ023162, JQ023161, EF185992, JN547228, JQ282909, JN825712, JX261936, KR265804, KJ503833, KJ645688, KU133249, KU133240, KJ645696, KJ645695, KJ645700, KF468752. Последовательности выбраны из литературных источников (Pan et al., 2012; Vlasova et al., 2013).

Результаты

За 2016 год из Западного региона методом ПЦР протестировано 9 образцов биологического материала из трех областей, в результате чего генетический материал вируса ЭДС выявлен в 25,1% образцов Закарпатской и 100% образцов Львовской области (табл. 2). В биологическом материале из Волынской области РНК вируса ЭДС не обнаружено. Исследования 2017 года представлены результатами серологического анализа 135 сывороток крови и ПЦР тестирования 34 проб биологического материала из пяти областей региона, в результате чего иммуноглобулины к антигенам вируса ЭДС и РНК вируса не обнаружены.

Таблица 2

Результаты лабораторных исследований по обнаружению в биологическом материале РНК возбудителя ЭДС (ПЦР-исследования) и специфических антител (ИФА-исследования) к его антигенам на территории Украины за 2016–2017 гг.

Название областей	2016				2017			
	ИФА		ПЦР		ИФА		ПЦР	
	исследованных	положительных	исследованных	положительных	исследованных	положительных	исследованных	положительных
Западный регион								
Волынская	–	–	2	0	65	0	–	–
Закарпатская	–	–	4	1	–	–	18	0
Ивано-Франковская	–	–	–	–	30	0	10	0
Львовская	–	–	3	3	20	0	–	–
Ривненская	–	–	–	–	–	–	–	–
Тернопольская	–	–	–	–	–	–	–	–
Хмельницкая	–	–	–	–	20	0	6	0
Черновицкая	–	–	–	–	–	–	–	–
Южный регион								
АР Крым	–	–	–	–	–	–	–	–
Запорожская	56	8	121	92	38	0	37	6
Николаевская	–	–	–	–	–	–	–	–
Одесская	30	2	2	0	15	0	–	–
Херсонская	–	–	–	–	–	–	–	–
Северный регион								
Житомирская	–	–	–	–	–	–	–	–
Киевская	–	–	2	2	–	–	4	0
Сумская	–	–	–	–	36	0	10	0
Черниговская	15	0	4	0	–	–	–	–
Восточный регион								
Донецкая	–	–	–	–	–	–	–	–
Луганская	–	–	–	–	–	–	–	–
Харьковская	–	–	–	–	60	0	46	0
Центральный регион								
Винницкая	–	–	7	6	–	–	–	–
Днепропетровская	33	8	24	18	34	5	34	0
Кировоградская	4	0	30	0	26	0	41	0
Полтавская	–	–	6	0	26	0	7	0
Черкасская	–	–	165	104	35	0	8	0

Примечание: "–" – не исследовано.

Анализ результатов диагностики ЭДС в разных районах Юга Украины показал, что в 2016 г. из 86 проб сывороток специфические иммуноглобулины к антигенам вируса выявлены в 14,3% образцах из Запорожской и в 7,2% из Одесской области. Также из 123 образцов биоматериала РНК вируса обнаружено в 76,0% образцов привезенных из Запорожской области. Все пробы, тестируемые из Одесской области вирусотрицательные. В 2017 году методом ИФА протестировано 53 пробы сыворотки крови, которые показали отрицательный результат, а также 37 проб биоматериала, которые во время генетического анализа идентифицировали геном вируса ЭДС в 16,2% проб из Запорожской области. За 2016 год антитела к вирусу ЭДС обнаружены в 12,4% образцов сывороток крови из Запо-

рожской и Одесской областей, а РНК вируса идентифицирована в 76,1% образцов только из Запорожской области. За 2017 год иммуноглобулины к возбудителю ЭДС не обнаружены ни в одной из областей Южного региона, а генетический материал вируса выявлен в 16,3% образцов Запорожской области.

Результаты диагностики ЭДС показывают, что в 2016 году серологически инфекция не обнаружена, тогда как при исследовании биоматериала 100% образцов из Киевской области содержали геном вируса ЭДС. ИФА и ПЦР исследования, проведенные в 2017 году, показывают 100% отрицательный результат.

Анализ результатов диагностики ЭДС в Восточном регионе показал, что в 2017 г. из свиноводческих предприятий отобрано и протестировано 60 образцов сывороток крови и 46 образцов биологического материала. Полученные результаты являются 100% отрицательными. В 2016 г. аналогичные исследования не проводились.

Результаты диагностики ЭДС в Центральном регионе Украины показывают, что в 2016 г. из 37 исследованных проб специфические иммуноглобулины к антигенам вируса выявили в 24,0% образцов сывороток крови из Днепропетровской области. Исследование 232 образцов биологического материала методом ПЦР за этот период вывило присутствие РНК вируса ЭДС в 86,3% образцов Винницкой области, 75,1% образцов Днепропетровской области и 63,3% образцов из Черкасской области. В 2017 г. из 121 образца сыворотки крови, тестированного методом ИФА, обнаружены специфические антитела к антигенам вируса в 15,2% проб из Днепропетровской области. Также за этот период методом ПЦР протестировано 90 образцов биологического материала, из которых ни в одном случае не обнаружено генетического материала вируса ЭДС.

На сновании официальных данных в Центральном регионе Украины в 2016 году ЭДС выявлен в Винницкой, Днепропетровской и Черкасской областях, а в 2017-м – только в Днепропетровской.

Суммируя результаты мониторинговых исследований ЭДС в Украине за 2016 год, следует отметить, что всего протестировано методом ИФА 138 образцов сывороток крови и методом ПЦР – 370 образцов биологического материала, из которых в 13,3% образцов сывороток обнаружены специфические иммуноглобулины к антигенам вируса ЭДС и в 61,1% образцов биологического материала выявлено генетический материал эпизоотического штамма вируса. На протяжении 2017 года методом ИФА исследовано 405 образцов сывороток крови, из которых 1,2% содержали специфические антитела к вирусу ЭДС. Методом ПЦР протестирован 221 образец биологического материала. При этом РНК вируса ЭДС идентифицирован в 2,5% проб.

На сновании официальных данных, всего за период с 2016 по 2017 гг. методами ИФА и ПЦР исследованы 1 134 пробы сывороток крови и биологического материала, отобранные в 105 сельскохозяйственных предприятиях из 17,3% административных районов Украины. Специфические антитела к вирусу ЭДС или его РНК обнаружены у 23,2% исследованных образцов, из которых 52,0% принадлежат предприятиям Центрального региона Украины.

Таким образом, за 2016 год ЭДС зарегистрирована на территории семи областей из четырех регионов Украины: в Закарпатской, Львовской, Запорожской, Киевской, Винницкой, Днепропетровской и Черкасской, а за 2017 год инфекцию регистрировали в Запорожской и Днепропетровской областях.

Особое внимание в наших исследованиях уделено именно эпизоотологическим аспектам распространения ЭДС и сопровождающей ее симптоматике у инфицированных животных с анализом анамнестических клинико-эпизоотологических данных ретроспективного обзора инфекционной ситуации с патогномоническим симптомом «водянистая диарея» у неонатальных поросят. При этом в процессе обработки значительного массива клинической информации выведены общие типичные закономерно повторяющиеся особенности в формировании эпизоотического очага, от его возникновения, при проникновении инфекционного агента до его ликвидации, при полной эрадикации возбудителя из экологической ниши обитания чувствительных животных и технологическом оборудовании.

После появления α-коронавирусной инфекции в ранее благополучном хозяйстве, вследствие недостаточного уровня биобезопасности хозяйства и неудовлетворительного соблюдения основополагающих ветеринарно-санитарных требований по недопущению проникновения инфекции и выполнения правила «все занято – все пусто» возникала первоначальная вспышка ЭДС в виде легкого течения водянистой диареи возникла среди инфицированных животных, чаще всего ремонтных свиноматок.

Массовая вспышка ЭДС возникает через 24–48 часов после появления инфекции на территории предприятия. Кишечная патология в течение 3–5 суток распространилась на большую часть свиноматок свинарника, у четверти стада расстройства дефекации не регистрируются. Симптомокомплекс кишечного расстройства включал скоротечную водянистую диарею без выраженных тяжелых патофизиологических и общеорганизменных отклонений от физиологической нормы, температурная реакция отсутствовала, поедаемость корма уменьшилась, поведенческие реакции характеризовались незначительным угнетением. Через 5–6 суток после появления первых случаев относительно легкого клинического течения диареи состояние животных в свинарнике приходило в норму.

Впоследствии клинически энзоотия ЭДС появлялась у неонатальных поросят. Поросята начинали поносить через сутки после рождения, у большей части животных понос начинался на вторые – третьи сутки, реже диарея появлялась на четвертые – шестые сутки. Диарея сочеталась с рвотой. Фекалии сразу разжижались и превращались в водянистые испражнения, бесцветные или зеленовато-желтые, без примеси крови. Диарея не проходила круглосуточно и быстро приводила к дегидратации, животные худели, у них начинали контурировать ребра, позвоночник, маклоки. Кожа становилась морщинистой, неэластичной, сухой, шероховатой. Угнетение физиологических функций организма поросят быстро усиливалось, животные заметно слабели на фоне токсических явлений в сочетании с метаболическим ацидозом. Через три – шесть суток течения диарейного синдрома, на фоне гипотермии и прогрессирующего истощения, поросята погибали. Летальность среди поросят, у которых клинические проявления возникали в первые 72 часа жизни, составила 100%. Во время вскрытия характерные признаки представлены комплексом патологических изменений, состоящим из дегидратации, истощения, анемии, тяжелейшей интоксикации в сочетании с явлениями метаболического ацидоза и алиментарной астении. В ЖКТ ярко выражены признаки катарально-геморрагического энтероколита и десквамации секреторного эпителия тонкого и толстого кишечника. Печень, почки и сердечная мышца в состоянии дистрофии (белково-липидной). Регионарные лимфоузлы отечны и гиперемированны. Селезенка не увеличена, ярко-красного цвета. Слизистые и кожа анемичны, кровь в сосудах не свернулась, жировые депо внутренних органов истощены.

Незначительная часть животных, около 20% от заболевших, у которых признаки диареи проявились на четвертые – пятые сутки, после тяжелого переболевания, длившегося более 10 суток, на фоне рутинной терапии неспецифического характера выжили, но они уже не представляли хозяйственной ценности, отнесены к санитарному браку и удалены из стада.

Диагноз на ЭДС устанавливали с помощью комплексных клинико-эпизоотологических и лабораторных исследований с применением методов ИФА и ПЦР для тестирования сыворотки крови и проб фекалий от заболевших поросят.

Поросята, заболевшие после двухнедельного возраста, переносили энтеральные расстройства значительно легче, с незначительным отходом, не имеющим существенного эпизоотического значения, выздоравливали. После переболевания на-

блюдалась двухнедельная задержка физиологического развития – постинфекционная астения, с последующим, практически полным восстановлением откормочных кондиций. Для месячных и более старших животных возбудитель ЭДС уже не представлял эмерджентной угрозы.

Персистенция вируса в реконвалесцентном организме не зафиксирована, технологические объекты могут быть только механическим фактором передачи возбудителя инфекции в течение времени сохранения жизнеспособности вируса ЭДС. Стабилизация эпизоотического очага инфекции опосредуется за счет сохранения вируса во внешней среде, в результате некачественной дезинфекции и при формировании не иммунного молодняка от ремонтных свиноматок, у которых вследствие ювенальной физиологической недостаточности функциональной активности иммунной системы синтезируются специфические протективные иммуноглобулины в низких титрах, что ведет к формированию слабопротективного лактогенного мукозного иммунитета у неонатальных поросят и его последующему прорыву высоковирулентным эпизоотическим вариантом вируса ЭДС.

Для первичной оценки биологических свойств и генетической характеристики эпизоотического варианта вируса ЭДС, выделенного из биологического материала, отобранного от свиней с типичным течением заболевания, от одного из свиноводческих комплексов Центрального региона Украины проведено определение его генетического происхождения и сравнение генетических характеристик с референтными образцами генофонда американских и китайских образцов возбудителя ЭДС.

Выяснение филогенеза образцов PEDV выполнено с помощью сиквенс-анализа фрагмента геномной РНК ЭДС, изолированного из биологического материала неонатальных свиней с проявлениями диарейного синдрома. Полученные результаты секвенированных вставок генетического материала вируса ЭДС имели следующие последовательности (приведены в формате fasta):

1. CAAATMAWAGGCTACTAACGGTAACACTAATGCTAC
TGCGCGATTGCGCATTTGCCAGTTTCCTAGCATTAAAAC
ATTGGGCCCCACTGCTAATAATGATGTTACAACAGGTCG
TAATTGCCTATTTAACAAAGCCATCCCAGCTCATATGAG
TGAACATAGTGTTGTCGGCATAACATGGGATAATGATCG
TGTCACTGTCTTTTCTGACAAGATCTATTATTTTTATTTT
AAAAATGATTGGTCCCGTGTTGCGACAAAGTGTTACAAC
AGTGGAGGTTGTGCTATGCAATATGTTTACGAACCCACC
TATTACATGCTTAATGTTACTAGTGCTGGTGAGGATGGT
ATTTCTTATCAACCCTGTACAGCTAATTGCATTGGTTATG
CTGCCAATGTATTTGCTACTGAGCCCAATGGCCACATAC
CAGAAGGTTTTAGTTTTAATAATTGGTTTCTTTTGTCCAA
TGATTCCACTTTGGTGCATGGTAAGGTGGTTTCTAACCA
ACCATTGTTGGTCAATTGTCTTTTGGCCATTCCTAAGATT
TATGGACTAGGCCAATTTTTCTCCTTTAATCAAACGATC
GATGGTGTTTGTAATGGAGCTGCTGTGCAGCGTGCACCA
GAGGCTCTGAGGTTTAATATTAATGACACCTCTGTCATT
CTTGCTGAAGGCTCAATAAAAA

2. CTTTTTMMTAAGGCTACTAACGGTAACACTAATGCTA
CTGCGCGATTGCGCATTTGCCAGTTTCCTAGCATTAAAA
CATTGGGCCCCACTGCTAATAATGATGTTACAACAGGTC
GTAATTGCCTATTTAACAAAGCCATCCCAGCTCATATGA
GTGAACATAGTGTTGTCGGCATAACATGGGATAATGATC
GTGTCACTGTCTTTTCTGACAAGATCTATTATTTTTATTT
TAAAAATGATTGGTCCCGTGTTGCGACAAAGTGTTACAA
CAGTGGAGGTTGTGCTATGCAATATGTTTACGAACCCAC
CTATTACATGCTTAATGTTACTAGTGCTGGTGAGGATGG
TATTTCTTATCAACCCTGTACAGCTAATTGCATTGGTTAT
GCTGCCAATGTATTTGCTACTGAGCCCAATGGCCACATA
CCAGAAGGTTTTAGTTTTAATAATTGGTTTCTTTTGTCCA
ATGATTCCACTTTGGTGCATGGTAAGGTGGTTTCTAACC
AACCATTGTTGGTCAATTGTCTTTTGGCCATTCCTAAGAT
TTATGGACTAGGCCAATTTTTCTCCTTTAATCAAACGAT
CGATGGTGTTTGTAATGGAGCTGCTGTGCAGCGTGCACC
AGAGGCTCTGAGGTTTAATATTAATGACACCTCTGTCAT
TCTTGCTGAAGGCTCAATAA

Анализ показал, что данные нуклеотидной последовательности являются характерными фрагментами гена, кодирующего белок S вируса (структурный ген спайка).

Результаты определенной последовательности подвергнуты множественному нуклеотидному выравниванию с типовыми последовательностями штаммов вируса ЭДС, на основании которого построено филогенетическое древо (рис.).

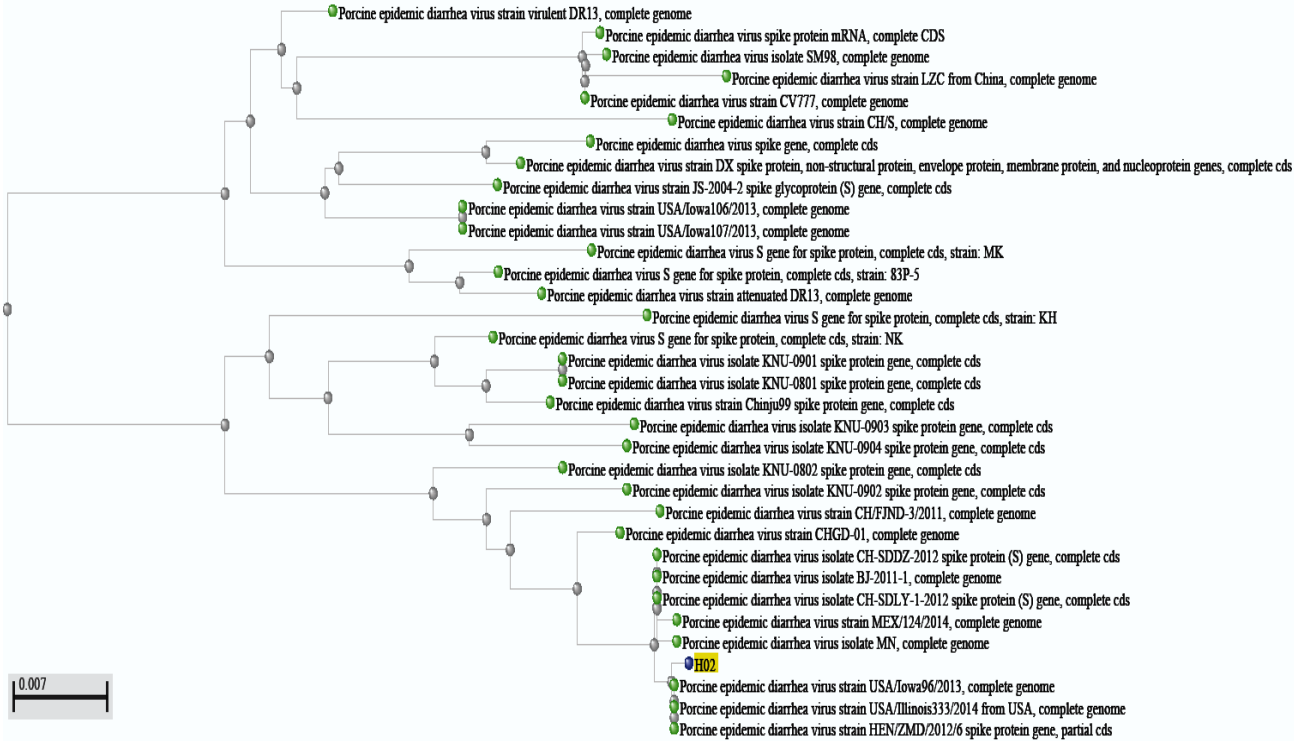


Рис. Филогенетическое древо, построенное на основании результатов исследования последовательности фрагмента генома вируса ЭДС: определенные в ходе исследования последовательности выделены желтым цветом

Результаты, представленные на кладограмме, указывают на то, что выявленный штамм наиболее близок к группе 2 (родственной китайскому штамму BJ-2011-1) североамериканской клади II вируса ЭДС. Обнаруженные последовательности относятся к североамериканской клади II из группы 2 штаммов вируса ЭДС и отличаются от них по меньшей мере одной нуклеотидной заменой гена, белка домена S.

Обсуждение

Для свиноводческих хозяйств Украины ЭДС является новой инфекционной патологией, возбудитель которой обладает очень опасными для новорожденных поросят болезнетворными свойствами, главными из которых являются чрезвычайная заразность, высокая вирулентность и выраженный тропизм к эпителию тонкой кишки (Jung et al., 2015). При попадании в энтероциты кишечника возбудитель ЭДС активно репродуцируется, что приводит к гибели и десквамации эпителия и развитию всего последующего комплекса патогенетических изменений местного и общеорганизменного характера в виде диарейного синдрома и гибели поросят вследствие дегидратации, интоксикации, метаболического ацидоза и истощения (Jung and Saif, 2015; Alvarez et al., 2016; Chaika et al., 2016).

Основной симптомокомплекс ЭДС – «диарейный синдром» не является исключительной прерогативой этого заболевания, а встречается и при других инфекционных патологиях энтерального характера (Chen et al., 2015). Поэтому диагностика и мониторинг эпизоотической ситуации в свиноводческих хозяйствах Украины невозможна без эффективных инструментальных и объективных высокотехнологичных методов, таких как иммунохимический скрининг специфических иммуноглобулинов против антигенов возбудителя ЭДСв ИФА и индентификация РНК вируса в ПЦР (Kim et al., 2007). Также важны и информативны классические способы сбора и логической обработки клинико-эпизоотологических данных распространения и проявления ЭДС в неблагополучном пункте на чувствительных животных (Okda et al., 2015; Jung and Saif, 2015; Song and Park, 2015).

Результаты лабораторных исследований сывороток крови от больных животных методом ИФА и фекалий методом ПЦР позволили установить неблагополучную ситуацию в распространении ЭДС на большей части территории Украины в 2016–2017 годах, кроме Восточного региона, включающего Донецкую, Луганскую и Харьковскую области. Наибольшее количество положительных результатов лабораторной диагностики выявлено в образцах из Южного и Центрального регионов Украины, где в среднем этот показатель составляет 36,1% и 29,3% диагностически положительных проб, соответственно, от общего количества поступивших на анализ. В Северном и Западном регионах Украины интенсивность эпизоотического процесса выражена значительно слабее, в долевом выражении это составило, соответственно, 3,2% и 2,4% диагностически положительных проб от общего количества поступивших на анализ. Количественно разница положительных результатов лабораторной диагностики ЭДС между территориальными формированиями с высоким и низким уровнем интенсивности эпизоотического процесса составляет один десятичный логарифм и является статистически достоверной.

Высокозначимым фактором, имеющим эпизоотологическое значение, является ветеринарно-санитарная культура ведения свиноводческой отрасли и уровень биобезопасности хозяйства (Song and Park, 2015; Jung and Saif, 2015; Masiuk et al., 2017). Традиционное ведение животноводства экстенсивного типа с неудовлетворительным уровнем противоинфекционной защиты приводит к тому, что в популяции чувствительных животных проникает возбудитель инфекции и, как следствие, вызывает эпизоотический процесс ЭДС. Занос возбудителя ЭДС возможен автотранспортом (особенно опасен автотранспорт мясокомбинатов), с животными, поступившими из неблагополучного пункта, механическими переносчиками. Ретроспективно, на основании лабораторного анализа невозможно достоверно установить механизм и источники заноса инфекционного агента, но факт возникновения ЭДС свидетельствует о нарушении ключевых ветеринарно-санитарных требований противоэпизоотической защиты животноводческого предприятия от заразных заболеваний (Dastjerdi et al., 2015; Choudhury et al., 2016). Возможно, что такие нарушения являются основной причиной того, что в 2016 году получено наибольшее количество положительных лабораторных диагностических результатов: в 13,3% образцов обнаружены специфические иммуноглобулины к антигенам вируса ЭДС и в 61,1% образцов биологического материала выявлен генетический материал эпизоотического штамма вируса. В 2017 году наблюдали значительное снижение интенсивности эпизоотического процесса ЭДС на неблагополучных территориях Украины. Методом ИФА в 1,2% образцов выявлены специфические антитела к антигену вируса ЭДС. Методом ПЦР РНК вируса ЭДС идентифицирована в 2,5% проб. Этот положительный противоэпизоотический тренд объясняется активным проведением противоинфекционного санирования в неблагополучных хозяйствах, включающих весь комплекс ветеринарно-санитарных и противоэпизоотических мероприятий.

Основная проблема при разработке алгоритма противоэпизоотических мероприятий состоит в том, что заражение и заболевание неонатальных поросят происходит у тех особей, которые имеют повышенную чувствительность к вирусу ЭДС. В то же время, средства специфической профилактики, индуцирующие создание механизмов колострального мукозного иммунитета, являются недостаточно эффективными (Annamalai et al., 2015; Song et al., 2015; Langel et al., 2016). Своевременная индикация вируса ЭДС в окружающей среде затруднительна и часто бывает запоздалой, что ведет к вспышке летального энтерального расстройства у неимунных неонатальных поросят (Jung and Saif, 2015).

При низкой культуре животноводства и неудовлетворительном уровне биобезопасности на фоне нарушения базисных норм эпизоотологии наблюдается формирование стационарных очагов инфекции (Lee, 2015; Akimkin et al., 2016). Заболевание приобретает эндемический характер, что неизбежно сказывается на биологической системе «паразит – хозяин», так как свиньи являются скороспелыми многоплодными животными с частой сменой потомства, на которых и происходит экзальтированная ротация вирусных клонов (Song and Park, 2012; Masiuk et al., 2017). Это приводит к существенной вариабельности межпопуляционных взаимоотношений и индукции разнообразия генетического реагирования вирусного генома. Клинически генетические модификации вирусной популяции проявляются изменением эпизоотических особенностей течения инфекционной патологии на различных возрастных группах животных и небольшим ослаблением напряженности инфекционного процесса, смертность незначительно уменьшается, тяжесть патогенеза диарейного синдрома ослабевает, а временной диапазон поражения расширяется с неонатальных поросят на животных старших возрастных групп (Annamalai et al., 2015; Jung et al., 2015; Goede and Morrison, 2016).

PEDV характеризуется высоким тропизмом по отношению к энтероцитам свиней (Wicht et al., 2014). При вскрытии павших от «водянистой диареи» поросят патогномоническим признаком являются дегенеративные изменения в энтероцитах, прежде всего тощей кишки, с развитием атрофии и укорочением ворсинок и микроворсинок (Jung et al., 2015). Утрата микроворсинок приводит к уменьшению всасывающей функции поверхности тонкого кишечника, что в совокупности с функциональными нарушениями и слущиванием значительного количества энтероцитов приводит к пониженному всасыванию и основному симптому инфектопатологии – профузной диареи. Гибель поросят наступает от сочетанного воздействия интоксикации, ацидоза и дегидратации на фоне нарастающей про-

страции и коматозного состояния (Annamalai et al., 2015; Goede and Morrison, 2016).

Методологическим базисом борьбы с вирусом ЭДС в технологической экосистеме обитания свиней является применение ветеринарно-карантинных и противоэпизоотологических методов воздействия, направленных на недопущение попадания возбудителя на свиноферму и эрадикацию вируса в окружающей технологической среде содержания свиней с помощью строжайшей дезинфекции до отрицательного результата в ПРЦ (Lee, 2015; Goede and Morrison, 2016). Для создания иммунного фона по отношению к возбудителю необходимо использовать иммунобиологические подходы, основанные на создании популяционной невосприимчивости чувствительной биосистемы к вирулентному возбудителю с помощью доступных иммунобиологических препаратов и приемов: вакцинации супороносных свиноматок в сочетании с «обратным скармливанием» инфицированным биоматериалом или одномоментным фекальным перезаражением половозрелых животных (Song et al., 2015; Langel et al., 2016). При этом необходимо удалить вирус из экосистемы обитания свиней и максимально повысить биобезопасность свиноводческого хозяйства (Song and Park, 2012; Jung and Saif, 2015).

Использование в качестве мер борьбы безвакциного варианта разрыва эпизоотической цепи, основанного на обратном скармливании инфицированного биоматериала от переболевших ЭДС поросят и эрадикации возбудителя из внешней среды обитания макроорганизма с помощью жесткой тотальной дезинфекции и жесткого соблюдения ветеринарно-санитарных правил ведения животноводства, приводит к тому, что вирус, покидая восприимчивый организм, погибает во внешней среде (Bowman et al., 2015; Goede and Morrison, 2016). Поэтому теоретически и практически возможна ликвидация эпизоотии ЭДС в отдельно взятом очаге инфекции при условии полной эрадикации возбудителя во внешней среде и создания надежного лактогенного иммунитета у неонатальных поросят (Choudhury et al., 2016; Dee et al., 2016).

Важнейшим направлением мониторинговых исследований эпизоотологии ЭДС является изучение молекулярно-генетических характеристик полевых изолятов вируса и коррелированных с генетическими особенностями штаммов биологическими свойствами, прежде всего вирулентностью и контагиозностью, а также иммуногенной способностью полевых изолятов и аттенуацией в различных биологических системах (Lin et al., 2017). Ограничения в использовании доступных для пролиферации PEDV клеточных культур в лабораторных условиях, а также референс-штаммов PEDV и, в частности, полевых изолятов возбудителя являются острой проблемой методологического характера, которая до сих пор не оптимизирована и не стандартизирована. Эти трудности являются одними из основных причин сложности пролиферации в культуре клеток биоматериала при процессе получения достаточного количества биоматериала PEDV при создании специфических профилактических биопрепаратов с аттенуированным или инактивированным возбудителем в составе вакцин и гипериммунных сывороток (Pan et al., 2012; Song and Park, 2012; Jarvis et al., 2016).

По результатам генетической характеристики эпизоотического изолята, а также кладограммы, определенной на основе данных сиквенс-анализа, установлено, что последовательности возбудителя соответствуют группе 2 (родственной китайскому штамму BJ-2011-1) североамериканской клади II вируса ЭДС вместе с такими штаммами, как USA/Illinois/333/2014, USA/Iowa/2013 и др. От этих последовательностей выявленный штамм отличается одной нуклеотидной заменой (например, KJ645688.1:n.20965 – C>T) (Marthaler et al., 2014; Jarvis et al., 2016).

Выводы

Анализ эпидемиологии ЭДС на территории Украины за 2016–2017 годы позволил установить, что возбудитель инфекции циркулирует среди чувствительных животных свиноводческих хозяйств и индуцирует ЭДС, которая является трудноконтролируемой и слабо управляемой особо опасной эмерджентной заразной болезнью свиней. В 2016 году обследовано 6,5% административных районов, территориально расположенных в 12 из областей Украины, а за 2017 год исследовано 10,8% административных районов, расположенных на территории 14 из 25 областей страны. За 2016–2017 годы методами ИФА и ПЦР исследовано 1 134 пробы сывороток крови и биологического материала, отобранные от 105 сельскохозяйственных предприятий из 17,3% районов Украины. За 2016 год ЭДС зарегистрирована на территории семи областей из четырех регионов Украины: Закарпатской, Львовской, Запорожской, Киевской, Винницкой, Днепропетровской и Черкасской, а за 2017 год инфекцию регистрировали в Запорожской и Днепропетровской областях.

Результаты сиквенс-анализа РНК вируса ЭДС идентифицировали последовательность генома, которая имеет высокую степень гомологии с китайским штаммом BJ-2011-1. Обнаруженные последовательности относятся к североамериканской клади II из группы 2 штаммов вируса ЭДС и отличаются от них по меньшей мере одной нуклеотидной заменой гена, белка домена S. На основании полученных результатов можно предположить, что в Украине вирус ЭДС мог распространиться из Восточной Азии так же, как и из Северной Америки.

References

Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Hoper, D., Jenckel, M., & Pohlmann, A. (2016). New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany, 2012. Journal Emerging Infectious Disease, 22, 1314–1315.

Alvarez, J., Sarradell, J., Morrison, R., & Perez, A. (2015). Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs. Plos One, 10(3), e0120532.

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, 193–202.

Bi, J., Zeng, S., Xiao, S., Chen, H., & Fang, L. (2012). Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain AJ1102 isolated from a suckling piglet with acute diarrhea in China. Journal of Virology, 86, 10910–10911.

Bowman, A. S., Nolting, J. M., Nelson, S. W., Bliss, N., Stull, J. W., Wang, Q., & Premanandan, C. (2015). Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus. Veterinary Microbiology, 179(3–4), 213–218.

Chaika, O. V., Holovko, V. O., Symonenko, S. I., & Severyn, R. V. (2016). Epidemic swine diarrhea – new threat for pig farms in Ukraine. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(4), 134–138.

Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madson, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M., & Zhang, J. (2015). Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. Virology, 482, 51–59.

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. Journal of Virus Research, 226, 40–49.

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.

Dee, S., Neill, C., Singrey, A., Clement, T., Cochrane, R., Jones, C., Patterson, G., Spronk, G., Christopher-Hennings, J., & Nelson, E. (2016). Modeling the transboundary risk of feed ingredients contaminated with porcine epidemic diarrhea virus. BMC Veterinary Research, 12(1), 12:51.

Fan, H., Zhang, J., Ye, Y., Tong, T., Xie, K., & Liao, M. (2012). Complete genome sequence of a novel porcine epidemic diarrhea virus in South China. Journal of Virology, 86, 10248–10249.

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, 202–207.

Grasland, B., Bigault, L., Bernard, C., Quenault, H., Toulouse, O., Fablet, C., Rose, N., Touzain, F., & Blanchard, Y. (2015). Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. Genome Announcements, 3(3), e00535-15.

Huang, Y. W., Dickerman, A. W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., & Meng, X. J. (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. mBio, 4(5), e00737-13.

Jarvis, M. C., Lam, H. C., Zhang, Y., Wang, L., Hesse, R. A., Hause, B. M., Vlasova, A., Wang, Q., Zhang, J., Nelson, M. I., Murtaugh, M. P., & Marthaler, D. (2016). Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. Preventive Veterinary Medicine, 123, 175–184.

Jung, K., & Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. Veterinary Journal, 204, 134–143.

Jung, K., Eyerly, B., Annamalai, T., Lu, Z., & Saif, L. J. (2015). Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. Veterinary Microbiology, 177, 373–378.

Kim, S. H., Kim, I. J., Pyo, H. M., Tark, D. S., Song, J. Y., & Hyun, B. H. (2007). Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. Journal of Virological Methods, 146, 172–177.

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.

Lee, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. Virology Journal, 12, 193.

Lee, S. Y., & Rasheed, S. A. (1990). Simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. Biotechniques, 9(6), 676–679.

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 crossprotection to the original US PEDV infection. Veterinary Research, 46, 134.

Lin, C. M., Hou, Y., Marthaler, D. G., Gao, X., Liu, X., Zheng, L., Saif, L. J., & Wang, Q. (2017). Attenuation of an original US porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A via serial cell culture passage. Veterinary Microbiology, 201, 62–71.

Marthaler, D., Jiang, Y., Collins, J., & Rossow, K. (2014). Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus from the United States. Genome Announc, 2(2), e00218-14.

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.

Okda, F., Liu, X., Singrey, A., Clement, T., Nelson, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., & Lawson, S. (2015). Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of porcine epidemic diarrhea virus. BMC Veterinary Research, 11, 180.

Pan, Y., Tian, X., Li, W., Zhou, Q., Wang, D., Bi, Y., Chen, F., & Song, Y. (2012). Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China. Virology Journal, 9, 195.

Song, D., & Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhea virus, a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis and vaccines. Virus Genes, 44, 167–175.

Song, D., Moon, H., & Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: A review of current epidemiology and available vaccines. Clinical and Experimental Vaccine Research, 4(2), 166–176.

Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., Weissenböck, H., Weissenbacher-Lang, C., Ritzmann, M., & Ladinig, A. (2015). Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. BMC Veterinary Research, 11, 142.

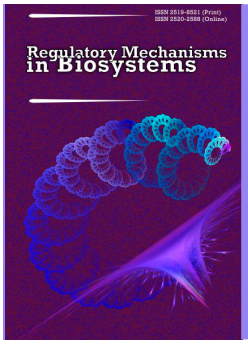
Stevenson, G. W., Hoang, H., Schwartz, K. J., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B. J., Koster, L. G., Killian, M. L., & Yoon, K. J. (2013). Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 25, 649–654.

Sun, D., Wang, X., Wei, S., Chen, J., & Feng, L. (2016). Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: A mini-review. Journal of Veterinary Medical Science, 78(3), 355–363.

Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A., Collins, J., & Saif, L. J. (2013). Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, Emerging Infectious Diseases, 20(10), 1620–1628.

Wang, L., Byrum, B., & Zhang, Y. (2014). New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. The Journal of Veterinary Medical Science, 20, 917–919.

Wicht, O., Li, W., Willems, L., Meuleman, T. J., Wubbolts, R. W., van Kuppeveld, F. J. M., Rottier, P. J. M., & Bosch, B. J. (2014). Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. Journal of Virology, 88, 7952–7961.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 611–615
doi: 10.15421/021793

Features of the microbiota of the urogenital tract of women with pathological conditions

Y. M. Bezkrovna, L. P. Golodok, A. I. Vinnikov

Center of Laboratory Diagnostics, LLC "Medlayf", Kremenchug, Ukraine
Oles Honchar Dnipro National University, Dnepr, Ukraine

Article info

Received 28.09.2017
Received in revised form 04.11.2017
Accepted 08.11.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-097-300-54-79.
E-mail: bezk-yuliya@yandex.ru

Bezkrovna, Y. M., Golodok, L. P., & Vinnikov, A. I. (2017). Features of the microbiota of the urogenital tract of women with pathological conditions. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 611–615. doi:10.15421/021793

Nonspecific infection of the female reproductive system continues to occupy the first place among pathologies of the reproductive tract of the female. These diseases affect the organs and tissues related to the reproductive system. Using the method of polymerase chain reaction in real time, we investigated characteristics of the normal and conditionally pathogenic aerobic / facultative anaerobic, anaerobic biota in the urethra, cervical canal and vagina of women aged 16 to 58 years, studies were carried out on the basis of the Center of Laboratory Diagnostics, LLC "MEDLAYF". For all women up to the age of 40, biota is mainly represented by lactobacilli (*Lactobacillus* spp.), and in pathological complications of the urogenital tract of women the microbial composition of the biocoenosis is characterized by a decrease in the number of lactobacilli and their replacement by pathogenic anaerobic microorganisms. In disorders of the microflora of the urogenital tract we also detected the human papillomavirus of both high and low carcinogenic risk and *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*), *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis* and yeast of the genus *Candida* spp. The most frequently distributed of the most common causative agents of pathological conditions of the reproductive system of women is the human papillomavirus of high carcinogenic risk, *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*) and *Candida* spp. This is due to anatomical and physiological characteristics of the genital organs, hormonal and immune system.

Keywords: PCR in real time; reproductive age; urogenital tract; dysbiosis; microorganisms

Особливості мікробіоти урогенітального тракту жінок за патологічних станів

Ю. М. Безкровна, Л. П. Голодок, А. І. Вінніков

Центр лабораторної діагностики ТОВ «Медлайф», Кременчук, Україна
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Неспецифічні інфекції жіночої статевої системи продовжують посідати одне з перших місць серед патологій репродуктивного тракту жінки. Ці хвороби негативно впливають на органи та тканини, які належать до репродуктивної системи. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу досліджено характеристики нормальної та умовно-патогенної аеробної або факультативно-анаеробної, анаеробної біоти в уретрі, цервікальному каналі та піхві жінок віком 16–58 років. В усіх жінок до 40 років біота представлена переважно лактобацилами (*Lactobacillus* spp.), а за патологічних ускладнень урогенітального тракту жінок мікробний склад біоценозу характеризується зниженням кількості лактобацил і заміщенням їх умовно-патогенними анаеробними мікроорганізмами. За порушення мікрофлори урогенітального тракту також виявлено вірус папіломи людини високого та низького канцерогенного ризику та *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*), *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis* та дріжджі роду *Candida*. За частотою виділення найпоширеніші збудники патологічних станів репродуктивної системи жінок – вірус папіломи людини високого канцерогенного ризику, *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*) і *Candida* spp. Це пов'язано з анатомо-фізіологічними особливостями статевих органів, гормональним фоном і станом імунної системи.

Ключові слова: ПЛР у режимі реального часу; репродуктивний вік; урогенітальний тракт; дисбіоз; мікроорганізми

Вступ

Останніми десятиліттями відмічають ріст дисбіотичних захворювань урогенітального тракту жінок. Зміни екологічного стану довкілля, нераціональне харчування, перенесені гострі кишкові інфекції, хронічні захворювання та дисфункція шлунково-кишкового тракту, широке застосування антибіотиків, зниження імунологічної реактивності організму можуть бути причинами порушень рівноваги представників резидентної мікрофлори та виникнення дисбактеріозу піхви (Machado and Cerca, 2015). Один із важливих факторів резистентності жіночих статевих органів до урогенітальних інфекцій, які переда-

ються статевим шляхом, – нормальна мікрофлора піхви. У здорових жінок репродуктивного віку вона характеризується більшим різноманіттям видів бактерій, життєдіяльність яких багато в чому залежить від їх здатності до адгезії на клітини піхвового епітелію та можливості конкуренції між собою за місця перебування та продуктами харчування. Мікрофлора піхви здорових жінок репродуктивного віку включає широкий спектр мікроаерофілів, факультативних і облігатних анаеробів.

За фізіологічної норми жіночий організм контактує з тисячами видів мікробів, перебуваючи з ними у симбіотичних відносинах. За впливу ендогенних і екзогенних чинників відбувається постійна зміна мікробіоти вагінального біотопу, що викликає порушення складу нормальної мікрофлори. Зменшення кількості лактобацил та збільшення анаеробних представників мікрофлори може спричинити дисбіоз (Algeburi et al., 2015). Видовий склад лактобактерій піхвового біотопу в кожної жінки унікальний, нерідко представлений декількома видами. Нині класифіковано понад 150 лактобактерій, із них, за даними різних авторів, у піхві здорових жінок може бути від 6 до 15 видів. Найчастіше зустрічаються *Lactobacillus acydophilus*, *L. paracasei*, *L. crispatum*, *L. brevis*.

Вагінальна флора може змінюватися в різні фази менструального циклу. Найменша кількість мікроорганізмів визначається у період менструації. Деякі автори вважають, що число аеробів упродовж менструального циклу досить постійне, а кількість анаеробів може змінюватися (Reid et al., 2003). Тому можливі варіації нормального мікробоценозу піхви.

Мікрофлора урогенітального тракту представлена в основному мікробіотою (бактеріальні мікроорганізми), мікобіотою (гриби), а також вірусами та найпростішими, сукупність яких забезпечує колонізаційну резистентність. Лактобацили домінують у мікрофлорі піхви, але за останні роки з'являється все більше даних про те, що збільшилося різноманіття мікробіоти піхви у поєднанні зі зниженою чисельністю *Lactobacillus* spp. У свою чергу, це викликає підвищення рівня патогенних мікроорганізмів і зараження вірусними агентами, які спричиняють передрак і рак шийки матки (Mitra et al., 2017).

Нині це одна з найважливіших медико-соціальних проблем – інфекційна патологія репродуктивної системи жінки. Провідне місце у структурі цієї патології посідають запальні процеси, викликані умовно-патогенними мікроорганізмами. За даними Larsen et al. (2001) і Klebanoff et al. (2004), частота бактеріальних інфекцій урогенітального тракту сягає 80% серед патологічних станів жіночої статевої сфери. Розвиток дисбалансу біоти урогенітального тракту може супроводжуватися метаболічними та імунними порушеннями, та в низці випадків клінічними проявами, ступінь вираженості яких варіює від безсимптомного носійства до виражених клінічних проявів (Ferris et al., 2004). Порушення нормальної мікрофлори репродуктивного тракту можуть спричиняти переривання вагітності, передчасні пологи, внутрішньоутробне інфікування плода та післяпологові ускладнення в матері (Nikulina et al., 2012). Дослідження Aila et al. (2010) показали, що майже у 50% випадків на первинному прийомі діагностується ускладнений перебіг урогенітальних інфекцій у жінок.

Збільшення кількості хворих на неспецифічні інфекції, труднощі терапії, пов'язані з антибіотикорезистентністю збудників, складністю та неясністю багатьох питань механізму розвитку захворювання, відсутністю чітких критеріїв діагностики та впливу інфекції на репродуктивну систему, роблять цю проблему надзвичайно актуальною. Метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі дозволяє виявити збудників у низькій концентрації, а також діагностувати дисбіотичні порушення на ранніх етапах, коли можливо запобігти подальшому розвитку складних патологічних станів.

Мета цього дослідження – встановити частоту виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів та вірусів урогенітального тракту жінок в умовах патологічних ускладнень.

Матеріал і методи досліджень

На першому етапі для аналізу співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори обстежили 175 жінок віком 16–58 років, при цьому застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Залежно від ступеня вираженості клінічних проявів пацієнток поділили на дві групи: «норма» (110 жінок, які не мали суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики) та «патологія» (65 пацієнток, які пред'являли скарги за відсутності об'єктивної клінічної та наявної суб'єктивної симптоматики). У частини здорових жінок фертильного віку (старше 40 років) відбувається зниження колонізації урогенітального тракту лактобацилами порівняно з молодшими фертильними жінками. У зв'язку із цим жінок із груп «норма» та «патологія» залежно від віку поділили на три групи: I – 16–25 років, II – 26–39 і III вікова група – 40–58 років.

У жінок відбирали клінічні зразки шляхом скребка з поверхні епітелію із задньобокового склепіння піхви та цервікального каналу стерильним одноразовим інструментом типу «Cutobrush». Зразок поміщали у пробірку з транспортним середовищем.

На наступному етапі обстежено 125 жінок віком 16–58 років. Для виявлення вірусу папіломи людини високого та низького канцерогенного ризику, а також інших вірусних агентів, усіх пацієнток поділено на три вікові групи, зазначені вище. Цей поділ зроблений з метою детального вивчення розповсюдження вірусу папіломи людини та інших вірусних агентів в урогенітальному тракті жінок різного репродуктивного віку. Всім досліджуваним проведене комплексне обстеження та гінекологічний огляд.

Для цього етапу застосовано тест-системи «Фемофлор» і «Квант-21» для проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Клінічний матеріал із піхви відбирали за допомогою одноразового стерильного зонда із заднього або бічних зводів шляхом скребка з поверхні епітелію, матеріал із цервікального каналу отримали за допомогою уретрального зонда, який потім поміщали в пробірки з транспортним середовищем.

Результати

Методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу дослідили склад мікрофлори урогенітального тракту 175 жінок різних вікових категорій, що звернулись до Центру лабораторної діагностики ТОВ «Медлайф» (м. Кременчук, (табл.).

Таблиця

Частота виділення аеробних і анаеробних бактерій урогенітального тракту жінок, які не мали суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики

Вид мікроорганізму		Частота виділення клінічних штамів мікроорганізмів, %		
		жінки 16–25 років n = 50	жінки 26–39 років n = 40	жінки 40–58 років n = 20
Аеробна мікрофлора	*Lactobacillus* spp.	90	70	45
	Escherichia coli	10	10	10
	Staphylococcus aureus	5	8	5
	Candida albicans	3	10	5
Анаеробна мікрофлора	*Atopobium vaginae*	0	20	20
	Megasphaera spp.	0	8	10
	Dialister spp.	0	8	10
	Gardnerella vaginalis	3	10	15
	Porhyromonas spp.	0	0	5
	Eubacterium spp.	0	0	10

У жінок віком 16–25 років кількість умовно-патогенних мікроорганізмів відповідала нормоценозу, а у пацієнток понад 40 років зі зниженою кількістю лактобацил виявлено збільшення кількості анаеробних умовно-патогенних мікроорганізмів, у жінок віком 26–39 років відмічали незначне збільшення кількості анаеробних умовно-патогенних мікроорганізмів. Таким

чином, у жінок понад 40 років за відсутності атрофічних змін в урогенітальному тракті відбувається заміщення лактобацил на широкий спектр анаеробних бактерій (рис. 1) У жінок молодше 25 років частота виявлення лактобацил становить 90%, співвідношення аеробних і анаеробних мікроорганізмів відповідало нормоценозу, а частота виділення анаеробних бактерій у всіх обстежених понад 40 років, на відміну від аеробних (факультативно-анаеробних), перевищувала рівень лактобацил (45%).

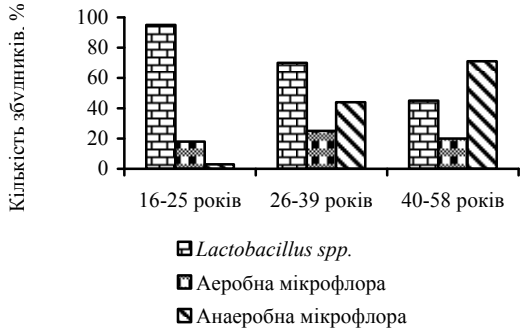


Рис. 1. Співвідношення аеробних і анаеробних мікроорганізмів урогенітального тракту жінок без суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики (n = 110)

Вивчення частотного розподілу мікроорганізмів показало, що у більшості жінок без суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики умовно-патогенні збудники не виявлені, реєструються лише поодинокі випадки у вигляді бактеріальної моноінфекції. Проводячи дослідження серед жінок, що пред'являли скарги за відсутності об'єктивної та наявності суб'єктивної клінічної симптоматики (група «патологія»). виділили такі умовно-патогенні штами мікроорганізмів: *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*), *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Candida* spp., *Neisseria gonorrhoeae* (рис. 2).

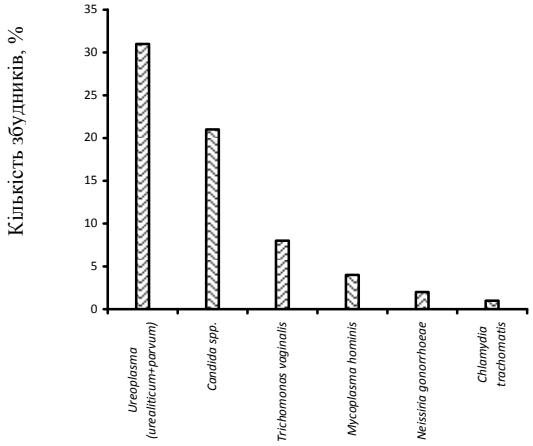


Рис. 2. Частота виявлення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (n = 65)

В усіх вікових групах жінок, які пред'являли скарги за наявності суб'єктивної клінічної симптоматики, виділені мікроорганізми у досліджуваному клінічному матеріалі містилися майже в однаковому відсотковому співвідношенні. У високих титрах виявлено *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*) (>10^4, 31%) та *Candida* spp. (21%). У 8% жінок виявлено *Trichomonas vaginalis*, у 4% – *Mycoplasma hominis*, у 1% – *Chlamydia trachomatis* та у 2% – *Neisseria gonorrhoeae*. Слід зазначити, що в усіх жінок групи «патологія» відмічено зниження рівня *Lactobacillus* spp. Можна зробити припущення, що найвірогідніша причина появи різних патологічних ускладнень за відсутності об'єктивних клінічних ознак запалення в урогенітальному тракті, за даними наших спостережень, – великий відсоток частоти виявлення *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*) та *Candida* spp., а також зниження рівня нормальної мікрофлори урогенітального тракту. У рідкісних випадках має значення також і великий спектр інших збудників запальних процесів урогенітального тракту жінок, у тому числі патогенних.

Таким чином, за відсутності об'єктивних клінічних симптомів запалення наявне як у жінок віком 26–39 років, так і у жінок віком понад 40 років та виявляється частіше, ніж у пацієнток, які не мають суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики. Така поширеність збудників може бути пов'язана з тим, що у жінок репродуктивного віку (26–39 років) відбуваються зміни мікрофлори урогенітального тракту, пов'язані з пологами, а також із вагітністю, соціальними умовами, частотою зміни статевих партнерів (Newton, 2001). Особливе значення у патології репродуктивної системи має вірус папіломи людини високого та низького канцерогенного ризиків, тому проведено аналіз поширення різних типів вірусу папіломи людини у різних вікових групах жінок.

У віковій групі 16–25 років виявлено 12 типів вірусу папіломи людини високого канцерогенного ризику. Найчастіше виявлявся 16-й тип (18,4%), інші типи виявлялися у незначних відсотках, також у першій віковій групі виділено вірус папіломи людини низького канцерогенного ризику 11 (2,6%) (рис. 3).

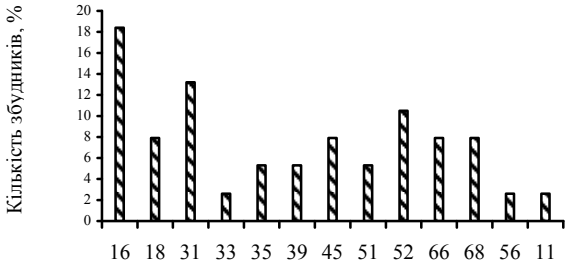


Рис. 3. Кількість різних типів вірусу папіломи людини (%) у першій віковій групі (від 16 до 25 років)

У жінок другої вікової групи (26–39 років, рис. 4) вірус папіломи людини високого канцерогенного ризику виявлявся у вищих відсотках відносно першої вікової групи. 16-й тип складав (32,3%), а 31-й (22,6%) типи 35-й і 68-й не виявлені.

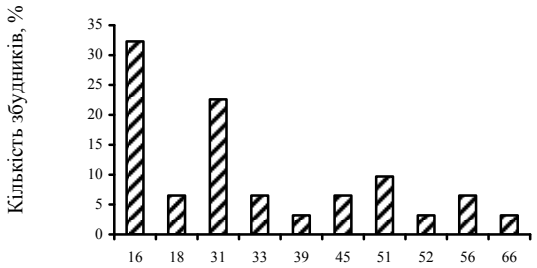


Рис. 4. Кількість різних типів вірусу папіломи людини (%) у другій віковій групі (26–39 років)

У жінок третьої вікової групи (40–58 років) найчастіше виділяли 56-й тип (42,9%), а також виділено 31, 39, 45, 68-й (14,2%) типи. Інших типів вірусу папіломи людини (16, 18, 33, 35, 51, 52-й високого та 11-й тип низького канцерогенного ризику) не виявлено. Це може бути пов'язано з поступовою елімінацією збудника з організму, що не викликало патологічних змін репродуктивного тракту жінок (рис. 5).

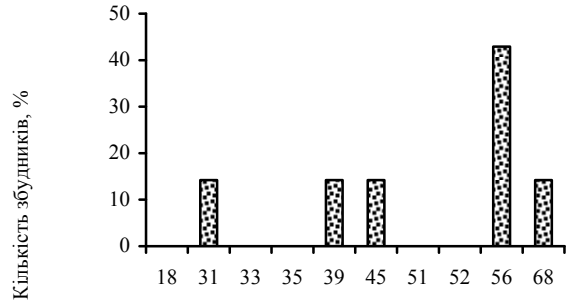


Рис. 5. Співвідношення (%) різних типів вірусу папіломи людини у третій віковій групі (40–58 років)

Обговорення

Порушення стану урогенітальної мікрофлори викликають багато факторів, які можна поділити на ендогенні та екзогенні. До ендогенних факторів відносять запальні захворювання яєчників, щитоподібної залози, захворювання шийки матки, перенесені раніше або супутні запальні захворювання сечостатевої системи, зниження імунологічної реакції організму, що викликають розвиток вірусних інфекцій. Екзогенні фактори – екологічні, санітарно-гігієнічні, клімато-географічні. Патологічні порушення складу урогенітального мікробоценозу відбуваються також за стресових впливів на макроорганізм: тривале застосування антибактеріальних препаратів, лікування гормонами цитостатиками, променева терапія, нервові потрясіння, використання внутрішньоматкових і оральних контрацептивів (Gupta et al., 2004).

Отже, за патологічного стану урогенітального тракту відбувається збільшення різноманіття піхвової мікробіоти у поєднанні зі зниженою чисельністю *Lactobacillus* spp., що, у свою чергу, спричиняє підвищення рівня умовно-патогенної мікробіоти та агентів вірусної природи. За даними Boldyrev et al. (2010), у жінок віком до 40 років кількість лактобацил склала 69%, у жінок вікової групи 40–50 років відмічене зниження кількості лактобацил до 39%. У жінок цієї вікової групи спостерігали перевищення кількості анаеробних бактерій відносно лактобацил удвічі. Potapov (2014) наводить фактори, за дії яких у піхві зменшується кількість лактобактерій і порушується мікробоценоз із ризиком розвитку бактеріального вагінозу, неспецифічного вагініту або вульвовагінального кандидозу.

Серед збудників інфекційно-запальних захворювань урогенітального тракту велику увагу фахівців привертають *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* і *M. genitalium*. Нині *M. genitalium* розглядається як абсолютний патоген, питання про значення *U. urealyticum* і *M. hominis* як збудників, які ініціюють розвиток патологічних процесів в урогенітальному тракті, залишається предметом дискусій. Дані про поширеність мікоуреаплазменної інфекції різні. Показники інфікованості населення репродуктивного віку коливаються, за даними низки авторів, у межах 4–50%.

Наші дані збігаються із дослідженнями Konoplyanko et al. (2015), які показують, що у понад 50% хворих виявляють хламідії: у 49,3% випадків – разом із гонококами, у 38,0% – із мікоплазмами, у 32,0% – із трихомонадами, у 25,2% – із вірусом герпесу. Трихомоніаз також найчастіше перебігає у поєднанні з мікоплазменною (47,3% випадків), гонококовою (29,1%), гарднерельозною (31,4%) та уреаплазмозною інфекцією (20,9% випадків).

За даними Goncharova et al. (2015), у разі патологічних ускладнень репродуктивного тракту жінок відмічається висока частота реєстрації вірусу папіломи людини високого канцерогенного ризику (51,4%), *Ureaplasma urealyticum* (28,2%), *Chlamydia trachomatis* (7,0%), *Trichomonas vaginalis* (3,5%), дріжджі роду *Candida* spp. (2,8%), *Mycoplasma hominis* (1,4%) та вірусу папіломи людини низького канцерогенного ризику (1,4%). Leli et al. (2017) показали частоту реєстрації *U. urealyticum* (31,5%) та *M. hominis* (2,5%) і також відзначили, що частота виявлення *M. hominis* у жінок, які пред'являли скарги, значно вища, ніж у тих, які не мали скарг.

Нині рак шийки матки – другий найпоширеніший вид раку у жінок. За даними de Sanjose et al. (2017), близько 5% усіх випадків раку у світі спричинено в основному вірусом папіломи людини високого канцерогенного ризику (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, і 59-й тип). Саме ці типи спричиняють інвазивний рак шийки матки та цервікальну інтраепітеліальну неоплазію. Folyak et al. (2010) дослідили співвідношення виявлення раку шийки матки та типування вірусу папіломи людини: виявили 17 типів вірусу папіломи людини високого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 і 82-й) та 7 низького канцерогенного ризику (6, 11, 42, 43, 61, 81 та 83-й). Нашим дослідженням також виявлено більшість цих типів вірусу, що корелює з їх дослідженнями. Tian et al. (2017) показали, що найпоширеніші генотипи вірусу папіломи людини – 6-й (11,8%), 16-й (11,2%), 11-й (10,8%), 51-й (7,0%) і 18-й (5,4%). Під час дослідження жінок виявляється принаймні один із 37 генотипів вірусу папіломи людини з високим канцерогенним ризиком, а також вірус папіломи людини з низьким ризиком. Дані Hafsa (2017) також показують, що найчастіше виявляють у жінок вірус папіломи людини 18-го (6,3%) та 16-го типів (4,2%). Jacome-Galarza et al. (2017) з'ясували, що найвищий рівень папіломовірусної інфекції виявлений у вікових групах жінок, молодших 25 та віком 25–34 роки. Під час проведення нашого дослідження найчастіше вірус папіломи людини виявлений у вікових групах 16–25 та 26–39 років, тому наші дані збігаються з результатами їх досліджень.

Таким чином, можна відмітити тенденцію до зростання поширеності інфекцій різної етіології репродуктивного тракту жінок і показати значимість даних досліджень для призначення схем етіотропного лікування та проведення профілактики зараження інфекціями, які передаються статевим шляхом.

Висновки

Проведено аналіз складу мікрофлори урогенітального тракту 175 жінок різних вікових категорій за допомогою методу полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу, який показав, що у жінок, молодших за 25 років, частота виявлення лактобацил становить 95%, співвідношення аеробних і анаеробних мікроорганізмів відповідає нормоцинозу, частота виділення анаеробних бактерій у всіх обстежених віком понад 40 років перевищувала рівень лактобацил (45%). У жінок із відсутністю об'єктивної та наявністю суб'єктивної клінічної симптоматики в усіх вікових групах умовно-патогенні мікроорганізми містилися майже в однаковому відсотковому співвідношенні. У високих титрах у жінок репродуктивного віку виявлено *Ureoplasma* (*urealiticum* + *parvum*) (>10^4, 31%) та *Candida* spp. (21%). У 8% жінок виявлено *Trichomonas vaginalis*, у 4% – *Mycoplasma hominis*, в 1% – *Chlamydia trachomatis* та у 2% – *Neisseria gonorrhoeae*.

Співвідношення агентів вірусної природи у жінок різних вікових категорій різниться. Серед усіх збудників патологічних станів репродуктивної системи жінок віком 16–25 років виділені віруси папіломи людини високого канцерогенного ризику типів 16 (18,4%), 31 (13,2%), 52 (10,5%), 18, 46, 66, 68 (по 7,9%), 35, 39, 51 (по 5,3%), 33 і 56 (по 2,0%), а також виділено вірус папіломи людини низького канцерогенного ризику 11 (2,6%). Найчастіше виділяли віруси папіломи людини високого канцерогенного ризику у жінок репродуктивного віку 16 (32,3%) і 31 (22,6%). Типи 35-й і 68-й не виявлені. З віком частота виявлення вірусу папіломи людини високого канцерогенного ризику різко знижується: найчастіше виділено 56-й тип (42,9%), інші типи вірусу папіломи людини (16, 18, 33, 35, 51, 52-й високого і 11-й тип низького канцерогенного ризику) не виявлено.

References

Aila, N. A., Tency, L., Claeys, G., Verstraelen, H., & Saerens, B. (2010). Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for

detection of group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. World Journal of Preventive Medicine, 3(1), 167–285.

Algeburi, A., Volsci, A., & Chicindas, M. L. (2015). Natural antimicrobials subtilosin and lauramide arginine ehyl esyer synergise with conventional antibiotics clindamycin Volsci, and metranidazole against biofilms of *Gardnerella vaginalis* but not against biofilms vaginal lactobacilli. Federation of European Microbiological Societies Pathogens and Disiase, 73(5), ftv018.

Balashov, S. V., Mordechai, E., Adelson, M. E., & Gygax, S. E. (2014). Identification, quantification and subtyping of *Gardnerella vaginalis* in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. Journal of Medical Microbiology, 63(2), 162–175.

Bansal, A., Singh, M. P., & Rai, B. (2016). Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. International Journal of Applied and Basic Medical Research, 6(2), 84–89.

Baron, C., Henry, M., Tamalet, C., Villeret, J., Richet, H., & Carcopino, X. (2015). Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. Journal of Medical Virology, 87(8), 1389–1396.

Bendas, V. V. (2011). Features of collection of material for laboratory diagnosis of candidiasis. Clinical and Experimental Pathology, 5(4), 125–129.

Chan, P. K. (2012). Human papillomavirus type 58: The unique role in cervical cancers in East Asia. Journal Cell and Bioscience, 2(1), 17.

Choe, H. S., Lee, D. S., Lee, S J., Hong, S. H., Park, D. C., Lee, M. K., Kim, T. H., & Cho, Y. H. (2013). Performance of Anyplex II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: Comparison with currently available methods. International Journal of Infectious Diseases, 7(12), 1134–1140.

Cox, C., Watt, A. P., McKenna, J. P., & Coyle, P. V. (2016). *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 35, 481–487.

Giraldo, P. C., Polpeta, N. C., & Juliato, C. R. (2012). Evaluation of sexual function in brazilian women with recurrent vulvovaginal candidiasis and localized provoked. Jurnal of Sexual Medicine, 9(3), 805–811.

Goncharova, S. Y., Golodoc, L. P., & Khlopov, A. V. (2015). Study of microflora the urogenital tract of women Dnepropetrovsky region using the method polymerase chain reaction. Biological Bulletin Melitopol State Pedagogical University named after Bogdan Khmelnitsky, 5(2), 75–84.

Goodman, A. (2015). HPV testing as a screen for cervical cancer. British Medical Journal, 350.

Haggerty, C. L., Totten, P. A., Tang, G., Astete, S. G., Ferris, M. J., Norori, J., Bass, D. C., Martin, D. H., Taylor, B. D., & Ness, R. B. (2016). Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. Sexually Transmitted Infections, 92(6), 441–446.

Hansen, D. S., Schumacher, H., & Hansen, F. (2012). Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) in danish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence, β-lactamase distribution, phylogroups, and coresistance. Scandinavian Jurnal of Infectious Diseases, 44(3), 174–181.

Holloway, D. (2011). Vaginal thrush: Treating and advising the patient. British Journal of Nursing, 20(22), 1410.

Jacome-Galarza, I., Ito-Nakashimada, M. A., Figueroa-Aguilar, G., García-Latorre, E., Salazar, M. A., López-Orduña, E., Camacho, A. D., Valdez-Alarcón, J. J., Hernández, J. M., & León-Avila, G. (2017). Prevalence of human papillomavirus in women from the State of Michoacan, Mexico, showed high frequency of unusual virus genotypes. Journal Revista de Investigacion Clinica, 69(5), 262–269.

Klebanoff, M. A., Schwebke, J. R., Zhang, J., Nansel, T. R., Yu, K. F., & Andrews, W. W. (2004). Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. Journal Ginecology and Obstetrics, 104(2), 267–272.

Leli, C., Mencacci, A., Latino, M. A., Clerici, P., Rassu, M., Perito, S., Castronari, R., Pistoni, E., Luciano, E., De Maria, D., Morazzoni, C., Pascarella, M., Bozza, S., & Sensini, A. (2017). Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. Journal of Microbiology Immunology and Infection, 17, in press.

Linhares, J. J., Cavalcante, P. G., & Vasconcelos, J. L. (2011). Prevalence of the colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women from a maternity in Ceará, Brazil, correlating with perinatal outcomes. Journal Ginecology and Obstetrics, 33(12), 395–400.

Louvanto, K., Rintala, M. A., Syrjänen, K. J., Grénman, S. E., & Syrjänen, S. M. (2010). Genotype-specific persistence of genital human papillomavirus (HPV) infections in women followed for 6 years in the Finnish Family HPV Study. Jurnal of Infection Diseases, 202(3), 436–444.

Mollers, M., Boot Hein, J., Vriend Henrike, J., King Audrey, J., van den Broek Ingrid, V. F., van Bergen Jan, E. A., Brink Antoinette, A. T., Wolffs Petra, F. G., Hoebe Christian, J. P., Meijer Chris, J. L., van der Sande Marianne, A. B., & de Melker Hester, E. (2013). Prevalence, incidence and persistence of genital HPV infections in a large cohort of sexually active young women in the Netherlands. Vaccine, 31(2), 394–401.

Nikulina, Y. Y., Sokolova, I. E., & Vinnikov, A. I. (2012). Immunological changes in pregnant women with impaired dysbiotic. Bulletin of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 3(1), 85–90.

Potapov, V. A. (2014). Probiotics in gynecology. A fad or perceived need (analytical review, part 2). Wturbota Proinku, 57, 70–74.

Price, M. J., Ades, A. E., De Angelis, D., Welton, N. J., Macleod, J., Soldan, K., Simms, I., Turner, K., & Horner, P. J. (2013). Risk of pelvicinflammatory disease following *Chlamydia trachomatis* infection: Analysis of prospective studies with a multistate model. American Jurnal of Epidemiology, 178, 484–492.

Rositch, A. F., Koshiol, J., Hudgens, M. G., Razzaghi, H., Backes, D. M., Pimenta, J. M., Franco, E. L., Poole, C., & Smith, J. S. (2013). Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: A literature review and meta-analysis. International Journal of Cancer, 133, 1271–1285.

Tian, T., Mijiti, P., Bingxue, H., Fadong, Z., Ainiwaer, A., Guoyao, S., Zhanlin, Z., Mahan, Y., Xiaoqin, T., Zheng, G., & Jianghong, D. (2017). Prevalence and risk factors of anal human papillomavirus infection among HIV-negative men who have sex with men in Urumqi city of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China. International Journal of Infectious Diseases, 12(11), e0187928.

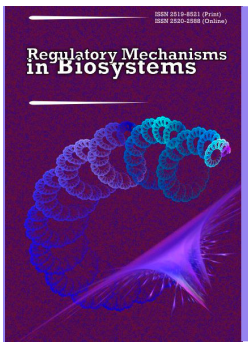
Winer, R. L., Xi, L. F., Shen, Z., Stern, J. E., Newman, L., Feng, Q., Hughes, J. P., & Koutsky, L. A. (2014). Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. International Journal of Cancer, 134, 1889–1898.

Woodford, N. F., Turton, J., & David, M. (2011). Multiresistant gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 35(5), 736–755.

Yoon, B., Romero, H. R., Lim, J. H., Shim, S. S., Hong, J. S., Shim, J. Y., & Jun, J. K. (2003). The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. American Journal Ginecology and Obstetrics, 189, 919–924.

Yoshida, T. S., Maeda, T., Deguchi, T., & Ishiko, H. (2003). Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. Jurnal of Clinical Microbiology, 4, 1850–1855.

Kaites, K. B., Katz, B., & Schelonka, R. L. (2005). Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. Jurnal of Clinical Microbiology, 18(4), 757–789.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 616–622
doi: 10.15421/021794

In vitro rhizogenesis of sugar beet microclones

V. V. Polishchuk*, L. M. Karpuk**, V. P. Mykolaiko***, A. A. Polishchuk*, I. I. Mykolaiko***

**Uman National University of Horticulture, Uman, Ukraine*
***Bila Tserkva National Agrarian University, BilaTserkva, Ukraine*
****Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University, Uman, Ukraine*

Article info

Received 30.09.2017
Received in revised form 26.10.2017
Accepted 29.10.2017

Uman National University of Horticulture, Instytutska str., 1, Uman, 20305, Ukraine.

Bila Tserkva National Agrarian University, Soborna sq., 8/1, BilaTserkva, 09100, Ukraine.

Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University, Sadova str., 2, Uman, 20300, Ukraine. Tel.: +38-050-858-74-54. E-mail: irinamikolaiko@i.ua

Polishchuk, V. V., Karpuk, L. M., Mykolaiko, V. P., Polishchuk, A. A., & Mykolaiko, I. I. (2017). In vitro rhizogenesis of sugar beet microclones. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 616–622. doi:10.15421/021794

The features of rhizogenesis of male-sterile simple hybrids, maternal components of sugar beet heterozosis hybrid and O-types of Darinka variety grown from seeds were investigated. The paper presents the results of studying the main basic nutrient media (B5–A1, B5–A2, B5–A3, B5–A4, B5–A5 and B5–A6) for rhizogenesis, in which the content of macro- and microelements has been reduced by three times, the content of sucrose is reduced by almost 6 times, the amount of agar is reduced by almost five times, while the vitamin PP content is increased by 1.6 times, and the BAP is completely removed. The largest number of rooted microclones was obtained with NAAs by the high indexes of average number of roots and medium indexes of average roots length. To the second, by the number of rooted microclones is assigned, media of 2,4–D, 2,4–DB containing, potassium salt of NAA and IBA were classified, while IAA was characterized by a lower efficiency. The possibilities of regulation of growth and development processes of sugar beet in vitro explants in favor of undifferentiated growth at the stage of proliferation or organogenesis (hemo- and rhizogenesis) have been determined. To improve the quality of rooting of sugar beet plants-regenerants, we have developed the method for dimming agarized nutrient medium with methylene blue at a 0.05% concentration, which made it possible to reduce the inhibitory effect of light on the development of lateral roots. The average index of micro-roots rooting for MS-forms was 81.5 %. The technology of adaptation of micro-roots rooting was developed, in which the plant material at the initial stage of growth had slight morphological changes in the puffer apparatus and stem, but by the end of the vegetation, the plants acquired the appearance characteristic of the donor plants of explants. The clone's resiliency is reached about 100% in the soil. According to the variability of morphological characteristics in reproduced in vitro sugar beet plants of the MS-forms of the Darynka hybrid, all the plants grown from the regenerants were more, than seed progeny from seed sowing of the same component obtained as a result of the attachment of sterility to the corresponding O-type. It has been found that in vitro cultivation has not weakened, and in some cases even increased the mitotic index of meristem cells of young roots of sugar beet. Most genotypes have reduced the number of pathological mitoses, apparently due to the activation of reparative systems, but did not extend the duration of individual phases of mitosis; without increasing the number of anaphase with bridges and fragments, but changed the number of anaphases with other chromosomal abnormalities. In all variants of the experiment, where activation of growth processes has been observed, the lowest variability of the signs is observed, that is, under the influence of stimulants, which are part of nutrient media, obviously there is unification of cell populations.

Keywords: auxins; cytokinins; ex vitro adaptation; micropropagation

Introduction

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is a plant of the Amaranthaceae family, one of the most important industrial crops in Ukraine which is the raw material base of the sugar industry, it is one of the main sugar-bearing plants. Biological features, a two-year cycle of development, a high level of heterozygosity and cross-pollination are complicating the process of new varieties of sugar beets obtaining by classical selection methods (Putnik-Delic et al., 2013; Yildizl et al., 2013, Kagami et al., 2016). One of the most promising ways to intensify the breeding process is the use of modern biotechnology methods that are used both for the propagation and preservation of valuable genotypes, and for the creation of new source materials of sugar beet with economically valuable features. For mass production of plants the method of clonal micropropagation is used, which provides a high reproductive rate, the selection of plants with selective and valuable features *in vitro* conditions, and the improvement from pathogens (Mishutkina and Gaponenko, 2006; Kolomiets, 2008; Krylovskaya, 2012). The basic principles of the method of microclonal propagation of sugar beet plants, as well as many other crops, have already been developed (Ritchieet al., 1989; Gurel et al., 2008; Neelwarne, 2013). It has been established that microclone propagation process, regardless of the type of explants, can be divided into four main stages: sterilization of plant material and introduction of explants into the nutrient medium; proliferation (rapid reproduction); hemo- and rhizogenesis (inducing the development of microparos and roots) and adaptation to non-sterile ex vitro conditions (Sullivan et al., 1993; Gurel and Wren, 1995; Kosenkoet al., 2008). This is possible in planar (agar) and suspension cultures, although agar cultures are preferable in seed breeding practice (Nagl et al., 2010; Rizkalla et al., 2012; Kosenkoet al., 2008). However, it should be noted that the published data are sometimes not fully supported with the introduction materials. The issues of explants' cultivation conditions need further development. The issues of optimization of nutrient media in terms of macro- and microsalts, vitamins, carbohydrates and phytohormones

(auxins, cytokinins and gibberellins) correlation at all stages of reproduction and on specific genotypes in particular require significant improvement (Wright and Penner, 1998; Zhang et al., 2001; Joersbo, 2007).

It is well known that during the formation and growth of roots a series of various interdependent biochemical, physiological and histological processes take place. The proximity of cells to the vascular tissue is among the anatomical factors that contribute to laying the root primordia. Vital capacity of in vitro rooted plants is largely conditioned by the place of the roots' laying. In some variants, even a sufficient number of *in vitro* rooted plants result in almost complete destruction of plants in non-sterile conditions. Three basic specific stages regarding nutrition and cultivation conditions are defined in the rooting process, namely: induction, initiation, roots growth. Under successful combination of the medium and conditions for rooting and bringing them in line with the plants genotype, the duration of the first two phases is 10–15 days (Kosenkoet al., 2008; Taski-Ajdukovic et al., 2012).

The previous experiments reveal that the decrease in light intensity accelerates the beginning of the roots' formation. We can assume that the light shortage generated specific protein receptors with high affinity for auxin and increased activity of peroxidase and IAA oxidase in the early stages of laying the roots in response to stressful conditions. Lack of oxygen in the nutrient media used for shoots rooting *in vitro* inhibits the development of root hairs as well. Insufficient development of root hairs is particularly dangerous during the test-tube adaptation of plants to non-sterile ex vitro conditions (Polischuk, 2012; Polischuk et al., 2012).

The goal of our work was to improve the *in vitro* methods for sugar beet crop. To achieve this goal, the following tasks had to be solved:

– to determine the optimum nutrient medium and cultivation conditions;

– to find out the possibilities of regulation of growth and development processes of sugar beet explants *in vitro*;

– to develop the technology of adaptation of rooted microclines.

Materials and methods

The objects of research were male-sterile simple hybrids, the maternal component of the heterozosis hybrid of sugar beet and O-types of the Darinka variety, which grown from seeds, pre-selected in thermal stress conditions (lowered germination temperature), are used as a provocative background for resistance to "blossom". The studies were conducted in several directions: the ability to callusogenesis in different explants, the intensity of regeneration and rooting of sugar beet regeneration plants in different variants of nutrient medium.

For the explants we used two-week sprouts, which were cut in a laminar box from a sterilized sprouted seed with a steamed scalpel at 180–200 °C and immediately transferred by sterilized (along with the scalpel) tweezers to the nutrient medium, that was prepared according to the Gamborg and Eveleg (B5) which was modified by sulfuric acid iron ($FeSO_4 \times 7H_2O$) – 27.8 mg/l with antioxidant Na2EDTA – 37.3 mg/l, and also additionally administered of Mio-inositol – 100 mg/l and an increased content of carbohydrate source up to 27 g/l of sucrose. In each of them we cut off the apex of shoots with cotyledons with 20–30 mm length. In each variant, in Petri dishes we planted 30 calluses in three replicates. Male sterile simple hybrids, maternal components of sugar beet heterosis hybrid and O-types were grown from the seeds, preselected in thermal stress condition (reduced germination temperature) used as a provocative background for resistance to "bolstering". The explants were harvested from seedlings obtained from the seed that had grown on "bolstering" resistant plants. For this purpose, these sterilized seedlings were placed into a sterile Petri dish and the shoot apex with cotyledons, 20–30 mm length was cut off with a sterile scalpel. Apex with cotyledons and hypocotyls top were carried into glass containers with B5 – 173 basic medium with 0.25 mg/l BAP. The first transplantation was performed in the third ten day period of December – 27 days after the introduction, and the subsequent subcultivation were conducted every 15 days, which provided a virtual opportunity to make 24 subcultivations a year. Microclones rooting started in the second ten day period of June after the 10th passage. Microclones that had reached about 2.0–2.5 cm height and had 1–2 leaves were put into sterile glass vessels (jars) into the medium for rhizogenesis, in which they were rooted under standard temperature of 25 °C and 16 hour photoperiod, but with reduced to 2.7 kiloluxes intensity lighting. However, three weeks after sugar beet cultivation in vitro the medium was replaced with a fresh one, but with the same composition. Accounting the rooted microclones and the number of roots on a microshoot, measuring the length of the newly formed roots were performed five weeks after the rooting.

However, we applied cytological methods of chemical components to determine the ploidy, since determining the ploidy using "Partec" analyser technology is relatively costly. At the initial stage the material was fixed at 0.03% o-xiquinoline solution for three hours at 2–4 °C. Then the objects were washed with distilled water and macerated for 25 minutes in a mixture of 96% alcohol, icy acetic acid and 25% hydrochloric acid at a ratio of 3.5 : 1 : 0.5. The next phase of work included washing the material with distilled water and its transfer to an object slide into a drop of 3% ossein, heating on a spirit lamp and covering the cover glass. We studied the cytogenetic parameters on permanent strangled preparations made from young roots of sugar beet by the standard method. The total number of the examined cells in each chemical, MI, the number of cells that divide and are in a certain phase of mitosis and PM were taken into account in the chemicals study. After that, we calculated MI (the ratio of the number of dividing cells and the total number of cells in the chemical), share prophase and PM.

Statistical processing of experimental data was carried out using the method (Fisher, 2006), using Statistical Software 6.0 from StatSoft.

Results and discussion

It is common knowledge that one of the main factors that influences the induction of rhizogenesis in in vitro crops is the composition of the nutrient medium (Mishutkina and Gaponenko, 2006; Ryabovol et al., 2012). The choice of the environment was largely due to the type of desired morphogenesis. In doing so, to achieve the positive results for each development phase, the genotype and the term of micropropagation can only be selected by selecting the appropriate optimum nutrient medium and the ratio of auxins and cytokinins in it. Often used in the crop of cells and tissues are the media which are based on the prescriptions of Gamborg and Eveleg, Linsmeier and Skoog, Murasig and Skoog, Heller, Shenk and Hildebrandt and White (Mishutkina and Gaponenko, 2006). All of them were developed and tested in the 1930s-1960s. Most other modern prescriptions of media are based on existing ones with variations in the content of individual components or the replacement of some of them with synthetic analogues. To stimulate rooting, they usually reduce the amount of sugar to 0.5–1.0% and eliminate the cytokinins completely, leaving only the auxins. Different sources of exogenous auxin are used as root stimulator, although rooting on the media without auxin is reported to be possible. IAA synthetic substitutes are mostly used instead of IAA since the latter destroys quickly. IAA is mainly replaced by NAA, IBA and potassium salt of the NAA which are easily soluble in water as well as in 2.4-D, 2.4-DB. In some cases they do not use the full concentration of salts, provided by the protocol, but only 0.25–0.50 of their content while preserving the correlation which concerns primarily the rhizogenesis process. High salt concentration delayed the roots formation *in vitro*, which caused the need to reduce their concentration (Mezei et al., 2006; Kosenkoet al., 2008).

As the result of the conducted research, the number of nutrient medium is modified on the basis of the Gamborg and Eveleg medium (B1–B200) analyzed, which made it possible to distinguish one of the most effective B5–173 (Table 1).

Six modifications to rooting medium (B5–A1, B5–A2, B5–A3, B5–A4, B5–A5 and B5–A6) remained after the reconnaissance testing in the experiment on MS microclones of maternal components of heterosis hybrids and O-types of sugar beets in the process of *in vitro* microclonal propagation. The content of macro- and micronutrients was three times reduced, sucrose content – almost six times reduced, and agar content – almost five times reduced in all the versions of the medium modification. Instead, vitamin PP content was 1.6 times increased and BAP was removed completely. B5–A2, B5–A3, B5–A4, B5–A5, B5–A6 media differed from the B5–A1 one only in the auxin forms

(2.4-D, 2.4-DB, NAA, NAA potassium salt and IBA) with the same amount of other components.

Table 1
Composition of sugar beets microclones rooting basic medium compared to the reproduction medium (mg/l)

Reproduction medium B5–173		Rooting medium B5–A1*	
$(NH_4)_2SO_4$	67.0	$(NH_4)_2SO_4$	22.3
KNO_3	1250.0	KNO_3	416.6
$MgSO_4 \times 7H_2O$	125.0	$MgSO_4 \times 7H_2O$	41.6
NaH_2PO_4	75.0	NaH_2PO_4	25.0
$CaCl_2 \times 2H_2O$	75.0	$CaCl_2 \times 2H_2O$	25.0
Fe-chelate $FeSO_4 \times 7H_2O$	27.8	Fe-chelate $FeSO_4 \times 7H_2O$	9.3
Na_2EDTA (trylon B)	37.3	Na_2EDTA (trylon B)	12.4
H_3BO_3	1.5	H_3BO_3	0.5
$MnSO_4 \times 4H_2O$	4.5	$MnSO_4 \times 4H_2O$	1.5
$ZnSO_4 \times 4H_2O$	1.5	$ZnSO_4 \times 4H_2O$	0.5
B_1	1.0	B_1	0.3
B_6	1.0	B_6	0.3
C	1.0	C	0.3
PP	1.0	PP	1.6
Glycine	1.0	Glycine	0.3
Myo-inositol	100.0	Myo-inositol	33.3
Agar	3000.0	Agar	700.0
Sucrose	2700.0	Sucrose	500.0
BAP	1.0	IAA	1.0

Note: B5–A2, B5–A3, B5–A4, B5–A5, B5–A6, media differed from the B5–A1 one only in the auxin forms (2.4-D, 2.4-DB, NAA, NAA potassium salt and IBA) with the same amount of other components; benzylaminopurine (BAP), indolyl-3-acetic acid (IAA), naphthylacetic acid (NAA), indolyl-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4-dichlorophenoxybutyric acid (2,4-DB), line of securing sterility (O-type), mitotic index (MI), pathological mitosis (PM).

Depending on the source of auxin, sugar beet microclones *in vitro* rooting was different. According to ANOVA dispersion analysis, auxin modified media can be divided into three groups by the number of rooted microclones. The largest number of rooted microclones was obtained under using NAA with high rates of the average number of roots and average figures for the average roots length. The second group, distinguished by the number of microclones rooted, comprised media with 2.4-D, 2.4-DB, potassium salt NAA and IBA, while IAA was characterized by lower efficiency (Table 2). In the variant with NAA clearly defined germs were visible on the 4th day and the first roots appeared on the 6th day. However, NAA began to inhibit the root system development under prolonged exposure (10–15 days). Similar, but less distinct phenomena were observed in the variants with other sources of auxin. Thus, according to the average number of roots per one in vitro plant three, the auxin modified media can be combined into three efficiency groups though the content is different. High average numbers of roots were in the variants with NAA and the IOA, the second rated was the medium with potassium salt NAA, while the media with IBA, 2.4-D and 2.4-DB were less efficient.

Table 2
Sugar beet microclones *in vitro* rooting depending on the auxin source (n = 3)

Rhizogenesis medium	Number of rooted microclones, %	Roots average number, pcs.	Roots average length, cm
B5–A1 – IAA	42.0	5.4	2.0
B5–A2 – 2.4-D	55.3	3.6	3.2
B5–A3 –2.4-DB	53.0	5.4	4.0
B5–A4 – NAA	65.2	16.1	3.4
B5–A5 – potassium salt NAA	57.1	11.3	2.7
B5–A6 – IBA	53.8	14.0	3.5
LSD_{05}	4.8	2.1	1.8

The difference in the media efficiency in terms of their influence on the average root length was almost completely levelled. However, it is the number of microclones rooted that is the critical performance characteristic of the given medium since the aim of the experiment was accelerated vegetative propagation *in vitro* in the unique sugar beets plant selected on provocative background, though the number of test-tube plants adopted to non-sterile *ex vitro* conditions able to grow to the size ensuring testes development, capable of flowering and producing seed if reproduced genotypes should be considered as well.

To improve the quality of sugar beet regenerant plants rooting, we developed a method of darkening the agar nutrient medium using methylene blue dye. The idea of darkening the medium was used in some fruit crops. Methylene blue dye at concentrations of 0.01% and 0.05% was added to B5–A6 with IBA medium (Fig. 1).

Variant 1
control (no dye)

Variant 2
dye concentration of 0.01%

Variant 3
dye concentration of 0.05%

Fig. 1. Test-tubed regenerant plants of sugar beets rooting room № 587 k 19 on medium B5–A6–IBA with the addition of methylene blue dye

The following variants were included into the scheme of the experiment on studying the effect of nutrient medium darkening on the process of rhizogenesis of sugar beet test-tubed regenerant plants. It was established that with the addition of dye, the methylene blue process of rooting proved the significantly better in all variants of the experiment. However, the best results of root formation were observed in the third variant test-tubed plants with adding methylene blue dye at a concentration of 0.05%, where the rhizogenesis was 78–85%. Pretty good performance was recorded in the second variant of the experiment with the concentration of the methylene blue dye 0.01%, where the root process was 66–70%. The methylene blue dye at the concentration of 0.05% colours nutrient medium more intensively, which, in our opinion, reduces the inhibitory effect of light on the development of lateral roots and increases the activity of IBA. The average rate of rooting microclones for MS-forms was 81.5%.

Carrying plants from *in vitro* conditions into *ex vitro* is an important and the most labour intensive final stage of microclonal reproduction (Kosenko et al., 2008; Tomaszewska-Sowa, 2012). The best time for transplanting is when plants have roots grown sufficiently to absorb mineral elements from the soil, and their young leaves are capable of productive photosynthesis. Root size for sugar beet plant adaptation in our experiment was 5–6 cm, and the lateral roots numbered 6–8 pieces. The plants' development phase made 2–4 leaves.

To carry plants from the medium conditions into natural conditions, it is necessary to acclimatize and adapt their material to the natural conditions of temperature, light and humidity. The adaptation process from *in vitro* to *ex vitro* conditions often is critical for plants survival. Different methods of adaptation are used, in particular: adaptation of test-tubed plants; plants intermediate rooting with the use of phytotrons. The first method involves the use of adaptational rooms equipped in a similar way to the cultural facilities where optimal conditions for plants growth gradually approach the natural environment to which the material will be transplanted. Two main factors should be taken into account in carrying out the adaptation: the anatomical and physiological ones, which are fundamentally different for plants grown under *in vitro* conditions. The first feature of the difference is the absence or reduced amount of cuticular wax, poor development of assimilating parenchyma and poor functioning of stomata apparatus. Another factor reflects the lowered photosynthesis capacity due to the cultivation on the media with carbohydrates source. In some cases, the roots of test-tubed plants have no root hairs. These features of regenerant plants cause their rapid dehydration on ex vitro transplantation from in vitro conditions, which causes the plants death.

The technology of adaptation of rooted microclones was developed, in which a mixture of perlite and sand was used as a substrate to which the necessary nutrients were introduced before planting. A mixture of perlite and sand was used for a substrate, with essential nutrients added before the transplanting of the plants . 25–30 kg of substrate with 1–2 g of nitrogen active substance, 2 g of phosphorus and 2 g of potassium was applied per three quarters of perlite and a quarter of sand. Also, a good air permeability and humidity – holding ability mix containing 2 parts of soil, 1 part of peat and 1 part of humus can be used for plants as they finish growing. To enhance plants taking roots, 2–3 cm layer of perlite was poured on the top of the mixture. Nutrient substrate height was 7–10 cm, with the area of plants nutrition of 5 × 5 cm. The substrate was watered with nutrient solution, which included growth regulators stimulating rhizogenesis. We tried to keep the temperature in the phytotron within 20–25 °C at 70–80% humidity and light period duration of 10 hours a day least. The plants planted into the substrate were covered with plastic wrap. Planting the plants into soil mix was performed by hand through making small holes and placing the roots vertically. Then we compacted the substrate around the plant, watering and covering it with film. 7–10 days later, when the plants had taken root and started growing, they were tempered. The film was removed for 10–15 minutes initially, then the time extended to 1–2 hours. 3–4 days afterwards the film was removed completely. The regenerated plants survival reached 87% under these conditions.

30–50 days later the plants formed well-developed aerial parts and a strong root system. At this time, the plants had a height of 10–15 cm and 6–10 leaves. These plants are suitable for transplantation into the field. In the second ten day period of May the regenerated plants were planted into open ground with a mandatory shading for two days, where they were regularly irrigated and cared for. Clones survival in the soil reached about 100%. The plant material at the initial stage of growth had minor morphological changes in the leaf apparatus and stem, but by the end of the growing season the plants acquired the shape typical for explanted donor plants.

It is considered that the variability observed in *in vitro* regenerated plants belongs to two categories: epigenetic variability in the form of short-term or long-term changes; genetic variability that arises from genomic, chromosomal and gene mutations (Miguel and Marum, 2011; Us-Camaset al., 2014). Genetic mutations are inherited and are often a manifestation of existing changes in the explants cells, though new mutations are possible too. Chromosomal abnormalities are one of the most important manifestations of these changes. Although the ploidy increase can occur during endopolyploid cell division of the source material, most polyploids and aneuploids occur during cultivation. These changes should be distinguished from the morphoses that are inherited from the effects of epigenetic changes which are often reversible and occur due to cultivation under *in vitro* conditions. It is also known that genetic changes in cells can be induced by auxin mutagenic action, especially by 2.4-D or cytokinins. However, changes that take place during somatic cells differentiation may be the most reliable source of genetic variability. When plant cells are cultivated *in vitro*, some cases of somaclonal variability i.e. different mutations, including ones with the changes in the chromosomes number, occur, resulting in loss of propagated microclones uniformity. The described changes can be both hereditary and non-hereditary (modification). Violation of correlative relationships and the fact that *in vitro* cell division occurs without genetically predetermined organism control that is carried out by endogenous phytohormones in an integrated plant account for somaclonal variability (Mezei et al., 2006; Penna et al., 2012). Chromosome variability of cells *in vitro* is among the best studied cytological disorders, like endomitosis and endoreduplication whicht causes polytene chromosomes formation, which are formed due to repeated DNA synthesis without further nucleus and cells fission (Carvalheira, 2000). Therefore, cytometric monitoring is carried out to choose appropriate medium (Pasqual et al., 2012). Reduced number of unwanted mutations and non-hereditary changes can be achieved by adjusting the concentration of exogenous phytohormones introduced in the nutrient medium instead of those regulating normal cell division *in vivo*. The purpose of our research was to select a nutrient medium in which the possibility of unintended spontaneous somaclonal variability would be reduced to a minimum. For marker signs monitoring somaclonal variability, the following were chosen: chromosomal aberrations and ploidity change, roots form, the degree of root crops absorption into soil, forms of leaf blades and rosettes shape.

We found that all the studied plants grown from regenerants were more uniform by the variability of morphological characteristics in the *in vitro* reproduced plants of sugar beet MS-forms of Daryna hybrid than the seed offspring obtained from the sowing the seeds of that very component obtained by fixing the sterility with appropriate corresponding O-type. In particular, changes in leaf rosettes were observed only in the seed offspring and in the variant with the B5–A3–2.4 DB medium with the same changes frequency of 1.1 ± 0.1%. Variations in the leaf plates morphology did not exceed 1.1 ± 0.1 in B5–A2–2.4-D variant under the lowest rate of 0.5 ± 0.1 in B5–A3–2.4-DB and B5–A5 – potassium salt NAA in seed control variability of 0.9 ± 0.2%. Similar effects were observed in roots absorption into soil and the number of atypical roots as well. The total amount of *in vitro* grown plants of MS-forms of sugar beet hybrid Daryna with morphological mutations in all versions of the experiment was less than that in the seed control (Table 3).

That can account for the influence of sterility fixative pollen, which obviously was not 100% analogous, and thus it could cause some allelic or interallelic interactions which cannot prevent high quality seeds production. That is, no morphological mutation characteristics are observed in Daryna hybrid component reproduction with biotech element inclusion as compared to conventional breeding using O-type fixing sterility

agents. The variability of the genome of all plants in general and variability of specific tissues and cells is considered to be a fundamental property of organisms. The rapid development of modern biotechnology revealed a number of facts on obtaining numerous various unpredictable changes brought out in the *in vitro* cultured cells. Genome endoreduplication is one of these changes.

Table 3
Variability of morphological characteristics of sugar beet plants in vitro grown (n = 3)

Medium	Number of regenerated plants with modified morphology, %				Total amount of regenerated plants with modified morphology, %
	leaf blades	leaf rosettes	root plants absorption	atypical root plants	
Seed (control)	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.1	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.3	4.9 ± 0.3
B5–A1–IAA	0.8 ± 0.2	–	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2
B5–A2 –2.4-D	1.1 ± 0.1	–	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	3.3 ± 0.3
B5–A3–2.4-DB	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2	3.5 ± 0.2
B5— NAA	0.6 ± 0.2	–	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1
B5–A5–potassium salt NAA	0.5 ± 0.1	–	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.8 ± 0.2
B5–A6–IBA	0.6 ± 0.1	–	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2	3.0 ± 0.2

Studying the chromosomal mutations in cultivating sugar beet *in vitro* is a sophisticated task. The reason is that sugar beet (diploid set 2H = 18) chromosomes are poorly identified because of their small size and morphology similarity (Pillen et al., 1992; Beyaz et al., 2013). That is why cytometric control is mostly limited to establishing ploidy level and chromosomal aberrations. Cells with unbalanced number of chromosomes in the callusogenesis may arise in connection with indirect division in the callusogenesis (Dhooghe et al., 2011; Pasqual et al., 2012). Scientists of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet of National Academy of Agrarian Sciences have developed a method that allows the analysis to be performed of genome ploidy level variability of initial breeding materials of sugar beet with "Partec" ploidyanalyzer technology. However, we applied cytological methods of chemical components to determine the ploidy, since determining the ploidy using "Partec" analyser technology is relatively expensive (Trush et al., 2015).

In the variants where a bud was taken for the explants, *in vitro* proliferation was the most successful. Practically no chromosomal aberrations were observed in the test-tubed plants (Fig. 2). Spontaneous endoreduplication was observed within 0.25–0.47% under sugar beet cultivation in the media with ethylene and NAA, and in the absence of kinetin it amounted to 1.23% in some variants. Instead, there are papers (Sliwinska and Lukaszewska, 2005) which point out endoreduplication in cotyledons and leaves cells. Based on the idea that one of the key biochemical mechanisms of mitosis is a nucleic exchange, the different levels of hormones in plants grown *in vitro* compared to the control seeds had to affect the cells mitotic activity, which prompted us to study this issue.

Some cytogenetic characteristics of cells meristem of sugar beet young roots were obtained in the course of studying *in vitro* propagated sprouted seeds of MS-forms of Daryna hybrid pre-selected at low temperatures from sugar beet plants. That is, we studied the roots of sprouted seeds obtained by pollination of *in vitro* flower reproduced plant pollen with respective O-types pollen. The same MS-forms seed obtained in the traditional way were used for the control. It was found out that *in vitro* cultivation did not weaken and in some cases even increased the mitotic index of meristem cells of young sugar beet roots. In most of the genotypes the cultivation reduced the number of pathological mitosis, probably due to activation of repair systems, though it violated the duration of individual mitosis phases; it did not increase the number of anaphases with bridges and fragments, but changed the number of anaphases with other chromosomal abnormalities. In all the variants of the experiment where the growth process activation was noted, the lowest signs of variability was observed, i.e., cell populations unification obviously took place under the influence of stimulants that were parts of the nutrient media (Table 4).

Table 4
Cytometric parameters of sugar beet young roots (R1) (n = 3)

Genotypes	Mitotic index, %	Pathological mitosis, %	Cells number by mitosis stages, %			
			prophase	anaphase	metaphase	telophase
Seed control	3.9 ± 0.4	0.3 ± 0.1	50.0 ± 1.8	27.6 ± 2.1	11.9 ± 1.7	10.5 ± 0.8
585 k 3	3.3 ± 0.5	0.1 ± 0.1	47.3 ± 2.9	24.5 ± 0.9	14.0 ± 1.5	14.2 ± 1.7
585 k 10	3.5 ± 0.3	0.6 ± 0.2	47.2 ± 0.9	30.7 ± 1.5	12.7 ± 0.7	9.4 ± 1.2
587 k 19	3.5 ± 0.5	0.4 ± 0.3	45.0 ± 2.4	30.3 ± 1.6	14.4 ± 1.6	10.3 ± 1.6
593 k 11	5.5 ± 0.4	0.7 ± 0.6	55.2 ± 2.4	22.6 ± 2.0	11.2 ± 1.3	11.0 ± 0.9
597 k 13	3.0 ± 0.2	0.9 ± 0.4	53.3 ± 1.5	26.3 ± 0.8	10.0 ± 1.9	10.4 ± 1.2
599 k 16	3.9 ± 0.5	0.3 ± 0.1	49.5 ± 1.9	29.2 ± 1.6	13.0 ± 0.8	8.3 ± 1.4
621 k 14	3.6 ± 0.4	0.8 ± 0.3	50.3 ± 1.7	14.8 ± 0.5	19.6 ± 1.6	15.3 ± 0.6
585 k 3	4.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	46.5 ± 1.9	32.2 ± 1.6	13.0 ± 0.8	8.3 ± 1.4
585 k 10	4.8 ± 0.2	0.4 ± 0.1	50.2 ± 2.0	29.6 ± 1.5	11.2 ± 1.8	9.0 ± 0.3
585 k 10	3.9 ± 0.5	0.6 ± 0.4	47.1 ± 03	27.4 ± 0.7	15.2 ± 1.2	10.3 ± 0.9
589 k 19	3.1 ± 0.4	0.1 ± 0.1	48.6 ± 0.6	26.8 ± 0.7	14.6 ± 1.9	10.0 ± 0.9
597 k 13	5.3 ± 0.3	0.8 ± 0.4	57.2 ± 2.0	29.6 ± 1.5	7.2 ± 0.7	6.0 ± 0.2
597 k 17	3.6 ± 0.5	0.6 ± 0.2	48.0 ± 0.8	32.1 ± 2.2	11.4 ± 1.1	8.5 ± 0.3
613 k 19	4.8 ± 0.1	0.6 ± 0.3	52.2 ± 0.3	24.6 ± 0.6	13.2 ± 1.8	10.0 ± 0.7
617 k 6	4.1 ± 0.3	0.6 ± 0.2	50.2 ± 1.8	20.6 ± 0.9	16.2 ± 0.4	13.0 ± 1.1
583 k 7	3.3 ± 0.5	0.2 ± 0.1	42.7 ± 0.3	29.1 ± 1.6	16.0 ± 1.2	12.2 ± 0.4
617 k 6	3.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	48.4 ± 2.9	26.5 ± 0.9	14.0 ± 1.5	11.1 ± 1.7
617 k 19	6.1 ± 0.4	0.7 ± 0.2	58.2 ± 2.6	18.6 ± 1.8	12.2 ± 1.1	11.0 ± 0.4

Therefore, it seems logical to assume that the increase in somaclonal variability *in vitro*, described primarily for *in vitro* genotypes lodging, can result from the influence of retardants used in the lodged cultures. As the subsequent observations reveal, microcloning does not increase the number of chromosomal aberrations and minor deviations in setting up the bridges, fragments and micronuclei do not exceed the limits of the experiments precision. The reasons for such stability have not been clarified, as it is also not clear whether the observed chromosomal aberrations cultured *in vitro* differ qualitatively. Manifestations of some of them already in the early stages of cell division suggests that the lack of clear rules is mainly the result of the stabilization of intracellular hormonal environment in its preparation for the separation, i.e. in the pre-start phase of the cell cycle (in interphase).

Conclusions

According to the data of the dispersion analysis, the modified media by auxins can be grouped into three groups of effectiveness by the

number of rooted microcloons. The first is attributed to the NOC, to the second – media with 2,4-D, 2,4-DB, potassium salt NAA and IBA, to the third – IAA. For subcultivation of inoculated seedlings which are cultivated *in vitro*, the nutrient medium B5–173 was found to be the best of the studied media, in which in conditions of excellent sterilization, microcrotones of sugar beets rooted better.

Fig. 2. Normal diploid chromosomal complement in the test-tubed plant regenerants of sugar beet number 585 k 10 grown in the field after *ex vitro* adaptation

The possibility of regulation of the growth and development of sugar beet explants *in vitro* in favour of undifferentiated growth during proliferation or organogenesis (hemo- and rhizogenesis) in the stage of the formation of roots or shoots has been found. The study confirmed the benefits of rooting the regenerant plants of sugar beet according to our method of darkening the agar culture medium using dye methylene blue at a concentration of 0.05% and owing to reducing the inhibitory light impact on the development of lateral roots, the average rooting in the microclones of MS-form reached 81.5%. The technology of the rooted microclones adaptation ensuring survival of plant-regenerants to 87% has been developed. The tasks of accelerated sugar beet *in vitro* breeding from fresh harvested seed in the adverse off-season period with prevention of somaclonal mutation has been completed and thus, obtaining genetically homogeneous maternal MS-forms of Daryna heterosis hybrid can be guaranteed.

This study is partly based on the work supported by the Uman National University of Horticulture (No 0111U005405) in compliance with their thematic plans of research work. We thank Professor Anatoly I. Opalko, PhD in Agriculture, leading researcher of the Genetics, Plant breeding and Reproductive Biology Division of the National Dendrological Park "Sofiyivka" of the National Academy of Sciences of Ukraine for consultations and discussion.

References

Beyaz, R., Alizadeh, B., Gürel, S., Özcan, S. F., & Yildiz, M. (2013). Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) growth at different ploidy levels. Caryologia, 66(1), 90–95.

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104(3), 359–373.

Gürel, E., & Wren, M. J. (1995). *In vitro* development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L). Rhizogenesis and the effect of sequential exposure to auxin and cytokinin. Annals of Botany, 75(1), 31–38.

Gurel, E., Gurel, S., & Lemaux, P. G. (2008). Biotechnology applications for sugar beet. Critical Reviews in Plant Sciences, 27(2), 108–140.

Joersbo, M. (2007). Sugar beet. In: Pua, E. C., & Davey, M. R. (Eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transgenic Crops, Springer-Verlag, Berlin, 59, 355–378.

Kagami, H., Taguchi, K., Arakawa, T., Kuroda, Y., Tamagake, H., & Kubo, T. (2016). Efficient callus formation and plant regeneration are heritable characters in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Hereditas, 153(1), 12.

Klyachenko, O. L., Lichanov, A. F., & Krylovskaya, S. A. (2012). Cell regulation of morphogenic processes in the callus tissues of sugar beet *in vitro* conditions. Bulletin of Agrarian Science, 12, 48–50 (in Ukrainian).

Kolomiets, Y. V. (2008). Clonal microprosthetics of sugar beet *in vitro*: possibilities for reproduction and preservation of biological diversity. Scientific Support of NAU, 1(9), 1–14.

Kosenko, I. S., Opalko, A. I., & Nebykov, M. V. (2008). Regeneration of plants in the process of micropropagation. Autochthonous and Alien Plants, 3–4, 57–67 (in Ukrainian).

Krylovskaya, S. A. (2012). Features of *in vitro* sugar beet morphogenesis (*Beta vulgaris* L.). Collection of scientific works of Institute of Bioenergetic Cultures and Sugar Beets, 14, 461–465 (in Ukrainian).

Mezei, S., Kovacev, L., & Nagl, N. (2006). Sugar beet micropropagation. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 20, 9–14.

Miguel, C., & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: Somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany, 62(11), 3713–3725.

Mishutkina, Y. V., & Gaponenko, A. K. (2006). Study of the influence of nutrient medium composition, explant type and genotype on the frequency of regeneration of sugar beet plants (*Beta vulgaris* L.) *in vitro*. Genetics, 42(2), 210–218 (in Ukrainian).

Mishutkina, Y. V., & Gaponenko, A. K. (2006). Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) morphogenesis *in vitro*: Effects of phytohormone type and concentration in the culture medium, type of explants, and plant genotype on shoot regeneration frequency. Russian Journal of Genetics, 42(2), 150–157.

Nagl, N., Maksimovic, I., Curcic, Z., Putnik-Delic, M., & Kovacev, L. (2010). Effect of induced water deficit on sugar beet micropropagation. In: Proceedings of 72nd IIRB Congress. (22th–24th Jun, 2010, Copenhagen, Denmark). International Institute for Beet Research (IIRB), Bruxelles, Belgium. pp. 179–185.

Neelwarne, B. (2013). Cell and tissue culture studies in *Beta vulgaris* L. In: Neelwarne, B. (Ed.). Red beet biotechnology. Springer Science + Business Media, New York, pp. 175–198.

Pasqual, M., Pio, L. A. S., Oliveira, A. C. L., & Soares, J. D. R. (2012). Flow cytometry applied in tissue culture. Leva, A., & Rinaldi, L. M. R. (Eds.): Recent advances in plant *in vitro* culture (Ch. 6), In Tech Prepress, Novi Sad, pp. 109–122.

Penna, S., Vitthal, S. B., & Yadav, P. V. (2012). *In vitro* mutagenesis and selection in plant tissue cultures and their prospects for crop improvement. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability: Global Science Books, 6(1), 6–14.

Pillen, K., Steinrücken, G.,Wricke, G., Herrmann, R. G., & Jung, C. (1992). A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics, 84(1), 129–135.

Polischuk, V. V., Polischuk, O. V., & Karpuk, L. M. (2012). Selection of nutrient medium for sugar beet cms component introduction and proliferation. Autochthonous and Introduced Plants of Ukraine, 8, 123–128 (in Ukrainian).

Polishchuk, V. (2012). Seedlings sterilisation of parental forms of sugar beets hybrids for input in vitro. Agrobiology, 9, 45–48 (in Ukrainian).

Putnik-Delic, M., Maksimovic, I., Venezia, A., & Nagl, N. (2013). Free proline accumulation in young sugar beet plants and in tissue culture explants under water deficiency as tools for assessment of drought tolerance. Romanian Agricultural Research, 30, 141–148.

Ritchie, G. A, Short, K. C., & Davey, M. R. (1989). *In vitro* shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of Experimental Botany, 40, 277–283.

Rizkalla, A. A., Badr-Elden, A. M., Ottai, M. E. S., Nasr, M. I., & Esmail, M. N. (2012). Development of artificial seed technology and preservation in sugar beet. Sugar Tech, 14(3), 312–320.

Ryabovol, L. O. Ryabovol, Y. S., & Lyubchenko, A. I. (2012). Nutrient medium for rooting homozygous material of sugar beet. Collection of scientific works of Uman National University of Horticulture, 81(1), 196–199.

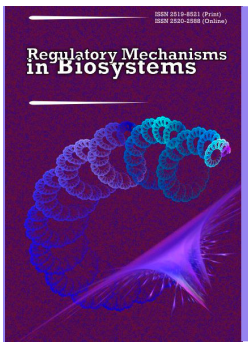
Sullivan, C. F., Finch, I., Dix, P. J., & Burke, J. I. (1993). Studies of *in vitro* propagation systems for sugar beet. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 32, 27–35.

Taski-Ajdukovic, K., Nagl, N., Kovacev, L., Curcic, Z., & Danojevic, D. (2012). Development and application of qRT-PCR for sugar beet gene expression analysis in response to *in vitro* induced water deficit. Electronic Journal of Biotechnology, 15(6), 10.

Tomaszewska-Sowa, M. (2012). Effect of growth regulators and other components of culture medium on morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in unfertilised ovule *in vitro* cultures. Acta Agrobotanica, 65(4), 91–100.

Trush, A. O., Perfenyuk, S. G., & Tatarchuk, V. M. (2015). The efficiency of different methods of cytological control of the ployidity of multi-growth tetraploid plasters of sugar beet in the selection of triploid hybrids on the basis

of the CMF. Collection of Scientific Works of Uman National University of Horticulture, 87(1), 176–182 (in Ukrainian).
Us-Camas, R., Rivera-Solís, G., Duarte-Aké, F., & De-la-Pena, C. (2014). *In vitro* culture: An epigenetic challenge for plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 118(2), 187–201.
Wright, T. R., & Penner, D. (1998). Cell selection and inheritance of imidazolinone resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*). Theoretical and Applied Genetics, 96(5), 612–620.
Yildiz, M., Alizadeh, B., & Beyaz, R. (2013). *In vitro* explant growth and shoot regeneration from petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines at different ploidy levels. Journal of Sugar Beet Research, 50, 22–36.
Zhang, C. L., Chen, D. F., Elliott, M. C., & Slater, A. (2001). Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 37(2), 305–310.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 623–627
doi: 10.15421/021795

Acid resistance and population structure of erythrocytes in trotter horses during and after exercise

V. I. Golovakha*, O. V. Piddubnyak*, S. V. Sliusarenko*, L. G. Slivinska**, I. A. Maksymovych**, A. R. Shcherbatyy**, B. V. Gutyj**

**Bila Tserkva National Agrarian University, Ukraine*
***Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine*

Article info

Received 12.09.2017
Received in revised form 21.10.2017
Accepted 25.10.2017

Bila Tserkva National Agrarian University, Pl. Soborna, 8/1, Bila Tserkva, 09117, Ukraine. Tel. +38-067-693-17-73.

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine. Tel.: +38-097-290-41-51. E-mail: maksymovych@lvet.edu.ua

Golovakha, V. I., Piddubnyak, O. V., Sliusarenko, S. V., Slivinska, L. G., Maksymovych, I. A., Shcherbatyy, A. R., & Gutyj, B. V. (2017). Acid resistance and population structure of erythrocytes in trotter horses during and after exercise. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 623–627. doi:10.15421/021795

Regular physical exercise improves the cardiovascular system function, increases energy metabolism and antioxidant protection, provides greater muscle strength and physical endurance. However, exhaustive physical exercise can cause oxidative stress. During intense physical exercise, erythrocytes become more vulnerable to oxidative damage due to action of active oxygen forms, high concentration of polyunsaturated fatty acids. Physical loading of horses is accompanied by the development of tissue hypoxia, so one needs to study in detail changes of hematopoiesis indices, responsible for providing oxygen to tissues. When monitoring animal health, blood tests will detect a disease in early stages, because blood is a sensitive indicator of metabolic disorders, both of physiological and pathological body conditions. The purpose of present study was to examine changes of some hematopoiesis indicators (RBC, Hb, HCT, MCV, MCH), acid resistance of erythrocytesand population structure in trotting horses due to workloads of 1,600 m trot races (at rest, after race, after 90 min). In total, 20 clinically healthy horses of Orlovska and Russian trotting breeds, aged 2–3 years, were used in the study. The experimental animals included 5 mares, 15 stallions. All horses had active training. The horses were divided into two groups. The first animal group included animals that showed high results (2 min 04 s – 2 min 21 s); the second had trotters that covered the distance with worse time (2 min 28 s – 2 min 41 s). The erythrocyte couint in the leader horses after the loading increased, in the outsider horses it fell. After rest the leader horses' erythrocytes returned to their original values, in the outsider horses they did not change. The outsider horses' hemoglobin level after loading was lower than in the leader horses. The leader horses had higher hemoglobin content after rest (by 11.0% as compared with the values before the loading). The outsider horses had lower hemoglobin content. The leader horses hematocrit value increased, in the outsider horses – decreased. The leader horses' MCV after the loading was reduced, however after rest it recovered. The outsider horses showed MSV increase during the whole study period. The MCH in the leader horses did not change over the entire research period, in the outsider horses – it increased. The animals that showed better results, had an increasing number of "mature" and "old" erythrocytes due to their elimination from the depot. However, the outsider animals had an increasing number of "young" erythrocytes, resistant to hemolysis, but they were not able to provide tissues with needed oxygen.

Keywords: hematological parameters, performance, hemoglobin, hemolysis, mares, stallions

Introduction

Pedigree horse breeding has become prestigious in recent years, they are mainly used in sports. Horse riding is an active recreation for people, but also a challenge for these "noble" animals. Their loading must relate to a rigid training system. Racetrack training should include gradual loading, exercising endurance and consideration for the physical abilities of the horrse (Bulgakov, 2002). Trotting horses are prominent among the breeds, used in sports. They are characterized by the sports features of agility and endurance. All these elements depend on the course of metabolic processes, regulated by the hematopoietic system, because the health and performance of sport horses depend on its functional state. Operating performance of sport horses is determined by many biological and physiological factors. Understanding the interrelation of these factors is required to ensure effective training and achieving sound sport results. In equine sport medicine studies have been conducted to determine some hematological parameters and reliable criteria to evaluate horse performance during exercise and physical load (Hinchcliff et al., 2004). Knowledge of the functional and metabolic processes occurring in a particular sport discipline is extremely important for understanding what metabolic paths are involved, and which physiological processes are induced during various physical activities (Bergero et al., 2005). It has been proved that horses undergo changes between the balance of oxidant and antioxidant systems, depending on the exercise type, its intensity and duration, training condition, environmental conditions, and presence of diseases (Kirschvink et al., 2006; Williams and Bur, 2012).

During intensive exercising, erythrocytes become more vulnerable to oxidative damage due to performance of active oxygen forms, high concentration of polyunsaturated fatty acids and haemoferrum (Petibois and Deleris, 2005; Çimen, 2008). Physical loading of horses is accompanied by the development of tissue hypoxia, so one needs to study in detail changes of hematopoiesis indices, responsible for providing oxygen to tissues. When monitoring animal health, blood tests will detect a

disease in the early stages, because blood is a sensitive indicator of metabolic disorders, both physiological and pathological body conditions (Andriichuk et al., 2014). Some hematological adaptation mechanisms are necessary to ensure oxygen and substrates supply, coming from the blood to the working muscles and releasing metabolites during training. Low efficiency of these mechanisms limits the physical performance of horses (Muñoz et al., 1997; Piccione et al., 2007). During physical loading some physiological changes happen in the horse's body, such as increased cardiac output, increased pulmonary arterial pressure, and blood flow is optimized by erythrocytes and hemoglobin (Terskov and Hitelzon, 1967).

The aim of this study was to examine the changes of erythrocytes' acid resistance and erythrocytes' population in trotting horses due to workloads of 1,600 m trot races (at rest, after race, after 90 min).

Materials and methods

There were used in total 20 clinically healthy horses of Orlovska and Russian trotter breeds, aged 2–3 years for this study. The experimental animals included 5 mares, 15 stallions. The horses' body weight averaged 509.8 ± 10.45 kg (450–581 kg). All horses had active training. All horses were studied for blood count and basic biochemical parameters, characterizing the functional state of organs and systems that were within the reference fluctuation. The mares were not pregnant. All horses were vaccinated and dehelmintizated, kept in the same conditions. All horses at the time of study were clinically healthy.

The horses' daily diet included: meadow hay (6 kg), oats (6 kg), wheat bran (2 kg), carrots (1 kg), and was divided into three portions. Salt and water were available without restriction. The study was conducted during trot races (with maximum trotter load of 1,600 m distance) The horses were divided into two groups. The first animal group (group A – 2 mares, 8 stallions; successfully completed, SC) included animals that showed high results (2 min 04 s – 2 min 21 s); the second (group B – 3 mares, 7 stallions; which had not successfully completed, nSC) had trotters that covered the distance with worse time (2 min 28 s – 2 min 41 s). The study was conducted at rest, after races and after 90 min.

Blood samples were taken from the jugular vein using a 16-gauge needle in to the vacuum blood tubes, 10 ml (Vacutest, Italy). Tubes of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used to study the blood hematology. The blood hematology was analyzed by an automated hematology analyzer Mythic 18 (Orphee S. A., Switzerland) and the PZ Cormay S. A. (Poland) reagents. The red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (Hb) and mean cell volume (MCV) were measured directly; packet cell volume (PCV) and mean cell hemoglobin (MCH) were calculated automatically.

Acid resistance of erythrocytes was determined by the method of A. I. Terskyi and I. I. Hitelzon. Blood samples were placed into centrifuge tubes, with previously added heparin at 10 IU per 10 ml of blood. Plasma was separated by centrifugation (1500 g/min for 20 min). The erythrocytes' suspension was washed three times by cooled to 4 ºC (to prevent lipoproteins oxidation) 0.85% solution of sodium chloride followed by centrifugation under the same conditions. The suspension of erythrocytes was taken by capillary (0.02) and transferred to test tubes, which already contained 10 ml of isotonic sodium chloride solution. The capillary was washed in the upper layer of the solution and the tube contents were thoroughly mixed. Thus 0.2% suspension of erythrocytes was received.

Measurement of solutions optical density was carried by a photometer at 540 nm wavelength (cuvettes with 10 mm process solution thickness). Before the study, both cuvettes were filled for 5–10 min with hemolytic solution with the abovementioned concentration. The control cuvette was filled with 4 ml of 0.85% sodium chloride, and the experimental one was filled with 2 ml of hemolytic solution and added 2 ml of 0.2% erythrocytes suspension. The hemolytic with erythrocytes suspension was stirred by the tip of the pipette . The sample extinction was determined immediately after mixing. Extinction changes were recorded every 30 seconds until a constant indicator is reached (during 30 s).

The difference between the initial and final (after hemolysis) optical density is seen as 100% and the ΔE percentage was calculated (the next extinction index was subtracted from the previous one and seen as "X"), which reflects the relative percentage of non-hemolyzed erythrocytes every 30 s. This calculation excludes dependence of the results on the number of erythrocytes and hemoglobin concentration. The obtained data was depicted graphically. The horizontal axis reflects time from 0 and every 30 s, the ordinate axis – the erythrocytes hemolysis percentage. The left side of the diagram indicates hemolysis of "old" erythrocytes populations, the central part with peak is formed by the destruction of "mature" and partially "young" cells, the right side is the hemolysis result of only "young" erythrocytes (Terskov and Hitelzon, 1967).

Erythrocytes population structure was determined by fractionation of sucrose density gradient by I. Sizova method.

Blood samples were put into centrifuge tubes, with previously added heparin at 10 IU per 10 ml of blood. Plasma was separated by centrifugation (1500 g/20 min). The erythrocytes suspension was washed three times by cooled to 4 ºC (to prevent oxidation of lipoproteins) 0.85% sodium chloride solution followed by centrifugation under the same conditions.

The erythrocytes suspension was taken by a 0.1 ml pipette and moved to Florinski test tubes, previously filled with 0.9 ml of isotonic sodium chloride solution. The pipette was washed in the upper layer of the solution and the tube contents was thoroughly mixed (thus obtaining 10% erythrocytes suspension). 0.5 ml of erythrocytes suspension was introduced into the 45o tilted column, and sucrose solution was put layer over layer on the column wall (the first layer – with the highest concentration, the last – with the lowest). This provides the distribution of erythrocytes in different concentrations of sucrose, depending on the erythrocytes' age.

The column was carefully leveled at 90o to avoid mixing of the sucrose layers, and every last layer was carefully separated into a separate graded tube (7 in total). Isotonic sodium chloride solution was added into each tube, totaling volume to 10 ml. All 7 tubes were thoroughly mixed and checked for the optical density.

Measurement of the solutions' optical density was carried by a photometer at 520 nm wavelength (cuvettes with 10 mm working layer thickness). A 0.85% sodium chloride solution was a control one. The received extinction amount was seen as 100%, and each tube index was seen as "X" and thus calculating the percentage of a particular faction. The indicators of the first three tests (in sucrose solutions of 30%, 26% and 22% concentrations) were added. The obtained result was a percentage indicator of the "old" erythrocytes number. The same was done with the fourth and fifth indicators (18% and 14% solutions), by calculating the concentration of "mature" cells, while adding percentage of the sixth and the seventh results (10% and 6% sucrose solutions) and we obtained a relative indicator of the "young" populations content (Sizova et al., 1980). After the releas of erythrocytes from the red bone marrow to peripheral blood, they undergo three age stages: "young", "mature" and "old". It depends on cell membranes' oxidation intensity and their antioxidant capacity (Wijk and Solinge, 2005).

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

Number of erythrocytes of the first and the second horse groups before the exercise was on the same level. After races , the leader horses showed significant ($P < 0.01$) increase in erythrocyte count. The outsiders, on the contrary, tended to show a decrease in the number of erythrocytes as compared to the period before exercise. After races, the erythrocyte count in the outsider horses was 16.5% less as compared to the leaders. 90 min after the trot race finished the erythrocytes number in the leader horses declined, but did not return to the original values. At the same time, the erythrocyte count in outsiders decreased during the recovery period, and was 15.8% lower ($P < 0.05$) as compared with indicators before exercise, and by 9.9% after the end of the races apparently due to exhaustion of the blood depot reserve capacity. The outsider horses in the recovery period had a 22.0% ($P < 0.01$) lower erythrocyte count compared to the leaders.

The hemoglobin content in outsider horses at rest was 10.5% lower as compared to the leaders. In the next period (after trot races) the value of hemoglobin in animals of both groups tended to increase, but the leaders showed higher figures. The leaders in the recovery period had further hemoglobin increase and it obtained probability ($P < 0.05$) and was 11.0% higher as compared to the period before exercise, which obviously points to increased performance of bone marrow and intensive formation of hemoglobin under physiological hypoxia. The outsiders had hemoglobin decreases compared with the after race period and this was almost similar to the value before exercise.

Assessing the hematocrit value, it should be noted that in the leaders after exercise it tended to increase, while in the outsiders it did not change, and after 90 min, this figure decreased by 5.0% as compared to the period before the exercise ($P < 0.05$). The MCV in the leaders after exercise decreased by 11.0% ($P < 0.05$), and after 90 min of rest it returned to original values. In the outsiders the reverse pattern occurred, after exercise the MCV tended to increase (by 8.7%), and in the recovery period it was higher by 15.4% as compared with the values before exercise ($P < 0.05$). When determining the MCH, it was found that in the leaders this ratio did not change during the entire study period, but in the outsiders after exercise it increased and obtained probability 90 min after exercise ($P < 0.01$; 25.0%). Such changes of red blood indexes in second group animals indicate slowed adaptation processes of "red" blood cells to physiological hypoxia during exercise and appearance of oversaturated macrocytic erythrocytes forms in the bloodstream.

The population structure of erythrocytes in both animal groups did not differ at the beginning of the experiment (Table. 1). At the beginning of the experiment there was no significant difference in erythrocyte's acid resistance between leaders and outsiders. However, if the left part of the chart (hemolysis of "old" and "mature" population) almost coincided, still the main peak in horses that showed high results was at 7.2 min, which was by 1.1 min longer as compared to the outsiders (Fig. 1).

Table 1
Erythrocytes population structure indexes in trotting horses (%, n = 10)

Experimental periods	"old"		"mature"		"young"	
	leaders	outsiders	leaders	outsiders	leaders	outsiders
Rest	8.8 ± 1.06	7.6 ± 0.92	33.1 ± 2.05	34.8 ± 4.26	58.0 ± 1.57	57.3 ± 5.10
After race	6.9 ± 1.44	6.0 ± 0.35	29.8 ± 2.44	30.5 ± 1.31	63.2 ± 3.80	63.4 ± 1.31
After 90 min	4.9 ± 0.32	4.5 ± 0.20**	25.8 ± 2.43	22.3 ± 1.07**	69.2 ± 2.28	73.1 ± 1.16***

Note: ** – $P < 0.01$, *** – $P < 0.001$, compared with the previous period.

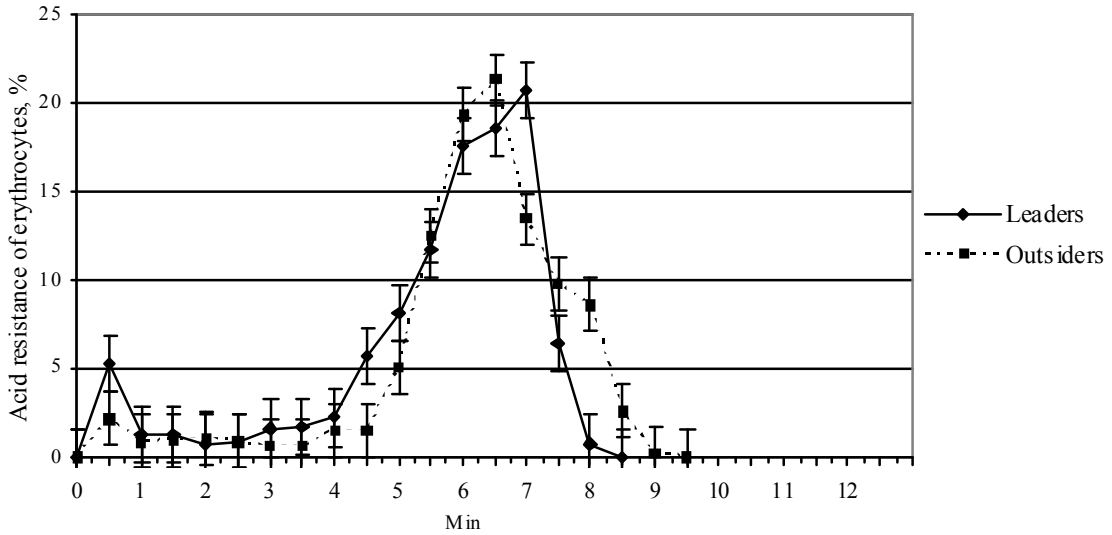


Fig. 1. Acid resistance of erythrocytes (% of hemolyzed erythrocytes) of trotter horses at rest: data are the mean ± standard error of the mean (n = 10)

However, the leaders full time of hemolysis ended within 8.5 min, and in outsiders 1 min later (9.5 min), indicating the circulation of a larger number ofr "young" cells in peripheral blood. After trot races both animal groups trended to decrease "old" (by 1.9% – in leaders; by 1.6% – in outsiders) and "mature" (by 3.3% and 4.3%, respectively) erythrocyte forms. However, the proportion of "young" populations increased by 5.2% and 6.1% respectively, probably due to bone marrow reflex stimulation as a result of excessive physical activity (Table 1).

A confirmation of these changes was depicted in the erythrocytes acid resistance diagram. The erythrocytes diagrams in leaders and outsiders coincided and almost overlapped. The left and right parts of the chart were the same, hemolysis time completed within 9 min. Only the main peak for the leaders was somewhat lower and smoother (Fig. 2), indicating the gradual destruction of "mature" and "young" cells under the influence of hemolytic and stable saturation with lipid components of erythrocytes' membranes in the first group of horses.

After 90 min bone marrow hyper regenerative response occurred in both animal groups, due to the deepening process of issue hypoxia after exercise. It should be noted that in the third period of study (after 90 min) the leaders showed only a tendency to reduce "old" and "mature" erythrocyte forms (in 10% of animals) while increasing the "young" (in 20% of horses) ones. However, the outsiders showed credible changes of these indicators, namely the number of "young" populations increased by 9.7% ($P < 0.001$; Table 1), while "mature" and "old" ones were less by 8.2% and 1.45% respectively. Obviously, this animal group even after rest manifests increased production of cells by bone marrow erythroid, leading to release of "young" cells into peripheral blood which are more resistant to hemolysis. Evidence of this is the erythrocyte diagram that reflects the age structure of red cells and the activity of biochemical connections between the membrane components. It was established that in outsiders the main peak – happened at 6.75 min (by 1.5% more as compared to leaders) and amounted to 22.5% of populations (Fig. 3). The full time of hemolysis ended in 10 min, while in horses that showed better results it was in 8 min, indicating the circulation in the outsiders of greater proportion of immature "young" cells in the bloodstream (due to bone marrow reflex stimulation), which are unable to fully perform the function of oxygenation, which in turn negatively affects the muscular activity of this group of animals.

Discussion

Exercise has variable effects on hematological parameters. These differences may depend on the intensity and duration of physical exercise. The erythrocyte count increase along with of hemoglobin concen-

tration increase after exercise is probably the result of splenic contraction and subsequent release of erythrocytes, accompanied by change in erythrocyte indices. Increase of the erythrocyte count, hemoglobin concentration and hematocrit value allows increased oxygen transportation to body tissues. It may also be associated with physical exercise and redistribution of fluids in the body, but these changes are secondary in relation to catecholamine release and splenic contraction (Robert et al., 2010; Gerber et al., 2014; Scantlebury et al., 2014; Padalino et al., 2017). The study results showed that physical exercise causes increase of red blood cells, hemoglobin and hematocrit concentration, immediately after exercise, returning to initial values within 1 hour after exercise (Vazzana et al., 2014).

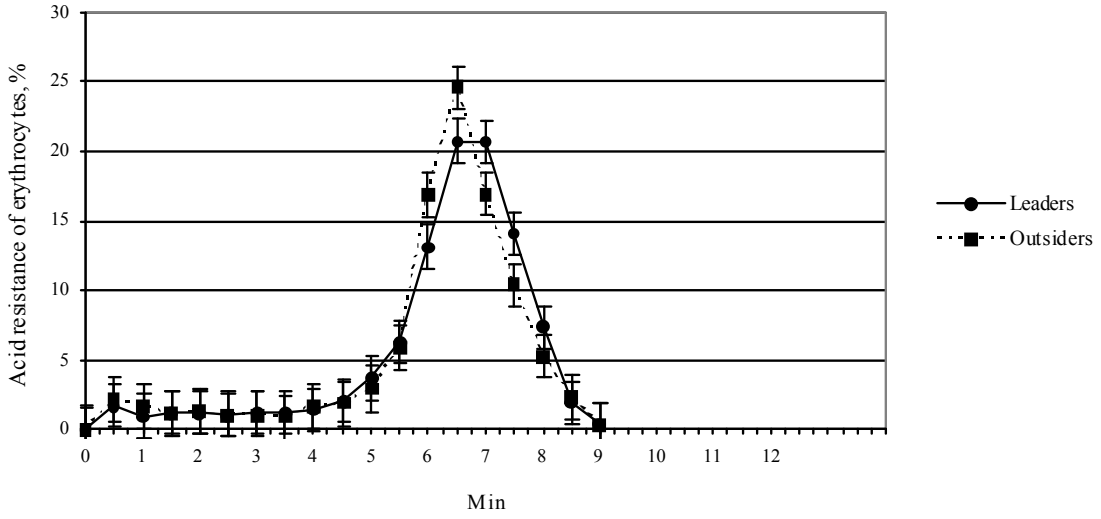


Fig. 2. Acid resistance of erythrocytes (% of hemolyzed erythrocytes) of trotter horses after race: the data are the mean ± standard error of the mean (n = 5)

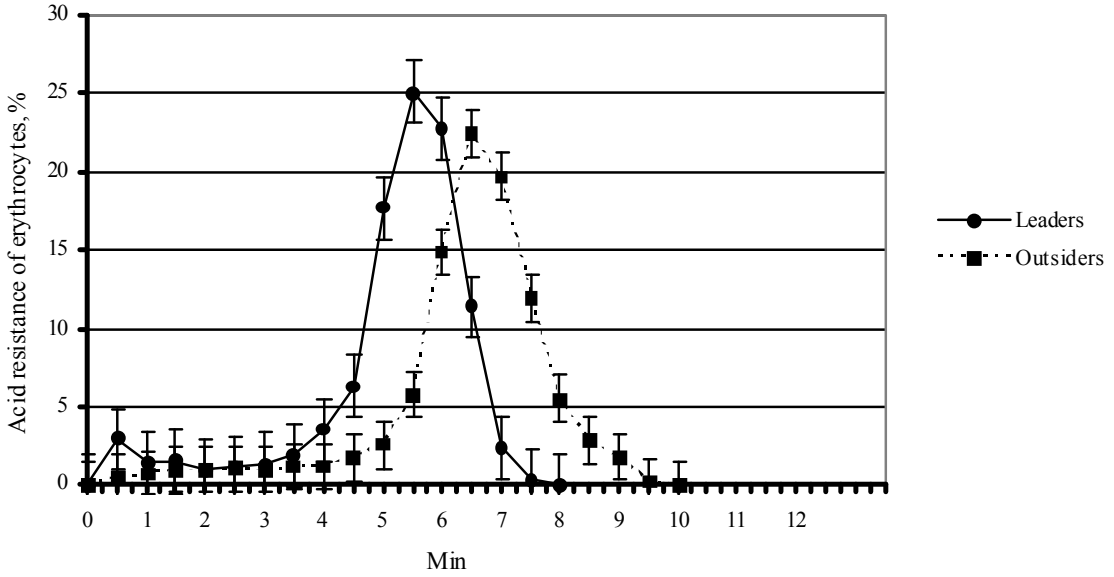


Fig. 3. Acid resistance of erythrocytes (% of hemolyzed erythrocytes) of trotter horses after 90 min: the data are the mean ± standard error of the mean (n = 5)

Cardiovascular and hematological adaptations are required for supplying tissues with oxygen and nutrients for active working muscles during physical exercise and release of metabolites (Piccione et al., 2007). This study showed changes in the erythrocyte number and hemoglobin concentration after exercise in horses of both groups, but more dramatic changes occurred in leader horses. Physical exercise has a different effect on the erythrocytic indices depending on exercise intensity, ability and professional training, environmental conditions, and horse breed (Krumrych, 2006). Our research results showed some differences in hematopoiesis indices in trotting horse of leaders and outsiders. Changes in the number of erythrocytes, Hb, Ht, MCV, MCN, acid resistance and population content of erythrocytes can be used to monitor the state of health and level of horse training.

The process of hematopoiesis (erythrocytopoiesis) is represented by the first morphologically identified germ cell, in which the cytoplasm begins to synthesize hemoglobin – it is a perioperiblast. During 4 days of development, it loses the "blast" morphology of the nuclei, passing the prognosis and normocyte stages. After the last mitosis, the picnotically modified nucleus is crimped out of the cell, there is denucleation (by carioexpression and carriolysis) and the formation of reticulocyte.

A "young" cell after many processes and transformations becomes a "mature" red blood cell, which performs many physiological functions: transportation of oxygen to the tissues and carbon dioxide from them, the adsorption of amino acids, proteins, and their decay products, antigens, antibodies, enzymes, synthesis macroergic compounds and others. The aging processes are accompanied by chronic oxidative stress and inhibit the metabolism of red blood cells leading to lipid membranes and protein degradation and the reduction of ATP (Dice, 1993).

Drainage and the postpartum period cause the occurrence of hypoxia, which leads to irritation of the "red" bone marrow and changes in the ratio of red blood cell populations in the peripheral blood system. According to experimental studies, it was found that Russian trotting

breed horses within three months after birth increase the number of "young" red blood cells forms, in which there is no definite stabilization of the structural elements of erythrocyte membranes. As to stallions of this breed, a decrease in "mature" and increase in "young" red blood cells forms was found, acid resistance of erythrocytes to hemolytics was increased, which probably indicates a genetic predisposition to significant physical activity and adaptive cytogenesis of erythroid sprout bone marrow for oxygenation (Piddubnyak et al., 2014).

Concerning horses at the latent course of leptospirosis and herpesvirus infection, there are changes in the erythrocytopoesis system, in particular, an increased number of "old" forms of erythrocytes with the simultaneous gradual decrease in "young" have been found, indicating the inhibition of erythrocytopopse processes, inhibition of erythrocyte maturation processes and increased aging in the peripheral blood system. The reflection of the morpho-functional state of the erythrocytopoetic system in peripheral blood can be traced on a graph of hemolysis rate of erythrocyte populations under the influence of acid solution. Erythrograms of horses at the latent course of leptospirosis and herpesvirus infection had a right shift of their major peaks and the complete time of hemolysis in animals was completed more quickly, which may prove a blocking effect of infectious agents on the elements of the bone erythroid bone marrow, inhibition of erythrocyte maturation processes and increased aging.

According to scientists, concerning horses at the process a combined invasion – paraskarasis and strontiglyidoses, the qualitative composition of erythrocytes varies even in the case of weak intensity of the invasion. This is evidenced by the reduction of the "old" and "mature" forms of red blood cells and the increase in "young" ones, which are intensively destroyed and are unable to carry out fully the processes of oxygenation. The configuration of erythrograms among invasive horses indicates its shift to the right side, which is due to the appearance of "young" red blood cells in the peripheral channel, but the reduction of the complete time of hemolysis indicates that their membranes are depleted by protein-lipid components because of the activation of free radical processes with the help of the life products of helminths (Piddubnyak et al., 2010). Neuropathia among horses suspected of having an alkaloid mycotoxicosis and encephalitis is caused by changes in the erythrocytic pool and hypoxia. Destructive changes in erythrocytes are reflected in their acid resistance. It is reduced in patients, which is confirmed by the reduction of full hemolysis time and rapid destruction of populations of "red" blood cells.

In conclusion we can state that the results of this study show that exercise is a very important issue in life of a sports horse, and that hematological research is vital in evaluating sports horses. Changes of some hematological parameters are related to the degree of horse physical training.

Conclusions

Thus, according to the performed studies, the efficiency of sport horses depends on the trained level of animals. During its assessment, one should take into account not only conventional indicators (erythrocyte count, hemoglobin content, hematocrit value and "red" blood indexes), but especially important physical-chemical properties of erythrocytes (buoyancy, acid resistance) and regulation mechanisms of gas exchange. Thus, in animals that showed the best results, the number of "mature" and "old" erythrocytes at the expense of elimination them from the depot. However, the number of "young" erythrocytes, resistant to hemolysis increased in outsider animals, but they are unable to satisfy tissue demand for oxygen.

References

Andriichuk, A., Tkachenko, H., & Kurhaluk, N. (2014). Gender difference of oxidative stress biomarkers and erythrocyte damage in well-trained horses during exercises. Journal of Equine Veterinary Science, 34(8), 978–985.

Bergero, D., Assenza, A., & Caola, G. (2005). Contribution to our knowledge of the physiology and metabolism of endurance horses. Livestock Production Science, 92(2), 167–176.

Bulgakov, V. D. (2002). Konevodstvo [Horse breeding]. PKF BAO, Donetsk (in Russian).

Çimen, M. Y. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. Clinica Chimica Acta, 390, 1–11.

Dice, J. F. (1993). Cellular and molecular mechanism of aging. Physiological Reviews, 73(1), 149−159.

Gerber, V., Tessier, C., & Marti, E. (2014). Genetics of upper and lower airway diseases in the horse. Equine Veterinary Journal, 47(4), 390–397.

Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., & Geor, R. J. (2004). Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of equine athlete. Saunders Ltd.

Kirschvink, N., de Moffarts, B., Farnir, F., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2006). Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breed. Equine Veterinary Journal, Supplement, 36, 239–244.

Krumrych, W. (2006). Variability of clinical and haematological indices in the course of training exercise in jumping horses. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 50, 391–396.

Muñoz, A., Santisteban, R., Rubio, M. D., Vivo, R., Agüera, E. I., Escribano, B. M., & Castejón, F. M. (1997). Functional evaluation indices in the Andalusian horse. The Journal of Veterinary Medical Science, 59, 747–752.

Padalino, B., Raidal, S., & Carter, N. (2017). Immunological, clinical, haematological and oxidative responses to long distance transportation in horses. Research in Veterinary Science, 115, 78–87.

Petibois, C., & Deleris, G. (2005). Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. Archives of Medical Research, 36(5), 524–531.

Piccione, G., Giannetoo, C., Fazio, M., Mauro, S., & Caola, G. (2007). Haematological response to different workload in jumper horses. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 10(1), 21–28.

Piddubnyak, O. V., Golovaha, V. I., & Antipov, A. A. (2010). Zminy pokaznykiv erytrotsytopoezu u konei za nematodoziv [Changes in indicators of erythrocytopopse in horses for nematodoses]. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 12(2), 236–240 (in Ukrainian).

Piddubnyak, O. B., Golovakha, V. I., Lumyanyk, S. V., & Lobodenko, O. V. (2014). Erythropoiesis indicators of Russian trotter horses breed. Scientific Jurnal of Veterinary Medicine, 108, 186–190.

Robert, C., Goachet, A. G., Fraipont, A., Votion, D. M., Erck, E. V., & Leclerc, J. L. (2010). Hydrationan delectroly tebalancein horses during an endurance season. Equine Veterinary Journal, 42, 98–104.

Scantlebury, C. E., Archer, D. C., Proudman, C. J., & Pinchbeck, G. L. (2014). Management and horse-level risk factors for recurrent colic in the UK general equine practice population. Equine Veterinary Journal, 47(2), 202–206.

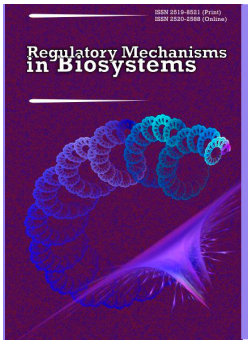
Sizova, I. A., Kamenskaja, V. V., Fedjakov, V. I. (1980). Bezapparaturnyj sposob frakcionirovanija krasnyh kletok krovi v gradiente plotnosti saharozy [The nonparametric method of fractionation of red blood cells in a sucrose density gradient]. Izvestija of Siberian Division of AN USSR, 3(15), 119–122 (in Russian).

Terskov, I. A., & Hitelzon, I. I. (1967). Znachenie dispersionnyh metodov analiza jeritrocitov v norme i patologii [The value of dispersion methods for erythrocytes analysis in norm and pathology]. Voprosy Biofiziki, Biohimii i Patologii Eritrocitov. Nauka, Moscow. pp. 41–48 (in Russian).

Vazzana, I., Rizzo, M., Dara, S., Niutta, P. P., Giudice, E., & Piccione, G. (2014). Haematological changes following reining trials in Quarter horses. Acta Scientiae Veterinariae, 42, 1–5.

Wijk, R., & Solinge, W. (2005). The energy-less red cell is lost: Erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. Blood, 106(13), 4034–4042.

Williams, C. A., & Bur, A. O. (2012). Antioxidant status in elite three-day event horses during competition. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012, 572–590.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 628–632
doi: 10.15421/021796

Impact of ions of zinc and cadmium on body weight, fertility and condition of the tissues and organs of *Procambarus virginalis* (Decapoda, Cambaridae)

O. M. Marenkov, K. K. Holovoborodko, U. S. Voronkova, O. S. Nesterenko

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 24.09.2017
Received in revised form 20.10.2017
Accepted 23.10.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-066-512-29-44.
E-mail: gidrobions@gmail.com

Marenkov, O. M., Holovoborodko, K. K., Voronkova, U. S., & Nesterenko, O. S. (2017). Impact of ions of zinc and cadmium on body weight, fertility and condition of the tissues and organs of Procambarus virginalis (Decapoda, Cambaridae). Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 628–632. doi:10.15421/021796

Heavy metals cause functional disorders in the tissues and organs of hydrobionts, affecting their linear-weight indicators, reproductive system, digestive and eliminative organs. Using the method of histological estimation of the conditions of the tissues and organs of *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 allowed us to determine the peculiarities of adaptation of crustaceans to the effect of different concentrations of heavy metal ions in the conditions of a modeling experiment. We studied the impact ions of zinc (0.1 mg/l) and cadmium (0.01 mg/l) on the organism of *P. virginalis*. The heavy metal ions had a negative effect on the weight indicators, survivability and reproduction of *P. virginalis*. During the experiments with zinc, we observed death of 18.2% of the tested crustaceans; the highest death rate was observed in the experiment with cadmium – 27.3%. Experimentally modeled concentrations of heavy metals negatively affected the reproductive system of *P. virginalis*. In the experiment with cadmium ions, we observed no spawning; the highest percentage of the females with deposed eggs was observed in the control – 29.1%. The conducted studies allowed us to observe the reaction of the eliminatory system of *P. virginalis* to the impact of heavy metal ions. The impact of ions of zinc and cadmium decreased the area of secretory cells of the green gland by 10.4–14.8%. We observed grinding of the nuclear cell apparatus. Therefore, the nucleii of granulocytes were 23.6% smaller under the impact of zinc, and 17.5% smaller under the influence of cadmium. The sizes of cells and nucleus apparatus decreased mutually and proportionally; this was proven by stable indicators of nucleus-cytoplasm ratio, its value equaled 0.29–0.31 units. The given concentrations of heavy metals did not affect the histological condition of the adipose tissue, the sizes of adipocytes fluctuated within the range of 215–2178 μm^2, the average equaled 872–994 μm^2. We determined the negative effect of heavy metals on the histological structure of the hepatopancreas and the value of gland lumens. In the control, the area of previous section equaled 164.5 μm^2 with 39 μm^2 lumen. During the experiment with zinc ions the structures of hepatopancreas increased by 19.9%, and in the experiment with cadmium, we observed the highest increase in the structural elements of the tissues – by 50.2%. The worst histological condition of the cells of the tested tissues and organs of *P. virginalis* was observed among individuals impacted by the cadmium ions; this is explained by the high toxic effect of this heavy metal.

Keywords: Marmorkrebs; crustaceans; heavy metals; hepatopancreas; adipocytes

Вплив іонів цинку та кадмію на масу тіла, плодючість і стан тканин і органів *Procambarus virginalis* (Decapoda, Cambaridae)

О. М. Маренков, К. К. Голобородько, Ю. С. Воронкова, О. С. Нестеренко

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Важкі метали викликають функціональні порушення у тканинах і органах гідробіонтів, впливаючи на їх лінійно-вагові показники, репродуктивну систему, органи травлення та виділення. Застосований метод гістологічного оцінювання стану тканин і органів мармурових раків дозволив визначити особливості адаптацій ракоподібних до дії різних концентрацій іонів важких металів в умовах модельного експерименту. Досліджено вплив іонів цинку (0,1 мг/л) та кадмію (0,01 мг/л) на організм *Procambarus virginalis* Lyko, 2017. Іони важких металів негативно впливали на вагові показники, виживання та відтворення мармурових раків. Під час експерименту в досліді з цинком загинуло 18,2% дослідних раків, найбільшу смертність ракоподібних спостерігали в експерименті з кадмієм (27,3%). Експериментально змодельовані концентрації важких металів негативно впливали на репродуктивну систему мармурових раків. У досліді з іонами кадмію відкладення ікри не спостерігали, найбільший відсоток самок із відкладеною ікрою відмічали в контролі (29,1%). Проведені дослідження дозволили виявити реакцію видільної системи мармурових раків на вплив іонів важких металів. За впливу іонів цинку та кадмію на 10,4–14,8% зменшувалась площа секреторних клітин зеленої залози. Спостерігали здрібнення нуклеарного апарату клітин. За впливу цинку ядра гландулоцитів були меншими на 23,6%, а за впливу кадмію – на 17,5%. Зменшення розмірів клітин і ядерного апарату відбувалося взаємопропорційно, що підтверджувалося сталими показниками ядерно-цитоплазматичного відношення, величина якого перебувала в межах 0,29–0,31 одиниць. Задані концентрації важких металів не впливали на гістологічну картину жирової

тканини, розміри адипоцитів коливалися в діапазоні 215–2178 мкм^2, у середньому становили 872–994 мкм^2. Визначено негативний вплив важких металів на гістологічну структуру гепатопанкреаса мармурових раків: відмічено достовірні зміни у структурі тканини, важкі метали впливали на форму дольок гепатопанкреаса та величину просвіту залози. У контролі площа поперечного зрізу дорівнювала 164,5 мкм^2 із просвітом 39 мкм^2. У досліді з іонами цинку структури гепатопанкреаса збільшені на 19,9%, а в експерименті з кадмієм спостерігали найбільше збільшення структурних елементів тканини – на 50,2%. Найгіршу гістологічну картину для клітин дослідних тканин і органів мармурових раків спостерігали в особин за впливу іонів кадмію, що пояснюється високим токсичним впливом цього важкого металу.

Ключові слова: мармуровий рак; ракоподібні; важкі метали; гландулоцити; гепатопанкреас; адипоцити

Вступ

Важкі метали виступають пріоритетними токсичними забруднювачами прісних водойм. Вони становлять надзвичайну небезпеку як забруднювачі природних вод, які навіть у порівняно малих концентраціях можуть негативно впливати на водні організми (Fedonenko et al., 2012; Opp et al., 2015). Біологічні наслідки забруднення важкими металами водного середовища виявляються, насамперед, у прямій токсичній дії на гідробіонтів, що спричиняє ураження їх фізіологічних систем.

Особливий інтерес становить вивчення адаптаційних можливостей нових видів гідробіонтів, які вперше вселяються до водойм зі сталим екологічним режимом та сформованим токсикологічним фоном. У такому випадку нові види можуть або загинути, не витримавши тиску антропогенних чинників, або, навпаки, адаптуватися до нових умов. При цьому процес адаптації, який відбувається на біохімічному та клітинному рівні, створює передумови виживання популяції інвазійного виду (Holoborodko et al., 2016).

У зв'язку з тим, що у 2015 році мармуровий рак потрапив до водойм Дніпропетровської області (Novitsky and Son, 2016), виникла необхідність дослідження можливостей його адаптацій до екологічних чинників водного середовища з метою подальшого прогнозування його поширення або навіть акліматизації в умовах токсикологічного забруднення водойм степового Придніпров'я (Holoborodko et al., 2016). Мармурові раки *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 (Decapoda, Cambaridae) – партеногенетичні ракоподібні, знайдені в 1990 році у водоймах Німеччини (Martin et al., 2010a, 2010b; Faulkes, 2015). Мармуровий рак описано як підвид американського виду *Procambarus fallax* (Hagen, 1870), природний ареал якого охоплює водойми Джорджії та Флориди (США) (Hobbs, 1942; Taylor et al., 1996). Ці ракоподібні потрапили до Європи як акваріумний вид та випущені до водойм Німеччини (Chucholl and Pfeiffer, 2010; Peay et al., 2010). Як інвазійний вид мармуровий рак відмічений у водоймах Нідерландів, Італії (Marzano et al., 2009), Словаччини (Lipták et al., 2016), Швеції (Bohman et al., 2013), Чехії (Patoka et al., 2015), України (Novitsky and Son, 2016) та Японії (Kawai and Takahata, 2010). Мармурові раки – типові інвазійні гідробіонти (Scholtz et al., 2003). Вони вселені у багатьох місцях і формують популяції, які здатні до самовідтворення, створюючи загрозу сільському господарству та конкуруючи з аборигенними видами.

Популяції мармурових раків складаються з триплоїдних самиць, а їх розмноження відбувається партеногенетичним шляхом (Scholtz et al., 2003; Alwes and Scholtz, 2006; Faulkes, 2010; Martin et al., 2016). Усі особини – самиці, генетично ідентичні до материнської особини (Jimenez and Faulkes, 2010). Таким чином, мармурові раки можуть використовуватися як показові модельні об'єкти у біологічних дослідженнях (Vogt, 2010; Martin et al., 2010b; Vogt et al., 2015).

У зв'язку із цим наше дослідження спрямоване на визначення впливу іонів важких металів на фізіологічний стан і гістоструктуру тканин і органів мармурових раків. Робочі гіпотези дослідження базувалися на визначенні реакції організму мармурових раків на вплив змодельованих концентрацій іонів цинку та кадмію в контрольованих умовах: вплив важких металів на вагові показники ракоподібних, плодючість, стан тканин і органів.

Матеріал і методи досліджень

Лабораторні модельні експерименти механізмів адаптацій до дії іонів цинку та кадмію здійснювали на особинах мармурових раків *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 (Decapoda, Cambaridae). Експеримент проводили у трьох акваріумах робочою ємністю 30 л. Постійну температуру води підтримували терморегулятором і в усіх акваріумах вона становила +24 ºС. Кисневий режим підтримували компресором, вміст кисню у воді акваріумів становив 8 мг/л. Двічі на тиждень повністю міняли воду в акваріумах і додавали токсиканти з розрахунку концентрацій іонів важких металів цинку 0,1 мг/л (10 ГДК), кадмію – 0,01 мг/л (2 ГДК). Концентрації важких металів установили з розрахунку їх вмісту у воді Запорізького (Дніпровського) водосховища – основній водоймі-реципієнті цього виду. Годували щодня однаковою кількістю корму. До кожного акваріума висаджували по 11 екземплярів мармурових раків однакової розмірно-вікової групи, отриманих партеногенетично від однієї самки. Експеримент тривав 21 добу.

Із метою дослідження впливу важких металів на гістоструктуру антенальної залози мармурових раків застосовували гістологічні методи досліджень. Особин контрольної та дослідної групи по завершенні експерименту фіксували у 4% розчині формаліну з подальшим опрацюванням згідно із загальноприйнятими гістологічними методами (Mumford et al., 2007). Для виготовлення зрізів використовували мікротом МС-2. Гістологічні зрізи фарбували гемотоксилін-еозином. Фотографії препаратів робили за допомогою цифрової насадки на мікроскоп Sciencelab T500 5.17 M, яку підключали до мікроскопа моделі Jenaval. У кожній дослідній групі аналізували та вимірювали по 120 клітин антенальної залози, по 100 дольок гепатопанкреаса, по 100 клітин адипоцитів. Опис гістологічних препаратів здійснювали з використанням атласів гістології ракоподібних (Shields and Boyd, 2014). Величину ядерно-цитоплазматичного відношення розраховували як відношення площі ядра до площі клітини.

Статистичне опрацювання даних здійснювали за загальноприйнятими методиками з використанням програмного пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Всі результати наведені як середнє значення ± стандартне відхилення (SD). Достовірність різниці між вибірками даних установлено із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу за рівня значимості $P < 0,05$.

Результати

Вплив важких металів на масу та плодючість. На початку експерименту всі мармурові раки мали середньовиважену масу особин 1,32 г, тобто належали до однорозмірної групи. У кінці експерименту приріст маси в контрольному акваріумі становив 0,32 г (24,4%). Найбільший приріст маси мармурових раків спостерігали у досліді з цинком 0,41 г (31,1%), але статистично достовірної різниці між ваговими показниками мармурових раків ми не відмітили. Незважаючи на це, найменший приріст маси у ракоподібних відмічали у досліді з кадмієм і він становив 0,15 г (11,2%).

В експериментальних акваріумах із важкими металами спостерігали загибель мармурових раків. На 21-шу добу експерименту в акваріумі з цинком загинуло 18,2% мармурових раків. Найбільшу смертність дослідних тварин відмічали в експерименті з кадмієм (27,3%). По завершенні експерименту деякі мармурові раки відклали ікру. В контролі відсоток самок з ікрою найбільший (27,2%), дещо менше самиць відклали ікру в досліді з цинком (11,1%). У досліді з кадмієм відкладення ікри не спостерігали (табл. 1). Важкі метали впливають на фізіологічний стан гідробіонтів, що відображається на їх тканинах і органах. Тому гістологічні дослідження тканин і органів можна використовувати як біологічні маркери негативного впливу токсикантів.

Таблиця 1

Репродуктивні показники *P. virginalis* за дії іонів цинку та кадмію (x ± SD)

Умови досліду	Контроль, n = 11	Дослід із цинком n = 9
Частка самиць з ікрою, %	29,1	11,1
Індивідуальна абсолютна плодючість, шт.	84,5 ± 2,44	78,0#
Маса статевих продуктів, мг	30,0 ± 1,42	25,0#
Маса однієї ікринки, мг	0,36 ± 0,021	0,32 ± 0,022
Діаметр однієї ікринки, мм	1,5 ± 0,05	1,7 ± 0,05*

Примітки: у досліді з кадмієм раки ікру не відкладали; * – різниця достовірна за P < 0,05, # – ікру відклала одна особина.

Фізіологічна оцінка антенальних залоз за впливу важких металів. Основні органи виділення мармурових раків – пара видозмінених метанефридіїв – антенальних залоз, або зелених залоз. Це досить великі округлі залози, розташовані в головному відділі, що відкриваються протоками поблизу основи антен. Кожна залоза складається з великого целомічного мішечка, звивистого канальця та сечового міхура. Секреторна частина антенальної залози маармурового рака мала вигляд мішечка, розділеного на численні камери, що вистилаються одношаровим залозистим епітелієм, який формував лабіринт (рис. 1). На гістологічних препаратах помітні ряди залозистих клітин, які містилися на тонкій базальній мембрані. Клітини кубічної форми містили велике ядро, в якому добре помітне ядерце. Кількість ядерець варіювала від одного до декількох.

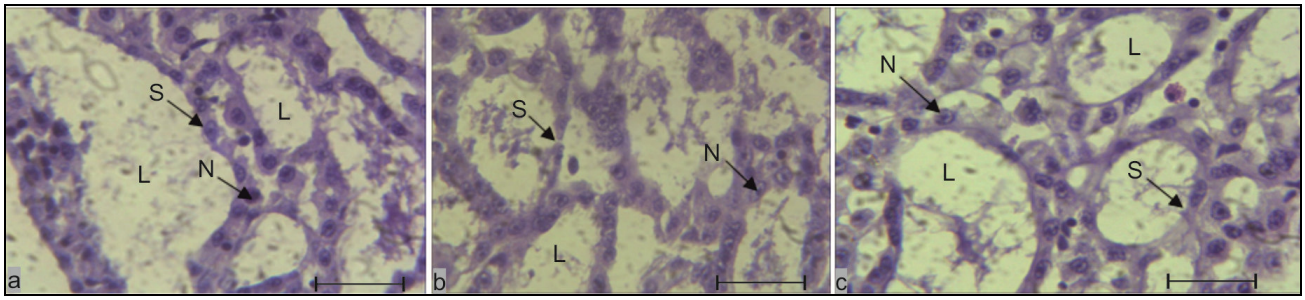


Рис. 1. Зелена залоза *P. virginalis*: *a* – дослід із цинком; *b* – дослід із кадмієм, *c* – контроль, *S* – секреторні клітини, *N* – ядро, *L* – просвіт залози; bar – 50 μm

Секрет зеленої залози накопичувався в апікальній частині клітини, протоплазма при цьому розріджувалася та частково втрачалася на створення секрету. На зовнішній частині клітини виникали вирости, які перетворювалися на великі пухирці, що містили секрет і рідку протоплазму. Потім ці пухирці відривалися від клітини та деякий час перебували у просвіті залози у вигляді крапель. Клітини антенальної залози мармурового рака в контролі сягали розміру 166,1 мкм² (табл. 2). Гландулоцити мали чіткі краї клітин, виражену структуру проток, чітку базальну мембрану. Великі ядра залозистих клітин у поперечному перерізі сягали розмірів 51,3 мкм². Нуклеарна мембрана мала рівний край, в ядрах спостерігали ядерця, які характеризувалися вираженою базофілією. Тобто структура антенальної залози мармурового рака в контролі відповідала нормі для десятиногих ракоподібних.

Таблиця 2

Гістометричний аналіз клітин антенальної залози *P. virginalis* (x ± SD, n = 120)

Дослідна група	Площа клітин, мкм²	Площа ядер, мкм²	Величина ядерно-цитоплазматичного відношення
Контроль	166,1 ± 9,11	51,3 ± 3,92	0,31 ± 0,013
Цинк, 0,1 мг/л (10 ГДК)	148,8 ± 10,12	39,2 ± 1,41**	0,29 ± 0,021
Кадмій, 0,01 мг/л (2 ГДК)	141,4 ± 7,61**	42,3 ± 1,73*	0,31 ± 0,022

Примітка: * – різниця достовірна за P < 0,05, ** – різниця достовірна за P < 0,01.

За впливу цинку клітини зеленої залози мармурового рака також мали чітку структуру, виражені мембрани, цілісні ядра та ядерця (рис. 1). Площа поперечного перерізу гландулоцитів сягала 148,8 мкм². Ядро клітини займало приблизно 26,1–29,2% і сягало розмірів 39,2 мкм². Порівняно з контролем статистично достовірної різниці між розмірами клітин не спостерігали, але розміри ядер клітин зеленої залози за впливу іонів цинку на 23,6% менші за контроль.

Найгіршу гістологічну картину для клітин антенальної залози спостерігали в особин, які перебували за впливу іонів кадмію (рис. 1). Структура вивідних проток зеленої залози в них порушена з нечіткими межами, протоки містили в собі велику кількість фрагментів цитоплазми гранулоцитів. У деяких клітинах відмічали пікноз ядер, а також вихід ядерця за межі ядра – появу мікроядер. Подібне явище пояснюється токсикологічним впливом кадмію. Порівняно з контролем гландулоцити антенальної залози були на 14,8% меншими. Ядра залозистих клітин також були достовірно меншими на 17,5% за контрольні показники. У досліді та контролі величина ядерно-цитоплазматичного відношення гландулоцитів статистично не різнилася та коливалася в межах 0,29–0,31 одиниць, що вказує на взаємопропорційне зменшення як цитоплазми клітин зеленої залози, так і їх ядер, що викликано впливом важких металів.

Фізіологічна оцінка жирових клітин за впливу важких металів. Дослідження адипоцитів сполучної тканини показали, що достовірної різниці між розмірами клітин за впливу важких металів не виявили. Розміри адипоцитів коливалися в широкому діапазоні 215–2 178 мкм² і в середньому сягали 872–994 мкм². Таким чином, дані концентрації важких металів за експозиції експерименту в 21-шу добу не впливали на накопичення ліпідів адипоцитами в організмі мармурових раків.

Жирова тканина – різновид сполучної тканини, що накопичувала ліпіди та брала участь у ліпідному обміні. Майже всю жирову клітину мармурових раків заповнювала жирова крапля, яку оточувала цитоплазма з витісненим на периферію ядром (рис. 2). Основне фізіологічне значення жирової тканини – енергетичне депо організму та збереження енергії.

Фізіологічна оцінка гепатопанкреаса за впливу важких металів. Травна система мармурових раків представлена трубкою, стравоходом, шлунком, середньою кишкою, задньою кишкою та травною залозою – гепатопанкреасом, який складався з дрібних часточок і відкривається своїми протоками у шлунок. Функція цього органа відповідає функції печінки та підшлункової залози хребетних. Секрет гепатопанкреаса мармурових раків може не тільки розщеплювати жири та переводити їх у стан емульсії, а й здатний переводити крохмаль у цукор, що характерно для підшлункової залози. У контролі площа поперечного зрізу часточки гепатопанкреаса дорівнювала 164,5 мкм² з просвітом 39 мкм² (рис. 3). У той час, як у досліді з цинком структури гепатопанкреаса були збільшені в 1,2 раза, у досліді з кадмієм спостерігали найбільше збільшення структурних елементів тканини – в 1,5 раза (табл. 3). Також відмічали достовірне збільшення площі поперечного перерізу просвіту гепатопанкреаса мармурових раків для тканин, які перебували за впливу іонів цинку та кадмію.

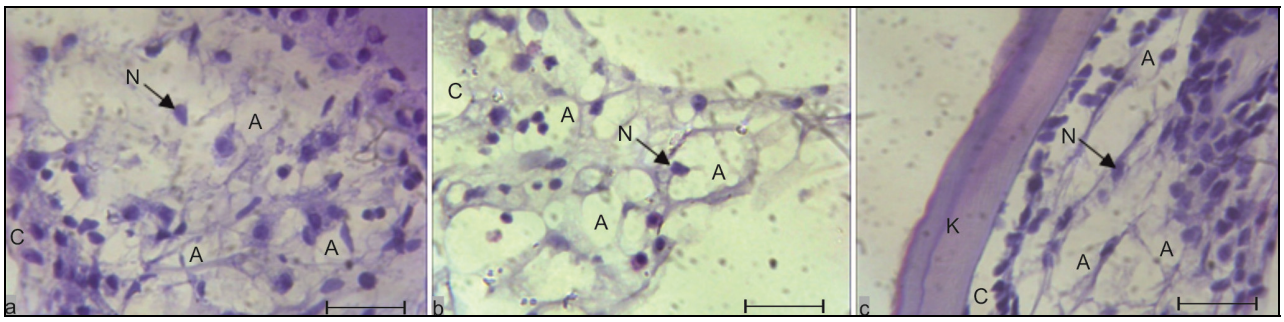


Рис. 2. Жирові клітини сполучної тканини *P. virginalis*: *a* – дослід із цинком; *b* – дослід із кадмієм, *c* – контроль; *K* – кутикула, *C* – сполучна тканина, *A* – адипоцити, *N* – ядро; bar – 50 μm

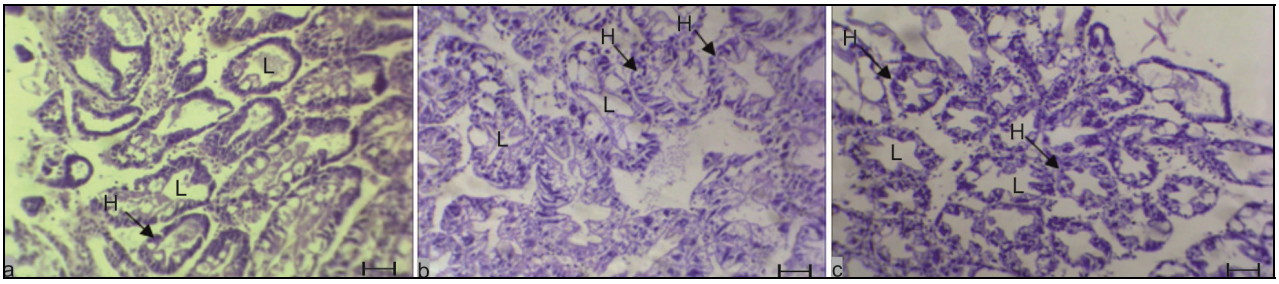


Рис. 3. Гепатопанкреас *P. virginalis*, канальні в поперечному перерізі:
a – дослід із цинком, *b* – дослід із кадмієм, *c* – контроль; *H* – часточка гепатопанкреаса, *L* – просвіт гепатопанкреаса; bar – 10 μm

Таблиця 3
Гістометричні показники гепатопанкреаса
P. virginalis (x ± SD, n = 100)

Показники	Контроль	Дослід із Zn	Дослід із Cd
Чвсточка гепатопанкреаса, мкм^2	164,5 ± 1,92	185,5 ± 0,71***	268,9 ± 2,92***
Просвіт гепатопанкреаса, мкм^2	39,0 ± 0,11	54,1 ± 0,42***	56,4 ± 1,13***

Примітка: *** – різниця достовірна за P < 0,001.

Дослідження гепатопанкреаса мармурових раків показали достовірні зміни у гістологічній структурі тканини. Важкі метали впливали на форму частинок гепатопанкреаса та величину просвіту залози. Іони цинку та кадмію викликали деформацію залозистих відділів залози та вивідних проток.

Обговорення

Мармурові раки – чужорідні гідробіонти, які потрапили до водойм Дніпропетровської області в 2015 році (Novitsky and Son, 2016). Оскільки популяції *P. virginalis* складаються винятково з партеногенетичних самок (Martin et al., 2010a, 2010b; Faulkes, 2015; Martin et al., 2016), вони виступають потенційними інвазійними видами, які можуть пристосуватися до умов водойм Придніпров'я. У зв'язку з тим, що водні екосистеми Придніпров'я значно забрудненні важкими металами (Fedonenko et al., 2012), вселені ракоподібні можуть або загинути, не витримавши тиску антропогенних чинників, або адаптуватися до нових умов існування. При цьому процес адаптації, який відбувається на клітинному рівні, створює передумови виживання популяції *P. virginalis* (Holoborodko et al., 2016).

В організм гідробіонтів, у тому числі й мармурових раків, можуть потрапляти лише розчинені у воді важкі метали (Fedonenko et al., 2010). Як правило, до найдоступніших для водяних тварин форм цих токсикантів належать акваіони, у той час, коли їх високомолекулярні сполуки біологічно неактивні. Важливе питання щодо впливу важких металів на органи та тканини ракоподібних, оскільки дослідження гістологічної структури тканин і органів на прикладі мармурових раків дозволяють розробити заходи щодо визначення біомаркерів для біоіндикації стану водного середовища із застосуванням гістологічних методів досліджень.

Дослідження впливу іонів цинку та кадмію на дослідних тварин показали, що вони негативно впливали на масу тіла ракоподібних, їх репродуктивні показники та стан тканин внутрішніх органів. Загибель мармурових раків спостерігали в усіх дослідах із важкими металами. Патологічні зміни фіксували в антенальній залозі та гепатопанкреасі. Іони цинку та кадмію впливали на розміри гландулоцитів та викликали порушення нуклеарного апарату залозистих клітин. Подібні зміни – адаптаційна реакція видільної системи на вплив іонів важких металів. Гістологічне оцінення тканин мармурових раків показало, що найгірший вплив на організм дослідних раків мали іони кадмію, оскільки кадмій належить до найшкідливіших речовин-забруднювачів водного середовища. Навіть залишкові його концентрації здатні викликати незворотні функціональні порушення, деформації, навіть смертність гідробіонтів. За токсичністю для прісноводних риб кадмію належить перше місце. У багатьох країнах світу вміст кадмію у воді жорстко регламентується для різних видів водокористування. Відповідно до рекомендацій експертів ФАО/ВОЗ (Food and Agricultural Organization / World Health Organization) вміст кадмію у питній воді регламентується на рівні 1 мкг/л. Змодельовані концентрації іонів кадмію (0,01 мг/л) викликали загибель частини дослідних раків (27,3%), що вказувало на токсичність кадмію для вищих ракоподібних (Mirenda, 1986; Wigginton and Birge, 2007). Навіть незначні концентрації токсичних речовин викликали помітні зміни у структурі гепатопанкреаса ракоподібних (Benli, 2015), у зв'язку із цим гістологічну структуру гепатопанкреаса можна використовувати як біомаркер фізіологічної реакції та адаптації організму мармурових раків на токсичність середовища.

Висновки

Іони важких металів у модельних концентраціях (цинк – 0,1 мг/л (10 ГДК), кадмій – 0,01 мг/л (2 ГДК)) спричинили загибель гідробіонтів. На 21-шу добу експерименту у досліді із цинком загинуло 18,2% мармурових раків. Найбільшу смертність ракоподібних спостерігали в експерименті з кадмієм – 27,3%.

Цинк і кадмій негативно впливали на репродуктивну систему мармурових раків. Найбільший відсоток самок із відкладеною ікрою відмічали в контролі (29,1%), в експерименті із цинком – 11,1%. У досліді з кадмієм відкладення ікри не спостерігали. За впливу іонів цинку та кадмію достовірно зменшувалася площа

клітин гландулоцитів на 10,4–14,8%. Також спостерігали порушення нуклеарного апарату клітин. За впливу цинку ядра секреторних епітеліоцитів були на 23,6% меншими, а за впливу кадмію – на 17,5%. У досліді та контролі величина ядерно-цитоплазматичного відношення гландулоцитів статистично не різнилася та коливалася в межах 0,29–0,31 одиниць, що вказує на взаємопропорційне зменшення як цитоплазми клітин зеленої залози, так і їх ядер, що викликано впливом важких металів.

Достовірної різниці між розмірами адипоцитів за впливу важких металів в умовах досліду не спостерігали. Розміри жирових клітин коливалися в межах 215–2178 мкм^2, у середньому сягали 872–994 мкм^2. Таким чином, задані концентрації важких металів за експозиції експерименту на 21-шу добу не впливали на гістологічну картину жирової тканини.

Дослідження гепатопанкреаса мармурових раків показали достовірні зміни структури тканини. Важкі метали впливали на форму частинок гепатопанкреаса та величину просвіту. У контролі площа поперечного зрізу дорівнювала 164,5 мкм^2, із просвітом 39,0 мкм^2, у той час, як у досліді із цинком структури гепатопанкреаса були збільшені в 1,2 раза, а в досліді з кадмієм спостерігали найбільше збільшення структурних елементів тканини (в 1,5 раза).

References

Alwes, F., & Scholtz, G. (2006). Stages and other aspects of the embryology of the parthenogenetic Marmorkrebs (Decapoda, Reptantia, Astacida). Development Genes and Evolution, 216(4), 169–184.

Benli, A. C. K. (2015). The influence of etofenprox on narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823): Acute toxicity and sublethal effects on histology, hemolymph parameters, and total hemocyte counts. Environmental Toxicology, 30(8), 887–894.

Bohman, P., Edsman, L., Martin, P., & Scholtz, G. (2013). The first Marmorkrebs (Decapoda: Astacida: Cambaridae) in Scandinavia. BioInvasions Records, 2(3), 227–232.

Chucholl, C., & Pfeiffer, M. (2010). First evidence for an established Marmorkrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) population in Southwestern Germany, in syntopic occurrence with *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). Aquatic Invasions, 5(4), 405–412.

Faulkes, Z. (2010). The spread of the parthenogenetic marbled crayfish, Marmorkrebs (*Procambarus* sp.), in the North American pet trade. Aquatic Invasions, 5(4), 447–450.

Faulkes, Z. (2015). Marmorkrebs (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) are the most popular crayfish in the North American pet trade. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 416, 20–35.

Fedonenko, O. V., Esipova, N. B., Sharamok, T. S., Anania, T. V., Yakovenko, V. A., & Zhezhera, V. A. (2012). Suchasni problemy hidroekolohiyi: Zaporizke vodoskhovyshche [Modern problems in hydroecology: Zaporizhzhya Reservoir], Lira, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).

Fedonenko, O. V., Sharamok, T. S., & Yesipova, N. B. (2010). Raspredelenie svinca i kadmiya v ehkosisteme samarskogo rybovodnogo pruda [Distribution of lead and cadmium in the ecosystem of the Samara fish pond]. Visnyk of Kharkiv National University, 6, 210–216 (in Russian).

Hobbs, H. H. (1942). The crayfishes of Florida. Biological Science Series, 3(2), 1–179.

Holoborodko, K. K., Marenkov, O. M., Gorban ,V. A., & Voronkova, Y. S. (2016). The problem of assessing the viability of invasive species in the conditions of the steppe zone of Ukraine. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 466–472.

Jimenez, A. S., & Faulkes, Z. (2010). Establishment and care of a laboratory colony of parthenogenetic marbled crayfish, Marmorkrebs. Invertebrate Rearing, 1, 10–18.

Kawai, T., & Takahata, M. (2010). The biology of freshwater crayfish. Hokkaido University Press, Sapporo.

Lipták, B., Mrugała, A., Pekárik, L., Mutkovič, A., Gruľa, D., Petrusek, A., & Kouba, A. (2016). Expansion of the marbled crayfish in Slovakia: Beginning of an invasion in the Danube catchment? Journal of Limnology, 75(2), 305–312.

Martin, P., Dorn, N. J., Kawai, T., van der Heiden, C., & Scholtz, G. (2010a). The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870). Contributions to Zoology, 79, 107–118.

Martin, P., Shen, H., Füllner, G., & Scholtz, G. (2010b). The first record of the parthenogenetic Marmorkrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) in the wild in Saxony (Germany) raises the question of its actual threat to European freshwater ecosystems. Aquatic Invasions, 5, 397–403.

Martin, P., Thonagel, S., & Scholtz, G. (2016). The parthenogenetic Marmorkrebs (Malacostraca: Decapoda: Cambaridae) is a triploid organism. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 54(1), 13–21.

Marzano, F. N., Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Piccinini, A., & Gibertini, G. (2009). The first record of the marbled crayfish adds further threats to fresh waters in Italy. Aquatic Invasions, 4(2), 401–404.

Mirenda, R. J. (1986). Toxicity and accumulation of cadmium in the crayfish, *Orconectes virilis* (Hagen). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 15(4), 401–407.

Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., Macconnell, B., & Blazer, V. (2007). Fish histology and histopathology. US Fish and Wildlife Service, Washington.

Novitsky, R. A., & Son, M. O. (2016). The first records of Marmorkrebs [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*] (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Ukraine. Ecologia Montenegrina, 5, 44–46.

Opp, C., Hahn, J., Zitzer, N., & Laufenberg, G. (2015). Heavy metal concentrations in pores and surface waters during the emptying of a small reservoir. Journal of Geoscience and Environment Protection, 3, 66–72.

Patoka, J., Kalous, L., & Kopecký, O. (2015). Imports of ornamental crayfish: The first decade from the Czech Republic's perspective. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 416, 4–13.

Peay, S., Holdich, D. M., & Brickland, J. (2010). Risk assessments of non-indigenous crayfish in Great Britain. Freshwater Crayfish, 17, 109–122.

Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., & Vogt, G. (2003). Parthenogenesis in an outsider crayfish. Nature, 421(6925), 769–873.

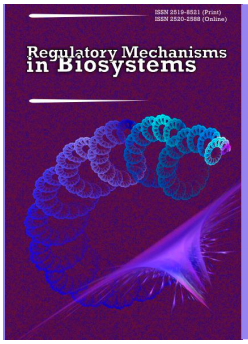
Shields, J. D., & Boyd, R. (2014). Atlas of lobster anatomy and histology. Virginia Institute of Marine Science, Gloucester Point.

Taylor, C. A., Warren, M. L., Fitzpatrick, J. F., Hobbs, H. H., Jezerinac, R. F., Pflieger, W. L., & Robison, H. W. (1996). Conservation status of crayfishes of the United States and Canada. Fisheries, 21(4), 25–38.

Vogt, G. (2010). Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: A review and perspective, with remarks on some further crustaceans. Biogerontology, 11(6), 643–669.

Vogt, G., Falckenhayn, C., Schrimpf, A., Schmid, K., Hanna, K., Panteleit, J., Helm, M., Schulz, R., & Lyko, F. (2015). The marbled crayfish as a paradigm for saltational speciation by autopolyploidy and parthenogenesis in animals. Biology Open, 4(11), 1583–1594.

Wigginton, A. J., & Birge, W. J. (2007). Toxicity of cadmium to six species in two genera of crayfish and the effect of cadmium on molting success. Environmental Toxicology and Chemistry, 26(3), 548–554.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 633–638
doi: 10.15421/021797

Post-pyrogenic changes in vegetation cover and biological soil crust in steppe ecosystems

V. V. Shcherbyna*, I. A. Maltseva**, Y. I. Maltsev**, A. N. Solonenko**

*Tavria State Agrotechnological University, Melitopol, Ukraine
**Melitopol Bohdan Khmelnytskyi State Pedagogical University, Melitopol, Ukraine

Article info

Received 26.09.2017
Received in revised form 07.11.2017
Accepted 14.11.2017

Tavria State Agrotechnological University, B.Khmelnytskyi Ave., 18, Melitopol, 72310, Ukraine.

Melitopol Bohdan Khmelnytskyi State Pedagogical University, Hetmanska str., 20, Melitopol, 72312, Ukraine.
Tel.: +38-097-506-25-20.
E-mail: shcherbyna_vv@ukr.net

Shcherbyna, V. V., Maltseva, I. A., Maltsev, Y. I., & Solonenko, A. N. (2017). Post-pyrogenic changes in vegetation cover and biological soil crust in steppe ecosystems. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 25(4), 633–638. doi:10.15421/011797

The study of the processes of restoration of species richness and productivity of steppe ecosystems after fires is an urgent problem that affects not only the conservation of biodiversity but also the maintenance of pasture resources. This article presents the results of a study of post-pyrogenic effects in steppe ecosystems, taking into account changes in the species composition of cyanoprokaryotes and algae that are art of the biological soil crust, which performs ecologically important functions in xerophytic ecosystems. The investigations were carried out in virgin and post-pyrogenic steppe ecosystems of the "Troitsk Clough" reserve (Zaporizhia region, Ukraine). For three years, the dynamics of the projective cover and the height of the vegetation cover in virgin areas of herbs-fescue-feather-grass and fescue-feather-grass steppes was studied as well as within two ecosystems of post-pyrogenic development after fires that occurred in the spring and winter periods. We discovered that restoration of the herbs-fescue-feather-grass and fescue-feather-grass steppes after fires occurs at different rates. The cause of the slow restoration of vegetation cover can be its severe damage by fire at the beginning of the vegetation season and the development of erosion processes. The number of species of cyanoprokaryotes and algae in the biological soil crust of virgin and post-pyrogenic ecosystems is not significantly different. It varies from 35 to 49 species. The greatest diversity is noted for Cyanoprokaryota. Chlorophyta is in the second place. Among the dominants, the filamentous forms of Cyanoprokaryota prevail. *Nostoc edaphicum* was noted as a nitrogen fixing representative. The similarity of the species lists of cyanoprokaryotes and algae of post-pyrogenic and virgin ecosystems, according to the calculated Jaccard coefficient, varies from 49.1% to 55.3%. This indicates a strong specificity of the composition of cyanoprokaryotes and algae in post-pyrogenic biological soil crusts. Changes in their composition reflect different stages of post-pyrogenic succession. In the first year after a fire, there is a slight increase in species richness, which is a consequence of the favorable effect of increasing the amount of mineral substances in the soil after the organic matter has burned out. The "pioneer" group includes: *Phormidium autumnale*, *Ph. dimorphum*, *Ph. retzii*, *Ph.* (*Leptolyngbya*) *henningsii*, *Luticola mutica*, *Hantzschia amphioxys*. Gradually this effect is leveled and the species richness of cyanoprokaryotes and algae is stabilized at a level peculiar for this type of ecosystem.

Keywords: steppe; fire; algae; cyanoprokaryotes; projective cover; biological soil crust; post-pyrogenic succession

Introduction

Fires in ecosystems formed by grasses is a fairly common phenomenon associated with the effects of natural and anthropogenic factors (Kolomiiets and Burda, 2007; Scheintaub et al., 2009; Clark et al., 2016). The study of the processes of restoration of their species richness and productivity after fires is a relevant problem considering the interests of not only the conservation of biodiversity but also the maintenance of pasture resources.

It is believed that the pyrogenic factor has a significant influence on the formation and evolution of the grass ecosystems, directing the natural selection to increase the fire resistance of biological diversity, the ability to quickly and most effectively use the changed environmental conditions (salinity of the soil cover, hydrothermal and geochemical regimes, etc.) for recovery, growth and development (Lysenko, 2008; Cleary et al., 2010; Buc, 2012). Changes that occur after fires in grass ecosystems have become the basis for working out the models with different scenarios of vegetation burning to control the productivity and species composition of pasture vegetation (Allen et al., 2011; Strong et al., 2013; Fonseca et al., 2017).

The occurrence and spread of fire leads to changes in all components of ecosystems. Their recovery is realized by successive digressive-demutational changes, the study of which has received considerable attention (Kolomiiets and Burda, 2007; Havrylenko, 2011; Buc, 2012). Y. Odum singles out the changes of ecosystems after a fire in a separate group of post-pyrogenic successions, calling them "pulsating stable successions". Peculiarities of pyrogenic changes and demutational processes are caused both by the specifics of ecosystem components and by the scale, intensity, time of occurrence of fires and other factors (Scherbina et al., 2014; Savadogo et al., 2017).

In the literature, there is a lot of data on the analysis of postpyrogenic transformations of soil (Vermeire et al., 2011; Rau et al., 2014; Qi et al., 2017), phytocenoses (Tooth and Leishman, 2013; Reed-Dustin et al., 2016), zoocenoses (Mordkovich et al., 2007; Morgun, 2010). The changes that occur in coenoses of soil microorganisms under the influence of fires, including algae communities (Chumacheva, 2001;

Myers and Davis, 2003; Pivovarova and Chumacheva, 2004) are much less studied. The latter are considered as an integral part of biological soil crusts, performing important ecological functions in grass ecosystems and, especially, in their xerophytic variants (Maestre et al., 2002; Belnap, 2002; Dettweiler-Robinson et al., 2013).

Soil algae and cyanoprokaryotes are pioneers of settling intrusions. Therefore, they can be the indicators of processes occurring in ecosystems immediately after fires and reflect the dynamics of their restoration from pyrogenic transformation. The data, obtained during the research presented in this article can be used in subsequent studies of post-pyrogenic territories, working out the scenarios of controlling their productivity and biodiversity processes. The aim of our research was to study post-pyrogenic effects in steppe ecosystems, taking into account the changes in the species composition of cyanoprokaryotes and algae included in the biological soil crust composition.

Materials and methods

Steppe ecosystems have been preserved in the territory of Ukraine mainly in protected areas. For their protection, a variety of different modes are used: from creation of strict nature reserve creation to the use of natural steppe areas as hayfields and for grazing. Our study of post-pyrogenic changes was conducted on the steppe plots of the local reserve "Troitsk Clough" (Zaporizhia region, Ukraine) under the conditions of herbs-fescue-feather-grass steppe (PP 1) and fescue-feather-grass steppe (PP 2) as well as within two ecosystems of post-pyrogenic development following 2009 (PP 3) and 2010 (PP 4) fires over 3 years in different seasons of the year. To evaluate post-pyrogenic changes, the projective cover and height of vegetation cover of virgin steppe and post-pyrogenic areas were investigated. To study the composition of cyanoprokaryotes and algae in the biological soil crust of steppe ecosystems, soil samples were selected in compliance with all requirements for microbiological studies. The methodology proposed by M. M. Golerbach and E. A. Shtyna (1969) was applied. Determining species composition of algae and cyanoprokaryotes was performed by using an optical microscope XSP-128V (lens 4x, 10x, 40x, 100x) involving the following culture methods: method of ground crops with glasses fouling batch culture, method of enrichment cultures on agar nutrient environment and method of pure cultures (Kostikov et al., 2001). Allologically pure cultures were defined by using a stereoscopic microscope MBS 1.

Identifying the species belonging to the algae of the Cyanoprocaryota (Cyanophyta), Chlorophyta, Xanthophyta and Eustigmatophyta groups was realized through the study of living cultures, which helped to determine identifiably significant characteristics of the algae of corresponding groups. Cytochemical reactions were used if needed. The research is based on the system of falgae classificatio, which is proposed in the monograph "Algae of Soils of Ukraine: History and Methods of Research, System, Constellation of Flora" (Kostikov et al., 2001).

On the basis of the cultures with fouling glasses, which are considered to be the closest to natural conditions, the dominants and the subdominants were determined by using a seven-point scale of abundance. The species with abundance score of 7 and 6 were considered to be dominants. The obtained data were analyzed by using the methods of comparative floristics. Mathematical analysis of the study results was conducted in Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA).

Results

Within the local reserve "Troitsk Clough" the plots of herbs-fescue-feather-grass and fescue-feather-grass steppes two sample plots PP 1 and PP 2 were selected as reference areas. The studied ecosystems differed in composition, projective cover, height of high altitude vegetation and were located at the top part of a slope of the northern exposure (Table 1). There is no step-bed. There is occurence of water erosion of the soil.

Table 1

Projective cover and height of vegetation cover of etalon and post-pyrogenic ecosystems of the reserve "Troitsk Clough" in the years and seasons of the study (M ± m, n = 6)

Criteria	2009	2010			2011		
	autumn	spring	summer	autumn	spring	summer	autumn
PP 1. Virgin steppe. Herbs-fescue-feather-grass							
Projective cover, %	71.3 ± 4.1	69.1 ± 3.2	68.6 ± 3.9	72.3 ± 2.5	69.3 ± 2.9	69.2 ± 2.2	70.8 ± 4.2
Height of vegetation cover, cm	80.0 ± 5.9	90.2 ± 11.3	70.2 ± 4.3	95.6 ± 6.8	80.3 ± 5.1	60.7 ± 3.7	82.3 ± 4.1
PP 2, Virgin steppe. Fescue- feather-grass steppe							
Projective cover, %	59.5 ± 3.1	60.6 ± 4.2	62.2 ± 2.2	54.2 ± 3.7	69.3 ± 6.5	54.3 ± 4.2	58.6 ± 4.7
Height of vegetation cover, cm	65.1 5.1	60.9 ± 4.7	73.6 ± 9.6	72.8 ± 4.8	55.3 ± 3.7	68.9 ± 7.8	59.3 ± 3.5
PP 3. Virgin steppe. Post-pyrogenic succession of winter fire in 2009							
Projective cover, %	42.3 ± 6.2	70.3 ± 5.2	68.6 ± 4.7	72.3 ± 4.7	69.3 ± 4.2	69.2 ± 5.7	70.8 ± 6.2
Height of vegetation cover, cm	63.0 ± 3.7	90.3 ± 5.0	70.2 ± 8.4	95.6 ± 9.3	80.3 ± 4.5	60.7 ± 3.6	82.3 ± 7.1
PP 4. Virgin steppe. Post-pyrogenic succession of spring fire in 2010							
Projective cover, %	–*	0	6.2 ± 0.5	10.6 ± 1.8	10.8 ± 1.6	12.3 ± 0.8	10.1 ± 0.7
Height of vegetation cover, cm	– .	0	22.3 ± 2.7	26.8 ± 3.1	28.7 ± 2.7	25.3 ± 3.0	24.6 ± 3.7

Note: M – arithmetic mean; m – error of arithmetic mean; n – general sampling; * – research was not realized.

According to the principle of geobotanical zoning, the researched object of Ukraine's nature reserve fund lies within the Euro-Asian steppe region, the Black Sea steppe province, Priazovsko-Black Sea steppe subprovince in the band of fescue-feather grass steppes. Fescue-feathergrass steppes are characterized by a predominance of xerophilic turf grasses with poor xerophilic grasses of such typical species as *Ferula orientalis* L., *Verbascum phoeniceum* L., *Carduus uncinatus* Bieb., *Tanacetum millefolium* (L.) Tzvel and others.

The higher vegetation flora of "Troitsk Clough" numbers about 450 species. Its territory is dominated by steppe vegetation (class Festuco-Brometea) with domination of *Stipa lessingiana* Trin. et Rupr., *Stipa capillata* L., *Stipa ucrainica* P. Smirn, *Agropyron pectinatum* (Beib.) Beauv., *Festuca valesiaca* Gaud. The site is one of the most important localities in Ukraine for *Calophaca wolgarica* (L. fil.) DC, *Cymbochasma borysthenica* (Pall. ex Schlecht.) Klok. et Zoz, *Allium pervestitum* Klok., *Elytrigia stipifolia* (Czern. ex Nevski) Nevski, *Caragana scythica* (Kom.) Pojark, *Centaurea talievii* Kleopow, *Astragalus pallescens* Bieb., *Eremogone rigida* (M. Bieb.) Fenzl. Many other rare species grow there, including endemic ones: *Bellevala sarmatica* (Georgi) Woronow (forms fragments of groupings), *Dianthus carbonatus* Klokov, *D. guttatus* Beib, *D. platyodon* Klok, *Minuartia leiosperma* Klok, *Stipa ucrainica*, *Veronica sclerophylla*. Kotov. Significant populations on the steppe part of the clough are formed by *Adonis vernalis* L. (Kolomiichuk et al., 2012).

Within the territory of the reserve, the strict nature reserve regime has not been introduced, therefore it is used by the local population as a pasture, which, along with fires, creates additional threats to biodiversity and productivity. According to the results of the conducted studies in PP 1 in the composition of biological soil crusts, 38 species of algae and cyanoprokaryotes were identified, belonging to 5 groups: Cyanoprokaryota – 21 (55.3%), Eustigmatophyta – 1 (2.6%), Xanthophyta – 1 (2.6%), Bacillariophyta – 6 (15.8%) and Chlorophyta – 9 species (23.7%).

The leading families are Phormidiaceae (10 species), Pseudanabaenaceae (6) and Bacillariaceae (3), which combine 50.0% of the group. The special attention should be given to the genera: *Phormidium* Kützing ex Gomont (10 species), *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komarek

(5), *Nostoc* Vaucher exBornet et Flahault (3) and *Nitzschia* Hassal (2). Dominant among cyanoprokaryotes and eukaryotic algae in the biological soil crust were: *Phormidium valderiae* (Delp.) Geitler, *Ph. bohneri* Schmidle, *Leptolyngbya foveolarum* (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis et Komarek, *Nostoc edaphicum* Kondratyeva, *Leptosira terricola* (Bristol) Printz, *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova and *Heterococcus viridis* Chodat.

In biological soil crust of ecosystem of the fescue-feather grass steppe (PP 2), 35 species of 5 groups were identified: Cyanoprocaryota – 20 (57.1%), Eustigmatophyta – 1 (2.9%), Xanthophyta – 2 (5.7%), Bacillariophyta – 6 (17.1%) and Chlorophyta – 6 species (17.1%). The leading families include Phormidiaceae (11 species), Pseudanabaenaceae (5) and Bacillariaceae (3), which combine 54.3% of the species of the group. The leading genera are: *Phormidium* (11 species), *Leptolyngbya* (5), *Nostoc*, *Chlorococcum* Meneghini and *Nitzschia* (2 species).

The dominants included *Eustigmatos magnus* (Petersen) Hibberd, *Heterococcus viridis*, *Phormidium autumnale* (Agardh) Gomont, *Ph.* (*Leptolyngbya*) *henningsii* Lemmermann, *Leptolyngbya foveolarum* (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis et Komarek, *Nostoc edaphicum*, *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow in Celeve et Grunow, *Bracteacoccus minor*.

In total, within the reference geobiocoenosis of the local reserve "Troitsk Clough" in biological soil crusts there were identified 49 species of cyanoprokaryotes and eukaryotic algae that belonged to 5 groups: Cyanoprocaryota – 27 (55.1%), Eustigmatophyta – 2 (4.1%), Xanthophyta – 2 (4,1 %), Bacillariophyta – 6 (12.2%) and Chlorophyta – 12 species (24.5%). In the composition of biological soil crusts of etalon ecosystems, about 30% of the species composition is formed by representatives of the family Phormidiaceae. The number of species in the families Pseudanabaenaceae and Bacillariaceae, belonging to the leading ones in the abovementioned biological soil crust is close.

In the local reserve "Troitsk Clough", the study of two geobiocoenoses of post-pyrogenic development from fires in 2009 (PP 3) and 2010 (PP 4) was conducted. The relevant sites were on the slope of the northern (PP 4) and southern exposure (PP 3). The studied ecosystems differed in composition, projective cover, height of higher vegetation (Table 1). 35 species of algae and cyanoprokaryotes from 5 groups were identified in the biological soil crusts composition on the PP 3, which was laid on the territory of the geobiocoenoses of post-pyrogenic development from the fire in 2009: Cyanoprocaryota – 20 species (57.1%), Eustigmatophyta – 1 (2.9%), Xanthophyta – 1 (2.9%), Bacillariophyta – 5 (14.3%) and Chlorophyta – 8 (22.9%). The leading families include Phormidiaceae (11 species), Pseudanabaenaceae (6), Chlorococaceae and Bacillariaceae (3 species of each), which combine 65.7% of species. Among the leading genera are *Phormidium* (11 species), *Leptolyngbya* (5), *Chlorococcum* and *Nitzschia* (2 species in each). The dominant species of post-pyrogenic biological soil crust among algae and cyanoprocariots in this plot were the following: *Heterococcus viridis*, *Phormidium retzii* (Agardh) Gomont, *Phormidium paulsenianum* B. Petersen, *Ph. bohneri*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Chlorococcum chlorococcoides* (Korschikov) Philipose, *Eustigmatos magnus*.

On the territory of the ecosystem of post-pyrogenic development from the fire in 2010 (PP 4) 41 species of algae from 5 groups were noted in the composition of biological soil crust: Cyanoprocaryota – 22 (53.7%), Eustigmatophyta – 1 (2.4%), Xanthophyta – 2 (4.9%), Bacillariophyta – 6 (14.6%) and Chlorophyta – 10 (24.4%). The leading families are Phormidiaceae (11 species), Pseudanabaenaceae (6), Bacillariaceae, Naviculaceae (3 species in each) and Chlorosarcinaceae (2) within the area of post-pyrogenic development and combine 61.0% of species. The leading genera are *Phormidium* (11 species), *Leptolyngbya* (4), *Nostoc* (3), *Chlorosarcinopsis* Herndon and *Nitzschia* (2 species in each).

The dominants were represented by the species *Heterococcus viridis, Phormidium retzii*, *Ph.* (*Leptolyngbya) henningsii, Leptolyngbya foveolarum, Leptolyngbya fragilis* (Gomont) Anagnostidis et Komarek, *Nostoc edaphicum*, *Parietochloris pseudoalveolaris* (Deason et Bold) Watanabe et Floyd in Deason et al., *Eustigmatos magnus*. 51 species of algae and cyanoprokaryotes belonging to five groups: Cyanoprocaryota – 25 (49.1%), Eustigmatophyta – 1 (1.9%), Xanthophyta – 2 (3.9%), Bacillariophyta – 6 (11.8%) and Chlorophyta – 17 (33.3%) were recorded overall in the biological soil crusts of post-pyrogenic ecosystems of "Troitsk Clough" reserve.

The calculated Jaccard index of commonality for the complete algal species list indicates an average specificity of the algae composition of the studied ecotopes in the post-pyrogenic and etalon ecosystems of the "Troitsk Clough" reserve (Table 2).

Table 2
Similarity of species composition of algae groups in different ecosystems according to the community coefficient of Jaccard

Sampling area	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4
PP 1	38	52.1	55.3	49.1
PP 2	25	35	52.2	55.1
PP 3	26	24	35	49.0
PP 4	26	27	25	41

Note: diagonally – the number of species in the group, in the upper corner – the value of the community of Jaccard coefficient, in the lower corner – the number of common species in the comparable groups.

Discussion

The restoration of steppe ecosystems after fires in general occurs according to the scenario typical for other ecosystems formed by grasses. A number of researchers note an increase in the productivity of grass ecosystems after a fire (Limb et al., 2016; Gates et al., 2017). There is information about increasing the participation of perennial grasses and reducing annual grasses, the positive response of legumes (Scheintaub et al., 2009). At the same time, evaluating the consequences of fires for grass ecosystems is not single-valued. The positive effect in post-pyrogenic changes may be absent. In most cases, negative manifestations are limited within a two-year period (Limb et al., 2016; Gates et al., 2017). Fire, combined with subsequent grazing, can lead to the disappearance of the most sensitive plant species (Clark et al., 2016). Therefore, outside well-studied ecosystems, the application of the obtained results should be restricted. This should be taken into account in the case of the planned burning out of grass ecosystems in order to increase their productivity (Scheintaub et al., 2009; Allen et al., 2011; Miller et al., 2017). The consequences of uncontrolled fires for an ecosystem depend on the season of the fire, its scale, intensity, frequency etc. (Ford and Johnson, 2006; Strong et al., 2013; Scherbina et al., 2014).

The investigated post-pyrogenic steppe ecosystems have a different rate of restoration of the projective cover by higher plants (Table 1). If in the plot PP 3 after the winter fire there was a rapid restoration to the virgin steppe indicators, then in PP 4, this process was very slow. The reason for the slow restoration of vegetation cover can be its severe damage by fire at the beginning of vegetation and the development of erosion processes. The high sensitivity of perennial grasses to fires during the growing season is also noted by Ford and Johnson (2006). Restoration processes of vegetation cover after fires occur simultaneously with the renewal of soil functions, vital activity of soil microorganisms and organisms in biological soil crusts (Liu et al., 2010; Limb et al., 2016).

In steppe ecosystems, as well as in other xerophytic ecosystems, biological soil crusts often are created on or below the soil surface (Langhans et al., 2010). They include cyanoprokaryotes, eukaryotic algae, mosses, lichens and fungi that connect soil particles. The thickness of such crusts is usually measured in several millimeters. Some types of filamentous cyanoprokaryotes can permeate the topsoil to a depth of 10 cm (Belnap and Gardner, 1993), increasing the thickness of the crust. It is known that the spread of algae and cyanoprokaryotes in the soil is not limited to this depth. Their living cells have been found at the depth of 120 cm (Maltseva and Pysanets 2004; Shekhovtseva and Maltseva 2015; Maltseva et al., 2017) and more (Gollerbah and Shtina, 1969). They are diffusely dispersed along the soil profile and cannot perform functions peculiar to biological soil crust.

The results of the latest research on algae and cyanoprokaryotes of virgin steppe ecosystems in Ukraine are reported in the works Maltseva (2003), Maltseva and Pisanets (2004), Baranova et al. (2009), Baranova and Maltseva (2009), Shcherbyna (2014, 2015), Maltseva and Shcherbyna (2011), Shcherbyna et al. (2014). This work has contributed to the

preliminary evaluation of the species richness of algae and cyanoprokaryotes of zonal and azonal soils, description of new areas of rare and widespread algae species, updated and supplemented existing data.

Many printed works are devoted to the ecology-coenological direction and contain information about the peculiarities of algae and cyanoprokaryotes of the steppe zone, whose dynamics are observed in accordance with soil conditions, the type of vegetation and other components and elements of ecosystems. In general, the features of the floral composition of algae and cyanoprokaryotes of zonal steppe ecosystems have been defined on the territory of Ukraine (Kostikov et al., 2001; Chumacheva, 2001; Pivovarova and Chumacheva 2004), as well as beyond its borders. One more direction has been presented by the study of algae and cyanoprokaryotes in the composition of biological soil crusts (Belnap, 2002; Ford and Johnson 2006; Langhans et al., 2009). It was found that the formation of biological soil crust on the soil surface of xerophytic ecosystems is carried out in stages (Dettweiler-Robinson et al., 2013). Cyanoprokaryotes and eukaryotic algae appear first, then lichens and mosses do. When destruction occurs, the rate of biological soil crust restoration differs. Crusts are most quickly restored after fires (Myers and Davis, 2003). This is confirmed by our research. On the plot burnt in the spring of 2010, in the summer period the species of Cyanoprocaryota, Bacillariophyta and isolated species of Chlorophyta were already observed. The "pioneer" group includes: *Phormidium autumnale*, *Ph. dimorphum* Lemmermann, *Ph. retzii*, *Ph.* (*Leptolyngbya*) *henningsii*, *Luticola mutica* Kutzing Mann in Round et al., *Hantzschia amphioxys*. The appearance of higher plants did not compensate the severe ecotopic conditions and did not contribute to the rapid increase in the diversity of cyanoprokaryotes and algae. The maximum species richness was noted in the spring of the second year after the fire. In general, the diversity of species of algae and cyanoprokaryotes reaches the highest values in the first two years after a fire and then decreases to values peculiar to the virgin steppe. In the initial period after a fire, the active development of algae and cyanoprokaryotes is facilitated by the appearance of easily accessible mineral compounds after the organic mass burning out, by the absence of shading from higher plants and steppe litter. Gradually this effect fades away; the species diversity of algae and cyanoprokaryotes is established in a range typical for this type of ecosystem. In our studies, the most susceptible to soil sod formation were Cyanoprocaryota (the correlation coefficient varied from –0.861 to –0.947).

In the study of biological soil crusts, as Tanja Margrit Langhans and co-authors (2010) note, the species composition analysis of the organisms that make up their composition is very rarely done. This limits the possibility of interpreting the obtained data. In our research the similarity of the algae and cyanoprokaryotes in biological soil crust species lists of post-pyrogenic and etalon ecosystems of the "Troitsk Clough" reserve is 49.0% by the value of the Jaccard coefficient, which confirms the average indicators of their similarity (Table 2).

According to the taxonomic structure of algae and cyanoprokaryotes, the etalon ecosystems are very similar to the post-pyrogenic ones. Cyanoprocaryota prevail in all of them without exception. The share of algae of the groups Eustigmatophyta, Xanthophyta and Bacillariophyta is almost unchanged. Green algae occupy the second place by number of species. Families of Phormidiaceae, Pseudanabaenaceae and Bacillariaceae are among the leading both in virgin areas and in post-pyrogenic geobiocoenoses. The return of the Nostoc genus to the list of leading genera on the area of post-pyrogenic restoration after the 2010 fire is in line with the results of studies by other authors, who during the study of the effects of fires on the state of microbiocenoses of the soil indicated the increase in the number of microorganisms in the nitrogen cycle: mineral nitrogen immobilizers, oligonitrophils, denitrification agents (Malinovskaia, 2012). They associated it with the entry of mineral substances into the soil after the fire. The results of algae studies of post-pyrogenic areas also indicate the activation of nitrogen-fixing Cyanoprocaryota (Pivovarova and Chumacheva, 2001).

The restoration of biological soil crust in xerophytic ecosystems is of great importance for their functioning. A fire occurring not in the vegetation season has a slight effect on perennial grasses, but maximally destroys the biological soil crusts. Their destruction worsens soil resistance to wind and water erosion (Hu et al., 2002; Bowker et al., 2004; Zhang et al., 2006; Jimenez-Aguilar et al., 2009), accompanied by loss of C and N due to water erosion (Barger et al., 2006) and a reduction in humus content (Langhans et al., 2010).

The studied ecosystems (both virgin and post-pyrogenic) are located on slopes. The increase in the diversity of algae and cyanoprokaryotes in the early stages of the formation of biological soil crust occurred against the background of overcoming the phenomena of flushing. The main role in fixing the surface of the soil was played by filamentous species of Cyanoprocaryota. Their anti-erosion role is shown in other ecosystems as well (Hu et al., 2002; Bowker et al., 2004; Jimenez-Aguilar et al., 2009).

Another interesting effect of the absence in the first stages of post-pyrogenic successions and the gradual formation of a typical biological soil crust for a particular ecosystem is the influence of biological soil crusts on seed germination and emergence (Langhans et al., 2009). It is indicated that the biological soil crusts can influence the penetration of seeds into deep soil layers, promote emergence by means of increasing moisture, nutrient content (Maestre et al., 2002; Liu et al., 2006). There is also evidence that biological soil crust may act as an inhibitor to higher plants (Escudero et al., 2007). The role of each of the components of biological soil crusts in the manifestation of these effects has not been sufficiently studied. Concerning cyanoprokaryotes that are part of the biological soil crust, it is known that some of them are capable of activating the beneficial and inhibiting the pathogenic microflora, altering the fermentative activity of the soil, etc., thereby stimulating the germination of the seeds of higher plants (Maltsev, 2015; Maltsev et al., 2017).

Taking this into account, it can be assumed that post-pyrogenic successions of higher plants and organisms that make up the biological soil crusts are coordinated and interdependent. Detailed study of this issue will allow us to reach a new level of control of restoration processes in post-pyrogenic ecosystems.

Conclusions

Restoration of the herbs-fescue-feather-grass and fescue-feather-grass steppes after fire occurs at different rates. The cause of the slow restoration of vegetation cover can be its severe damage by fire at the beginning of the vegetation season and the development of erosion processes.

The surface layer of the soil of virgin and post-pyrogenic steppe ecosystems is populated by cyanoprokaryotes and eukaryotic algae. They are the part of the biological soil crust, which performs important ecological functions in xerophytic steppe ecosystems: it increases the erosion resistance of the soil surface, enriches the soil with organic matter, increases the nitrogen content in the soil due to nitrogen fixation, affects the germination of seeds, etc.

The number of species of cyanoprokaryotes and algae in biological soil crusts of virgin and post-pyrogenic ecosystems is not significantly different. It varies from 35 to 49 species. The greatest diversity is noted for Cyanoprocaryota. Chlorophyta is in the second place. Among the dominants, the filamentous forms of Cyanoprocaryota prevail. *Nostoc edaphicum* was noted as a nitrogen fixing representative.

The similarity of the species lists of cyanoprokaryotes and algae of post-pyrogenic and virgin ecosystems, according to the calculated Jaccard coefficient, varies from 49.1 to 55.3%. This indicates a strong specificity of the composition of cyanoprokaryotes and algae in post-pyrogenic biological soil crust. Changes in their composition reflect different stages of post-pyrogenic succession. In the first year after the fire, there is a slight increase in species richness, which is a consequence of the favorable effect of increasing the amount of mineral substances in the soil after the organic matter has burned out. The "pioneer" group includes: *Phormidium autumnale*, *Ph. dimorphum*, *Ph. retzii*, *Ph.* (*Leptolyngbya*) *henningsii*, *Luticola mutica*, *Hantzschia amphioxys*. Gradually this effect is leveled and the species richness of cyanoprokaryotes and algae is stabilized at a level peculiar for this type of ecosystem.

References

Allen, E. B., Steers, R. J., & Dickens, S. J. (2011). Impacts of fire and invasive species on desert soil ecology. Rangeland Ecology and Management, 64(5), 450–462.

Baranova, O. O., & Maltseva, I. A. (2009). Gruntovi vodorosti khvostoskhovyshcha ta prylehlykh terytorii na Kryvorizhzhi [Soil algae of tailing dumps and adjacent territories of Kryvbas]. Gruntoznavstvo, 10(3–4), 93–98 (in Ukrainian).

Baranova, O. O., Kvitko, M. O., & Maltseva, I. A. (2009). Alhouhrupovannia stepovykh fitotsenoziv zakaznyka "Balka Pivnichna Chervona" na Kryvorizhzhi [Algae groups of steppe phytocoenoses of reserve "Gorge north red" of Kryvbas]. Visnyk Harkivs'kogo Nacional'nogo Agrarnogo Universytetu. Seriia Biolohiia, 1, 106–110 (in Ukrainian).

Barger, N. N., Herrick, J. E., Van Zee, J., & Belnap, J. (2006). Impacts of biological soil crust disturbance and composition on C and N loss from water erosion. Biogeochemistry, 77, 247–263.

Belnap, J. (2002). Impacts of off-road vehicles on nitrogen cycles in biological soil crusts: Resistance in different U. S. deserts. Journal of Arid Environments, 52(2), 155–165.

Belnap, J., & Gardner, J. S. (1993). Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: The role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. The Great Basin Naturalist, 53(1), 40–47.

Bowker, M., Belnap, J., Rosentreter, R., & Graham, B. (2004). Wildfire-resistant biological soil crusts and fire-induced loss of soil stability in Palouse prairies, USA. Applied Soil Ecology, 26(1), 41–52.

Buc, J. V. (2012). Pirogenna relaksija geosistem [Pyrogenic relaxation of geosystems]. Ljudina ta dovkillja. Problemi Neoekologii, 1–2, 71–76 (in Ukrainian).

Chumacheva, N. M. (2001). Strategija vosstanovlenija al'gogruppirovok posle nizovogo pozhara [The starategy of algae groupings remediation after the creeping fire]. Sibirskij Ekologicheskij Zhurnal, 4, 449–454 (in Russian).

Clark, P. E., Williams, C. J., Pierson, F. B., & Hardegree, S. P. (2016). Postfire grazing management effects on mesic sagebrush-steppe vegetation: Spring grazing. Journal of Arid Environments, 132, 49–59.

Cleary, M. B., Pendall, E., & Ewers, B. E. (2010). Aboveground and belowground carbon pools after fire in mountain big sagebrush steppe. Rangeland Ecology and Management, 63(2), 187–196.

Dettweiler-Robinson, E., Bakker, J. D., & Grace, J. B. (2013). Controls of biological soil crust cover and composition shift with succession in sagebrush shrub-steppe. Journal of Arid Environments, 94, 96–104.

Escudero, A., Martinez, I., de la Cruz, A., Otalora, M. A. G., & Maestre, F. T. (2007). Soil lichens have species-specific effects on the seedling emergence of three gypsophile plant species. Journal of Arid Environments, 70, 18–28.

Fonseca, F., Figueire, T., Nogueira, C., & Queiros, A. (2017). Effect of prescribed fire on soil properties and soil erosion in a mediterranean mountain area. Geoderma, 300, 172–180.

Ford, P. L., & Johnson, G. V. (2006). Effects of dormant-vs. growing-season fire in shortgrass steppe: Biological soil crust and perennial grass responses. Journal of Arid Environments, 67(1), 1–14.

Gates, E. A., Vermeire, L. T., Marlow, C. B., & Waterman, R. C. (2017). Fire and season of postfire defoliation effects on biomass, composition, and cover in mixed-grass prairie. Rangeland Ecology and Management, 70(4), 430–436.

Gollerbah, M. M., & Shtina, E. A. (1969). Pochvennyie vodorosli [Soil algae]. Nauka, Leningrad (in Russian).

Havrylenko, V. S. (2011). Systema zapobihannia stepovykh pozhezh, prychyny yikh vynyknennia ta sposoby hasinnia v Biosfernomu zapovidnyku "Askaniia-Nova" [A system of prevention of steppe fires, origin of the fires and methods of fire extinguishing in the biosphere reserve "Askania-Nova"]. Visti Biosfernoho Zapovidnyka Askaniia-Nova, 13, 64–77 (in Ukrainian).

Hu, C. X., Liu, Y. D., Song, L. R., & Zhang, D. L. (2002). Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. Journal of Applied Phycology, 14(4), 281–292.

Jimenez-Aguilar, A., Huber-Sannwald, E., Belnap, J., Smart, D. R., & Arredondo-Moreno, J. T. (2009). Biological soil crusts exhibit a dynamic response to seasonal rain and release from grazing with implications for soil stability. Journal of Arid Environments, 73(12), 1158–1169.

Kolomiichuk, V. P., Onyshchenko, V. A., & Perehrym, M. M. (2012). Vazhlyvi botanichni terytorii Pryazovia [Important botanical areas of the Azov Sea region]. Alterpres, Kyiv (in Ukrainian).

Kolomiiets, H. V., & Burda, R. I. (2007). Postpirohenni demutatsii ekosystem nadrichkovykh piskiv na Mykolaivshchyni [Post-pyrogenic de-mutation of tributary sands ecosystems in Mykolaiv region]. Naukovyi Visnyk Natsionalnoho Ahrarnoho Universytetu, 117, 34–41 (in Ukrainian).

Kostikov, I. Y., Romanenko, P. O., Demchenko, E. M., Dariyenko, T. M., Myhajlyuk, T. I., Rybchynskyj, O. V., & Solonenko, A. M. (2001). Vodorosti hruntiv Ukrainy: Istoriia ta metody doslidzhen, systema, konspekt flory. Fitosotsiotsentr, Kyiv (in Ukrainian).

Langhans, T. M., Storm, C., & Schwabe, A. (2009). Biological soil crusts and their microenvionment: Impact on emergence, survival and establishment of seedlings. Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 204(2), 157–168.

Langhans, T. M., Storm, C., & Schwabe, A. (2010). Regeneration processes of biological soil crusts, macro-cryptogams and vascular plant species after fine-scale disturbance in a temperate region: Recolonization or successional replacement? Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 205(1), 46–60.

Limb, R. F., Fuhlendorf, S. D., Engle, D. M., & Miller, R. F. (2016). Assessment of research on rangeland fire as a management practice. Rangeland Ecology and Management, 69(6), 415–422.

Liu, W. X., Xu, W. X., Hong, J. P., & Wan, S. Q. (2010). Interannual variability of soil microbial biomass and respiration in responses to topography, annual burning and N addition in a semiarid temperate steppe. Geoderma, 158(3–4), 259–267.

Lysenko, G. M. (2008). Pirogennye aspekty abioticheskoj reguljacii stepnyh rezervatnyh jekosistem [Pyrogenic aspects of the abiotic regulation of steppe reserve ecosystems]. Ekologija ta Noosferologija, 19(1–2), 143–147 (in Ukrainian).

Maestre, F. T, Huesca, M., Zaady, E., Bautista, S., & Cortina, J. (2002). Infiltration, penetration resistance and microphytic crust composition in contrasted microsites within a Mediterranean semi-arid steppe. Soil Biology and Biochemistry, 34(6), 895–898.

Malinovskaja, I. M. (2012). Vlijanie pozhara na sostojanie mikrobiocenoza pochvy vos'mi- i dvadcatiletnih zalezhej [Fire influence on the state of microbiocoenosis of eight- and twenty-year deposits soil]. Visnyk Poltavskoi Derzhavnoi Ahrarnoi Akademii, 4, 20–24 (in Russian).

Maltsev, E. Y. (2015). Vlyianye raznkh shtammov roda *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault na rost y razvytye *Pisum sativum* L. [Influense of *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault strains on growth and development of *Pisum sativum* L.]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 5(3), 148–154.

Maltsev, Y. I., Didovich, S. V., & Maltseva, I. A. (2017). Seasonal changes in the communities of microorganisms and algae in the litters of tree plantations in the Steppe zone. Eurasian Soil Science, 50(8), 935–942.

Maltseva, I. A. (2003). Gruntovi vodorosti yak strukturnyi element Velyko-Anadolskoho kulturbioheotsenozu [Soil algae as a structural element of Velyko-Anadol culture biogeocoenosis]. Gruntoznavstvo, 4(1–2), 66–72 (in Ukrainian).

Maltseva, I. A., & Pysanets, Z. H. (2004). Gruntova alhoflora lisovykh i stepovykh fitotsenoziv na terytorii Mariupolskoi doslidnoi stantsii [Soil algae flora of forest and steppe phytocoenoses on the territory of Mariupol research station]. Visnyk Zaporizkoho Derzhavnoho Universytetu, 1, 132–135 (in Ukrainian).

Maltseva, I. A., & Shcherbyna, V. V. (2011). Sezonna dynamika chyselnosti ta biomasy vodorostei deiakykh bioheotsenoziv stepovoi zony pivdnia Ukrainy [The seasonal dynamics of algae population and biomass of some biogeocenosis of a steppe zone in the southern Ukraine]. Visti Biosfernoho Zapovidnyka Askaniia-Nova, 13, 97–100 (in Ukrainian).

Maltseva, I. A., Maltsev, E. I., & Solonenko, A. N. (2017). Vodorosli pochv dubrav stepnoy zonyi Ukrainyi [Algae of the soils of Ukrainian steppe zone groves]. Algologia, 27(3), 323–336 (in Russian).

Miller, R. F., Naugle, D. E., Maestas, J. D., Hagen, C. A., & Halle, G. (2016). Special issue: targeted woodland removal to recover At-Risk Grouse and their Sagebrush-Steppe and prairie ecosystems. Rangeland Ecology and Management, 70(1), 1–8.

Mordkovich, V. G., Ljubechanskij, I. I., & Berezina, O. G. (2007). Problema pozharov i pirogennyh sukcessij soobshhestv pochvennyh chlenistonogih v Sibiri [Forest fire problem and pyrogenic successions of the communities of soil arthopoda in Siberia]. Sibirskij Ekologicheskij Zhurnal, 14(2), 169–181 (in Russian).

Morhun, Y. M. (2010). Osoblyvosti postpirohennoi transformatsii murashnykiv u zapovidnomu stepu Askania-Nova [The peculiarities of postpyrogenic transformation of anthills in the protected steppe Askania-Nova]. Visti Biosfernoho Zapovidnyka Askaniia-Nova, 12, 97–99 (in Ukrainian).

Myers, P. E., & Davis, J. S. (2003). Recolonization of soils by algae in a north central Florida pine forest after controlled fire and soil sterilization. Nova Hedwigia, 76(1–2), 207–219.

Pivovarova, Z. F., & Chumacheva, N. M. (2004). Osobennosti raspredelenija pochvennyh vodoroslej na uchastkah kostrishh [The peculiarities of soil algae distribution on the areas of fireplaces]. Sibirskij Ekologicheskij Zhurnal, 4, 419–422 (in Russian).

Qi, F., Naidu, R., Bolan, N., Dong, Z., Yan, Y., Lamb, D., Bucheli, T., Choppala, G., Duan, L., & Semple, K. (2017). Pyrogenic carbon in Australian soils. Science of the Total Environment, 586, 849–857.

Rau, B. M., Chambers, J. C., Pyke, D. A., Roundy, B. A., Schupp, E. W., Doescher, P., & Caldwell, T. G. (2014). Soil resources influence vegetation and response to fire and fire and fire-surrogate treatments in sagebrush-steppe ecosystems. Rangeland Ecology and Management, 67(5), 506–521.

Reed-Dustin, C. M., Mata-Gonzalez, R., & Rodhouse, T. J. (2016). Long-term fire effect on native and invasive grasses in protected area sagebrush steppe. Rangeland Ecology and Management, 69(4), 257–264.

Savadogo, P. D., Diawara, S., Dayamba, S. D., Sawadogo, L., & Nacro, H. B. (2017). Limited long-term effects of moderate livestock grazing and prescribed early fire on soil and root processes in Sudanian savanna-woodlands, West Africa. Geoderma, 306, 18–27.

Scheintaub, M. R., Derner, J. D., Kelly, E. F., & Knapp, A. K. (2009). Response of the shortgrass steppe plant community to fire. Journal of Arid Environments, 73(12), 1136–1143.

Scherbina, V. V., Maltseva, I. A., & Solonenko, A. N. (2014). Peculiarities of postpyrogene development of algae in steppe biocenoses at Askania Nova National Park. Contemporary Problems of Ecology, 7(2), 187–191.

Shcherbyna, V. V. (2014). Sezonna fluktuatsiia bioiriznomanittia alhouhrupovan tsilynnykh ta antropohenno-porushenykh bioheotsenoziv Pivdennoho stepu Ukrainy [Seasonal fluctuations of algae community biodiversiti of virgin and anthropogenic-broken biogeocenosis south steppe of Ukraine]. Jekosistemy ih Optimizacija i Ohrana, 11(30), 165–167 (in Ukrainian).

Shcherbyna, V. V. (2015). Strukturno-funktsionalni kharakterystyky alhouhrupovannia tsilynnoho typchakovo-kovylovoho stepu Biosfernoho zapovidnyka Askaniia-Nova [Structural-functional descriptions of algae associations of virgin steppe of biosphere reserve of Askaniya-Nova]. Zapovidna Sprava, 21(1), 33–39 (in Ukrainian).

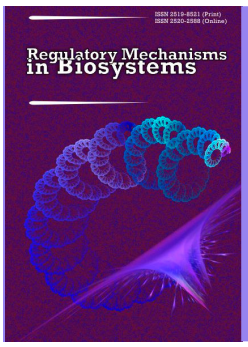
Shekhovtseva, O. G., & Maltseva, I. A. (2015). Physical, chemical, and biological properties of soils in the city of Mariupol, Ukraine. Eurasian Soil Science, 48(12), 1393–1400.

Strong, D. J., Vermeire, L. T., & Ganguli, A. C. (2013). Fire and nitrogen effects on purple threeawn (*Aristida purpurea*) abundance in northern mixed-grass prairie old fields. Rangeland Ecology and Management, 66(5), 553–560.

Tooth, I. M., & Leishman, M. R. (2013). Post-fire resprouting responses of native and exotic grasses from Cumberland Plain Woodland (Sydney, Australia) under elevated carbon dioxide. Austral Ecology, 38(1), 1–10.

Vermeire, L. T., Crowder, J. L., & Wester, D. B. (2011). Plant community and soil environment response to summer fire in the nother great plains. Rangeland Ecology and Management, 64(1), 37–46.

Zhang, Y. M., Wang, H. L., Wang, X. Q., Yang, W. K., Zhang, D. Y. (2006). The microstructure of microbiotic crust and its influence on wind erosion for a sandy soil surface in the Gurbantunggut Desert of Northwestern China. Geoderma, 132(3–4), 441–449.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 639–643
doi: 10.15421/021798

Morphofunctional indicators demonstrated by young students resident in Russia's Northeast

I. V. Averyanova, A. L. Maksimov, S. I. Vdovenko

Scientiic Research Center "Arktika", Fareastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia

Article info

Received 06.10.2017
Received in revised form 14.11.2017
Accepted 16.11.2017

Scientiic Research Center "Arktika", Fareastern Branch of the Russian Academy of Sciences (SRC "Arktika" FEB RAS) Russia.
Tel.: 4132-62-84-82.
E-mail: Inessa1382@mail.ru

Averyanova, I. V., Maksimov, A. L., & Vdovenko, S. I. (2017). Morphofunctional indicators demonstrated by young students resident in Russia's Northeast. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 639–643. doi:10.15421/021798

The specific climatic and geographical conditions of the northern territories of Russia, the relatively small workforce, as well as intensive migration processes require a specific approach with regard to northern regions and, particularly, to the healthcare of the young generation residing in the territory. This study was aimed at exploring the body functionality of the young inhabitants of Russia's Northeast considered as a human rescource for the future in relation to their period of residence in Magadan oblast. Based on the study of cardiovascular, biochemical, lipid and carbohydrate metabolism, psychophysiological characteristics, as well as respiratory system and gas exchange parameters, a comparative examination was carried which involved 1,560 male students aged 17–21. Depending on their period of residence in Magadan oblast, the examined subjects were divided into three groups. Group 1 was presented by newcoming settlers, whites by origin (adaptants), who had migrated from the Central-European or Asian areas of Russia and lived in the northern region for at least 5 years (the zero generation). Group 2 was made up of those young males born and living in Magadan oblast (the 1st generation), whites by origin, who were children of immigrants to the area. Finally, group 3 was representatives of the 2nd generation born and living in Magadan oblast, whose parents were representatives of the 1st generation. We found that people with a longer term of residency in the north had become more optimized in cardiovascular functioning (demonstrate decrease in arterial pressure and more effective myocardial performance), less stressed in external respiration with simultaneous decrease in exhaled heat loss, had normalised lipid metabolism shown through a reduced percentage of deviations in lipidograms as well as the index of atherogenicity and higher functioning of the central nervous system. Besides, having experienced severe climatic conditions they have formed their specific region-related metabolic profile featuring lowered lipid metabolism values and high blood glucose which can be caused by changes in nutrition of city residents. It should be concluded that discovered tendency of adaptive changes demonstrated by north-born young white males enables us to consider it as formation of a new population of inhabitants of the North having the best functional abilities for optimal adaptation to the specific ecological and climatic conditions.

Keywords: young males; cardiovascular system; external breathing function indices; psychophysiological characteristics; physiological systems; biochemical profile

Особенности морфофункциональных показателей юношей-студентов, постоянных жителей Северо-Востока России

И. В. Аверьянова, А. Л. Максимов, С. И. Вдовенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-исследовательский центр «Арктика» Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия

Особые климато-географические условия северных территорий России, относительно низкая численность производственных сил, а также интенсивные миграционные процессы требуют применения особого подхода в отношении территорий Севера, наиболее важным звеном которой должно стать сохранение здоровья подрастающего контингента. Целью данной работы явилось изучение функционального состояния организма молодых жителей как основы будущего человеческого ресурса Северо-Востока России в зависимости от продолжительности проживания на территории Магаданской области. На основании изучения показателей сердечно-сосудистой системы, липидного и углеводного обмена биохимического профиля, психофизиологических характеристик, респираторной системы и газообмена проведено сравнительное изучение 1 560 юношей-студентов возрастом 17–21 год. Обследуемый контингент в зависимости от сроков проживания на территории Магаданской области был поделен на три группы. Первую группу представили приезжие мигранты из числа европеоидов (адаптанты) из центрально-европейских и азиатских районов России со стажем пребывания в северных районах не менее пяти лет (нулевое поколение). Во вторую группу вошли юноши – уроженцы Магаданской области в первом поколении, уроженцы Магаданской области из

числа европеоидов, у которых родители являлись мигрантами, и третью группы составили представители второго поколения – уроженцы Магаданской области, у которых родители являлись представителями первого поколения. Результаты исследования показали, что у лиц с наибольшим стажем проживания в условиях Севера происходит оптимизация в работе сердечно-сосудистой системы (снижение артериального давления и повышение эффективности работы миокарда), снижение напряжения в работе внешнего дыхания при одновременном уменьшении респираторных теплопотерь, нормализация липидного обмена за счет снижения процента отклонений в липидограммах и индекса атерогенности, а также возрастает функциональный уровень центральной нервной системы. Также в процессе проживания в сложных климатических условиях у них происходит формирование особенного регионального состояния метаболического профиля, характеризующегося сниженными концентрациями показателей липидного обмена и повышенным содержанием глюкозы в крови, что, по-видимому, связано с изменением питания современного городского жителя. В заключение необходимо отметить, что выявленная направленность адаптационных перестроек у молодых уроженцев-северян из числа европеоидов позволяет рассматривать это в качестве процесса формирования новой популяции жителей территории Севера, имеющей наибольшие функциональные резервы с точки зрения достижения максимальной адаптации к особенным эколого-климатическим условиям.

Ключевые слова: юноши; сердечно-сосудистая система; показатели газоанализа; функции внешнего дыхания; психофизиологические характеристики; биохимический профиль

Введение

Крайний Север, а также приравненные к нему территории представляют собой обширные районы, которые занимают существенную часть территории России, при этом значительная часть Востока страны характеризуется суровым климатом. В данных областях «высоких широт» формируется особая климато-экологическая обстановка, характеризующаяся низкой среднегодовой температурой, относительно жестким ветровым режимом, преобладанием снежного покрова, сменами полярной ночи и дня, а также высокой активностью гелиокосмических факторов, частыми возмущениями в ионосфере и, как следствие, высокой ионизацией воздуха, напряженностью магнитного поля – tension (Lasker, 1969; Soulman et al., 1980; Osterman et al., 1981). Среди всех субъектов Российской Федерации по численности проживающих Магаданская область занимает предпоследнее, 81-е, место после Чукотки и 11-е место по занимаемой площади (Shershakova, 2013). По данным Shershakova (2013), Магаданская область по сравнению с другими регионами страны территориально расположена в наиболее неблагоприятных условиях (Shershakova, 2013).

Абиотические факторы внешней среды вызывают соответствующие реакции ряда физиологических механизмов, направленных на сохранение целостности организма. Указанные отличительные особенности северных территорий определяют сложность пребывания человека в данных условиях. Непривлекательность суровых северных условий, а также продолжающийся миграционный отток населения осложняют создание и развитие человеческого капитала области. Освоение районов Крайнего Севера, а также приравненных к ним территорий, каковой и является Магаданская область, в данный момент идет в основном за счет процесса миграции населения из регионов, сильно отличающихся по своим климато-географическим параметрам. Наблюдаемый интенсивный отток молодежи из области указывает на то, что регион лишается своей будущей «северной» рабочей силы, так необходимой для успешного развития края. Обеспечить возможность полноценного и относительно комфортного существования человека в новых климатических и социальных условиях может лишь перестройка физиологических функций организма; в противном случае неизбежно ухудшение состояния здоровья и рост числа хронических болезней организма (Startseva et al., 2007; Kalichman et al., 2011; Khadilkar et al., 2015). Возрастающая разбалансированность средовых отношений в регионах Севера, неадекватная социальная цена и экологическая несбалансированность гипертрофированного роста ресурсных отраслей требует особого подхода региональной политики в отношении данных территорий, важнейшим звеном которой обязана стать охрана здоровья подрастающего контингента, основанная на принципах экологии, а также учете процессов адаптации и коррекции жизнедеятельности (Denisov et al., 2003).

Студенческая молодежь в данном аспекте привлекает особое внимание. Студенты являются не только мощными потенциальными трудовыми ресурсами общества, но и популяционным пулом, посредственное и откровенное плохое состояние здоровья которого негативным образом скажется и на дальнейших поколениях (Irazusta et al., 2007).

В данной связи целью этой работы является изучение функционального состояния организма молодых жителей как основы будущего человеческого ресурса Северо-Востока России с учетом времени проживания на данной территории.

Материал и методы исследований

При помощи методики случайной выборки было обследовано 1 560 юношей в возрастном периоде 17–21 год, живущих на постоянной основе в регионе. Данные люди были поделены на три подгруппы. В первую (56 человек) входили приезжие мигранты из числа европеоидов (адаптанты) из центрально-европейских и азиатских районов России со стажем пребывания в северных районах не менее 5 лет (в среднем 7,2 ± 1,4 лет), т. н. нулевое поколение. Вторая группа – это юноши-уроженцы Магаданской области в первом поколении из числа европеоидов (924 человека), третья группа – представители второго поколения (580 человек), при этом у обеих данных групп родители являлись мигрантами-адаптантами, приехавшими на Северо-Восток в прошлом веке.

Для анализа состояния системы кровообращения с помощью тонометра-автомата Nessei DS-186 (Япония) в покое проводили измерение значений систолического (САД, мм рт. ст.) и диастолического (ДАД, мм рт. ст.) артериального давления, а также частоты сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин). Общее периферическое сопротивление сосудистого определялось расчетным путем (ОПС, дин. с. $см^{-5}$), так же как и ударный объем по Starr (УО, мл) (Yurev et al., 2003).

Для газового анализа, а также оценки респираторной системы при помощи метаболографа MedGraphics VO2000 (США) также в состоянии покоя определялся минутный объем дыхания (МОД, л), дыхательный объем (ДО, мл), коэффициент использования кислорода ($КИО_2$, мл/л). Ряд других показателей респираторной системы фиксировался при помощи компьютерного спироанализатора КМ АР-01 Диамант-С (Россия). Все базовые показатели сравнивали с должными значениями, являющимися инвариантами нормы, полученными в отношении жителей Центрально-Европейской России. Анализ состояния респираторной системы осуществляли на основании оценки объемных и объемно-скоростных значений легких: ЖЕЛ – жизненная емкость легких (%), ПОС – пиковая объемная скорость выдоха (%), $МОС_{25\%}$, $МОС_{50\%}$ и $МОС_{75\%}$ – мгновенные объемные скорости на участках 25%, 50% и 75% от объема форсированного выдоха, соответственно, (%). С помощью психофизиологической системы контроля уровня стресса FirstSync (СКУС, Россия) определяли скорость простой, а также сложной зрительно-моторной реакции (ПЗМР, СЗМР, мс). Для анализа функциональных возможностей газотранспортной и респираторной систем методом неинвазивной фотооксигемометрии с помощью пульсоксиметра NPB 40 (США) во время максимальной задержки дыхания на вдохе и выдохе (проба Stange и Genchie) определяли сатурация гемоглобина кислородом (HbO_2,%).

Для оценки биохимического профиля в обследовании приняли участие 110 юношей. В группу мигрантов-европеоидов вошли

20 испытуемых, в группу лиц первого поколения – 35, а выборку лиц второго поколения – 37 испытуемых. Определение общего холестерина (ОХЛ, ммоль/л), глюкозы (ммоль/л), триглицеридов (ТГ), липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП, ммоль/л) и липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП, ммоль/л) в капиллярной крови, взятой утром натощак, как минимум, через 10 часов после приема пищи, было проведено при помощи портативного биохимического экспресс-анализатора CardioChek PA (США). Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по формуле:

$$КА = (ОХС – ХС\ ЛПВП) / ХС\ ЛПНП).$$

Для оценки атерогенного потенциала липидов крови установлены следующие значения: показатель отношения липопротеидов низкой плотности к липопротеидам высокой плотности (ХС ЛПНП / ХС ЛПВП) и отношение липопротеидов высокой плотности к общему холестерину (ОХС / ХС ЛПВП) (Expert panel, 2001).

Все обследования осуществлялись в помещении с температурой окружающего воздуха 18–20 ºС, в первой половине дня. Исследования проведены в соответствии с Хельсинской декларацией. Алгоритм обследований одобрен Этическим комитетом медико-биологических исследований при СВНЦ ДВО РАН. Перед обследованием у каждого юноши получено письменное информированное согласие. Полученные данные обработаны с применением пакета Statistica 7.0. Проверка на нормальность распределения выборки, осуществленная при помощи теста Колмогорова – Смирнова, показала, что все данные являются нормально распределенными. Результаты представлены в виде среднего значения (x) и стандартной ошибки средней (SE). При обработке данных использовали дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением при помощи критерия Sheffe. Критический уровень значимости (P) принят равным 0,05 (Borovikov, 2003).

Результаты

Базовые физиологические показатели различных систем организма юношей из числа адаптантов Севера, которые являются представителями различных поколений, приведены в таблице. В отсутствии межгрупповых различий по пульсу, а также уровню сопротивления сосудов преобладает ясная тенденция, направленная на снижение уровня как систолического, так и диастолического АД от лиц из числа мигрантов-адаптантов (нулевое поколение) к лицам второго поколения в отсутствие значимых различий у юношей в первом и втором поколениях. Дыхательный объем имеет отчетливую тенденцию к уменьшению по мере возрастания срока адаптации. Подобная динамика выявлена и для параметра минутного объема, минимальные значения которого установлены у лиц второго поколения.

Респираторная система характеризуется преимущественным снижением объемно-скоростных значений от юношей нулевого и первого к юношам второго поколения. При неизменных значениях жизненной емкости легких и проводимости мельчайших и мелких бронхиол ($МОС_{75\%}$), у лиц второго поколения выявляются минимальные показатели выдоха на пиковой скорости, а также проводимости бронхиол большого ($МОС_{25\%}$) и среднего ($МОС_{50\%}$) калибра.

Таблица

Сравнение различных физиологических систем организма юношей – представителей нулевого, первого и второго поколений

Наименование показателя	Сравниваемые группы			Значимые различия между группами, P		
	нулевое поколение, n = 56	первое поколение, n = 924	второе поколение, n = 580	1–2	2–3	1–3
САД, мм рт. ст.	130,4 ± 0,81	128,4 ± 0,42	128,3 ± 0,41	0,03	0,87	0,02
ДАД, мм рт. ст.	79,9 ± 0,91	77,0 ± 0,31	76,2 ± 0,44	0,01	0,62	$4{,}7*10^{-4}$
ЧСС, уд. мин	82,4 ± 1,60	82,9 ± 0,51	81,5 ± 0,52	0,98	0,94	0,98
УО, мл	67,5 ± 0,93	69,4 ± 0,37	70,7 ± 0,51	0,57	0,41	$3{,}2*10^{-3}$
ОПС, дин·с·см$^{-5}$	1498 ± 43	1446 ± 14	1443 ± 16	0,96	0,78	0,8
ДО, мл	762 ± 40	672 ± 14	612 ± 18	0,04	0,01	$1{,}3*10^{-3}$
МОД, л	10,5 ± 0,51	9,4 ± 0,21	8,6 ± 0,23	0,04	0,01	$1{,}4*10^{-3}$
$КИО_2$, мл/л	34,1 ± 0,86	36,3 ± 0,42	37,5 ± 0,24	0,01	0,01	$2{,}1*10^{-4}$
ЖЕЛ, %	100 ± 1,9	102 ± 0,9	101 ± 0,9	0,43	0,39	0,72
ПОС, %	112 ± 2,4	111 ± 1,1	107 ± 1,1	0,71	0,01	0,05
$МОС_{25\%}$, %	113 ± 3,1	110 ± 1,2	105 ± 1,3	0,36	0,01	0,05
$МОС_{50\%}$, %	117 ± 3,5	117 ± 1,6	111 ± 1,9	0,82	0,02	0,22
$МОС_{75\%}$, %	134 ± 5,4	142 ± 2,6	139 ± 2,7	0,25	0,42	0,53
ПЗМР, мс	225 ± 2,5	215 ± 1,4	210 ± 1,3	$3{,}7*10^{-4}$	0,01	$5{,}3*10^{-8}$
СЗМР, мс	258 ± 4,8	260 ± 1,2	250 ± 1,8	0,65	$4{,}3*10^{-6}$	0,13
Фоновый уровень HbO_2, %	99,4 ± 0,14	99,2 ± 0,01	98,9 ± 0,01	0,05	$4{,}1*10^{-5}$	0,01
Уровень HbO_2 на пике пробы Штанге, %	97,2 ± 0,51	97,1 ± 0,13	97,2 ± 0,12	0,75	0,2	0,99
Уровень HbO_2 на пике пробы Генчи, %	93,3 ± 0,62	94,8 ± 0,11	94,6 ± 0,21	0,01	0,4	0,05
ОХС, ммоль/л	4,2 ± 0,22	3,5 ± 0,12	3,3 ± 0,25	$2{,}3*10^{-3}$	0,32	$1{,}5*10^{-3}$
ТГ, моль/л	0,7 ± 0,21	0,6 ± 0,01	0,9 ± 0,14	0,24	$2{,}8*10^{-3}$	0,97
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,5 ± 0,14	1,4 ± 0,14	1,3 ± 0,13	0,83	0,64	0,98
ХС ЛПНП, моль/л	2,2 ± 0,35	1,5 ± 0,12	1,6 ± 0,11	0,03	0,1	0,13
КА, усл. ед.	2,5 ± 0,31	1,4 ± 0,13	1,9 ± 0,12	$5{,}2*10^{-4}$	0,1	0,16
ОХС/ХС ЛПВП, усл. ед.	3,3 ± 0,53	2,8 ± 0,14	2,9 ± 0,12	0,23	0,3	0,32
ХС ЛПНП/ХС ЛПВП, усл. ед.	1,8 ± 0,32	1,2 ± 0,12	1,6 ± 0,17	0,01	0,43	0,13
Глюкоза, ммоль/л	5,2 ± 0,27	5,3 ± 0,21	5,6 ± 0,21	0,42	0,23	0,72

Примечание: результаты параметрических методов обработки полученных данных представлены в виде средних величин показателей (x) и их стандартных ошибок (SE); САД – систолическое артериальное давление, BPS, mm Hg; ДАД – диастолическое артериальное давление, BPD, mm Hg; ЧСС – частота сердечных сокращений, HR, bpm; УО – ударный объем, SV, mL; ОПС – общее периферическое сопротивление, TPVR, dyne^2 s cm^{-5}; ДО – дыхательный объем, TV LVV, mL; МОД – минутный объем дыхания, RO, L/min; $КИО_2$ – коэффициент использования кислорода, OUQ, mL/L; ЖЕЛ – жизненная емкость легких, VLC, %; ПОС – пиковая объемная скорость, PEF, l/s; $МОС_{25\%}$ – мгновенная объемная скорость на участке 25% от форсированного выдоха, $МЕФ_{25\%}$, %; $МОС_{50\%}$ – мгновенная объемная скорость на участке 50% от форсированного выдоха, $МЕФ_{50\%}$, %; $МОС_{75\%}$ – мгновенная объемная скорость на участке 75% от форсированного выдоха, $МЕФ_{75\%}$, %; ПЗМР – простая зрительно-моторная реакция, SVMR, msec; СЗМР – сложная зрительно-моторная реакция, CVMR, msec; Фоновый уровень HbO_2 – сатурация артериальной крови на фоне, oxygen saturation (HbO_2, %); уровень HbO_2 на пике пробы Штанге – сатурация артериальной крови на пике пробы Штанге, HbO_2 at peak Stange test, %; уровень HbO_2 на пике пробы Генчи – сатурация артериальной крови на пике пробы Генчи, HbO_2 at peak Genchie test, %; ОХС – общий холестерин, TCh, mmol/L; ТГ – триглицериды, TG, mmol/L; ХС ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности, TCh HDLP, mmol/L; ХС ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности, TCh LDLP, mmol/L; КА – коэффициент атерогенности, AI, arb. units; ОХС/ХС ЛПВП – отношение общего холестерина к холестерину липопротеидов высокой плотности, TCh/Ch HDLP, arb. units; ХС ЛПНП/ХС ЛПВП – отношение холестерина липопротеидов низкой плотности к холестерину липопротеидов высокой плотности, Ch LDLP / Ch HDLP, arb. units; глюкоза – глюкоза крови, Glucose, mmol/L.

Скорости простой (ПЗМР) и сложной (СЗМР) сенсомоторной реакции являются показателями, отражающими текущее состояние нервной системы. В нашем случае происходит значимое уменьшение этих показателей в ряду от мигрантов-адаптантов к лицам второго поколения.

Фоновый показатель сатурации кислородом гемоглобина (HbO_2) уменьшается от мигрантов-адаптантов к лицам второго поколения. При этом отмечается рост данного параметра в период, когда происходит выполнение пробы на выдохе (Genchie) у лиц первого и второго поколения по сравнению с юношами-адаптантами. Значение наполнения кислородом артериальной крови при исполнении дыхательной пробы на вдохе (Stange) остается неизменным в ряду разных поколений.

Обсуждение

Можно говорить о том, что установленная реакция возрастания кровяного давления в начале адаптационного периода к условиям Северо-Востока России у новоселов является, судя по всему, компенсаторным механизмом, формирующимся под воздействием пониженных температур окружающей среды. При этом у лиц второго поколения по сравнению с юношами-мигрантами статистически значимо увеличивается ударный объем, что можно характеризовать как благоприятный фактор, когда интенсификация работы сердца связана не с повышением пульса, а с увеличением сократительной функции сердечной мышцы (Victor et al., 1987).

Снижение показателей ДО и МОД от нулевого ко второму поколению говорит об оптимизировании работы системы внешнего дыхания у этих лиц, так как вентиляция легких прямым образом воздействует на величину отдачи тепла с дыханием, и наблюдаемое снижение объемов дыхания, очевидно, является проявлением функции «экономии», реализующейся, в частности, через снижение респираторных теплопотерь, происходящих в сложных условиях внешней среды (Shishkin et al., 1995). Особо следует отметить, что в ряду от нулевого ко второму поколению статистически значимо возрастает коэффициент использования кислорода, что говорит об увеличении прохождения кислорода через альвеолярно-капиллярную мембрану (Neverova, 1972) и улучшении функции транспорта кислорода во всем организме. Наблюдаемое уменьшение объемно-скоростных показателей от юношей нулевого и первого к юношам второго поколения может свидетельствовать об уменьшении напряжения в работе респираторной системы при возрастании срока проживания на Северо-Востоке.

Время простой (ПЗМР) и сложной (СЗМР) сенсомоторной реакции является интегральным маркером скорости прохождения нервного возбуждения по элементам рефлекторной дуги (Peysakhov, 1974). Наблюдаемая четкая картина снижения значения как простой, так и сложной реакции (увеличения скорости нервных процессов) в ряду от нулевого ко второму поколению является отражением улучшения функциональных параметров ЦНС. В целом, анализ психофизиологических показателей говорит о повышенном уровне концентрации произвольного внимания и функционального состояния центральной нервной системы при длительном нахождении в условиях Севера. В данном случае можно говорить о том, что во время адаптации к экстремальным абиотическим условиям Северо-Востока России происходит формирование популяции укорененных жителей с высоким функциональным состоянием центральной нервной системы.

При сравнении значений оксигенации артериальной крови во время дыхательных проб на вдохе и выдохе видно, что исходный уровень сатурации артериальной крови может рассматриваться в качестве четкого критерия для оценки стадии адаптации к экстремальным природно-климатическим факторам Магаданской области. Статистически значимое понижение показателя HbO_2 в ряду «нулевое – первое – второе» поколение, по-видимому, связано со снижением чувствительности дыхательного центра к концентрации углекислого газа.

При анализе биохимических характеристик крови установлено, что в выборках обследованных юношей ни одна из характеристик не превышала границ референтных уровней (Prophylaxis, diagnostics, 2004). Анализ липидного состава крови показал, что имеются некоторые различия в уровнях общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов крови. Наивысшие показатели содержания общего холестерина в крови отмечены в группе юношей – мигрантов-адаптантов с непродолжительным сроком нахождения на территории Магаданской области. У представителей нулевого и второго поколений содержание триглицеридов в крови было статистически значимо выше, чем у представителей первого поколения. Полученные данные свидетельствуют о том, что наивысшая величина ХС ЛПНП была обнаружена у юношей-мигрантов. Статистически значимых различий по среднему уровню ХС ЛПВП у юношей трех групп в наших исследованиях не выявлено. Оптимальный уровень ЛПВП имеет различные положительные эффекты, такие как антиоксидантная, антиагрегантная и антикоагулянтная функция (Kontush and Chapman, 2010; Chung et al., 2015).

Самые высокие показатели коэффициента атерогенности имели юноши с наименьшим стажем проживания (мигранты) в Магаданской области. В соответствии с использованием маркеров атерогенного потенциала липидного профиля, где рост соотношения ОХС/ХС ЛПВП более 5 усл. ед. и величина расчетного показателя ХС ЛПНП/ХС ЛПВП более 3,3 усл. ед. свидетельствовали о нарушении липидного профиля, ассоциированного с возрастанием риска развития атеросклероза; в наших исследованиях выявлено, что все юноши в среднем имели более низкие значения данных индексов.

Оценка углеводного обмена проведена путем определения уровня глюкозы в периферической крови натощак. Концентрация глюкозы является очень важной характеристикой внутренней среды организма. Ее уровень в кровяном русле при различных состояниях колеблется в границах 3,25–5,60 ммоль/л. Поддержание постоянства гликемии в крови является результатом работы углеводного обмена, а выход за рамки указанного диапазона говорит либо о нарушениях в работе регуляторных механизмов, либо свидетельствует о перестройке энергетического обмена (Panin, 1978). Среднее значение концентрации глюкозы в сыворотке крови у юношей варьировало от 5,2 до 5,6 ммоль/л. Полученные в нашем исследовании величины находились на верхнем уровне референтной границы для глюкозы, при отсутствии каких-либо значимых различий. Повышенное содержание в крови глюкозы в молодом возрасте может служить основой будущего развития целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний, включая диабет второго типа и связанные с ним тяжелые осложнения complications (Porkka et al., 1994; Srinivasan et al., 1996; Juonala et al., 2011).

Полученные нами результаты также позволили выявить степень влияния продолжительности нахождения в условиях Северо-Востока России на биохимический профиль адаптантов. Наши данные убедительно свидетельствуют, что у мигрантов Севера с непродолжительным периодом нахождения в экстремальных климато-географических условиях отмечается наибольший процент отклонений в липидном профиле с повышением индекса атерогенности, что согласуется с данными Krivoshapkina (2010).

Заключение

Установленный нами вектор функциональных перестроек физиологических систем мигрантов-адаптантов, а также различных поколений уроженцев из числа европеоидов-северян позволяет констатировать тот факт, что в текущих условиях Северо-Востока России происходит формирование нового типа популяции жителей Магаданской области, в отношении которой можно говорить об оптимизации значений в ряду от нулевого ко второму поколению проживания на Севере и которую можно обозначить как укорененные лица. У лиц с наибольшим стажем проживания на Севере наблюдается снижение артериального давления и повышение эффективности работы сердечной мышцы, уменьшение напряжения в работе респираторной системы при синхронном снижении респираторных теплопотерь, а также повышение функ-

ционального уровня центральной нервной системы. В процессе проживания в сложных климатических условиях Северо-Востока России происходит формирование особенного регионального состояния метаболического профиля, характеризующегося сниженными концентрациями показателей липидного обмена и увеличенным содержанием глюкозы в крови, что, по-видимому, связано с изменением типа питания современного жителя города.

Юноши второго поколения, имеющие максимальный стаж проживания на территории Северо-Востока, характеризуются оптимальными показателями, необходимыми для эффективного адаптивного ответа на сложные климато-экологические условия среды, а также сохранения наилучшего режима функционирования различных систем организма.

References

Borovikov, V. P. (2003). Statistica. Iskusstvo analiza dannykh na kompyutere: dlya professionalov [Statistica. The art of analyzing data on a computer: for professionals]. Piter, Saint Petersburg (in Russian).

Chung, D. W., Chen, J., Ling, M., Fu, X., Blevins, T., Parsons, S., Le, J., Harris, J., Martin, T. R., Konkle, B. A., Zheng, Y., & Lopez, J. A. (2015). High density lipoprotein modulates thrombosis by preventing von Willebrand factor self-association and subsequent platelet adhesion. Blood, 127, 637–645.

Denisov, V. N., Babenko, A. I., & Trufakin, V. A. (2003). Demograficheskie problemy okhrany zdorovya naseleniya Sibiri [Demographical problems in Siberia's population health care]. Vestnik Mezhregionalnoy Assotsiatsii Zdravookhranenie Sibiri, 1, 5–8 (in Russian).

Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholestrol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholestrol in adults (Adult Treatment Panel III) (2001). The Journal of the American Medical Association, 285, 2486–2497.

Irazusta, I., Hoyos, J., Irazusta, F., Ruiz, E., & Diaz, J. (2007). Increased cardiovascular risk associated with poor nutritional habits in first-year university students. Nutrition Research, 27, 387–394.

Juonala, M., Magnussen, C. G., Berenson, G. S., Venn, A., Burns, T. L., Sabin, M. A., Srinivasan, S. R., Patricia, S. R., Davis, H., Chen, W., Sun, C., Cheung, M., Viikari, S. A., Dwyer, T., & Raitakari, O. T. (2011). Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors. The New England Journal of Medicine, 365, 1876–1885.

Kalichman, L., Korostishevsky, M., Batsevich, V., & Kobyliansky, E. (2011). Hand osteoarthritis in longevity populations. Aging Clinical and Experimental Research, 23(5–6), 457–462.

Khadilkar, A., Mandlik, R., Chiplonkar, S., Khadilkar, V., Ekbote, V., & Patwardhan, V. (2015). Reference centile curves for triceps skinfold thickness for Indian children aged 5 to 17 years and cut offs for predicting risk of childhood hypertension: A multi-centric study. Indian Pediatrics, 52(8), 675–680.

Kontush, A., & Chapman, M. J. (2010). Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: Focus on antioxidative activities. Current Opinion in Lipidology, 21, 312–318.

Krivoshapkina, Z. N. (2010). Biokhimicheskiy spektr syvorotki krovi kak otrazhenie adaptivnykh metabolicheskikh protsessov u zhiteley vysokikh shirot (na primere Yakutii) [Blood serum biochemical spectrum as reflection of adaptive metabolic processes in residents of high latitudes: Evidence from Yakutia]. Yakutsk Academy Press, Yakutsk (in Russian).

Lasker, G. W. (1969). Human biological adaptability. Science, 166, 1480–1486.

Neverova, N. P. (1972). Sostoyanie vegetativnykh funktsiy u zdorovykh lyudey v usloviyakh Kraynego Severa [State of autonomic functions in healthy people under Extreme North conditions]. Novosibirsk GMI Press, Novosibirsk (in Russian).

Oesterman, P. O., Lovstrand, K. G., Lyndberg, P. O., Lundberg, P. O., Lundquist, S., & Muhr, C. (1981). Weekly headace periodically and effect of weather changes on headance. International Journal of Biometeorology, 25(1), 39–45.

Panin, L. Y. (1978). Energeticheskie aspekty adaptatsii [Energetic aspects of adaptation]. Medicina Press, Leningrad (in Russian).

Peysakhov, N. I. (1974). Samoregulyatsiya i tipologicheskie svoystva nervnoy sistemy [Autoregulation and typological properties of nervous system]. KGU Press, Kazan' (in Russian).

Porkka, K. V., Viikari, J. S., Taimela, S., Dahl, M., & Akerblom, H. K. (1994). Tracking and predictiveness of serum lipid and lipoprotein measurements in childhood: a 12-year follow-up. The cardiovascular risk in young finns study. American Journal of Epidemiology, 140, 1096–1110.

Prophylaxis, diagnostics and treatment of hypertension. Russian recommendations (The second revision). (2004). Prilozhenie k zhurnalu Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika [A supplement to the journal of Cardiovascular therapy and prophylaxis], 20 (in Russian).

Shershakova, Y. M. (2008). Otsenka demograficheskoy bezopasnosti Magadanskoy oblasti [Magadan region demography safety assessment]. Prostranstvennaya Ekonomika, 4, 153–165 (in Russian).

Shishkin, G. S., Petrunev, S. A., & Preobrazhenskaya, V. K. (1995). Osobennosti ventilyatsii legkikh pri dykhanii nizkotemperaturnym vozdukhom [Specific profiles for lung ventilation at respiring low temperature air]. Fiziologiya Cheloveka, 21(2), 61–66 (in Russian).

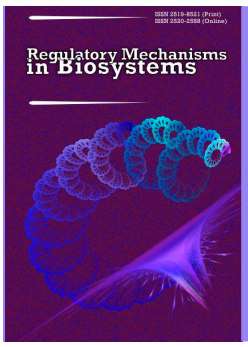
Soulman, J., Levition, A., Slack, W., Porter, D., & Graham, J. R. (1980). The relationship of headache occurrence to atmospheric pressure. International Journal of Biometeorology, 24(3), 213–219.

Srinivasan, S. R., Bao, W., Wattigney, W. A., & Berenson, G. S. (1996). Adolescent overweight is associated with adult overweight and related multiple cardiovascular risk factors: The Bogalusa heart study. Metabolis, 45, 235–240.

Startseva, O. N., Belousov, V. V., Frolova, O. V., & Gilmanov, A. J. (2007). Osobennosti nekotorykh pokazateley lipidnogo i belkovogo obmena u prishlogo naseleniya regionov Kraynego Severa [Some profiles of lipid and protein metabolism in new-coming populations of Extreme North regions]. Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika, 8, 22–35 (in Russian).

Victor, R. G., Seals, D. R., & Mark, A. L. (1987). Differential control of heart rate and sympathetic nerve activity during dynamic exercise: Insight from intraneural recordings in humans. Journal of Clinical Investigation, 79(2), 508–516.

Yurev, V. V., Simakhodskyi, A. S., & Voronovich, N. N. (2003). Rost i razvitie rebenka [Child's growth and development]. Piter, Saint Petersburg (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 644–648
doi: 10.15421/021799

Metformin reduces urate nephropathy in experimental nephrolithiasis

V. Y. Perfil'ev*, Y. F. Zverev**, D. Y. Perfil'eva**, I. V. Lysenko*, A. G. Miroshnichenko*

*Altay State University, Barnaul, Russian Federation
**Altay State Medical University, Barnaul, Russian Federation

Article info

Received 30.09.2017
Received in revised form 10.11.2017
Accepted 14.11.2017

Altay State University, Lenin prospekt, 61, Barnaul, 656049, Russian Federation.

Altay State Medical University, Lenin Ave., 40, Barnaul, 656038, Russian Federation.
Tel.: +7-385-229-12-09.
E-mail: 1991ps@mail.ru

Perfil'ev, V. Y., Zverev, Y. F., Perfil'eva, D. Y., Lysenko, I. V., & Miroshnichenko, A. G. (2017). Metformin reduces urate nephropathy in experimental nephrolithiasis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 644–648. doi:10.15421/021799

The objective of the article is to evaluate the effectiveness of metformin in the prevention and treatment of experimental urate nephropathy. About 33% of the populations of developed countries suffers from metabolic syndrome. The relationship between metabolic syndrome, especially insulin resistance, with gout and urate nephrolithiasis, is now proven. The search for a common pathophysiological link in the development of these conditions allows us to identify insulin-dependent excessive urinary acidification due to impaired education and renal ammonium transport. We suggested the use of drugs that can increase the sensitivity of tissues to insulin, and induce a decrease in the manifestations of urate nephropathy. The study was performed on 30 male Wistar rats weighing 250–300 g. For the induction of urate nephropathy in rats, we used the classical model of inhibition of uricase by oxononium acid. Metformin was administered at a dose of 150 mg/kg in the treatment and prophylactic regimens. It was found that the use of metformin both in prophylactic and therapeutic regimen leads to a reliable decrease the level of uric acid in blood plasma and urine in rats with experimental urate nephrolithiasis. We found that the preventive use of metformin brought significant relief after experimental urate nephropathy, as evidenced by a shift in urine pH to the alkaline side, a decreased lactate dehydrogenase activity in urine, as well as a decrease in the processes of free radical oxidation in the blood and in the kidneys of the animals.

Keywords: oral hypoglycemic agents; uric acid; urate deposits; free radical oxidation

Introduction

According to modern statistical data, on average 33% of the populations of developed countries suffer from metabolic syndrome, and in patients older than 60 years this indicator exceeds 40% (Kim et al., 2013; Roberts et al., 2013; Choo et al., 2016). As is known, metabolic syndrome includes abdominal obesity, dyslipidemia and hypertriglyceridemia, impaired glucose tolerance, and hypertension (Choo et al., 2016; Srikanthan et al., 2016). Along with disorders in carbohydrate and lipid metabolism, metabolic syndrome shows signs of a disorder of the metabolism of purines. Today, the relationship between metabolic syndrome and gout and urate nephrolithiasis has been proven (Srikanthan et al., 2016; Won et al., 2016; Yarovoi et al., 2017). Urinary nephrolithiasis is a pathological process that occurs as a result of a disorder of purine metabolism that leads to hyperuricemia and hyperuricosuria, and is accompanied by the deposition of uric acid crystals in the kidneys. It is known that the overall frequency of metabolic syndrome in patients with gout is on average 57.0%, and the frequency of urate nephrolithiasis in patients with metabolic syndrome reaches 21.9% (Akman et al., 2012). To treat patients with urate nephrolithiasis, surgical methods or shock wave lithotripsy are usually used, which requires hospitalization and a long period of rehabilitation (Yarovoi et al., 2017). However, urate microliths are a special type of kidney stones, which can be completely dissolved by conservative therapy. Pharmacological modulation of factors affecting the dissolution of urate stones can promote effective and safe litholysis of urate stones, and therefore has high relevance.

The search for a common pathophysiological link in the development of metabolic syndrome and urate nephrolithiasis revealed excessive urinary acidification due to impaired generation and renal transport of ammonium (Sakhaee and Maalouf, 2008; Bobulescu et al., 2013). The results of the studies show that the main reason for lowering the acidity of urine is insulin resistance (Abate et al., 2004; Cameron et al., 2006). Insulin, activating the insulin receptors in the renal tubules, stimulates the activity of the isoform $3Na^+/H^+$ exchanger, which provides transfer through the membrane of hydrogen ions for subsequent interaction with NH_3 and direct transport of NH_4^+ into the lumen of the tubule (Curthoys, 2013). It is also known that insulin activates the metabolism of glutamine through glutamate and α-ketoglutarate, resulting in the formation of ammonia in the cells of the proximal renal tubules (Nissim et al., 1995). The solubility of uric acid crystals is directly dependent on pH. In the blood (pH = 7.4), uric acid is in soluble form. However, the pH of the urine can vary considerably. At a pH of 6.5, the uric acid in the urine, as well as in the blood, is predominantly in a soluble form. But when urine pH drops to 5,5, the solubility of uric acid decreases by 20 times. Thus, even under conditions of normal excretion, the probability of crystallization of uric acid and the formation of microlites is significantly increased (Liebman et al., 2007; Curthoys, 2013; Liu et al., 2017).

Insulin resistance leads to a decrease in the formation and secretion of ammonium, which contributes to the acidification of urine. We assumed that the use of a drug that increases the sensitivity of tissues to insulin will lead to a decrease in urate nephropathy. We have chosen metformin, a synthetic anti-diabetic agent, a biguanide derivative (Fig. 1). Metformin increases the affinity of insulin receptors to insulin, changes their conformation and stimulates receptor and postreceptor pathways (Rena et al., 2013). Thus, the aim of the study was to evaluate the effectiveness of metformin in the prevention and treatment of experimental urate nephropathy.

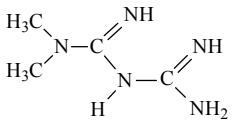


Fig. 1. Metformin (N,N-dimethylbiguanide)

Material and methods

A study was performed on 30 male Wistar rats weighing 250–300 g. The animals were in individual cages adapted for collection of urine. Keeping animals met the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). To induce urate nephropathy we used a classic model of uricase inhibition (Stavric et al., 1969). Animals were divided into 3 groups: control group (n = 14), prevention group (n = 10), treatment group (n = 10). Rats of the control group in the diet for 3 weeks received 500 mg/kg of oxonic acid and 1000 mg/kg of uric acid daily. Rats of the control group received 500 mg/kg of oxonic acid and 1000 mg/kg of uric acid daily by oral administration for 3 weeks. Rats of the prevention group additionally received metformin at a dose of 150 mg/kg daily. Rats of the prevention group additionally received metformin at a dose of 150 mg/kg daily, rats of the prevention group – from 11 to 21 days of the experiment.

At 21 days in the daily urine, the concentration of uric acid, total protein, creatinine, and activity of enzymes markers of renal dysfunction (lactate dehydrogenase, gamma-glutamyltransferase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase) was measured. In the blood, the concentration of uric acid, creatinine was measured. The parameters of free radical oxidation were also measured: activity of catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, concentration of reduced glutathione in erythrocytes; concentration of thiobarbiturate-reactive products in blood plasma, total antioxidant activity and total prooxidant activity of blood plasma. These free radical oxidation parameters were also measured in the kidneys. The rat kidneys also underwent histological examination. Sections of tissue 4–6 μm thick were obtained, which were stained with hematoxylin and eosin according to a standard procedure. Quantitative counting of urate stones in the lumen of the kidney tubules was carried out using the Axio Vision 4.7 software package (Carl Zeiss, Germany).

For calculations and statistical processing the software Sigma-Stat 3.5 (Systat Software Inc., USA) was used. To compare the three groups, a rank analysis of the Kruskel-Wallis variations was used among themselves. For a posteriori pairwise comparisons, a nonparametric Mann-Whitney test was used. Data were presented as a median and interquartile range – Me (25%; 75%). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

It was found that prolonged administration of metformin in the preventive regimen caused a marked decrease in plasma uric acid concentration – 1.1 (0.8; 1.2) mg/dL in the prevention group vs. 1.4 (1.2; 1.8) mg/dL in the control group (P = 0.009). This was accompanied by a significant decrease in the excretion of uric acid in the urine – 19.5 (11.0; 22.9) mg/day in the prevention group vs. 31.5 (24.5; 33.6) mg/day in the control group (P = 0.002). When the drug was administered in the treatment regimen, there was also a significant decrease in the plasma concentration of uric acid – 1.0 (0.7; 1.2) mg/dL in the treatment group vs. 1.4 (1.2; 1.8) mg/dL in the control group (P = 0.013). This resulted in a significant decrease in the excretion of uric acid in the urine – 15.4 (14.5; 18.7) mg/day in the treatment group against 31.5 (24.5; 33.6) mg in the control group (P = 0.001).

When studying the effect of metformin on renal function in rats with experimental urate nephrolithiasis (Table 1), there was a tendency to increase the glomerular filtration rate in animals receiving metformin in the preventive regimen compared to the control group. In addition, it was found that prolonged administration of metformin leads to a significant increase in the pH of the urine compared with the control.

In the group of animals receiving metformin in the treatment regimen, an increase in the glomerular filtration rate was observed by 20% compared to the control animals. Metformin in animals with experimental urate nephrolithiasis caused a shift in the pH of the urine to the alkaline side by 3% in comparison with the control values. However, these changes did not reach statistical significance (Table 1).

The positive effect of metformin on the kidney is confirmed by a marked decrease in the activity of lactate dehydrogenase in the urine of rats of the prevention group by more than 1.5 times in comparison with animals from the control group (Table 2). When analyzing the effect of metformin on the kidney, a marked decrease in the activity of lactate dehydrogenase (cytosolic enzyme of the tubular epithelium) in the urine of the rats of the treatment group is also noticeable by 47% compared with the control. The activity of gamma-glutamyltransferase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase in the urine of animals receiving metformin in both regimens did not change significantly.

Table 1

Non-enzymatic markers of kidney function in rats with experimental urate nephrolithiasis with the administration of metformin in the prevention and treatment regimen

Group	Glomerular filtration rate, ml/min	Urine pH
Control, n = 14	18.3 (14.8; 21.5)	6.8 (6.5; 6.9)
Prevention, n = 10	23.6 (20.9; 26.4)	7.9 (7.5; 8.2)*
Treatment, n = 10	21.9 (17.0; 28.4)	7.0 (6.6; 7.4)
Kruskel-Wallis test		
P	0.062	0.003

Note: * – significant difference in comparison with the control (Mann-Whitney test, P<0.05).

Table 2

Enzyme markers of kidney function in rats with experimental urate nephrolithiasis with the administration of metformin in the prevention and treatment regimen

Group	Lactate dehydrogenase activity, U/l	Gamma glutamyltransferase activity, U/l	N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity, U/l
Control, n = 14	1.6 (1.1; 2.3)	32.2 (21.1; 45.7)	0.3 (0.2; 0.4)
Prevention, n = 10	1.0 (0.7; 1.1)*	49.1 (36.5; 55.3)	0.3 (0.2; 0.4)
Treatment, n = 10	0.9 (0.7; 1.0)*	39.7 (30.2; 56.2)	0.6 (0.4; 1.2)
Kruskel-Wallis test			
P	0.027	0.161	0.130

Note: see Table 1.

Analysis of the effect of metformin on the processes of free radical oxidation in the blood of rats with experimental urate nephrolithiasis showed that in animals receiving the drug in the preventive regimen, a significant decrease in the total prooxidant activity was recorded at the end of the 3 weeks of the experiment (Table 3). This was not due to the activation of antioxidant enzymes: the total antioxidant activity of the blood plasma, the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase did not differ from the control. Concentrations of reduced glutathione of erythrocytes and thiobarbiturate-reactive plasma products also did not change. The administration of metformin in the treatment regimen additionally caused an increase in the concentration of reduced glutathione.

Table 4 presents the markers of the processes of free radical oxidation in rat kidneys under the influence of metformin. There was a significant increase in the total antioxidant activity of the renal tissue and the concentration of reduced glutathione. As in the analysis of blood markers, changes in the total antioxidant activity, antioxidant enzyme activity, and the concentration of thiobarbiturate-reactive products are not observed. In the quantitative assessment of the number of urate microliths in the histological sections of the kidneys, the positive effect of the prophylactic administration of metformin on the course of experimental urate nephrolithiasis was confirmed. As can be seen in Figure 2, in the prevention group there was a significant decrease in the amount of uric acid in comparison with the control group. In the prevention group, the number of urate microliths was 3.5 (1.0; 6.0) per 100 tubules vs. 19.0 (11.8; 29.0) in the control group (P = 0.002).

Table 3
Markers of free radical oxidation in the blood of rats with experimental urate nephrolithiasis with the administration of metformin in the prevention and treatment regimen

Group	Blood plasma			Erythrocytes			
	thiobar-biturate-reactive products, μM	total prooxidant activity, %	total antioxidant activity, %	reduced glutathione, mmol/g Hb	catalase activity, %	superoxide dismutase activity, %	glutathione peroxidase activity, %
Control, n = 14	5.0 (4.8; 5.1)	67.2 (58.3; 76.8)	34,5 (30.9; 41.7)	0.2 (0.2; 0.3)	0.6 (0.6; 0.7)	18.0 (13.6; 22.9)	13.2 (12.2; 16.0)
Prevention, n = 10	5,7 (4.5; 6.4)	45.2 (39.7; 48.1)*	32.9 (29.9; 34.7)	0.3 (0.3; 0.3)	0,7 (0.6; 0.7)	17,9 (13.0; 21.5)	13,5 (12.7; 14.8)
Treatment, n = 10	4,5 (3.8; 5.1)	50.2 (49.7; 54.1)*	34.8 (32.7; 37.2)	0.3 (0.3; 0.3)*	0,7 (0.5; 0.7)	13,9 (12.7; 23.8)	14,0 (13.9; 14.9)
Kruskel-Wallis test							
P	0.111	0.004	0.432	0.028	0.930	0.877	0.252

Note: see Table 1.

Table 4
Markers of free radical oxidation in the kidneys of rats with experimental urate nephrolithiasis with the administration of metformin in the prevention and treatment regimen (per g protein)

Group	Thiobar-biturate-reactive products, μM	Total antioxidant activity, %	Total prooxidant activity, %	Reduced glutathion, mmol	Catalase activity, %	Superoxide dismutase activity, %	Glutathione peroxidase activity, %
Control, n = 14	0.3 (0.2; 0.3)	4.6 (4.4; 5.9)	2.3 (1.6; 2.8)	1.8 (1.4; 2.3)	0.03 (0.02; 0.04)	2.5 (1.9; 3.1)	14.2 (13.2; 19.6)
Prevention, n = 10	0.3 (0.2; 0.4)	5.1 (4.6; 5.5)	4.2 (3.4; 4.6)*	2.5 (2.1; 3.2)*	0.04 (0.03; 0.05)	3.0 (2.6; 3.3)	16.5 (15.0; 19.6)
Treatment, n = 10	0.3 (0.2; 0.5)	5.0 (4.6; 5.4)	4.3 (3.6; 4.6)*	2.6 (2.2; 2.8)*	0.04 (0.02; 0.04)	2.7 (2.1; 3.2)	16.9 (14.6; 18.4)
Kruskel-Wallis test							
P	0.827	0.939	0.003	0.023	0.427	0.443	0.635

Note: see Table 1.

Metformin administration in the treatment regimen significantly reduced the amount of urate microliths: 8.0 (5.5; 12.0) per 100 tubules in the treatment group versus 19.0 (11.8; 29.0) in the control group (P = 0.044).

Discussion

There are several basic conditions that determine the development of urate nephrolithiasis, which include an excessively acidic pH of urine, hyperuricemia and hyperuricosuria, a decreased volume of urine. A low volume of urine is a nonspecific and universal factor contributing to the formation of all types of renal calculi. Due to the limited solubility of uric acid, increasing its concentration with a reduced volume of urine leads to supersaturation and the creation of conditions conducive to precipitation of uric acid and its sodium salt (Robertson, 2003).

The consequence of an increase in the content of uric acid in the blood is an increase in its excretion in the urine with the development of hyperuricosuria. T. Yü and A. Gutman in their work showed a strict linear relationship between the concentration of uric acid in the blood plasma and urate nephrolithiasis. In patients with plasma uric acid levels below 7 mg/dL, microliths were only detected in 9.9% of cases, and with an increase of uric acid concentration in plasma of up to 13 mg/dL and higher, concrements were already detected in 53% of cases (Yu and Gutman, 1967). Later, the researchers confirm these results and concluded that gout is a risk factor for the formation of kidney stones (Kramer et al., 2003). Besides gout, there are other conditions that are accompanied by an increase in the excretion of uric acid in the urine. Among them, the genetic defect of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase enzyme (Lesch-Nyhan syndrome). This enzyme prevents the cellular destruction of purines, and a change in its activity leads to the development of severe hyperuricemia (Davidson et al., 2004). Some hereditary diseases are also characterized by hyperuricemia and may be accompanied by the development of urate nephrolithiasis. Among them, Wilson-Konovalov's disease, Hartnup's disease, Girke's disease, Kelly-Zygmiller syndrome, Fanconi syndrome (Talente et al., 1994). Hyperuricemia can develop against the background of chemotherapy in myelo- and lymphoproliferative diseases because of catabolism of tumor cells, hemolytic and sickle-cell anemia, polycythemia and psoriasis as a result of enhanced cellular turnover (Davidson et al., 2004). In addition, hyperuricemia may be the result of long-term use of a number of drugs, including thiazide and loop diuretics, carbonic anhydrase inhibitors, a number of non-steroidal anti-inflammatory drugs, some antibiotics, angiotensin converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, statins, modern antiviral agents (Burckhardt, 2012). An equally important pathogenic factor contributing to the formation of urate stones is hyperuricosuria. With an increase in the concentration of uric acid in the primary urine, good conditions are created for its precipitation in renal interstitium with subsequent crystallization. Both genetic causes and the impact of acquired factors can lead to the development of hyperuricosuria. Congenital hyperuricosuria occurs as a result of disorders of uric acid transport in the kidneys due to mutations of kidney uric acid transporters. Acquired hyperuricosuria can be caused by a purines-rich diet and the use of uricosuric medicines such as pyrazinamide, probenicide, benzbromarone, sulfinpyrazone, phenylbutazone, acetylsalicylic acid in high doses, losartan, fenofibrate, atorvastatin (Liebman et al., 2007).

During the experiments, it was found that both preventive and therapeutic use of metformin significantly facilitate the course of experimental urate nephrolithiasis. First, there was a significant decrease in plasma uric acid concentrations and a reliable decrease of it with urinary excretion against the background of long-term administration of the drug in the prevention and treatment groups compared to the control values. The results obtained are in good agreement with the view that the action of metformin is not limited to interfering with the metabolism of carbohydrates, but it is more extensive, and affects other types of metabolism, including purine metabolism (Najeed et al., 2002; Curthoys, 2013; Rena et al., 2013). Metformin may also inable to influence the transport of uric acid by increasing the number of its specific Glut9 transporters (SLC2A9) on the surface of the membranes of liver cells, kidneys, intestines, chondrocytes, leukocytes. In the kidneys, this transporter is located on the apical (isoform "b") and the basolateral (isoform "a") membranes and is responsible for the reabsorption of uric acid from the primary urine into the blood. In enterocytes, Glut9a provides the transfer of uric acid from the blood to the lumen of the intestine, which ensures its excretion with feces (So and Thorens, 2010). It provides reduction of the concentration of uric acid in the blood plasma and excretion of uric acid with the urine.

Secondly, against the background of the use of metformin, the urine pH shifted to the alkaline side in animals from both experimental groups in comparison with the control values. As noted earlier, the excessively acid urine pH is a potent factor contributing to urate lithogenesis (Liu et al., 2017). Considering the significance of the acidity level of urine in the formation of urate microliths, it can be assumed that the pH shift to the alkaline side under the influence of metformin had a beneficial effect. Increasing the sensitivity of the insulin receptors of the renal tubules to insulin, metformin activates the function of NHE3 and, as a consequence, the transport of NH_3 to the lumen of the renal tubule, which leads to an increase in the pH of the urine (Curthoys, 2013). It should also be noted that a pronounced decrease in the level of lactate dehyd-

rogenase indirectly indicates a favorable effect of metformin on the state of tubule epitheliocytes. Of special interest is the study of the effect of metformin on the processes of free radical oxidation accompanying urate nephropathy, an important role of which in the development of this state was described by us earlier (Perfil'ev et al., 2017). Analyzing the dynamics of free radical oxidation processes in blood and kidneys of experimental animals in comparison with the control animals, it can be assumed that the total antioxidant activity of renal tissue increased under the influence of metformin led to a decrease in the blood total prooxidant activity of rats with experimental urate nephrolithiasis. Moreover, the noted absence of activation of antioxidant enzymes is possibly due to the ability of metformin to interfere with the processes of free radical oxidation. It is well known that metformin can inhibit oxidative reactions, including oxidative glycosylation of proteins (Najeed et al., 2002; Daskalopoulou et al., 2004). Probably, against the background of metformin, the activity of non-enzyme antioxidant protection increased at the expense of low-molecular compounds with antioxidant properties, including some vitamins, β-carotene etc. (Nissim et al., 1995). Thus, in the treatment of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus, a tendency was registered to increase and normalize the content of endogenous α-tocopherol, which is known to be one of the main endogenous antioxidant compounds (Mah et al., 2015).

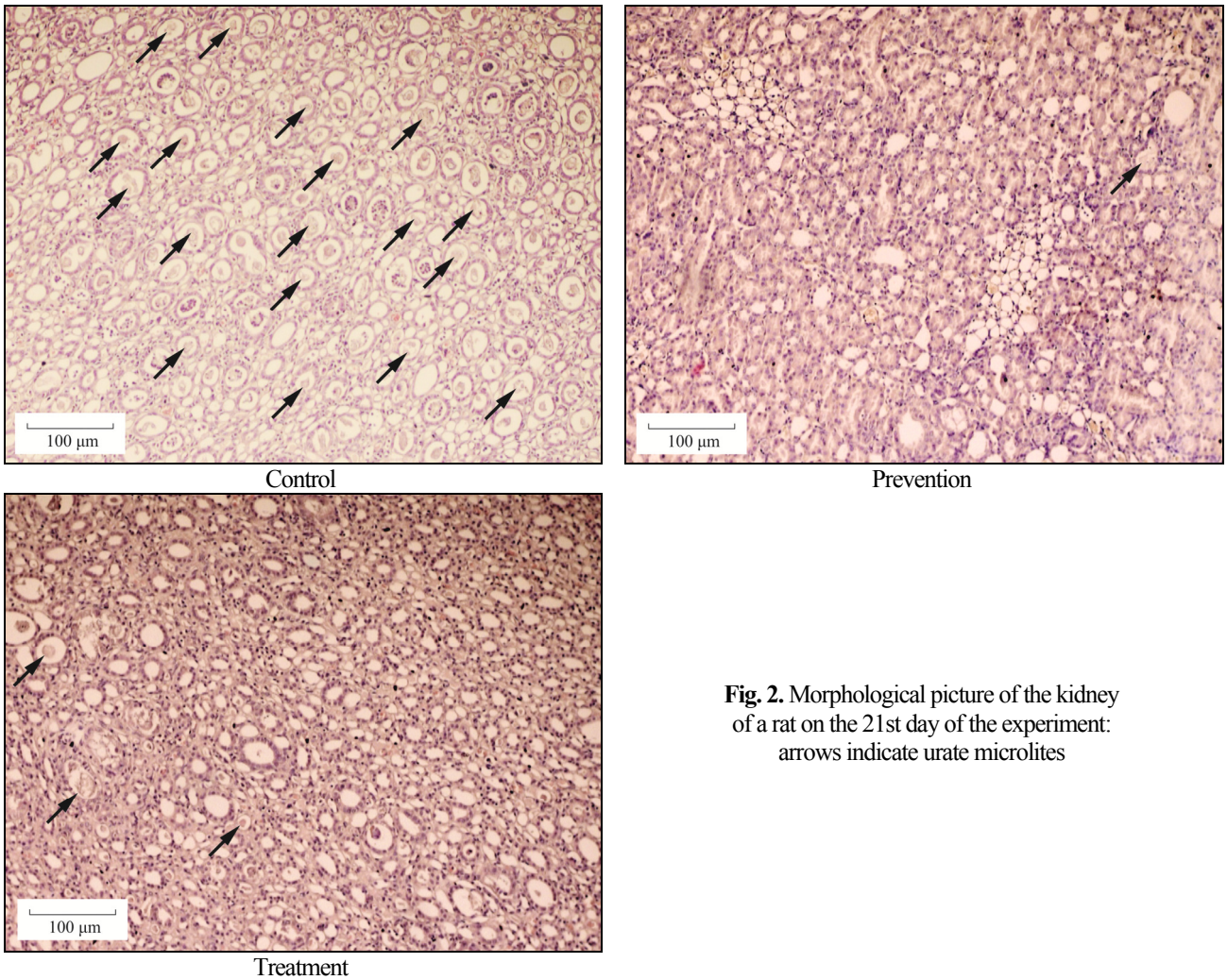


Fig. 2. Morphological picture of the kidney of a rat on the 21st day of the experiment: arrows indicate urate microlites

In addition, it is well known that uric acid is a powerful antioxidant, but under certain conditions it acquires prooxidant properties, caused by the formation of a urate radical during oxidation (Glantzounis et al., 2005; So and Thorens, 2010). It is possible that under the influence of metformin in plasma and kidneys, an optimal concentration of uric acid is created, which provides a greater manifestation of its antioxidant properties.

Conclusion

The use of metformin both in preventive and treatment regimens has a beneficial effect on the course of experimental urate nephrolithiasis. The use of the drug leads to a decrease in the number of renal stones, leads toa reliable decrease the level of uric acid in the plasma and urine of sick animals. Prophylactic use of metformin greatly facilitates the course of urate nephropathy, which is confirmed by a shift in the pH of the urine to the alkaline side, a decrease in the activity of lactate dehydrogenase, an enzyme that reflects the damage to the renal epithelium, and a decrease in free radical oxidation in the blood and in the kidneys.

References

Abate, N., Chandalia, M., Cabo-Chan, A. V., Moe, O. W., & Sakhaee, K. (2004). The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: Novel features of renal manifestation of insulin resistance. Kidney International, 65(2), 386–392.

Akman, T., Binbay, M., Erbin, A., Tepeler, A., Sari, E., Kucuktopcu, O., & Muslumanoglu, A. (2012). The impact of metabolic syndrome on long-term outcomes of percutaneous nephrolithotomy (PCNL). British Journal of Urology International, 110(11c).

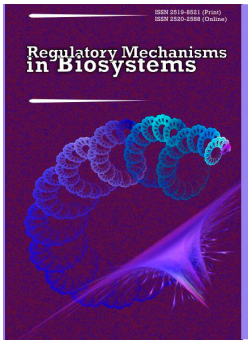
Bobulescu, I. A., Maalouf, N. M., Capolongo, G., Adams-Huet, B., Rosenthal, T. R., Moe, O. W., & Sakhaee, K. (2013). Renal ammonium excretion after an acute acid load: Blunted response in uric acid stone formers but not in patients with type 2 diabetes. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 305(10), F1498–F1503.

Burckhardt, G. (2012). Drug transport by organic anion transporters (OATs). Pharmacology and Therapeutics, 136(1), 106–130.

Cameron, M. A., Maalouf, N. M., Adams-Huet, B., Moe, O. W., & Sakhaee, K. (2006). Urine composition in type 2 diabetes: Predisposition to uric acid nephrolithiasis. Journal of the American Society of Nephrology, 17(5), 1422–1428.

Choo, J., Yoon, S. J., Ryu, H., Park, M. S., Lee, H. S., Park, Y. M., & Lim, D. S. (2016). The seoul metropolitan lifestyle intervention program and metabolic

syndrome risk: A retrospective database study. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13(7), 667.
Curthoys, N. P. (2013). Renal ammonium ion production and excretion. Seldin and Giebisch's the kidney (Fifth edition).
Daskalopoulou, S. S., Mikhailidis, D. P., & Elisaf, M. (2004). Prevention and treatment of the metabolic syndrome. Angiology, 55(6), 589–612.
Davidson, M. B., Thakkar, S., Hix, J. K., Bhandarkar, N. D., Wong, A., & Schreiber, M. J. (2004). Pathophysiology, clinical consequences, and treatment of tumor lysis syndrome. The American Journal of Medicine, 116(8), 546–554.
Glantzounis, G. K., Tsimoyiannis, E. C., Kappas, A. M., & Galaris, D. A. (2005). Uric acid and oxidative stress. Current Pharmaceutical Design, 11(32), 4145–4151.
Kim, Y. J., Kim, C. H., Sung, E. J., Kim, S. R., Shin, H. C., & Jung, W. J. (2013). Association of nephrolithiasis with metabolic syndrome and its components. Metabolism, 62(6), 808–813.
Kramer, H. J., Choi, H. K., Atkinson, K., Stampfer, M., & Curhan, G. C. (2003). The association between gout and nephrolithiasis in men: The health professionals' follow-up study. Kidney International, 64(3), 1022–1026.
Liebman, S. E., Taylor, J. G., & Bushinsky, D. A. (2007). Uric acid nephrolithiasis. Current Rheumatology Reports, 9(3), 251–257.
Liu, N., Xu, L., Shi, Y., Fang, L., Gu, H., Wang, H., & Zhuang, S. (2017). Pharmacologic targeting ERK1/2 attenuates the development and progression of hyperuricemic nephropathy in rats. Oncotarget, 8(20), 33807–33826.
Mah, E., Sapper, T. N., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M. L., Schill, K. E., Clinton, S. K., & Bruno, R. S. (2015). α-Tocopherol bioavailability is lower in adults with metabolic syndrome regardless of dairy fat co-ingestion: A randomized, double-blind, crossover trial. The American Journal of Clinical Nutrition, 102(5), 1070–1080.
Najeed, S. A., Khan, I. A., Molnar, J., & Somberg, J. C. (2002). Differential effect of glyburide (glibenclamide) and metformin on QT dispersion: A potential adenosine triphosphate sensitive K^+ channel effect. The American Journal of Cardiology, 90(10), 1103–1106.
Nissim, I., States, B., Nissim, I., Lin, Z. P., & Yudkoff, M. (1995). Hormonal regulation of glutamine metabolism by OK cells. Kidney International, 47(1), 96–105.
Perfil'ev, V. Y., Zverev, Y. F., Zharikov, A. Y., & Bryukhanov, V. M. (2017). The role of free radical oxidation in the development of experimental urate nephropathy. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 163(1), 28–30.
Rena, G., Pearson, E. R., & Sakamoto, K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: Old or new insights? Diabetologia, 56(9), 1898–1906.
Roberts, C. K., Hevener, A. L., & Barnard, R. J. (2013). Metabolic syndrome and insulin resistance: Underlying causes and modification by exercise training. Comprehensive Physiology, 3(1), 1–58.
Robertson, W. G. (2003). Renal stones in the tropics. Seminars in Nephrology, 23(1), 77–87.
Sakhaee, K., & Maalouf, N. M. (2008). Metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis. Seminars in Nephrology, 28(2), 174–180.
So, A., & Thorens, B. (2010). Uric acid transport and disease. The Journal of Clinical Investigation, 120(6), 1791–1799.
Srikanthan, K., Feyh, A., Visweshwar, H., Shapiro, J. I., & Sodhi, K. (2016). Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: A panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. International Journal of Medical Sciences, 13(1), 25–38.
Stavric, B., Johnson, W. J., & Grice, H. C. (1969). Uric acid nephropathy: An experimental model. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 130(2), 512–516.
Talente, G. M., Coleman, R. A., Alter, C., Baker, L., Brown, B. I., Cannon, R. A., & Herman, G. E. (1994). Glycogen storage disease in adults. Annals of Internal Medicine, 120(3), 218–226.
Won, J. C., Hong, J. W., Noh, J. H., & Kim, D. J. (2016). Association between estimated 24-h urinary sodium excretion and metabolic syndrome in Korean adults: The 2009 to 2011 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Medicine, 95(15), 1–8.
Yarovoi, S. K., Golovanov, S. A., Khaziakhmetova, M. R., & Dzhalilov, O. V. (2017). Nephrolithiasis coexisting with type 2 diabetes: Current concept of the features of stone formation and the effects of hypoglycemic therapy on lithogenesis. Urologiia, 3, 92–97.
Yu, T. F., & Gutman, A. B. (1967). Uric acid nephrolithiasis in gout: Predisposing factors. Annals of Internal Medicine, 67(6), 1133–1148.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 649–655
doi: 10.15421/0217100

Morphometric parameters of the intestine and aggregated lymphatic nodules of meat rabbits

P. M. Gavrylin, M. O. Nikitina

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 07.10.2017
Received in revised form 29.10.2017
Accepted 01.11.2017

Dnipro State Agrarian and Economic University, Serhii Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine.
Tel.: +38-097-969-46-96.
E-mail: morfologagro@gmail.com

Gavrylin, P. M., & Nikitina, M. O. (2017). Morphometric parameters of the intestine and aggregated lymphatic nodules of meat rabbits. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 649–655. doi:10.15421/0217100

Nowadays, new breeds of rabbits are appearing with high productivity and rapid growth rate. These breeds require fresh research to be conducted in different fields, which include morphology of the intestine and gut-associated lymphoid tissue (GALT). The morphology of the intestine and GALT of meat rabbits are the investigated objects of the current research. We conducted the investigation on rabbits of different ages (1, 10, 20, 30, 60 and 90 days old). Each age group consisted of five animals. All veterinary ethical requirements were complied with. The body lengths and body masses were measured. Using t-coefficients, we estimated the range of variation of these parameters in each age group. The conclusion about this variation was taken. The masses and lengths of the different intestine parts were investigated as well. Using the obtained values, we provided a continuous numerical model to compute the mass and length of any intestine part of a rabbit of any age in the range from one to 90 days. This allowed us to represent the obtained empirical model by a plot for subsequent detailed study. We found that the changes in masses and lengths do not follow the same pattern for all intestine parts. For some intestine parts, this pattern is approximately linear in the range from one to 90 days; meanwhile for others, the changes in masses and lengths are quite complicated. We observed two local maximas of the growth rate for some intestine parts. Apart from the masses and lengths of the intestine parts, we accomplished macro analysis of the aggregated lymphoid nodules of each age group of animals. We estimated the index of gross area and the law by which it changes in each group. The research results presented here may be used as a basis for composing food ration, assessment of immune status and development of effective prevention and treatment against some diseases.

Keywords: small and large intestine; ilial diverticulum; vermiform appendix; gut-associated lymphoid tissue; average daily gain; growth of length

Морфометричні показники кишечника та агрегованих лімфатичних вузликів кролів м’ясного напрямку використання

П. М. Гаврилін, М. О. Нікітіна

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Поява нових порід кролів із підвищеною продуктивністю та прискореною інтенсивністю росту зумовлює необхідність досліджень у різних галузях, у тому числі морфології кишечника та його імунних структур. Результати цих досліджень необхідні як базові дані для складання раціону, визначення імунного статусу, розроблення ефективної профілактики та лікування деяких хвороб тварин. У дослідження залучені кролі різних вікових груп: 1, 10, 20, 30, 60 та 90-добового віку. Визначено інтервальні оцінки маси та довжини тіла, за якими встановлено, що їх приріст відбувається не рівномірно. За середніми значеннями вимірювань відділів кишечника кролів отримані моделі відносної зміни їх маси та довжини залежно від віку. Періоди найбільшого та найменшого приросту маси збігаються у 1) порожній і прямій кишках, 2) сліпій, великій і малій ободових кишках. У порожній та прямій кишках період найменшого приросту маси реєстрували з першої доби народження до 10-ї доби розвитку, але найактивніше маса збільшується з 60-ї по 90-ту добу. Сліпій, великій та малій ободовим кишкам також властиві найповільніші зміни маси з 1-ї по 10-ту добу життя, але найбільший приріст відмічається від 20-ї по 30-ту добу постнатального онтогенезу. Виявлено збіг лінійного приросту у сліпій та великій ободовій кишках. На 20-ту добу постнатального онтогенезу в тонкому відділі кишечника макроскопічно виявлено агреговані лімфатичні вузлики, загальна площа яких до 90-ї доби життя нерівномірно збільшується.

Ключові слова: відділи кишечника; дивертикул клубової кишки; червоподібний відросток; агрегована лімфоїдна тканина; слизова оболонка кишечника; приріст маси; лінійний приріст

Вступ

Кролівництво виступає як перспективна галузь тваринництва завдяки фізіологічним особливостям виду (плодючість і скороспілість) (Pechenkin et al., 2013) та корисним властивостям продукції, тому активно ведуться дослідження, спрямовані на визначення впливу на кролів умов утримання з урахуванням поведінки, рівня стресу та щільності утримання (Trocino et al., 2014), оцінювання відмінностей у туші, якості характеристик м'яса та м'язових волокон серед кролів різних порід і розмірів (Tumova et al., 2014).

Таким чином, постає питання збереження необхідних якостей продукції кролівництва та економічної ефективності виробництва, для успіху в чому необхідно знизити витрати на годування та смертність унаслідок захворювань шлунково-кишкового тракту (Tazzoli et al., 2014). Тому проводяться дослідження раціонів із визначенням впливу кількості білка на показники росту, вміст сечового азоту та загальний стан здоров'я кролів (Gidenne et al., 2013); обмеженого годування з високою енергетичною поживністю (Knudsen et al., 2014), крохмалю на ферментацію у сліпій кишці (Trocino et al., 2011) тощо. Завдяки подібним дослідженням у праці Fortun-Lamothe and Boullier (2007) установлено, що деякі поживні речовини, наприклад, жирні кислоти та клітковина, можуть бути використані для поліпшення імунної здатності тварин, оскільки вони беруть участь у розвитку імунної відповіді. Саме кишечник та його імунні структури відіграють важливу роль у забезпеченні імунного статусу тварин (Samoyliuk, 2011). Вагоме значення приділяється дослідженню морфології травної системи та її лімфоїдних утворень, оскільки їх слизова оболонка постійно піддається антигенному впливу через корм (Korableva, 2011).

Кишковий канал – найбільша поверхня тіла, яка захищає внутрішнє середовище від зовнішнього середовища (Sicherer et al., 2010; Camps-Bossacoma et al., 2017). Вага травного каналу у кроликів продуктивних порід складає приблизно 20% від загальної маси тіла, при цьому шлунок і сліпа кишка виконують роль основних резервуарів (Margüenda et al., 2012). Основна функція кишечника полягає не тільки у процесах травлення та всмоктуванні поживних речовин (Sicherer et al., 2010; Camps-Bossacoma et al., 2017), а й у формуванні імунітету. У свою чергу, лімфоїдна тканина, що асоційована з його слизовою оболонкою, відіграє центральну роль у підтриманні гомеостазу (Vighi et al., 2008; Camps-Bossacoma et al., 2017). Вона містить майже 70% імунних клітин усієї імунної системи, що захищає поверхню кишечника від потенційно шкідливих антигенів (Mowat et al., 2003; Camps-Bossacoma et al., 2017).

Тривалий контакт із поверхнею слизової оболонки травного тракту корму та продуктів його травлення спричиняє формування лімфоїдних вузликів (Korableva, 2011b). Агреговані лімфатичні вузлики – високоорганізовані лімфоїдні утворення кишечника, що розглядаються як вагомий компонент імунної системи організму. Вони беруть участь у процесі формування імунної відповіді, а також у лімфопоезі та рециркуляції лімфоцитів (Korableva, 2011a). Агреговані лімфатичні вузлики разом із червоподібним відростком являють собою невід'ємні та важливі компоненти імунної системи організму тварини. Найбільша кількість агрегованих лімфатичних вузликів міститься у тонкому відділі кишечника (Korableva, 2011a). За результатами досліджень Stoyanovskiy et al. (2014) установлено, що у слизовій оболонці дванадцятипалої кишки 6- та 12-місячних кролів агреговані лімфатичні вузлики не виявляються. У порожній кишці їх близько 4–5. Агреговані лімфатичні вузлики округлої або дещо видовженої форми, виступають над поверхнею слизової оболонки. У клубовій кишці наявний один агрегований лімфатичний вузлик округлої форми, а також специфічне для кролів утворення, яке міститься перед сліпою кишкою у вигляді дивертикулоподібного розширення з міцними стінками – дивертикул клубової кишки. Сліпа кишка об'ємна, має перехвати, що розділяють кишку на окремі комірки, поступово звужується та закінчується сліпо переходячи в червоподібний відросток, для якого характерне потовщення стінок. Імунні структури в кінцевому відділі товстих кишок у кролів макроскопічно не виявлені (Stoyanovskiy et al., 2014).

Створюються нові породи з підвищеною продуктивністю та прискореною інтенсивністю росту для промислових цілей, які потребують додаткового вивчення морфологічних особливостей будови кишечника та асоційованих із його слизовою оболонкою імунних компонентів як необхідних базових даних, із подальшим застосуванням їх для складання раціону, визначення імунного статусу, розроблення ефективної профілактики та лікування деяких хвороб тварин.

Мета статті – виявити особливості вікової динаміки макрометричних показників кишечника та його імунних структур, асоційованих зі слизовою оболонкою, зокрема, агрегованих лімфатичних вузликів, у кролів м'ясного напряму використання, які відрізняються високими показниками швидкості росту тіла в період постнатального онтогенезу.

Матеріал і методи досліджень

Дослід проводили на базі Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Всі маніпуляції з піддослідними тваринами проведені з дотриманням етичних норм і, відповідно до міжнародного та українського законодавства. Матеріал дослідження – кишечник (тонкий і товстий відділи) клінічно здорових груп кролів м'ясного напрямку використання 1, 10, 20, 30, 60 та 90-добового віку, по п'ять особин у кожній віковій групі. Прижиттєво зважували кожну тварину та вимірювали довжину тіла.

Після анатомічного препарування відбирали матеріал для визначення макрометричних і морфометричних показників кишечника, дослідження макроморфології, лінійних промірів і форми агрегованих лімфатичних вузликів. Зважували окремі відділи кишечника на аналітичних вагах Kern 440-35A з відтворюваністю 0,01 г. Лінійні проміри відділів кишечника (довжина, ширина) та агрегованих лімфатичних вузликів виконували за допомогою сантиметрової стрічки та лінійки з ціною поділки 1 мм.

У кожній віковій групі кролів вимірювали довжини та маси відділів кишечника. За отриманими вимірюваннями розраховували середні значення, що є оцінками типової маси та довжини у кожній групі. За отриманими середніми значеннями параметрів розраховували відносні оцінки за формулою:

$$z_k^* = \frac{\bar{x}_k}{x_{90}} 100\% , \qquad (1)$$

де $\bar{x}_k$ – середнє значення параметра (маси або довжини відділу кишечника), що вимірювався для k-ї вікової групи; $\bar{x}_{90}$ – середнє значення вимірювань параметра відділу кишечника кролів на 90-ту добу розвитку; z_k^* – оцінка параметра k-ї вікової групи кролів у процентах відносно значення оцінки параметра кролів на 90-ту добу; $k \in \{1, 10, 20, 30, 60, 90\}$.

Оцінки дозволяють порівнювати динаміку росту відділів кишечника. За значеннями цих оцінок отримані неперервні числові моделі відносної зміни маси та довжини відділів кишечника залежно від віку кролів. Моделі обчислені за допомогою кусково-неперервної інтерполяції кубічними ермітовими поліномами (PCHIP). Характерна особливість обраного методу інтерполяції – збереження характерної форми та монотонності функції, що інтерполюється (Fritsch et al., 1980).

Результати

Вимірювали масу та довжину тіла та кишечника шести вікових груп кролів по п'ять особин у кожній. Інтервальні оцінки маси та довжини тіла та маси та довжини кишечника неведені в таблиці 1 для кожної вікової групи кролів. Розкид оцінок параметрів у кожній віковій групі істотно менший за відстань між оцінками параметрів різних вікових груп. Це означає, що відмінність між групами зумовлена різними значеннями параметрів, а не похибками вимірювань. Аналіз значень оцінок (табл. 1) показує, що у постнатальному періоді онтогенезу приріст живої маси кролів відбува-

ється не рівномірно. Від народження загальна маса тіла кроленяти дорівнює в середньому 53,2 г. Найменш інтенсивний набір маси тіла з 1-ї по 20-ту добу розвитку, коли середньодобовий приріст маси становить близько 14,3 г за добу. З 20-ї доби відмічали дещо прискорене збільшення живої маси з найактивнішим періодом з 30-ї до 60-ї доби, з середньодобовим приростом близько 43,8 г на добу. У період з 60-ї по 90-ту добу набір маси тіла знижується до середнього значення 34,0 г за добу. Маса кролів м'ясного напрямку використання на 90-ту добу життя досягає близько 2 960 г, тобто збільшується майже в 55 разів порівняно з початковою.

Таблиця 1

Оцінки маси та довжини тіла та кишечника кролів (m ± SD, n = 5)

Доба життя	Маса тіла, г	Довжина тіла, см	Загальна маса кишечника, г	Загальна довжина кишечника, см
1	53,2 ± 3,0	10,5 ± 1,1	1,63 ± 0,17	72,9 ± 1,0
10	201,8 ± 4,3	16,6 ± 1,1	5,20 ± 0,26	145,4 ± 2,0
20	339,5 ± 6,8	23,2 ± 1,3	23,06 ± 1,36	248,7 ± 4,7
30	625,5 ± 8,6	31,0 ± 1,6	39,24 ± 2,18	318,2 ± 4,3
60	1 940,0 ± 114,0	41,2 ± 1,6	58,91 ± 0,91	426,5 ± 8,2
90	2 960,0 ± 96,2	60,2 ± 2,4	106,74 ± 1,88	617,8 ± 6,0

Довжина тіла кролів у постембріональному періоді змінюється не лінійно та на перший день складає майже 10,5 см. До 30-ї доби розвитку спостерігали відносно рівномірне збільшення довжини тіла, з найвищими показниками з 20-ї по 30-ту добу розвитку із середньодобовим приростом близько 0,78 см на добу. З 30-ї доби відбувається різке зниження інтенсивності приросту довжини тіла, з найменшим показником у період від 30-ї до 60-ту добу розвитку і становить у середньому 0,34 см за добу. До 90-ї доби збільшується лінійний приріст довжини тіла та збільшується майже в 10 разів від показника довжини, встановленого на першу добу життя.

Загальна маса кишечника на перший день постембріонального розвитку становить близько 1,63 г. Приріст загальної маси кишечника (тонкого та товстого відділів) найменш інтенсивний у період з 1-ї по 10-ту добу із середньодобовим збільшенням маси органа близько 0,36 г за добу. Найактивніше кишечник набирає масу у період з 20-ї по 30-ту добу, коли приріст становить у середньому 1,70 г на добу. Від 30-ї доби інтенсивність набору маси кишечника знижується, а з 60-ї по 90-ту добу розвитку – збільшується до майже 1,59 г за добу. На 90-ту добу розвитку абсолютна маса кишечника в середньому складає 106,74 г, що в 65 разів більше за визначену масу в першу добу після народження.

На першу добу постнатального онтогенезу загальна довжина кишечника кроленят становить близько 72,9 см. Від народження спостерігається відносно активний період збільшення лінійного приросту, але найінтенсивніший розвиток припадає на 10–20-ту добу із середньодобовим збільшенням близько 10,3 см за добу. Після 20-ї доби відзначили зниження інтенсивності змін загальної довжини кишечника, з найменшим показником на 30–60-ту добу зі значенням приросту в середньому на 3,6 см на добу. До 90-ї доби лінійний приріст дещо збільшується та кінцеве значення загальної довжини кишечника в середньому дорівнює 617,8 см, що у 8,5 раза більше за початкову довжину.

Оцінки дозволяють порівнювати динаміку росту відділів кишечника між собою. На рисунку 1 за отриманими числовими моделями зображені графіки відносної зміни маси відділів кишечника. Вертикальними лініями показано довірчий інтервал для нормованих оцінок математичного сподівання маси відділів кишечника (P = 0,10).

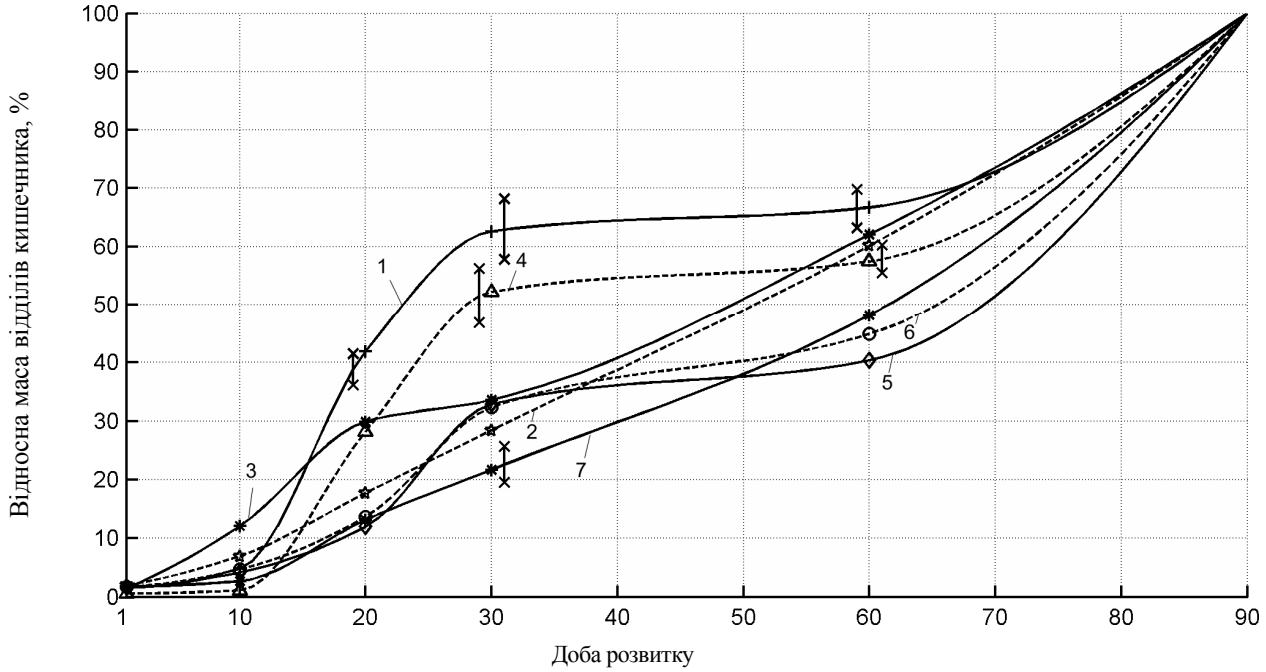


Рис. 1. Відносна зміна очікуваної маси (у відсотках) відділів кишечника залежно від доби життя: *1* – дванадцятипала кишка, *2* – порожня кишка, *3* – клубова кишка, *4* – сліпа кишка, *5* – велика ободова кишка, *6* – мала ободова кишка, *7* – пряма кишка

Використовуючи дані таблиці 2 та рисунка 1, можна розрахувати абсолютну масу кожного відділу кишечника з першого по 90-ту добу постнатального розвитку. На рисунку 1 спостерігали певні особливості у відповідні постембріональні періоди приросту маси кожного відділу кишечника. Для більшості відділів найменш активний етап приросту маси до 10-ї доби та найінтенсивніший – з 10-ї по 20-ту добу постнатального онтогенезу. Найменше змінюється абсолютна маса порожньої кишки (збільшується в 49 разів) та найбільше – сліпої (зростає в 170 разів). Збігаються періоди найбільшої та найменшої активності приросту маси у таких відділах: 1) порожній та прямій; 2) сліпій, великій і малій ободових кишках. Для першої групи характерно, що період меншого приросту маси припадає на 1–10-ту добу розвитку та найінтенсивніше маса збільшується з

60-ї по 90-ту добу. Другій групі також властиві найповільніші зміни у масі на 1–10-ту добу життя, але найактивніший приріст припадає на 20–30-ту добу постнатального розвитку.

Таблиця 2

Оцінки маси та довжини кожного відділу кишечника на 90-ту добу розвитку (x ± SD, n = 5)

Відділ кишечника	Маса відділу, г	Довжина відділу, см
Дванадцятипала кишка	9,79 ± 0,14	66,2 ± 1,9
Порожня кишка	28,77 ± 0,54	306,0 ± 1,0
Клубова кишка	9,70 ± 0,30	40,2 ± 1,9
Сліпа кишка	22,22 ± 0,45	55,6 ± 0,9
Велика ободова кишка	11,44 ± 0,73	25,3 ± 0,7
Мала ободова кишка	8,69 ± 0,43	20,7 ± 1,0
Пряма кишка	16,13 ± 0,29	103,8 ± 0,8

Серед відділів кишечника найменші показники початкової абсолютної маси спостерігаються у дванадцятипалій (0,16 ± 0,03 г), клубовій (0,14 ± 0,03 г), сліпій (0,13 ± 0,04 г), великій (0,18 ± 0,02 г) та малій ободових (0,15 ± 0,02 г) кишках, але найнижче значення співвідношення до кінцевої маси відділу має сліпа кишка (близько 0,58%). Найважчий відділ на першу добу життя – порожня кишка, абсолютна вага якої становить 0,59 ± 0,03 г, за співвідношення до маси на 90-ту добу розвитку значення близько 2,1%. Для дванадцятипалої кишки характерний повільний приріст маси від народження до 10-ї доби розвитку, після чого спостерігається найінтенсивніше збільшення ваги відділу протягом наступних 10 діб, яке дорівнює близько 0,36 г на добу. Після 20-ї доби спостерігається поступове зменшення набору маси, з мінімальним значенням у період 30–60-ї доби, що становить у середньому 0,013 г за добу. Маса дванадцятипалої кишки на 90-ту добу розвитку в середньому складає 9,79 г, що у 52 рази перевищує вихідну масу.

Порожній кишці, з початковою в постнатальний період масою 0,59 ± 0,03 г, притаманний найповільніший період приросту від народження до 10-ї доби життя, який дорівнює близько 0,14 г на добу. У подальшому спостерігали відносно рівномірне збільшення маси відділу у період із 10-ї по 60-ту добу, після якого за наступні 30 діб відбувається активний приріст маси в середньому на 0,38 г на добу. Кінцева, на момент завершення досліду (90-та доба), маса складає близько 28,8 г, яка більша за початкову в 49 разів.

Приріст постембріональної маси клубової кишки має відносно повільний період до 10-ї доби, після якої починається найактивніший набір маси до 20-ї доби, якому відповідає збільшення в середньому на 0,17 г за добу. З 20-ї по 30-ту добу відбувається найінтенсивніший приріст маси, що становить близько 0,31 г на добу. До 90-ї доби спостерігали прискорення набору маси з подальшим відносно рівномірним її збільшенням із кінцевою вагою відділу майже 9,7 г, тобто в 72 рази більше маси, встановленої на першу добу життя кроленяти.

Дивертикул клубової кишки як специфічне утворення відповідного відділу має власні закономірності приросту маси. На першу добу життя його маса дорівнює 0,01 ± 0,002 г. Найповільніший набір маси з 10-ї по 20-ту добу розвитку, і відповідає в середньому 0,005 г за добу, після чого спостерігали незначне збільшення маси. Після 30-ї доби характерний інтенсивніший приріст маси з максимальним значенням на 60–90-ту добу, що становить близько 0,09 г на добу. Кінцева абсолютна маса дивертикулу клубової кишки складає 5,45 ± 0,07 г, отже, зростає у 400 разів порівняно з початковою масою.

У сліпій кишці з першого дня до 10-ї доби відмічали найменш активний період приросту маси зі значенням близько 0,01 г на добу. З 10-ї по 20-ту добу відбувається найактивніше збільшення маси в середньому по 0,60 г на добу, а до 30-ї доби приріст маси незначно зменшується. До 90-ї доби збільшення маси сповільнюється та кінцеве значення в середньому дорівнює 22,2 г, що у 173 рази перевищує вихідну масу цього відділу.

Червоподібний відросток має подібні до сліпої кишки закономірності набору маси. На першу добу постнатального розвитку його маса склала 0,04 ± 0,01 г. До 10-ї доби реєстрували найменш інтенсивний період набору маси, що становив у середньому 0,007 г на добу, а з 10-ї по 20-ту добу – найактивніший, близько 0,12 г за добу. У подальшому швидкість набору маси знижується, на 90-ту добу становить близько 6,0 г, тобто перевищує масу, встановлену на першу добу життя, у 137 разів.

Для великої ободової кишки встановили найповільніші постембріональні періоди збільшення маси на 1–10-ту та 30–60-ту добу постембріонального розвитку із середньодобовим приростом близько 0,03 г на добу. Найінтенсивніший набір маси припадав на 20–30-ту добу, що становив у середньому 0,24 г за добу та 60–90-ту добу – близько 0,23 г на добу. Маса великої ободової кишки на 90-ту добу становила 11,44 г, отже, початкова маса збільшується в 65 разів.

Збільшення показнику маси малої ободової кишки найменш інтенсивне від дня народження до 10-ї доби, і складає близько 0,03 г за добу. Найактивніший приріст маси припадає на період 20–30-ї доби та дорівнює в середньому 0,16 г на добу, після чого дещо знижується. На 60–90-ту добу маса знов активно зростає близько 0,16 г за добу до кінцевого середнього значення 8,69 г, що у 56 разів більше, ніж встановлена маса на першу добу життя.

Пряма кишка на першу добу постнатального онтогенезу має абсолютну масу 0,29 ± 0,03 г. На 1–10-ту добу розвитку спостерігали найповільніший проміжок приросту маси в середньому на 0,01 г за добу, після чого прискорюється інтенсивність набору маси з найактивнішим показником на 60–90-ту добу близько 0,28 г на добу. На 90-ту добу маса відділу дорівнює 16,1 г, тобто у 55 разів перевищує початкове значення.

Для вказаних вікових групп, окрім маси відділів, кишечника досліджували зміну їх довжини. Отримані числові моделі зображені у вигляді графіків (рис. 2).

За даними таблиці 2 та рисунка 2, можна розрахувати довжину відділу кишечника з 1-ї по 90-ту добу постембріонального розвитку для кожного відділу кишечника. Найменше змінюється абсолютна довжина клубової кишки (збільшується у 4,5 раза) та найбільше – сліпої (зростає у 16 разів). Збігаються періоди найбільшої та найменшої активності лінійного приросту у сліпій і великій ободовій кишках, тобто найактивніший лінійний приріст спостерігається з 20-ї по 30-ту добу життя, після якого спостерігається різке уповільнення з найменшим показником на 30–60-ту добу. Найкоротший відділ на першу добу життя мала ободова кишка, яка має абсолютну довжину 2,76 ± 0,17 см і найдовший відділ – порожня кишка довжина якої складає 37,18 ± 0,16 см.

Абсолютна довжина дванадцятипалої кишки на першу добу постнатального розвитку – 6,36 ± 0,11 см. Лінійний приріст у дванадцятипалій кишці найбільше виражений із 10-ї по 20-ту добу та становить у середньому 1,83 см за добу. Спостерігається незначне зменшення швидкості лінійного приросту до 30-ї доби. Найменша інтенсивність збільшення довжини відділу – з 30-ї по 60-ту добу, дорівнює близько 0,14 см на добу. До 90-ї доби незначне прискорення росту довжини відділу з кінцевим показником близько 66,2 см, тобто на порядок перевищує початкове значення довжини відділу.

Найактивніше у порожній кишці збільшення довжини відбувається з 10-ї по 20-ту добу після народження (середньодобовий приріст – близько 4,0 см за добу). Із 20-ї по 30-ту добу – різке зниження лінійного приросту з мінімальним значенням близько 0,88 см на добу. Довжина відділу збільшується до 90-ї доби розвитку, на який становить майже 306 см, що увосьмеро більше за значення встановленого на першу добу.

Довжина клубової кишки на першу добу постембріонального періоду складає 8,84 ± 0,23 см. Найбільший лінійний приріст відмічається з 1-ї по 10-ту добу розвитку, що має середньодобове значення близько 0,83 см за добу. Після чого поступово сповільнюється до 20-ї доби, падає з найменшою інтенсивністю у збільшенні довжини відділу у період з 30-ї по 60-ту добу та становить 0,08 см на добу. До 90-ї доби розвитку довжина відділу збільшується уп'ятеро з початкової та в середньому дорівнює 40,2 см.

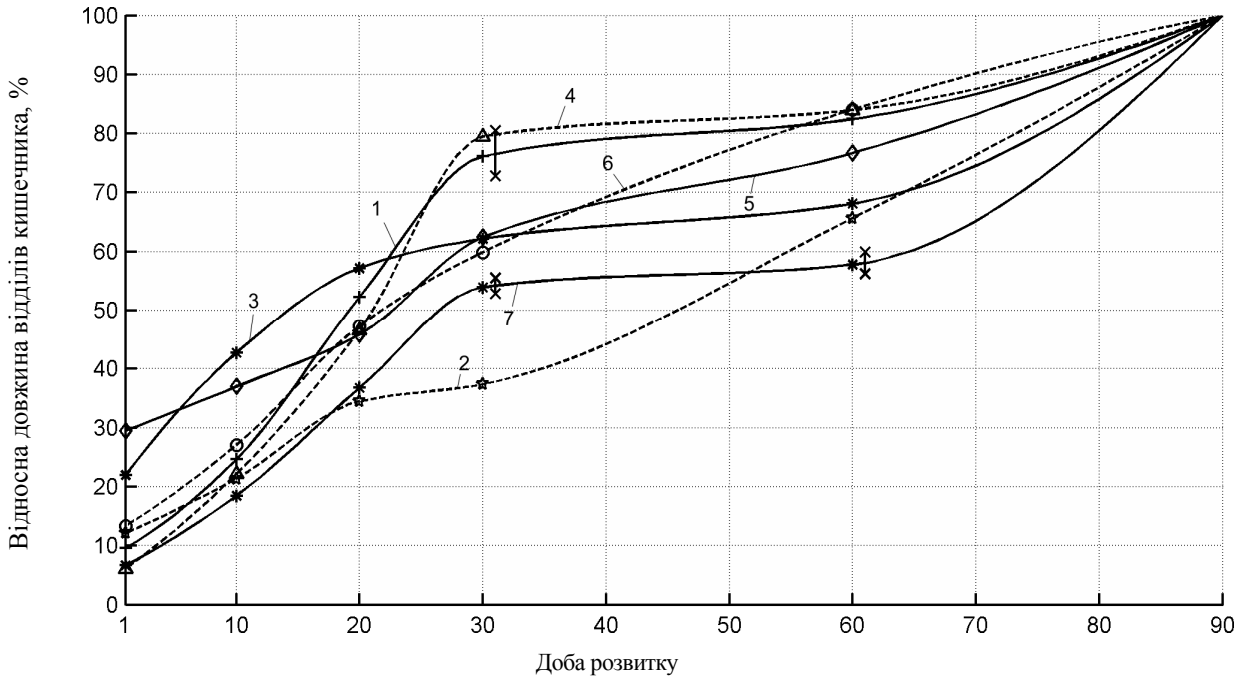


Рис. 2. Відносна зміна (%) очікуваної довжини відділів кишечника залежно від доби життя: *1* – дванадцятипала кишка, *2* – порожня кишка, *3* – клубова кишка, *4* – сліпа кишка, *5* – велика ободова кишка, *6* – мала ободова кишка, *7* – пряма кишка

Дивертикул клубової кишки на першу добу постнатального онтогенезу має початкову довжину 0,40 ± 0,07 см. На відміну від клубової кишки, її дивертикул з 1-ї по 10-ту добу розвитку має найактивніший період лінійного приросту і складає в середньому 0,02 см за добу. З 10-ї доби відбувається прискорення збільшення довжини та найінтенсивніше – з 20-ї по 30-ту добу з середньодобовим значенням близько 0,08 см на добу. Після 30-ї доби сповільнюється лінійний приріст, кінцева довжина на 90-ту добу становить 4,06 ± 0,19 см, що перевищує початкову довжину удесятеро.

Абсолютна довжина сліпої кишки на першу добу постембріонального розвитку дорівнює 3,38 ± 0,15 см. Від народження спостерігається відносно рівномірне збільшення довжини відділу до 20-ї доби. Найбільше зростає показник лінійного приросту з 20-ї по 30-ту добу та складає в середньому 1,83 см за добу та різко знижується – з 30-ї по 60-ту добу із середньодобовим значенням близько 0,08 см на добу. До 90-ї доби відбувається незначне прискорення збільшення довжини. Кінцева абсолютна довжина відділу збільшилась у 16 разів (близько 55,6 см).

Червоподібний відросток у першу добу постнатального періоду займає майже половину довжини сліпої кишки, що відповідає 1,6 ± 0,1 см. Максимальний та мінімальний періоди лінійного приросту червоподібного відростка не збігаються із розвитком сліпої кишки та відповідають періодам з 1-ї по 10-ту добу – із середньодобовим збільшенням близько 0,36 см за добу, і з 10-ї по 20-ту – в середньому на 0,02 см за добу, відповідно. До 90-ї доби абсолютна довжина відділу збільшується в 9,5 раза від початкової та становить майже половину від довжини сліпої кишки близько 15,2 см.

Велика ободова кишка від народження має абсолютну довжину 7,46 ± 0,09 см. Від першої доби збільшується приріст довжини відділу та найінтенсивніший період відзначається з 20-ї по 30-ту добу розвитку в середньому на 0,42 см за добу. Найменш активний лінійний приріст припадає на період з 30-ї по 60-ту добу розвитку та становить близько 0,12 см на добу з подальшим незначним прискоренням. На 90-ту добу абсолютна довжина відділу зростає утричі від початкової та у середньому дорівнює 25,3 см.

Для малої ободової кишки характерний відносно інтенсивний лінійний приріст від народження з найбільшим показником у період з 10-ї по 20-ту добу постембріонального розвитку в середньому по 0,42 см на добу. Після 20-ї доби відмічається поступове зниження інтенсивні зміни абсолютної довжини відділу з найменшим значенням з 60-ї по 90-ту добу близько 0,11 см за добу. Кінцеве значення абсолютної довжини малої ободової кишки близько 20,7 см, що перевищує довжину, встановлену на першу добу життя в 7,5 раза.

Абсолютна довжина прямої кишки на першу добу постнатального періоду дорівнює 6,92 ± 0,16 см. Найактивніший лінійний приріст відділу відбувається з 10-ї по 20-ту добу розвитку в середньому на 1,9 см щоденно, а найменш інтенсивний – з 30-ї по 60-ту добу в середньому по 0,13 см за добу. До 90-ї доби розвитку довжина прямої кишки становить майже 103,8 см, що в 15 разів більше, ніж початкова.

Окрім маси та довжини кишечника досліджували агреговані лімфатичні вузлики, асоційовані зі слизовими оболонками кишечника. Вони макроскопічно виявляються з 20-ї доби постнатального онтогенезу на антибрижовій поверхні тонкого відділу кишечника та мають округло-овальну форму. Збільшення їх площі відбувається не рівномірно з найменшою інтенсивністю на 20–30-ту добу.

На кінці дванадцятипалої кишки у кролів 20-добового віку виявили один агрегований лімфатичний вузлик, довжина та ширина якого дорівнюють 0,66 ± 0,05 і 0,54 ± 0,05 см, відповідно. У порожній кишці вони містились у кількості 5 штук на різній відстані один від одного з лінійними промірами близько 0,61 × 0,52 см. На деякій відстані від початку клубової кишки виявляли один агрегований лімфатичний вузлик довжиною 0,56 ± 0,09 і шириною 0,44 ± 0,05 см. Загальна площа агрегованих лімфатичних вузликів у кролів 20-добового віку становила близько 1,79 см^2.

На 30-ту добу постнатального розвитку в дванадцятипалій кишці також наявний один агрегований лімфатичний вузлик із лінійними промірами 0,70 ± 0,10 × 0,60 ± 0,07 см. У порожній кишці вони нерівномірно розміщені по її довжині загальною кількістю 5 штук, довжина яких становила близько 0,66 см, а ширина близько 0,55 см. На початку клубової кишки наявний один агрегований лімфатичний вузлик із довжиною 0,62 ± 0,07 см і шириною 0,54 ± 0,05 см. Ці структури на 30-ту добу розвитку мали загальну площу майже 2,05 см^2.

З 30-ї по 60-ту добу відмічається найактивніше збільшення показників площі агрегованих лімфатичних вузликів. На 60-ту добу агрегований лімфатичний вузлик дванадцятипалої кишки має показники: довжина – 1,20 ± 0,17 см, ширина – 0,94 ± 0,11 см. Відповідні структури порожньої кишки асиметрично розміщені, кількістю 5 штук, мали лінійні проміри близько 1,22 × 0,94 см. У верхній третині клубової кишки виявляли один агрегований лімфатич-

ний вузлик із довжиною 1,32 ± 0,19 см і шириною 1,02 ± 0,13 см. Загальна площа агрегованих лімфатичних вузликів до 60-ї доби досягає близько 6,5 см^2.

Дванадцятипала кишка кролів на 90-ту добу життя має один агрегований лімфатичний вузлик, довжина якого складає 1,88 ± 0,16 см, а ширина – 1,30 ± 0,18 см. У порожній кишці ці структури мають лінійні проміри близько 1,76 × 1,18 см. Агрегований лімфатичний вузлик клубової кишки довжиною 1,72 ± 0,08 см і шириною 1,26 ± 0,11 см. До 90-добового віку загальна площа агрегованих лімфатичних вузликів досягає майже 11,84 см^2, тобто збільшується в 6,6 раза порівняно з показником, отриманим на 20-ту добу розвитку.

Обговорення

Згідно з даними морфометрії кишечника та його агрегованих лімфатичних вузликів кролів різних порід та вікових груп інших авторів установлено певні відмінності. За результатами досліджень Nikitchenko et al. (2013), жива маса диких кролів дорівнювала у самців близько 2,1 кг, а самок – 2,3 кг. Під час дослідження м'ясних порід (фландр, білий великан, французький баран) Pechenkin et al. (2013) встановили, що їх ріст відбувається достатньо швидко: у віці 90 діб їх маса перевищує 2 кг, а до 6-місячного віку – 4,3–5,5 кг. При цьому найбільші середньодобові прирости спостерігали на третій місяць розвитку, після чого вони знижувалися. У дослідженні Vakulenko et al. (2016a, 2016b) вищу активність росту спостерігали до двомісячного віку, після чого вона знижується.

За даними Shubina and Choporova (2015), загальна довжина кишечника домашнього кролика складає близько 4–6 м, у дикого кролика вона становить близько 465 см (Nikitchenko et al., 2015). У результатах досліджень Stoyanovskiy et al. (2014) довжина кишечника самців кролів у 6 та 12 місяців становить близько 588 та 568 см, відповідно.

В аналізі даних Balakirev et al. (2012) м'ясо-шкурні породи мають кращий розвиток товстого відділу кишечника, ніж м'ясні. А у м'ясних порід краще розвинений тонкий відділ кишечника.

Агреговані лімфатичні вузлики в найбільшій кількості розміщуються у тонкому відділі кишечника ссавців, при цьому їх кількість у слизовій оболонці тонкої кишки кролів від 3 до 15 (Korableva, 2011a). Однак Stoyanovskiy et al. (2014) зазначили, що агреговані лімфатичні вузлики у дванадцятипалій кишці відсутні. У слизовій оболонці порожньої кишки макроскопічно виявляли перший агрегований лімфатичний вузлик на початку кишки. Їх кількість у 6-місячних кролів становила 4,2 ± 0,14 шт., із середньою довжиною – 1,45 ± 0,09 см. У кролів на 12-й місяць життя агрегованих лімфатичних вузликів було 4,8 ± 0,1 шт., але з меншою середньою довжиною – 1,18 ± 0,10 см. За дослідженнями клубової кишки кролів на 6-й та 12-й місяць реєстрували один агрегований лімфатичний вузлик довжиною відповідно 1,8 ± 0,12 та 1,1 ± 0,05 см.

Ці дані підтверджують наявність певних відмінностей у динаміці розвитку тіла, кишечника та його агрегованих лімфатичних вузликів у кролів залежно від породи та віку.

Висновки

Приріст маси тіла кролів у постнатальному розвитку відбувається нерівномірно і зростає до 90-ї доби у 55 разів, за той же період довжина тіла збільшується лише у 8,5 раза з початкової. Їх найбільш і найменш активні інтервали не збігаються. Найменш інтенсивний приріст маси тіла спостерігається з 1-ї по 20-ту добу життя, а найінтенсивніший – з 30-ї по 60-ту добу постнатального онтогенезу. Найбільше зростання довжини тіла припадає на період 20–30-ї доби життя, після чого відбувається найповільніший лінійний приріст до 60-ї доби розвитку.

Закономірність приросту маси та довжини кишечника по відділах різна. Для більшості відділів кишечника найменше зростання маси відбувається до 10-ї доби, найбільше – з 10-ї по 20-ту добу постембріонального розвитку. До 90-ї доби найменше змінюється абсолютна маса порожньої кишки, найбільше – сліпої. Найінтенсивніший період лінійного приросту відділів кишечника – з 10-ї по 20-ту добу, як і приріст маси, а найменші зміни довжини спостерігаються з 30-ї по 60-ту добу. Найменше змінюється абсолютна довжина клубової кишки, а найбільше – сліпої. Відмічається подібність у періоди найбільшого та найменшого приросту маси у таких відділах: 1) порожній і прямій; 2) сліпій, великій і малій ободових кишках. У першій групі період меншого приросту маси становить із дня народження до 10-ї доби розвитку, найактивніше маса збільшується з 60-ї по 90-ту добу. Другій групі також властиві найповільніші зміни у масі з 1-ї по 10-ту добу життя, але найінтенсивніший приріст припадає на 20–30-ту добу постнатального розвитку. Збігаються періоди найбільшої та найменшої активності лінійного приросту відділів кишечника лише у сліпій і великій ободовій кишках: найактивніший лінійний приріст спостерігається з 20-ї по 30-ту добу життя, після якого настає різке сповільнення з найменшим показником у 30–60-ту добу.

Агреговані лімфатичні вузлики макроскопічно виявляються на 20-ту добу постнатального розвитку з антибрижового боку кишечника овально-округлої форми. Їх загальна площа з 20-ї по 90-ту добу життя не рівномірно збільшується майже усемеро.

References

Balakirev, N. A., Nihmatullin, R. M., & Tinaeva, E. A. (2012). Interernye osobennosti krolikov osnovnykh porod, razvodimykh v Rossiyskoy Federatsii [Interior features of rabbits of the main breeds bred in the Russian Federation]. Vestnik Orlovskoho Hosudarstvennoho Ahramoho Universiteta, 4(12), 76–79 (in Russian).

Bianospino, E., Moura, A. S. A. M. T., Wechsler, F. S., Fernandes, S., & Dal-Pai-Silva, M. (2008). Age-ralated changes in muscle fiber type frequencies and cross-sectional areas in straightbred and crossbred rabbits. Animal, 2(11), 1627–1632.

Buijs, S., Keeling, L. J., Rettenbacher, S., Maertens, L., & Tuyttens, F. A. M. (2011a). Glucocorticoid metabolites in rabbit faeces influence of environmental enrichment and cage size. Physiology and Behavior, 104, 469–473.

Buijs, S., Keeling, L. J., & Tuyttens, F. A. M. (2011b). Behaviour and use of space in fattening rabbits as influenced by cage size and enrichment. Applied Animal Behaviour Science, 134, 229–238.

Buijs, S., Keeling, L. J., Vangestel, C., Baert, J., Vangeyte, J., & Tuyttens, F. A. M. (2011c). Assessing attraction or avoidance between rabbits: Comparison of distance-based methods to analyse spatial distribution. Animal Behaviour, 82, 1235–1243.

Camps-Bossacoma, M., Perez-Cano, F. J., Franch, A., Untersmayr, E., & Castell, M. (2017). Effect of a cocoa diet on the small intestine and gut-associated lymphoid tissue composition in an oral sensitization model in rats. Journal of Nutritional Biochemistry, 42, 182–193.

Fortun-Lamothe, L., & Boullier, S. (2007). A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. Livestock Science, 107(1), 1–18.

Fritsch, F. N., & Carlson, R. E. (1980). Monotone piecewise cubic interpolation. SIAM Journal on Numerical Analysis, 17(2), 238–246.

Gidenne, T., Combes, S., & Fortun-Lamothe, L. (2012). Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: Effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: A review. Animal, 6, 1407–1419.

Gidenne, T., Kerdiles, V., Jehl, N., Arveux, P., Eckenfelder, B., Briens, C., Stephan, S., Fortune, H., Montessuy, S., & Muraz, G. (2013). Protein replacement by digestible fibre in the diet of growing rabbits: 2-Impact on performances, digestive health and nitrogen output. Animal Feed Science and Technology, 183(3), 142–150.

Korableva, T. P. (2011a). Limfoidnye obrazovania kishechnika mlekopitaiushchikh [Lymphoid formations of intestine of mammals]. Naukovi Pratsi Pivdennoho Filialu Natsionalnyi Universytet Bioresursiv i Pryrodokorystuvannia Ukrainy Krymskyi Ahrotekhnolohichnyi Universitet Seria Veterinarni nauki, 133, 86–92 (in Russian).

Korableva, T. P. (2011b). Topohraficheeskie osobennosti odinochnykh limfoidnykh uzelkov kishechnika teliat [Topographical features of single lymphoid nodules of intestine of calves]. Immunologiya Seria Veterinarna Meditsina, 2, 26–28 (in Russian).

Knudsen, C., Combes, S., Briens, C., Coutelet, G., Duperray, J., Rebours, G., & Gidenne, T. (2014). Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. Livestock Science, 169, 96–105.

Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nature Reviews Immunology, 3, 331–41.

Nikitchenko, V. E., Naumova, E. I., & Shuber, S. S. (2015). Morfplohicheskoe stroenie zheludochno-kishechnoho tracta krolikov [Morphological structure of the gastrointestinal tract of the rabbit]. Vestnik Rossiyskoho Universiteta Druzhby Narodov. Seria Ahronomia i Zhivotnovodstvo, 10(1), 18–24 (in Russian).

Pechenkin, E. V., Sahirov, A. A., & Horelic, O. V. (2013). Rost i razvitie krolikov raznykh porod [Growth and development of rabbits of different breeds]. Izvestiia OHAU, 6(44), 88–90 (in Russian).

Prola, L., Cornale, P., Renna, M., Macchi, E., Perona, G., & Mimosi, A. (2013). Effect of breed, cage type, and reproductive phase on fecal corticosterone levels in doe rabbits. Journal of Applied Animal Welfare Science, 16, 140–149.

Samoyliuk, V. V. (2011). Osoblyvosti anatomiyi i topohrafiyi limfoidnykh utvoren kyshechnika porosiat misiachnoho viku [Features of anatomy and topography of intestinal lymphoid formations of month old piglets]. Veterynarna Medycyna, 95, 405–407 (in Ukrainian).

Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. Allergy and Clinical Immunology, 125, 116–125.

Stoyanovskiy, V. G., Kolomiyets, I. A., & Kamratska, O. I. (2014). Topografichni osoblyvosti imunnykh struktur kyshechnika kroliv [Topographical features of immune structures of rabbits intestine]. Naukovyi visnyk Lvivskiy Natsionalniy Universitet Veterynarnoyi Medytsyny ta Biotekhnologiyi imeni S. Z. Gzhytskoho, 60, 308–313 (in Ukrainian).

Shubina, T. P., & Choporova, N.V. (2015). Sravnitelnaya kharakteristica orhaniv pishchevareniya pushnykh zverei [Comparative characteristics of the digestive organs of fur-bearing animals]. Kontsept, 13, 4076–4080 (in Russian).

Tazzoli, M., Trocino, A., Birolo, M., Radaelli, G., & Xiccato, G. (2015). Optimizing feed efficiency and nitrogen excretion in growing rabbits by increasing dietary energy with high-starch, high-soluble fibre, low-insoluble fibre supply at low protein levels. Livestock Science, 172, 59–68.

Trocino, A., Filiou, E., Tazzoli, M., Bertotto, D., Negrato, E., & Xiccato, G. (2014). Behaviour and welfare of growing rabbits housed in cages and pens. Livestock Science, 167, 305–314.

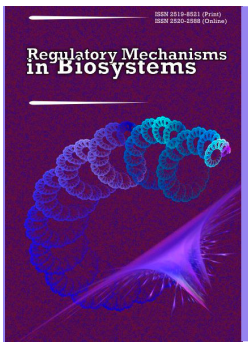
Trocino, A., Fragkiadakis, M., Majolini, D., Carabaño, R., & Xiccato, G. (2011). Effect of the increase of dietary starch and soluble fibre on digestive efficiency and growth performance of meat rabbits. Animal Feed Science and Technology, 165(3), 265–277.

Tumova, E., Bizkova, Z., Skrivanova, V., Chodova, D., Martinec, M., & Volek, Z. (2014). Comparisons of carcass and meat quality among rabbit breeds of different sizes, and hybrid rabbits. Livestock Science, 165, 8–14.

Vakulenko, I. S., Danets, L. M., & Aksonov, E. O. (2016a). Biologichni osnovy formuvannia myasnoyi productyvnosti kroliv [Biological bases of formation of rabbit meat productivity]. Efectyvne Krolivnytstvo i Zvirnytstvo, 2, 13–21 (in Ukrainian).

Vakulenko, I. S., & Petrash, V. (2016b). Formuvannia myasnoyi produktyvnosti kroliv u vikoviy dynamitsi [Rabbits meat productivity formation in the age dynamics]. Naukovo-Tekhnichnyi Biuleten Natsionalna Akademiya Ahrarnykh Nauk Ukrainy, 116, 21–29.

Vighi, G., Marcucci, F., Sensi, L., Di Cara, G., & Frati, F. (2008). Allergy and the gastrointestinal system. Clinical and Experimental Immunology, 153, 3–6.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 656–661
doi: 10.15421/0217101

Ethnobotanical and ecological study of *Punica granatum* in Dir district, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan

K. Ali*, S. Khan*, N. Khan*, W. Khan**, I. U. Rahman*, F. Ullah*, K. Ali***, M. Nisar*

*University of Malakand, Chakdara, Pakistan
**Nanjing Agricultural University, Nanjing, China
***University of Swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan

Article info

Received 16.10.2017
Received in revised form 12.11.2017
Accepted 15.11.2017

University of Malakand, Chakdara, Dir lower, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan.
E-mail: kishwarali@live.com, waqar.khan399@gmail.com

Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China.

Centre of Biotechnology and Microbiology, University of Swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan.

Ali, K., Khan, S., Khan, N., Khan, W., Rahman, I. U., Ullah, F., Ali, K., & Nisar, M. (2017). Ethnobotanical and ecological study of Punica granatum in Dir district, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 656–661. doi:10.15421/0217101

Punica granatum L. (wild) belongs to family Punicaceae, a woody plant, predominantly found on calcareous and alkaline soils. The species is extensively utilized as food and firewood and for the extraction of various chemicals due to its therapeutic properties. To understand the ethno-botanical and ecological status of the species on a regional scale, a questionnaire survey was conducted in the Dir (L) area using close and open-ended questionnaires. Data collected from 124 respondents were analysed quantitatively using statistical analysis to calculate indices like Relative Frequency of Citation (RFC), Use value (UV) and multivariate analysis. GPS data used for the presence data of the plants were used to develop GIS thematic maps. Geo-referenced data on *P. granatum* was collected from the study area, using GPS. Results suggest that the plant is mostly used as a remedy for dry cough, as an astringent, people used powder form of fruit peelings. It was documented in the present investigation that *P. granatum* is mainly eradicated due to its extensive use as firewood. The study also evaluated on the major aspect of how the *P. granatum* can be conserved naturally. It was found out that the plant is conserved in areas inaccessible to humans. The status of the vegetation community around this plant was also explored, it is found out that specific shrub and tree communities were major flora growing in proximity to *P. granatum*. The finding of this survey has concluded that wild *P. granatum* is an endangered species due to its extensive and uncontrollable use for firewood, curing diseases and its economic potential. These findings could be exploited to take necessary steps for the conservation of this species.

Keywords: ethnobotany; georeferenced; cluster analysis; Pakistan

Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a plant beloved from ancient times. The utilization of the pomegranate can be traced to the ancient human cultures such as Greeks and Romans as a food and for various medical remedies. The uses of *P. granatum* are deeply embedded in human history. The pomegranate tree requires a hot, dry and long season to get a good and large quality of fruits (Morton, 1887).

The family Punicaceae is mono-generic, with only two species. *P. protopunica* Lucas and Synge, 1978 is confined to the island of Socotra only. The members of this family originated mainly in Iran and then spread widely in ancient times to the Himalayas and the Mediterranean region of Europe. In Iran, Pakistan, India, Egypt, Afghanistan, Iraq, China, Bangladesh, Saudi Arabia and Burma *P. granatum* grows well (Morton, 1987). It is believed that from its point of origin in the Middle East, it spread first to the Mediterranean region, India and China, and later to America, Mexico and California (Robert et al., 2002). The plant has native and well-defined forest patches in the northern areas of Pakistan. The plant is commonly found at altitudes of 1000–2000 m in the north-west of Pakistan but the wild pomegranate is frequently grown especially in Khyber Pakhtunkhwa (Chitral, Dir and Kurrum), Baluchistan and south-Waziristan the. It is also found in some areas of Kashmir and Hazara (Kotmballi et al., 2002; Jurenka, 2008; Ali et al., 2015). The present study was undertaken in Lower Dir District, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan (Fig. 1), to identify the main reasons for its eradication, conservation, its folk uses, methods of use and associated plant communities, as well as geo-referenced data of the species in the study area (Fig. 2). The total area of Lower Dir is 1,583 km^2 and lies in the Lesser Hindu Kush range between 35°10′ to 35°16′ N Latitude and 71°50′ to 71°83′ E Longitudes (Khan et al., 2010) with three major temperature variation zones (Fig. 3).

Due to overexploitation of the plants for various reasons it is very close to being lost from their natural habitat.

Material and Methods

Data collection. Frequent field trips were made to evaluate the species status from the residents of Lower Dir. The respondents were divided into four groups based on their ages. The total number of respondents was 124; 24 of whom were 20 to 30 years old, 30 were 31 to 40 years old, 28 were 41 to 50 years old and 42 were aged 51 and above (Table 1). All the respondents were local inhabitants of Lower Dir district. The interviews were conducted in the local language Pashto. The key questions included in the interviews were about the folk uses of the plant, recipes, its ecological structure and reason for extinction and/or survival.

Relative Frequency of Citation (RFC). The collected ethno-medicinal data was quantitatively analysed using the Relative Frequency of Citation (RFC) index. This indicator shows the local importance of the species and is calculated from the frequency of citation (FC, the number

of informants mentioning the usage of the species) divided by the total number of informants in the survey (N), without considering the use categories (Ahmad et al., 2014) using the formula:

$$RFC = FC/N,$$

value ranges from zero (none of the informants cited the plant as useful) to one (every informant reported the plant to be useful (Sadeghi and Kuhestani, 2014)).

Use value (UV). The use value (UV) demonstrates the relative importance of locally known plants (Rawat et al., 2010). It is calculated using the formula:

$$UV = \sum U_i/N,$$

where U_i is the number of uses mentioned by each information for a given species and N is the total number of informants.

Geo-referenced data on the species sites. Georeferenced data on the species was collected from the study area, using GPS. The collected degree, minute and second format was converted into decimal point format by the formula

$$(C_2 + D_2/60) + (E_2/3600) \text{ and } (F_3 + G_3/60) + (H_3/3600).$$

The spreadsheets were converted to CSV comma delimited format and inserted to GIS for the development of thematic maps (Fig. 2).

Cluster analysis. Plant communities in various parts of the district were assessed on the basis of their similarities and differences. Cluster analysis function of PC-ORD with two-way cluster analysis method was applied using distance measure (correlation) and group linkage method (Ward's method).

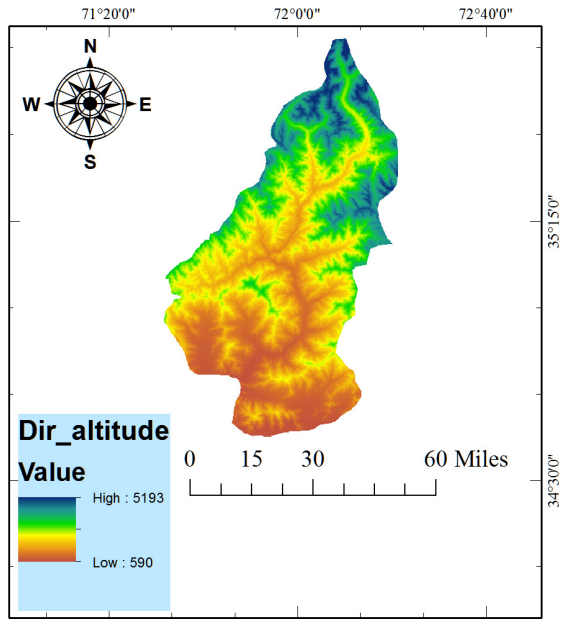


Fig. 1. Dir District map with its geocoordinates

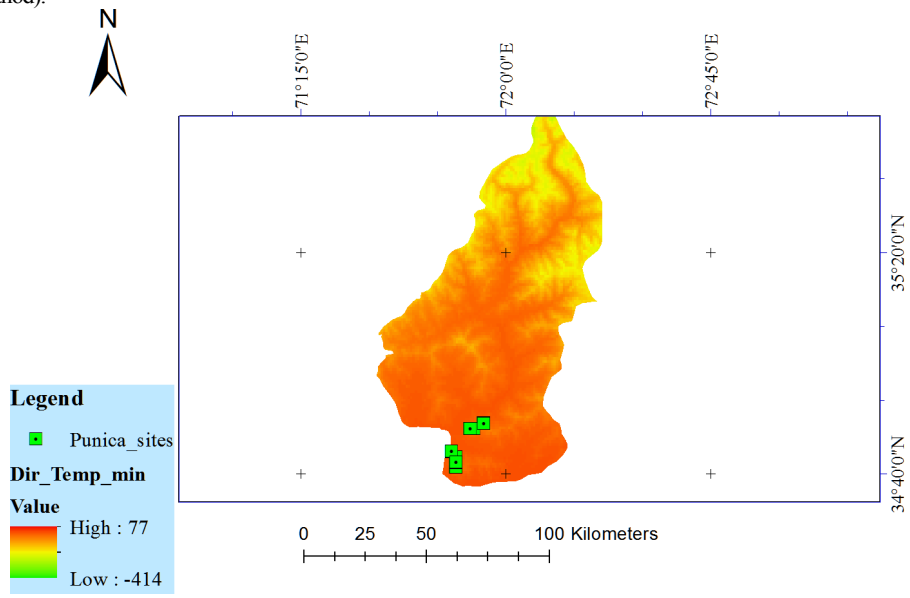


Fig. 2. *Punica granatum* sites assessed during the field work

Results

Folk uses of *P. granatum*. Residents' perspectives about this plant evaluated in this category of results were very interesting. The responses of the people about the medicinal uses of *P. granatum* are summarized (Table 1). In the common domain, the plant was used for the treatment of dry cough, urine irritation, stomach disease, diarrhoea, bone pain, chest pain, skin irritation, dysentery and throat infection. People use this plant as refrigerant, anti-diabetic, anthelmintic, expectorant, astringent and as a blood purifier. About 18.0% of people used it for treating dry cough, 17.0% people used it for urine irritation and for stomach disorders. Just over 9.0% used it for diarrhoea, 7.0% used it for blood purification, 6.0% for arthritis related issues, and chest pain. Skin irritation and refrigerant use was restricted to only 4.7% of people of the area. About 4.0% used it for dysentery, 3.1% of people used it as anti-diabetic, 2.3% of people used it as an anthelmintic, 2.3% of people used it for throat infection, 1.6% of people used it as an expectorant and 1.8% of people used it as an astringent.

Recipes with *P. granatum*. It is evident from the results that only 10 recipes are in common use in the study area for *P. granatum*. Most of the inhabitants (27.6%) used the powder form of the plants, 26.2% mixed the powder with water, 17.2% mixed it with sugar, 10.3% of people used the seeds as food, 2.8% used the powder form of the drug mixed with opium, 2.1% used seeds mixed with vegetables, 1.4% of people used fresh extract of juice from the seeds, 2.8% used the powder form mixed with other sweets. Some people, 4.1%, used the fruits' peels as medicine (Table 2).

Conservation indicators of *P. granatum*. Responses to the question about the survival of the species suggest that over 18.0% of the respondents agree that the plant has survived due to its inaccessibility to humans, 13.0% people relate it to steep slopes, while 13.2% of people says that this plant has survived due to its chance appearance on fertile soil. People's perception suggests that 13.2% of people believe that there is a connection between the plant's ability to absorb water efficiently. Some 11.4% suggest that it has survived due to the spines growing on the plants, others, just over 10.0% link it to the secondary growth system. Some 8.0% people suggest that these plants have survived due to their medicinal value. Other insignificant reasons were also mentioned (Table 3).

Eradication indicator of *P. granatum*. In the present study, reasons for the serious decline of *P. granatum* in the study area were also investigated. The most important reason for its decline recorded was its overuse as firewood. Other reasons include ease of human access to the

plant, excessive use of its fruits, high palatability, soil erosion, overuse of the seeds, lack of official protection status, occurrence in sites unsuitable for growth, vulnerability to water logging and salinity etc. (Table 4). The agreement percentage is 17.1% who believe that its decline is due to its overuse as firewood, 15.5% of people say that the main reason for its decline is due to its accessibility to humans, 14.0% of people say that the main reason for its decline is excessive use of fruits and high palatability, 12.4% of respondents say that the main reason for its loss is due to soil erosion. Some people also relate the loss of the species to climatic changes in the area.

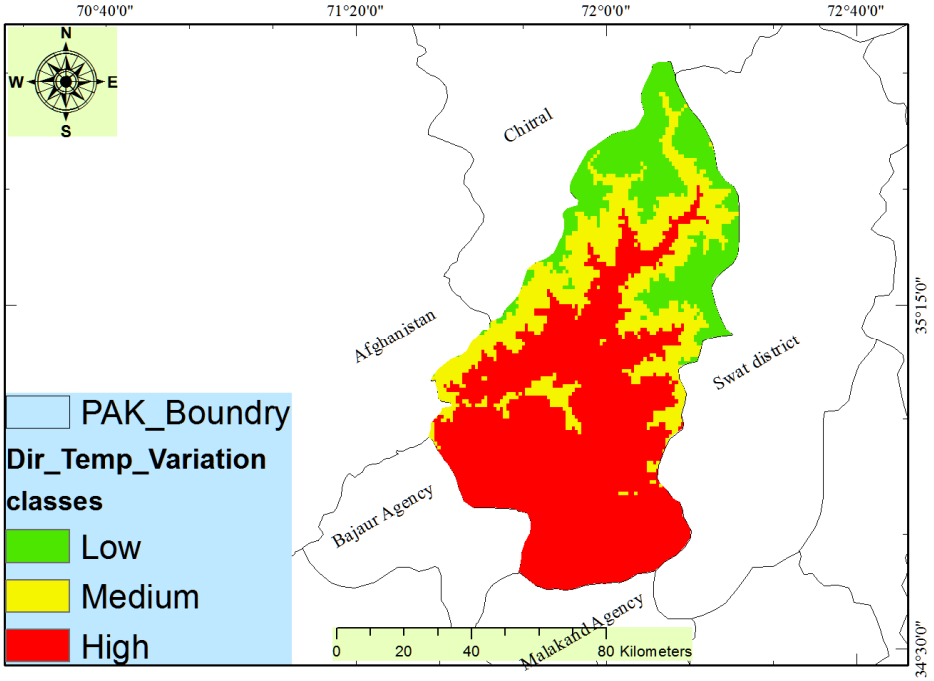


Fig. 3. Temperature variation in Dir District

Table 1
Medicinal folk uses of *Punica granatum* plant in Lower Dir District, KP, Pakistan

Folk uses (Dir L) KP	FC (20–30)	FC (31–40)	FC (41–50)	FC (51–above)	∑Ui	N	Use value (UV)	%, UV
Dry cough	3	7	5	8	23	128	0.179	17.96
Urine irritation	3	4	7	8	22	128	0.171	17.18
Stomach disease	4	3	3	5	15	128	0.117	17.71
Diarrhoea	2	5	2	3	12	128	0.093	9.37
Blood purification	1	2	3	4	10	128	0.078	7.81
Bone pain	1	3	1	3	8	128	0.062	6.25
Chest pain	1	2	3	2	8	128	0.062	6.25
Skin irritation	2	2	0	2	6	128	0.046	4.68
Refrigerant	1	2	1	2	6	128	0.046	4.68
Dysentery	1	1	2	1	5	128	0.039	3.90
Anti-diabetic	1	2	1	0	4	128	0.031	3.12
Anthelmintic	1	1	0	1	3	128	0.023	2.34
Throat infection	0	1	1	1	3	128	0.023	2.34
As expectorant	0	1	0	1	2	128	0.015	2.34
Astringent	0	0	0	1	1	128	0.007	1.78

Note: FC – frequency of citation, ∑Uri – the total number of uses mentioned by each informant, N – the total number of informants, UV – use value, %UV – the percentage of use value.

Table 2
Use value of different recipes with *Punica granatum* for curing different diseases in Lower Dir District, KP, Pakistan

Recipes (Dir L) KP	FC (20–30)	FC (31–40)	FC (41–50)	FC (51–above)	∑Ui	N	Use value (UV)	%UV
Powder form is used	9	10	10	11	40	145	0.27	27.58
Powder form is mixed with water	6	11	10	11	38	145	0.26	26.20
Powder form is mixed with sugar	3	5	9	6	25	145	0.17	17.24
Seed is used as a food	2	3	2	8	15	145	0.10	10.34
Powder form is mixed with opium	1	1	0	2	4	145	0.02	2.75
Powder form is mixed with milk	1	3	0	4	8	145	0.05	5.51
Seed is mixed with vegetables	2	0	0	1	3	145	0.02	2.06
Extraction of juice from seed	0	1	0	1	2	145	0.01	1.37
Powder form is mixed with other sweets	2	1	1	0	4	145	0.02	2.75
Small part of fruit bark is used	1	0	2	3	6	145	0.04	4.13

Note: see Table 1.

Cluster analysis. The various plant communities of the area were also tested for their similarities and differences. It is clear from the cluster diagram based on the habitat of the various stands that some stands show similarities in their habitat (Fig. 4). The data was recoded from five types of habitats i.e. plain, streams, farmlands, steep slopes and springs. From the cluster diagram, it is evident that, St.1, St.2,

St.3, St.4, St.10, St.14, St.17, and St.18 have similarities in their floristic composition along with the target species and are thus grouped together in one cluster. Some stands were very peculiar to specific habitat type i.e. plain. It was found that St.12 and St.15 belongs to the category streams, St.5, St.6, St.13 and St.20 show similarity having the same type of habitat (i.e. field / farmland site), while St.7, St.8, St.16 and St.9 show similarity having (steep slopes). Plant communities have specific nutrient requirements and soil regime. Stands of the species were also classified into a cluster diagram based on their soil texture and nature. Soil being the dominant environmental variable has divided the plant stands into various branches of the cluster (Fig. 5). According to the figure, there are five types of soil texture such as rocky, muddy, loam, sandy and fine sand and loam. The Figure shows that St.4 and St.18 show similarity having the same type of soil with similar floristic composition (rocky), St.1, St.2, St.5, St.6, St.8, St.9, St.10, St.14, St.15, St.17 and St.20 show similarities having the same type of soil (muddy), St.12, St.16 and St.19 show similarity with soil type (loamy), St.4 and St.18 show similarity having the same type of soil (sandy) and St.3, St.7 and St.11 show similarity, having fine sand and loamy soil.

Table 3
Different reasons for survival of *Punica granatum* in Lower Dir District

Reason for survival (Dir L) KP	FC (20–30)	FC (31–40)	FC (41–50)	FC (51–above)	∑Ui	N	Use value (UV)	%UV
Human inaccessibility	4	2	6	9	21	114	0.18	18.42
Present on steep slopes	3	3	2	7	15	114	0.13	13.15
Present on fertile soil	0	6	4	5	15	114	0.13	13.15
Good water absorption	2	0	5	8	15	114	0.13	13.15
Self-defence spines	2	6	3	2	13	114	0.11	11.40
Strong secondary growth system	2	3	4	3	12	114	0.10	10.52
Protection due to its medicinal value	0	4	3	2	9	114	0.07	7.89
Resistance to drought conditions	3	1	0	3	8	114	0.07	7.01
Rainfall frequency	0	1	1	1	3	114	0.02	2.63
Protection from animals	1	0	1	1	3	114	0.02	2.63

Note: see Table 1.

Table 4
Reasons for decline of *Punica granatum* L. in Lower Dir. District

Reason for decline (Dir L) KP	FC (20–30)	FC (31–40)	FC (41–50)	FC (51–above)	∑Ui	N	Use value (UV)	%UV
Used as firewood	2	7	8	5	22	129	0.170	17.05
Accessibility to humans	5	4	6	5	20	129	0.155	15.50
Excessive use of fruits	1	4	3	10	18	129	0.139	13.95
High palatability	2	6	3	7	18	129	0.139	13.95
Soil erosion	1	6	3	6	16	129	0.124	12.40
Overuse of the seeds	3	0	3	6	12	129	0.093	9.30
Lack of protection	2	2	2	2	8	129	0.062	6.20
Unsuitable growing areas	2	1	2	2	7	129	0.054	5.42
Vulnerability	2	2	0	1	5	129	0.038	3.87
Water logging and salinity	1	1	0	1	3	129	0.023	2.32

Note: see Table 1.

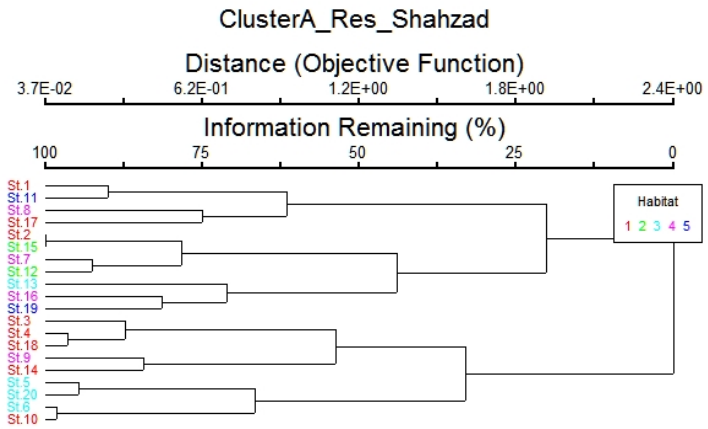


Fig. 4. Shows cluster analysis of habitat of the plant

Figure 5 shows that plant community and environmental variable (grazing) show similarity in various stands. According to the below figure St.4, St.6, St.7, St.9, St.10, St.12, St.14, St.15, St.18 and St.19 show absence of grazing while St.1, St.2, St.3, St.5, St.8, St.11, St.13, St.16, St.17 and St.20 show presence of grazing.

Discussion

Punica species belong to the Punicaceae family, mostly shrubs or small trees up to six m long and profusely branched from the base (Morton, 1987). The family Punicaceae includes only one genus and two species, extending throughout the Mediterranean region. The pomegranate tree is native from Iran to the Hiamalayas (Robert et al., 2002). The most important regions where *P. granatum* is found are Pakistan, Afghanistan, Egypt, China, Iran, Iraq, Bangladesh, India, Burma and Saudi Arabia. Wild pomegranates grow today in Central Asia from Iran and Turkmenistan to northern India (Rajaei and Parisa, 2015). In Pakistan, it grows at an altitude of 1000–2000 m, over the whole of the western and northern belt (South Waziristan, Khyber Pakhtunkhwa, Dir, Kurram, Chitral, Baluchistan). It also grows in Hazara regions; and has been found in Kashmir and in the Himalayan regions. (Kotamballi et al., 2003; Jurenka et al., 2008). Wild pomegranate is an endangered species which is found in areas which contain calcareous, alkaline, and sandy soil.

Mostly, local people use it for the curing of different types of disease e.g. anti-cancer (Jeune et al., 2005), antioxidant (Gil et al., 2000). Its root bark is used for dysentery (Schubert et al., 1999). The fruit of pomegranate is used to treat microbial infection, diarrhoea and haemorrhage (Fuentes and Exposito et al., 1995). It is used as an antiseptic and for skin infections and injuries (Kotamballi et al., 2003; Juernka, 2008; Das and Barman, 2012; Khan et al., 2013, 2014). Fresh leaves extract is used for dysentery, skin disease, checking of blood flow from nose and as eyewash. Fruits are as astringent, refrigerant, laxative, and used for blood purification. Seeds are dried and then used as a spice and condiment. Root and stem bark is anthelmintic, antipyretic, expectorant and used in mouth washes.

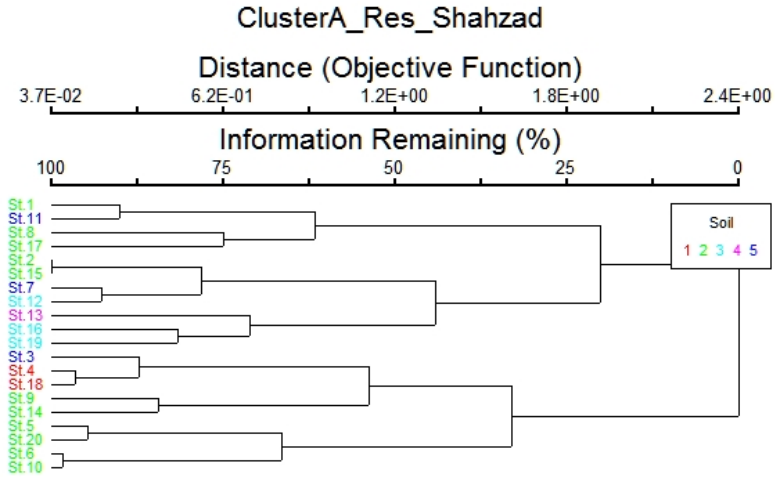


Fig. 5. Shows cluster analysis of soil types

Folk uses, various parts of the plant are used. 18.0% of respondents used it for dry cough, 17.2% used it for urine irritation, 17.7% used it for stomach disease, 9.4% used it for diarrhoea, 7.8% used it for blood purification, 6.3% used it for bone pain, 6.3% used it for chest pain, 4.7% used it for skin irritation, 4.7% used it as a refrigerant, 3.9% used for dysentery, 3.1% as an anti-diabetic, 2.3% as an anthelmintic, 2.3% used it for throat infection, 2.3% used it as an expectorant and 1.8% used it as an astringent (Ali et al., 2017).

Fresh leaves are crushed and the extract is used for dysentery and skin diseases. The seeds are dried and used as a spice. The bark of stem and roots are dried and then converted to powder form, which is used as an expectorant, anthelmintic and antipyretic (Hassan et al., 2015). The fruit seeds are directly used (Nasrullah et al., 2012). The plant leaves are browsed by domestic stock. The tree branches are cut and used as firewood. Their wood is hard and durable, mostly used in making farm implements. From the root bark, a black ink is produced rich in tannins and useful in dyeing and leather (Nehofer et al., 2013; Ali et al., 2017).

Methods of use: 27.6% of respondents used it in powder form, 26.2% in powder form is mixed with water, 17.2% in powder form mixed with sugar, 10.3% as seed used as a food, 2.8% in powder form mixed with opium, 5.5% in powder form mixed with milk, 2.1% as seed mixed with vegetables, 1.4% by extraction of juice from seed, 2.8% in powder form mixed with other sweets and 4.1% used a small part of the fruit bark (Ali et al., 2017).

In some countries, paper or plastic bags or any other covers may be put over the fruits to protect them from borers, birds, bats and squirrels. Treatment with Carbendazin, is effective against fungal disease, carbendazin protects the fruits from damage (Morton, 1987).

Reasons for survival (Lower Dir) Khyber Pakhtunkhwa. 18.4% of respondents claimed survival was due to human inaccessibility, 13.2% due to presence on steep slopes, 13.2% due to presence on fertile soil, 13.2% due to good water absorption, 11.4% due to presence of protective spines, 10.5% due to their strong secondary growth system, 7.9% protection due to its medicinal value, 7.0% due to its resistance to drought condition, 7.0% due to rainfall frequency and 2.6% of respondents claimed its survival was due to protection from animals (Jurenka, 2008). Reasons for threat of extinction (Lower Dir) Khyber Pakhtunkhwa. 17.1% of respondents claimed the threat was due to use of plant stem and branches as firewood, 15.50% due to accessibility to humans, 13.9% due to excessive use of its fruits, 13.9% due to high palatability, 12.4% due to soil erosion, 9.3% due to overuse of the seeds, 6.2% due to lack of protection, 5.4% due to its presence in areas unsuitable for growth, 3.9% due to vulnerability and 2.3% due to water logging and salinity of the soil (Sadeghi and Kuhestani, 2014).

Conclusions

Finally, in the light of the findings of the present study, the following conclusions were drawn. We conclude that *P. granatum* is a commonly grown plant in Lower Dir district, found from areas in the plains to steep mountain slopes. We can also conclude that it is a highly medicinal plant and is in common domain of ethno-medicinal plants of the area. Around 18% people use it for dry cough, 27.6% use it in its powder form. According to the opinion of people, this plant has survived in the area due to difficult human access to some of its habitats. People also believe that the plant is endangered due to its excessive use and could soon vanish from the area.

The old age group interviewed showed better knowledge of the ethnoecology of the species. We personally believe that due to modernization of our society, people are not paying attention to preservation of this valuable ethnomedicinal knowledge. We also conclude that similar stands must have similar environmental conditions and should support similar floristic diversity.

We recommend that further studies on the impact of climate change on this plant should be carried out in the area and that the species should be given conservation priority for generations to come.

We sincerely thank all interviewees for taking part and sharing their knowledge. We are also grateful to the anonymous reviewers for all their useful suggestions and contributions.

References

Ahmad, B., Abbas, S. J., Hussain, F., Bashir, S., & Ahmad, D. (2014). Study on *Caralluma tuberculata* nutritional composition and its importance as medicinal plant. Pakistan Journal of Botany, 46(5), 1677–1684.

Ali, K. (2015). A comparative assessment of climate change effect on some of the important tree species of Hindu-Kush Himalayas, using predictive modelling techniques. International Journal of Advanced Research, 3(5), 1230–1240.

Ali, K., Khan, N., Rahman, I. U., Ahmad, S., Khan, W., Ali, M., & Sheday, A. A. (2017). Climate change: An evil or an opportunity-evidence from the Hindu-Kush Mountain system of Pakistan. International Journal of Biosciences, 11(2), 99–105.

Ali, K., Ullah, F., Khan, N., Rahman, I. U., Ullah, S., Khan, W., Ali, M., Uddin, N., & Nisar, M. (2017). Ethnobotanical and ecological study of *Myrtus communis* (L.) in Bajaur agency (FATA) Khyber-Pakhtunkhwa, Pakistan. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 11(1), 152–164.

Ali, M., Alam, M., Wadood, S. F., Khan, W., Uddin, N., Zaman, S. U., Nazir, N., Karim, N., Ali, Z., & Nisar, M. (2017). Biochemical characterization of Pakistani *Zea mays* landraces growing in the remote areas of Khyber Pakhtunkhwa. International Journal of Biosciences, 11(3), 51–58.

Barman, S., & Das, S. (2012). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic extract of leaves of *Punica granatum* in alloxan-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus albino rats. Indian Journal of Pharmacology, 44(2), 219–224.

BiBi, H., Afzal, M., Muhammad, A., Kamal, M., Sohail, Ullah, I., & Khan, W. (2014). Morphological and anatomical studies on selected dicot xerophytes of district karak, Pakistan. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 14(11), 1201–1212.

Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., & Singh, R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(17), 4791–4795.

Fiallo, V. F., & Montoya, A. E. (1995). Las encuestas etnobotanicas sobre plantas medicinales en Cuba [Enthobotanical survey of medicial plants in Cuba]. Rev. Jard. Bot. Nacion. Univ. Habana, 16, 77–145.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10), 4581–4589.

Jeune, M. A. L., Kumi-Diaka, J., & Brown, J. (2005). Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. Journal of Medicinal Food, 8(4), 469–475.

Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. Alternative Medicine Review, 13(2), 128.

Khan, N., Ahmed, M., Wahab, M., & Hussain, S. S. (2010). Studies along an altitudinal gradient in *Monotheca buxifolia* (Falc.) ad, forest, District Lower Dir, Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 42(5), 3029–3038.

Khan, N., Ali, K., & Shaukat, S. (2014). Phytosociology, structure and dynamics of *Pinus roxburghii* associations from Northern Pakistan. Journal of Forestry Research, 25(3), 511–521.

Khan, N., Shaukat, S. S., Ahmed, M., & Siddiqui, M. F. (2013). Vegetation-environment relationships in the forests of Chitral district Hindukush range of Pakistan. Journal of Forestry Research, 24(2), 205–216.

Lucas, G., & Synge, H. (compilers) (1978). IUCN plant red data book. Unwin Bros., Ltd., UK.

Neuhofer, H., & Witte, L., & Gorunovic, M., & Czygan, F.-C. (1993). Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (Pomegranate) from Yugoslavia. Pharmazie, 48, 389–391.

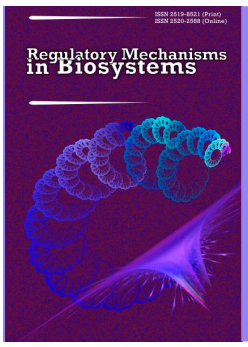
Nisar, M., & Ali, Z. (2012). Ethnobotanical wealth of Jandool Valley, Dir Lower, Khyber Pakhtunkhwa (KPK), Pakistan. International Journal of Phytomedicine, 4(3), 351–354.

Rajaei, H., & Yazdanpanah, P. (2015). Buds and leaves in pomegranate (*Punica granatum* L.): Phenology in relation to structure and development. Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 214, 61–69.

Rawat, J. M. S., & Tomar, Y. K., & Rawat, V. (2017). Effect of stratification on seed germination and seedling performance of wild pomegranate. Journal of American Science, 6(5), 97–99.

Sadeghi, Z., & Kuhestani, K. (2014). Ethnobotany of date palm (*Phoenix dactylifera*) in Baluch tribe of Saravan region, Baluchistan, Iran. Journal of Agricultural Technology, 10(6), 1571–1585.

Schubert, S. Y., Lansky, E. P., & Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. Journal of Ethnopharmacology, 66(1), 11–17.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), 662–672
doi: 10.15421/0217102

Pharmaceutical development of complex wound-healing ointment for the needs of military medicine

V. O. Tarasenko*, V. V. Shmatenko*, V. O. Kuchmistov*, N. O. Koziko**, O. P. Shmatenko*, A. O. Drozdova***, V. V. Rudenko*, T. S. Nehoda**

Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv, Ukraine
***National Medical University named after O. O. Bohomolets, Kyiv, Ukraine*
****National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupyk, Kyiv, Ukraine*

Article info

Received 27.10.2017
Received in revised form 21.11.2017
Accepted 24.11.2017

Ukrainian Military Medical Academy, Melnikov Str., 24, Kiev, 04050, Ukraine. Tel.: +38-095-838-97-19. E-mail: vika_tarasenko83@ukr.net

National Medical University named after A. A. Bogomolets, Pushkinskaya Str., 22, Kiev, 01601, Ukraine. Tel.: +38-068-594-67-95. E-mail: fedoritenko-nata@ukr.net

National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupyk, Dorogozhitska Str., 9, Kiev, 04112, Ukraine. Tel.: +38-066-364-84-14. E-mail: drozdova82@ ukr.net

Tarasenko, V. O., Shmatenko, V. V., Kuchmistov, V. O., Koziko, N. O., Shmatenko, O. P., Drozdova, A. O., Rudenko, V. V., & Nehoda, T. S. (2017). Pharmaceutical development of complex wound-healing ointment for the needs of military medicine. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 662–672. doi:10.15421/0217102

This article presents experimentally proved scientific-practical methods of developing modern vulnerary medical preparations in the form of an ointment with antibacterial, anti-inflammatory and anesthetic properties for the purposes of military medicine. In pursuit of the designated goals, the authors used modern methods of research: pharmacological-technological, physical-chemical, structural-mechanical and biological methods – for proving the compound of the combined ointment including ofloxacin, nimesulide and lidocaine. On the basis of the research conducted, we proved the content and rational technique of the complex antimicrobial ointment with anti-inflammatory and anesthetic effect using ofloxacin (0.05 g), nimesulide (1.0 g) and lidocaine (4.0 g). We experimentally established the optimal content of the main component of the ointment: emulsive base of mixture of Polyethylene Oxide-400 and Polyethylene Oxide-1500 (1 : 4) and a complex of emulsifiers of the first and the second generations – cetostearylic alcohol – 3%, monoglyceryl stearate – 5% at the constant concentration of paraffin oil – 20%, which involves a certain temperature regime during preparation, a sequence of introducing active pharmacological ingredients and adjuvants to the water and oil phases, frequency and duration of mixing. Physical-chemical tests of the ointment base determined the optimum concentration of glycerine as 5%, which encourages elimination of purulent discharge from damaged tissues, causing an anti-inflammatory effect and providing a prolonged, but milder dehydrating effect. The relation between physical-chemical, rheological, biopharmaceutical properties of the developed preparation and the concentration and method of introduction of the active pharmaceutical ingredients was theoretically and experimentally proven. We conducted pre-clinical studies (*in vivo*) for defining the therapeutic efficiency of the ofloxacin-nimesulide composition in the compound of the developed ointment for complex treatment of the wound process. We studied the specific activity (anti-alternative – model of standard tissue wounds in rats), which allowed us to establish the optimum concentration of nimesulide, which is 1%. Biopharmaceutical studies (*in vitro* method) determined the optimum method of introducing ofloxacin, nimesulide and lidocaine in the ointment base as a solution in dimethyl sulfoxide. To select an anesthetic substance for the ointment, the authors conducted a comparative study on the anesthetic effect of the anesthetics most widely available in Ukraine: novocaine, dicainum, lidocaine, trimecainum and pyromecainum. The research conducted on the time it took for the anesthetic effect to occur and on the duration and extent of the effect enabled us to select a 4% concentration of lidocaine anesthetic for the preparation. The choice of the temperature regime for the ointment's preparation was proved. The *in vitro* method and rheological studies determined that the optimum temperature regime for the technological process of preparing the ointment on the emulsive base is 25–30 ºC. The development and introduction of the new combined ointment on a contemporary hydrophilic ointment base into practical pharmacy would lead to an enlargement in the nomenclature of the medical preparations used for local treatment of the purulent – necrotic phase of the wound process, which is relevant for pharmaceutical technology and global medical science and practice.

Keywords: ofloxacin; nimesulide; lidocaine; rheology; wound process

Introduction

In the course of the Anti-Terrorist Operation in Ukraine, gunshot and combined wounds dominate in the structure of sanitary casualties among the combatants (around 86.9%); two thirds of these are limb wounds, combined wounds and head wounds, all of which require urgent and high quality medical treatment, including use of modern highly-efficient wound-healing preparations. Limb wounds which account for 53% dominate localization of patients' groups, and require urgent elimination of the development of the microflora in the wound, creating optimum conditions for the wound process to develop into the regeneration phase (Cardinal et al., 2009; Healy and Freedman, 2010). Nowadays the practice of treating wounds under dressings makes possible a significant shortening of the systematic antibacterial therapy period, by searching and active introduction of new medical preparations with poly-factor effect and capable of mutually-potentiating and mutually supporting activity, which meet the current requirements

of pharmaceutical safety and allow efficient local treatment of wounds in accordance with the stage of the wound process (Atiyeh et al., 2009; Hotz et al., 2010). The importance of developing wound-healing preparations with complex effects is conditioned by the increase in the number of post-operational infectious complications, resistance of microorganisms to antibiotics, changes in immune-biological responsiveness of the macroorganism, etc. (Dohmen, 2008; Cardinal et al., 2013).

The search for active substances and adjuvants and methods of technology of production with consideration of physiological peculiarities of the wound surface are the main directions in the development of biopharmaceutics in the sphere of development and enlargement of the nomenclature of domestic soft medical preparations for treatment of the wound process (Owens and Stoessel, 2008; Vyas and Vasconez, 2014). Currently, vulnerary medical preparations are one of the most common pharmaceutical forms. They make up 10% of the total output of the production of ready-to-use formulations. Soft pharmaceutical preparations are used in different spheres of medicine for treatment, diagnosis and prevention of diseases (Swarbrick, 2013). They are characterized by relative simplicity and safety of usage, economical and technological effectiveness (Sheskey et al., 2017). The regulation of pharmaceutical changing factors allows modification of the properties of pharmaceutical ingredients, facilitating their distribution on the wound surface, and prolonging their therapeutic effect, etc. (Swarbrick et al., 2012; Swarbrick, 2013; Farooq et al., 2014; Maitz, 2015). The contact method of implementation of soft pharmaceutical preparations for treating purulent-inflammatory processes allows maximum concentration of the medical substance on the wound area. The method of soft medication introduction is considered the safest, for the greater part of the dose is on the surface of the wounded area (Healy and Freedman, 2010; Rüttermann et al., 2013).

The pharmacotherapeutic effect of medical preparations for treating purulent-inflammatory processes is closely related to the nature, properties and quantitative ratios of the base components. Rationally selected components of the base can increase the therapeutic activity of the active pharmaceutical ingredients, support or impede its release and absorption, increase or decrease its pharmaceutical effect, affect its bioavailability and define various side-effects, distinguishing the effect of the preparation (resorptive or surface) (Abrantes et al., 2016). The base is essential to the pharmacotherapeutic effect and pharmacokinetics of the preparation. The base impacts the state, properties and the pathological process of the wounded area covered by the soft pharmaceutical preparation. Also, the base determines the consumer properties of the soft pharmaceutical form (Swarbrick, 2013; Chauhan et al., 2016).

Currently, pharmaceutical practice includes around 200 individual and combined ointment and gel bases, which possess different properties and correspond to different medical-biological purposes. There is no perfect base, for provision of the base with required properties involves combining several adjuvants (Maitz, 2015; Chan et al., 2017). As we know, ointments, creams for treating purulent-inflammatory processes, should at the same time possess multi-directional impact on the main etiopathogenetic factors of the inflammation, sufficient osmotic activity, preventing secondary infection (Hotz et al., 2010). Medical usage of the preparation is defined by the usage of the corresponding adjuvants and bases (Merkle, 2015).

In treatment of purulent wounds it is necessary to consider that over the purulent-necrotic phase of the wound process, it is recommended to use soft pharmaceutical forms with a strong antimicrobial, anti-inflammatory, anesthetic and osmolar effect, which are capable of controllable dehydrating activity and impact on the release, bioavailability and therapeutic effect of medical substances (Hotz et al., 2010; Chauhan et al., 2016). It is generally accepted that the manifestation of osmotic activity in anti-inflammatory preparations promotes dehydration in the zone of inflammation, which leads to decrease of edemas and accelerates the metabolic processes in the tissues (Kadajji and Betageri, 2011; Janis and Harrison, 2016).

The substances having these properties are polyethylene oxides of the base (from mixture of macrogols), which due to their bacteriostatic properties are resistant to microbial contamination, and also fully release medical substances and prolong their effectiveness (Maisch, 2007; Kadajji and Betageri, 2011). Bioavailability of the active pharmaceutic ingredients is not related to the temperature of the melting of polyethylene oxidal base and is conditioned only by the speed of dissolution of the bases and their diffusion. From the technological perspective, the advantage of polyethylene oxide (PEO) bases is high viscosity, which prevents the sedimentation of non-dissolved medical substances (Merkle, 2015). Chemical indifference, thermal stability, absence of polymorphic modifications and resistibility to pH changes determine the suitability of polyethylene oxide bases for production of many pharmaceutical forms for treating purulent-inflammatory processes. The high affinity of the base to biological fluids in the organism (interstitial fluid) facilitates the full release of the active pharmaceutical ingredients from the pharmaceutical form over a certain period of time (Kiamahalleh et al., 2017). Considering the requirements of wound-treatment preparations, the usage of hydrophobic bases is not appropriate, for they minimize the dynamic processes of absorption, and, therefore decrease penetration and release of the medical substances (Merkle, 2015). Modern production of soft pharmaceutical forms for treating purulent-inflammatory processes prefers pharmaceutical preparations on hydrophilic bases, which can be applied to the wound surface without disturbing the perspiration. Active pharmaceutical ingredients are easily absorbed from such substances (Chauhan et al., 2016); non-aqueous solvents in the base, which affect the penetrability of the cellular membranes and increase the absorbability of the preparation, contribute to this process.

Therefore, use of hydrophilic or combined bases which are highly effective in releasing active pharmaceutical ingredients is optimal for developing wound-treatment preparations. This is due to the fact that achieving optimum therapeutic effect in the wounded area requires mixing the base and the medical preparation with exudates of damaged tissues (Healy and Freedman, 2010; Swarbrick, 2013). Pharmaceutical practice uses bases with elastic-viscous flexible environment (emulsion of the I generation) and hydrophilic non-aqueous solvents and carbomer gels on the base of hydrophilic surfactants (Haag and Kratz, 2006; Islam et al., 2014). A no less important characteristic of the development of wound-treatment preparations is considered to be the use of I generation emulsion bases (oil/water), which are effective in contacting the wound surface, are capable of a cooling effect due to active evaporation of the water phase of the base, and are able to provide an anesthetic and soothing effect to a certain extent (Debjit et al., 2012; Chauhan et al., 2016).

Thus, considering the abovementioned points and the main stages of pathogenetic wound process development (Atiyeh et al., 2009; Healy and Freedman, 2010), we found it appropriate to include nimesulide, a non-steroidal anti-inflammatory preparation, in the developed ointment (Kopenkin and Talitsky, 2013; Alves et al., 2007); with local usage, this preparation manifests anti-inflammatory, anti-edema and local anesthetic effects (Victorov and Kashuba, 2014). The treatment of complex infectious processes of the skin most often uses broad-spectrum antibiotics and antiseptics (Dohmen, 2008; Owens and Stoessel, 2008; Puoci et al., 2012). Therefore, the antibacterial component was ofloxacin, to which a wide range of microorganisms has no resistance (Maisch, 2007). An important part of treatment of the wound process is decreasing the pain threshold. Therefore, for providing the anesthetic effect, lidocaine was added to the new developed medical preparation (Healy and Freedman, 2010; Hotz et al., 2010).

The aim of this article is to present research focused on the scientific grounding and development of a modern Ukrainian-made medical preparation with a complex effect for local treatment of wounds, in the form of an ointment, capable of anti-bacterial, anti-inflammatory and local anesthetic effect, and which does not require frequent changes in the treatment of wounded military personnel.

Materials and methods

Bacterial strains tested. As cell cultures recommended by the National Pharmacopoeia of Ukraine (Hryzodub et al., 2015), etalon test strains from the American Type Culture Collection were used (USA): *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653, *Proteus vulgaris* 4636, *Clostridium perfringens* A28 (BP6K), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bucillus subtilis* ATCC 6633 and strains of the same microorganisms, selected from patients with pathological purulent-inflammatory processes.

Therefore, strains classified as gram-positive and gram-negative, anaerobic and aerobic, sporogenous and non-sporogenous bacteria were selected. The selected microorganisms are considered the main pathogens of purulent-inflammatory process of soft tissues of the epidermis (Trostrup et al., 2013). Among them, the following strains were used: strains of *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, recommended by the World Health Organization. The test strains of bacteria used corresponded to morphological, culture, tinctorial and biochemical properties. As a breeding ground, we used sterile liquid soybean-casein environment ("Biomerieux" Enterprise, France, No 51019).

In the course of the experimental research, the authors used active pharmaceutical ingredients – ofloxacin, nimesulide (gift sample from Dr. Reddy's labs, Hyderabad, India), lidocaine (Merck, Germany), and adjuvants – sodium carboxymethyl cellulose, propylene glycol, eudragit NM30D, glycerine (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India), polyethylene oxide-400, polyethylene oxide – 1500, dimethyl sulfoxide, sodium cetearyl sulfate, monoglyceryl stearate, cetylstearyl alcohol, polysorbate-80, liquid paraffin (Sigma-Aldrich, Germany). All the chemicals, emulsifiers and reagents were of analytical grade.

Technological, physical-chemical and biopharmaceutical indicators of the ointment were calculated according to the generally accepted methods in accordance with the National Pharmacopoeia of Ukraine (Hryzodub et al., 2015).

Preparation of the model samples. As we know, the highest stability, high dispersity and required viscous-flexible properties of the emulsions are provided by usage of a combination of emulsifiers of the first and the second generation in certain ratios; this defines important data on the inter-phase function of the surfactants (Isaac et al., 2015; Chauhan et al., 2016). It must be acknowledged that emulsions with emulsifiers of different types can be stable at identical values of hydrophilic-lipid balance, which should be distinguished among them (Mastropietro et al., 2013; Islam et al., 2014). The choice of emulsifier considered not only its ability to form stable emulsions with corresponding consistency properties, but also the necessity of providing easy fusion of the ointment with serosal discharges and purulent exudates. For this purpose, to carry out the research in the model samples we used non-ionic surfactants – cetylstearyl alcohol for emulsifiers of the first generation, and monoglyceryl stearate as emulsifier of the second generation.

According to data from the literature (Mastropietro et al., 2013), the most frequent optimum concentration of the oil phase in pharmaceutical emulsion ointments is 20%. At this content of oil, it is possible to obtain stable emulsion with satisfactory consumer indicators and viscous-flexible characteristics.

Therefore, in the course of our research, the type of the surfactant was changed, and the following indicators remained constant: total concentration of the surfactant (8%), and also the content of adjuvants (liquid paraffin – 20%, polyethylene oxide – 1500 – 1%, polyethylene oxide – 400 – 4%, glycerine – 5%, purified water – up to 100%). For selecting the ointment base, the authors developed 10 model systems (Table 1).

Table 1
Model compositions with emulsifiers cetostearyl alcohol and monoglyceryl stearate

Model composition	Vaseline oil, %	Cetostearyl alcohol, %	Monoglyceryl stearate, %	Glycerine, %	PEO-1500 / PEO-400, %	Purified water up to, %
1	20.00	7.75	0.25	5.00	1.00/4.00	100.00
2	20.00	7.50	0.50	5.00	1.00/4.00	100.00
3	20.00	7.25	0.75	5.00	1.00/4.00	100.00
4	20.00	7.00	1.00	5.00	1.00/4.00	100.00
5	20.00	6.00	2.00	5.00	1.00/4.00	100.00
6	20.00	5.00	3.00	5.00	1.00/4.00	100.00
7	20.00	4.00	4.00	5.00	1.00/4.00	100.00
8	20.00	3.00	5.00	5.00	1.00/4.00	100.00
9	20.00	2.00	6.00	5.00	1.00/4.00	100.00
10	20.00	1.00	7.00	5.00	1.00/4.00	100.00

Criteria for selecting the base compound. For selecting the base, the authors studied those which are widely used in the pharmaceutical industry and are described in the literature (Table 2).

Osmotic activity was studied at the temperature of 34 ± 1 ºC in the experiments *in vitro* using the method of dialysis of semipermeable membrane (Hryzodub et al., 2015). The weighted amount of ointment bases equaled 10 g, the semipermeable membrane – defatted intestine. The mass of internal cylinders was weighed 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 hours on AS 220/C Radwag (Poland) analytical scales with up to 0.001 g accuracy, first wiping them from the external side. As an environment for the dialysis, water was used. The amount of the fluid absorbed by the ointment base was expressed as a percentage in relation to the mass of the studied sample (10 g). The tests were conducted at a temperature of 34 ± 1 ºC using TS-1/20 SPU Biomed (Kharkiv) thermostat. Periodically, the amount of purified water in the dialysis chamber was adjusted to the initial level. The amount of absorbed amount of fluid was defined according to the difference between two weighings.

Rheological studies were conducted using a RV 2.1 Rheotest rotating viscometer (Germany) according to generally accepted methodic of the National Pharmacopoeia of Ukraine (Hryzodub et al., 2015). The measurements were made at different temperature regimes at speeds of shift from 1.5 to 1332.0 s^{-1}. The thermostatting process was carried out using the ultra thermostat, included in the set of equipment.

Table 2
Model ointment base composition

Base No	Ointment base type	Excipients	The content of substances, g
1	Emulsion type oil / water	Vaseline oil	25.0
		Tween-80	5.0
		Cetostearyl alcohol	25.0
		PEO-400	12.0
		Purified water	33.0
2	Emulsion type oil / water	Vaseline oil	10.0
		PEO-400	10.0
		natrium cetearyl sulfate	8.0
		Purified water	72.0
3	Hydrophilic	PEO-400	80.0
		PEO-1500	20.0
4	Hydrophilic	eudragit NM30D	10.0
		Propylene glycol	45.0
		Purified water	45.0
5	Hydrophilic	Monoglyceryl stearate	5.0
		Glycerin	10.0
		Purified water	85.0
6	Hydrophilic	Monoglyceryl stearate	10.0
		Propylene glycol	45.0
		Purified water	45.0

The tangential stress of shear was calculated using the formula:

$$\tau_r = Z \cdot L, \quad (1)$$

τ_r – tangential stress of shear (Pa), Z – constant of the device (dependency on the type of cylinder), L – the device's indicator.

After calculating the shear stress at calculated speeds of the shear, we calculated the structural viscosity of the studied samples, using the formula:

$$\eta = \tau_r / D_r, \quad (2)$$

D_r – shear speed (s^{-1}), η – structural viscosity (Pa • c), τ_r – tangential stress of shear (Pa).

The obtained data is necessary for developing rheograms of the ointment's effect. They reflect the relation between the tangential stress of shear (τ_r) and shear speed (D_r), which is the indicator of the capacity of the ointment to spread. As the control in the study of rheological properties of the developed ointment we used a placebo-ointment (with no pharmaceutical ingredients).

For investigation of the anesthetic properties of local anesthetics we used the device and the method for defining the pain sensitivity, which were developed in the Ukrainian Institute of Improvement of Medical Qualifications (Stefanov et al., 2001).

For determining the anesthetic properties of local anesthetics we used guinea pigs. All animals in the experiments were divided into 6 groups of three. The time when the first subjective feelings, registered with the stopwatch, occurred, was considered the time of beginning of the anesthetic effect. The body of the device was tightly pressed to the studied area of the skin, and the depth of the pain sensitivity was defined by inserting the device's needle with a measurement scale. This depth, defined before applying the anesthetic, was used as the pain threshold. Beginning with the moment of manifestations of the first subjective feelings (the time of the start of the anesthesia), at certain intervals (5–10 min), we defined the depth of the anesthesia by inserting the needle of the device, and considered this as maximum anesthesia. The time during which the needle caused pain was registered as the ending of the anesthetic effect.

The antimicrobial activity of the samples was defined according to the National Pharmacopoeia of Ukraine using the microbiological method of diffusion in agar on a solid growth medium; the method is based on the antibacterial substance's ability to suppress the breeding of bacteria (Hryzodub et al., 2015). The inhibition zones of the breeding of the tested bacteria strains, caused by a tested sample were compared to the diameters of the breeding inhibition zones, which resulted after using the Oflocain referential preparation (Darnytsia Pharmaceutical Enterprise, Ukraine).

Bacterial microorganisms *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC8 85/653, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bucillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* 4636, *Clostridium perfringens* A28 (BP6K) were grown at a temperature of 35 ºC over 18–20 hours on meat peptone agar. The growth media were examined for sterility and for growth abilities according to the requirements of the National Pharmacopoeia of Ukraine.

Bacterial suspensions were prepared and their optical density was defined at 550 nm using Densimat BioMerieux densitometer (France) in McFarland units for identifying the concentration of bacterial suspension in colony-forming units (CFU/ml). We selected smooth and uniformly pigmented colonies, which were characterized by growth and tinctorial properties during staining according to Gram's method, then transferred them to a dense growth medium of the same composition and incubated them depending to the species of microorganisms: over 18–20 or 24–48 hours according to anaerobic and aerobic bacteria. In parallel, the number of microorganisms in the suspensions was confirmed using the direct inoculation method on a Petri dish with sterile dense soybean-casein agar growth medium and counted to CFU/ml.

During the next stage of determining the antimicrobial activity of the studied ointment sample, in order to obtain a uniform layer, the corresponding melted agar breeding ground, cooled to 40–45 ºC, was inoculated by test strain in optimum ($1 \cdot 10^7$ CFU/ml) concentration and put at 20 ml into Petri dishes, which were situated on the surface of a rotary table, and were left on a smooth horizontal surface until the agar solidified.

Our microbiological studies included the following stages: the prepared suspension (1 ml) with unknown bacterial concentration was put in a prepared API ampoule (with 5 ml of 0.85% solution of NaCl) and mixed; then the ampoule was put in a scanning unit and the numeric McFarland value was calculated. If the obtained value was less than 0.5, the ampoule was taken out of the device and a necessary amount of bacterial suspension was added. If the amount of the inoculants was higher than 7, then we dissolved the suspension and repeated the test using another ampoule.

If the obtained value was less than 0.5, the ampoule was taken out of the device and the required amount of bacterial suspension was added. If the amount of inoculants was higher than 7, then we dissolved the suspension and repeated the test using another ampoule. Each ampoule had to be clean on the outside and wiped before usage. Testing of the device was compulsory: 6 McFarland Standard ampoules with 5 ml in each (0.5, 1, 2, 3, 4, 5) were in turn put in the densitometer. The test was conducted each time after cleaning the device (Table 3).

Table 3
Correspondence of McFarland units to optical density

McFarland Standard	Bacterial concentration, $\times 10^8$ ml^{-1}	Theoretical optical density, 550 nm
0.5	1.5	0.125
1.0	3.0	0.250
2.0	6.0	0.500
3.0	9.0	0.750
4.0	12.0	1.000
5.0	15.0	1.250
6.0	18.0	1.500
7.0	21.0	1.750

When measuring (to accuracy of 1 mm) the zones of strain growth inhibition, we orientated on the zone of full inhibition of visible bacterial growth. The diameters of the growth inhibition zones were measured using a caliper to accuracy of 1 mm).

Determining the anti-alternative activity. The biological research were conducted at the Institute of Problems of Pathologies of the National Medical University named after A. A. Bogomolets according to the methodological recommendations (Stefanov et al., 2001) using *in vivo* method (the model of standard skin wounds) on white rats of 200–240 g body weight. As a comparative preparation, Nimulid (Panacea Biotec Ltd., India) was used.

Under Hexenalum anesthesia, we formed standard skin wounds of 10 mm diameter and 1.5 to 5.0 mm depth of scarified wound. First, the skin was depilated and then at the surface a skin wound was inflicted to a standard diameter and depth by a rotating scarificator tightly pressed to the skin. To estimate anti-alternative activity we used an indicator of area (S) of the wound (mm^2), which was measured planimetrically. This indicator was used for calculation of the percentage of the activity of the tested preparation in relation to non-treated animals.

The speed of healing of wounds was calculated using the formula:

$$V = \frac{S_y - S_t}{S_y} \cdot 100 \quad (3),$$

V – speed of wound healing (%), S_y – initial wound area (mm^2), S_t – wound area in the day of measurement (mm^2).

To the compound of the pharmaceutical form, nimesulid was added in a form of a solution in dimethyl sulfoxide concentration from 0.5% to 1.0% (Table 4).

Studying the impact of the method of introducing the active pharmaceutical ingredients to the ointment compound and their antibacterial properties with further determination of their optimum concentration. Considering the physical-chemical properties of the active pharmaceutical ingredients, ofloxacin and nimesulide were introduced as solution in dimethyl sulfoxide, suspension with polyethylene oxide – 400, glycerine and liquid paraffin. Lidocaine is easily soluble in water and hydrophilic non-

aqueous solvents, therefore, it was introduced to the ointment base in the form of solution in water, solution in dimethyl sulfoxide and solution in polyethylene oxide – 400 (Davtian, 2009).

Table 4
Concentration of active pharmaceutical ingredient in the ointment developed to treat groups of animals

Group of animals	Drug/composition		Concentration of active pharmaceutical ingredient	
			Ofloxacin	Nimesulide
1	–		-	-
2	Preparation of comparison	Oflocaxin	-	-
3		Nimulid	-	1.0
4	Ointment	1a	0.10	1.0
5		1b	0.05	0.5
6		1c	0.05	1.0

The research was conducted in five series (five samples in each). Statistical analysis of the obtained results were made using Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Data in the tables was provided as x ± SE, where x is average value of the indicator, SE is standard deviation. The results were considered statistically reliable at $P < 0.05$ (Mincer et al., 2003).

Results

Proving the selection of the base compound. The development of the compound and the technology of the soft pharmaceutical preparation were based on current medical-biological requirements for wound-treating preparations, developed on emulsion and hydrophilic bases.

Research on the osmotic properties of the model samples of the base. As we know, the process of release of active pharmaceutical ingredients from ointments is closely related to the osmotic activity of the bases. This factor is considered a treatment factor, which decreases edema and facilitates dehydration in the inflammatory zone, and provides necessary conditions for healing of damaged surface of skin. As an environment for dialysis, water was used. The obtained data was presented as a curve of dependency of the liquid absorption upon the duration of dialysis (the numbers of the curves correspond to the numbers of model bases). The authors conducted studies on osmotic activity of the model bases (Fig. 1).

The results of the research conducted showed that the highest osmotic activity – 280.0 ± 1.5% was shown by the sample of the ointment base 3, which was developed on a polyethylene oxide base. The ointment bases 1 and 2 showed similar osmotic properties (180.0 ± 0.35%, 175.2 ± 0.23% respectively). Moderately higher osmotic properties were observed in the samples of the ointment bases 5 and 6 (230.3 ± 0.24%, 250.2 ± 0.36% respectively). Considering the medical-biological requirements to the pharmaceutical formulations for treating phase one of the wound process, in particular high osmotic activity, which would provide a contributory effect on cleansing purulent exudates of wounds, we chose the base 3, which includes alloy of PEO-400 and PEO-1500 (4 : 1), for further tests.

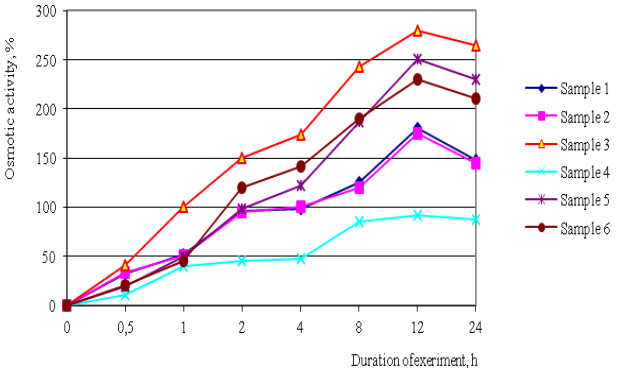


Fig. 1. Osmotic activity of model samples

Proving the choice of the emulsifiers for stabilizers of hydrophilic base. During the process of selecting the emulsifiers for stabilizing the emulsion, we studied the dependency of the rheological indicators of the emulsions on the type, ratio and the number of emulsifiers of the first and the second generation. For calculating the ratios of the emulsifiers, we constructed full rheograms of the activities of the model bases in the following coordinates: the speed of shear (Dr, c^{-1}) – the shear stress (τr, Pa) (Fig. 2, 3). The numbers of the curves correspond to the numbers of the model bases.

As a result of the research, we chose for the development of a combined ointment model composition 6 with the following compound of the emulsifiers: 5.0% cetylstearyl alcohol and 3.0% monoglyceryl stearate. This studied sample possesses the best thixotropic properties, which can be seen in the significant surface of area between the upward and downward curves, which indicates that it is capable of dissolving after being applied to the skin, is easily applied and is capable of extrusion from the tubes; also the consistency of the ointment base is satisfactory, for the stress curves are fully included in the area of optimum rheology of AB and CD for hydrophilic ointments.

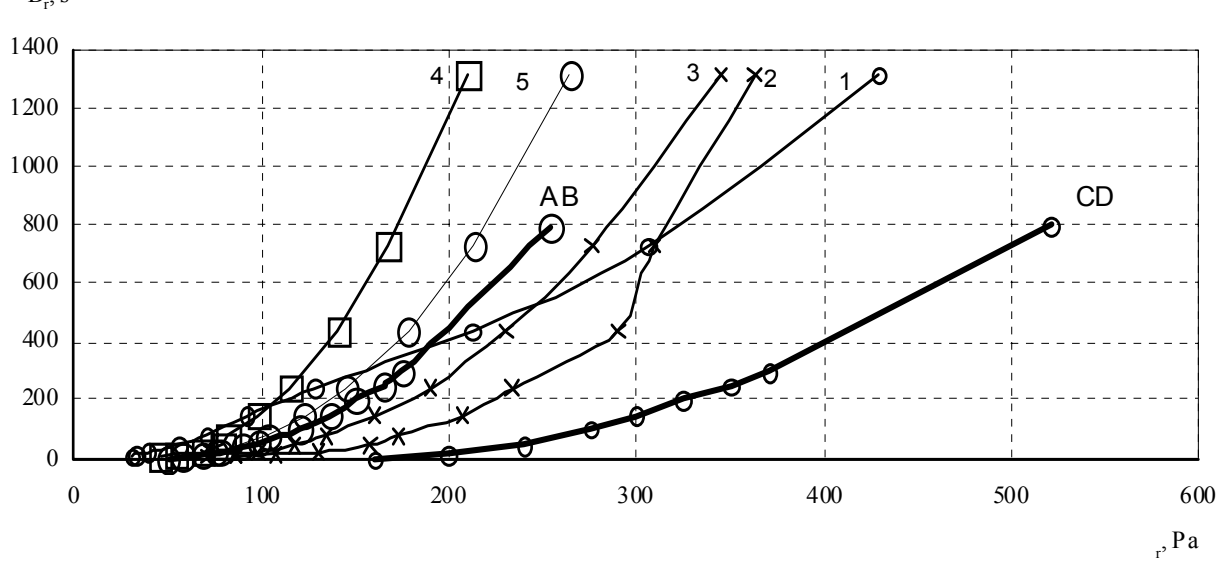


Fig. 2. Rheogram of model compositions flow with emulsifiers, cetostearyl alcohol / monoglyceryl stearate: 1. – 7.75% / 0.25%, 2. – (7.5% / 0.5%), 3. – (7.25% / 0.75%), 4. – (7.0% / 1.0%), 5. – (6.0% / 2.0%); AB and CD – borders of the rheological optimum in consistencies

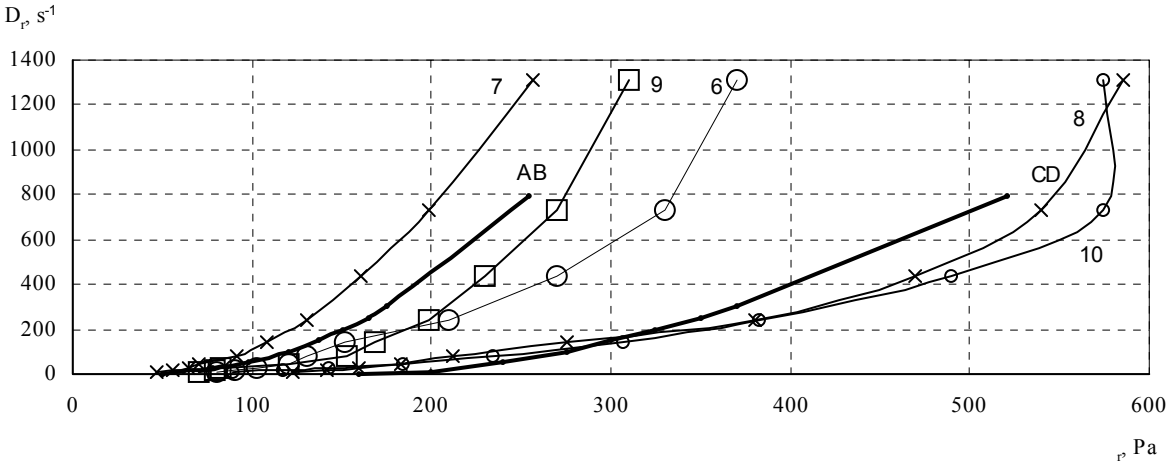


Fig. 3. Rheogram of model compositions flow with emulsifiers, cetostearyl alcohol / monoglyceryl stearate: 6. – (3.0% / 5.0%), 7. – (4.0% / 4.0%), 8. – (5.0% / 3.0%), 9. – (2.0% / 6.0%), 10. – (1.0% / 7.0%); AB and CD – borders of the rheological optimum in consistencies

Proving the selection of the hydrophilic non-aqueous solvents for the ointment compound. The next stage of research was proving the introduction of a certain amount of glycerine to the ointment compound by finding out the impact of this substance at various concentrations on the osmotic properties of emulsion ointment systems. According to the data from the literature, most soft pharmaceutical forms are provided with moisturizing and softening properties through addition of glycerine at concentrations ranging from 2.0% to 10.0%. It serves as a penetrant and solubilizer and is capable of increasing the transepidermal penetration of water and other substances.

On the basis of previous research into of the impact of glycerine concentration on osmotic properties of emulsion ointment systems, we researched the emulsion model ointment base 6 with a combination of the emulsifiers of cetylstearyl alcohol and monoglyceryl stearate in ratios of 5% and 3% respectively, with glycerine content up to 10%. The non-aqueous solvent was introduced to the prepared emulsion at a temperature of 40 ± 2 ºC. For deciding the quantitative compound of the osmotically active solvent in the composition of the ointment base, we chose glycerine at different concentrations (2.5%, 5.0%, 7.5% and 10.0%) and researched its osmotic activity (Fig. 4).

The conducted studies showed that the model samples 1, 3 and 4 manifested significant osmotic properties after 12 hours (160.0 ± 2.7%, 170.2 ± 2.5%, 165.2 ± 2.1% respectively). The sample 2 significantly differed in absorption properties (195.5 ± 2.7%). Such high percentage of the indicator of osmotic activity facilitates elimination of purulent discharges from the damaged tissues, causing anti-inflammatory activity and providing a prolonged and mild dehydrating effect.

Determining the optimum concentration of ofloxacin using in vitro method. For determining the optimum concentration of ofloxacin in the ointment compound, we added it at 0.025% to 0.100% concentrations with a two step increase. The comparative analysis of the obtained experimental data (*in vitro* method) showed that the optimum concentration of ofloxacin in the ointment compound is 0.05%. At such concentration, the diameters of the zones of growth inhibition of the strains equaled 26.0 ± 0.33 mm for *E. coli*, 26.9 ± 0.22 mm for *K. pneumoniae*, 26.3 ± 0.11 mm for *S. aureus*, 26.3 ± 0.11 mm for *C. perfringens*, 26.7 ± 0.20 mm for *C. albicans*, 30.5 ± 0.23 mm for *P. aeruginosa* and 30.2 ± 0.33 mm for *P. vulgaris* respectively. For more accurate determination of the optimum ofloxacin concentration in the ointment, we studied antibacterial activity of samples with ofloxacin content within the range 0.03% to 0.10% (Table 5).

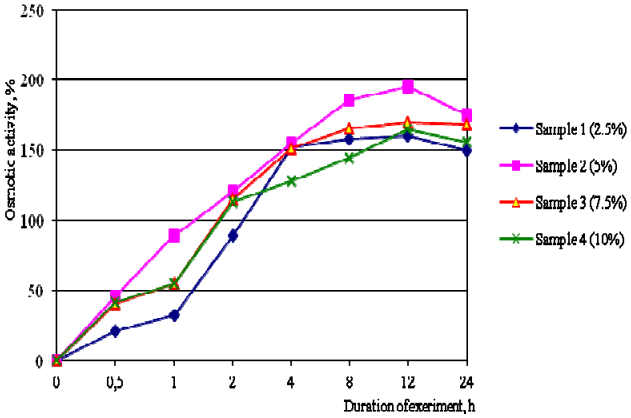


Fig. 4. Dependence of osmotic properties of model emulsion ointment bases on concentrations of glycerol

The obtained results showed that further increase of the ofloxacin concentration caused gradual decrease in the zones of inhibition of strain growth, i.e. to 25.0 ± 0.11 mm for *E. coli*, to 24.7 ± 0.12 mm for *K. pneumoniae*, to 24.8 ± 0.12 mm for *S. aureus*, to 26.4 ± 0.32 mm for *C. perfringens*, to 24.6 ± 0.31 mm for *C. albicans* to 27.0 ± 0.12 mm for *P. aeruginosa* and to 27.0 ± 0.30 mm for *P. vulgaris* respectively. Therefore, the optimum ofloxacin concentration for the ointment proved to be 0.05%.

Table 5

Ointment antimicrobial activity at different ofloxacin concentrations (10^7 CFU/ml in the top layer of the growth medium, x ± SE)

Ofloxacin concentration, %	Diameter of the test strain growth inhibition zone, mm						
	E. coli ATCC 10536	*K. pneumoniae* ATCC 10031	*S. aureus* ATCC 25923	*C. perfringens* A28 (BP6K)	*C. albicans* ATCC8 85/653	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*P. vulgaris* 4636
0.03	23.1 ± 0.12	26,3 ± 0.12	25.3 ± 0.12	27.0 ± 0.20	26.5 ± 0.10	28.4 ± 0.21	29.3 ± 0.22
0.04	24.4 ± 0.22	26.4 ± 0.13	26.4 ± 0.12	27.6 ± 0.17	27.1 ± 0.10	29.2 ± 0.12	29.1 ± 0.13
0.05	26.0 ± 0.33	26.9 ± 0.22	26.3 ± 0.11	28.2 ± 0.14	26.7 ± 0.20	30.5 ± 0.23	30.2 ± 0.33
0.06	25.2 ± 0.22	26.5 ± 0.23	25.5 ± 0.22	27.7 ± 0.24	25.8 ± 0.20	30.0 ± 0.14	29.0 ± 0.10
0.07	25.2 ± 0.33	25.2 ± 0.11	25.1 ± 0.13	27.3 ± 0.14	25.2 ± 0.20	30.0 ± 0.32	28.7 ± 0.11
0.08	25.2 ± 0.22	25.1 ± 0.31	25.0 ± 0.31	27.1 ± 0.31	25.1 ± 0.10	28.3 ± 0.12	28.3 ± 0.20
0.09	25.1 ± 0.22	25.1 ± 0.12	25.0 ± 0.13	26.8 ± 0.14	25.0 ± 0.10	28.0 ± 0.24	27.4 ± 0.12
0.10	25.0 ± 0.11	24.7 ± 0.12	24.8 ± 0.12	26.4 ± 0.32	24.6 ± 0.31	27.0 ± 0.12	27.0 ± 0.30

Determining the anti-alternative activity for identifying the optimum nimesulide concentration. The model of standard skin wounds of rats is the most common method for defining specific anti-alternative activity, which enables observation of the medical effect of a preparation at alternative inflammations and its impact on wound healing. The advantage of this method is standard conditions of wound formation. For the experiments on the animals we received permission from bioethical experts. All animals in the study were divided into six groups of six animals each (Table 6). Analysis of the data in Table 6 showed that from the 5th day of the experiment, the area of ulcers among animals of all groups began to significantly decrease. Active reduction of the ulcer areas among the animals and occurrence of juicy granulations in the wounds indicated the transition from phase I of the wound process to phase II – granulation and proliferation. A certain regularity was observed: treatment with compositions with a concentration of ofloxacin and nimesulide at 0.05% and 0.50% respectively (1b) was longer compared to the compositions 1a and 1c. Considering the almost identical pharmaceutical effect on the organism of animals at different concentrations of the active pharmaceutical ingredients, we chose their optimum concentrations for the ointment compound: 0.05% of ofloxacin and 1.00% of nimesulide.

Table 6
Planimetric figures for ointments and drugs compared to models aseptic skin ulcers in rats, x±SE, P < 0.05

Day of treatment	Indicator	Control pathology	Ofloxacin, 0.1 %	Nimesulid, 1.0 %	1a	1b	1c
1	aseptic area of ulcers (S)	1.08	1.09	1.03	1.03**	1.02**	1.04**
3	aseptic area ulcers (S)	0.89	0.92	0.93	0.92**	0.89**	0.87**
	speed of wound healing (V)	4	6	13	12*	9*	17*
5	aseptic area of ulcers (S)	0.87	0.89	0.62	0.60**	0.71**	0.61**
	speed of wound healing (V)	13	16	39	43*	35*	47*
7	aseptic area of ulcers (S)	0.79	0.83	0.45	0.4**	0.29**	0.31**
	speed of wound healing (V)	23	19	58	73*	68*	74*
9	aseptic area of ulcers (S)	0.66	0.74	0.25	0.15**	0.18**	0.14**
	speed of wound healing (V)	35	28	79	86*	85*	88*
11	aseptic area of ulcers (S)	0.57	0.55	0.18	0.07**	0.09**	0.04**
	speed of wound healing (V)	44	47	83	100*	93*	100*
13	aseptic area of ulcers (S)	0.42	0.28	0.10	–	0.02**	–
	speed of wound healing (V)	58	65	90	–	100*	–
15	aseptic area of ulcers (S)	0.35	0.16	0.06	–	–	–
	speed of wound healing (V)	63	76	92	–	–	–

Note: S – aseptic area of ulcers (mm^2), V – speed of wound healing (%), *– researched drug activity relative to control pathology, ** – researched drug activity relative to Ofloxacin and Nimesulid.

Selection of anesthetic medical substance in the ointment compound. We conducted a comparative study on the anesthetic effect of the most common domestic anesthetics: novocaine, dicainum, lidocaine, trimecainum and pyromecainum at concentrations from 1% to 10%. We determined the time of the beginning, duration and depth of the anesthesia. The experiments established that when lidocaine was used, the anesthesia began 5–20 min earlier than with solutions of other anesthetics at the same concentrations. Lidocaine showed the longest duration of anesthesia (20–50 min). At the moment of the maximum anesthesia, its depth when lidocaine was used equaled 0.4–0.7 mm. Therefore, the concentration of lidocaine of 4% was proven by the experimental studies.

Research on the impact of the method of introducing active pharmaceutical ingredients to the ointment composition and their antibacterial activity. The microbiological experiments proved the usefulness of introduction of active pharmaceutical ingredients in the form of solution in dimethyl sulfoxide (Table 7). Examination of the zones of inhibition of strain growth in relation to *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* showed that the solution of ofloxacin and nimesulide in dimethyl sulfoxide manifested higher antibacterial activity. The comparative analysis of the experimental results showed that the samples of ointment in which lidocaine was introduced to the base as a solution in dimethyl sulfoxide also manifested significant antibacterial activity, which equaled 22.2 ± 0.2, 23.0 ± 0.5, 22.9 ± 0.7, 22.2 ± 0.5, 22.2 ± 0.5 and 22.2 ± 0.5 mm and *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* respectively.

Table 7
Indicators of antibacterial activity of the ointment samples with different methods of introducing active pharmaceutical ingredients (x ± SE)

Model samples		Microorganisms inhibition growth zones, mm					
		E. coli ATCC 10536	*K. pneumoniae* ATCC 10031	*C. albicans* ATCC8 85/653	*S. aureus* ATCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633	*P. aeruginosa* ATCC 27853
Ofloxacin / Nimesulide	Solution in dimethylsulfoxide	24.8 ± 0.21	24.2 ± 0.50	23.4 ± 0.21	24.0 ± 0.20	23.3 ± 0.30	24.5 ± 0.31
	Suspension of PEO-400	22.4 ± 0.11	21.4 ± 0.32	21.3 ± 0.32	22.2 ± 0.32	21.3 ± 0.61	22.5 ± 0.30
	Suspension of glycerol	18.2 ± 0.52	19.1 ± 0.41	18.6 ± 0.21	19.2 ± 0.44	19.2 ± 0.22	19.2 ± 0.40
	The suspension of vaseline oil	20.2 ± 0.34	21.1 ± 0.31	22.2 ± 0.31	20.1 ± 0.22	20.1 ± 0.11	23.6 ± 0.31
Lidocaine	Solution in water	20.1 ± 0.53	19.9 ± 0.21	19.3 ± 0.31	19.5 ± 0.44	19.9 ± 0.62	19.4 ± 0.52
	Solution in dimethylsulfoxide	22.3 ± 0.22	23.0 ± 0.21	22.9 ± 0.21	22.2 ± 0.55	22.2 ± 0.52	22.2 ± 0.62
	Solution to the PEO-400	16.6 ± 0.64	17.2 ± 0.33	18.1 ± 0.21	17.6 ± 0.21	17.3 ± 1.10	19.1 ± 0.75

Proving the choice of temperature regime in the technology of producing the ointment. To research the optimum temperature regime for making of the ointment, the authors examined the impact of the temperature factor on the antimicrobial activity of the ointment. For this purpose, samples of the ointment were studied at the following temperature regimes: 20–30, 30–40 and 40–50 ºC (Table 8). At temperatures of 20–30 and 30–40 ºC the samples manifested approximately identical bactericidal effects on the strains, therefore the optimum temperature regime for introducing active pharmaceutical ingredients to the ointment base is temperatures up to 40 ºC (30–40 ºC).

Further studies on rheological properties of the ointment including ofloxacin, nimesulide and lidocaine (Fig. 5) showed that maximum decomposition of systems occurs at the temperature of 40 ºC. The analysis of the hysteresis loops at different temperatures (Fig. 5 and 6) suggests the conclusion that the studied ointment sample was capable of sufficient thixotropy, which was also indicated by significant areas of hysteresis at the temperatures of 25 and 30 ºC.

The character of the rheograms indicates that an increase in the shear speed causes directly proportional dependency of the stress on the speed of deformation, which also indicates the relationship of the ointment to viscous-flexible bodies with a certain structure. Thus, the *in vitro* method and rheological studies proved that the optimum temperature regime for the technological process equals 25–30 ºC. Therefore, the conclusion can be drawn that the studied system has clearly manifested thixotropic properties, which may be indicated by the significant area between upward and downward curve. The thixotropic properties

of the ointment indicate its sufficient ability to spread and to be extruded from tubes. At high temperatures, on one hand, the decomposition of the system occurs, and, on the other hand, its spreading and extrusion from the tubes becomes easier. To prevent decomposition of the system, the ointment should be maintained at room temperature.

Research on the structural-mechanical properties of the developed ointment. For a fuller and more objective evaluation of the consumer properties of the developed ointment, particularly its ability to spread, we conducted experiments on defining the stress shear within the range of 125–275 s^{-1} speeds, when the ability of an ointment to cover the skin is modeled. A sample of the ointment was put in a graduated cylinder of a viscosimeter, which was thermostatted at a temperature of 34 ºC; then we studied the shear stress at two speeds: 145 and 243 s^{-1}. Each shear speed test was made using a separate covering of the ointment. The indicators of the viscosometer scale were registered 2–3 s after it was turned on and 15 s after the device's operation. The results showed that the spreading capacity of the ointment was satisfactory – the limited rheogram fully fits the area of the optimum for rheology of the distinguished polygon ABVGDEKLM (Fig. 7). Thus, on the basis of the obtained results, the conclusion can be drawn that the studied ointment has sufficient thixotropy, which means that it is capable of dissolving while being spread on the skin, covers the skin well and is capable of extrusion from the tubes; also the consistency of the ointment and ointment base is satisfactory for the shear stress curves fully fit the area of the optimum for hydrophilic ointments.

Table 8
Effect of temperature on the antimicrobial activity of ointment (x ± SE)

Microorganism	Temperature, ºC		
	20–30	30–40	40–50
Candida albicans ATCC8 85/653	20.4 ± 0.51	19.1 ± 0.52	15.9 ± 0.22
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	20.2 ± 0.22	19.0 ± 0.33	16.0 ± 0.41
Escherichia coli ATCC 10536	21.6 ± 0.33	20.3 ± 0.21	18.1 ± 0.32
Bacillus subtilis ATCC 6633	19.6 ± 0.51	19.2 ± 0.42	17.3 ± 0.33
Clostridium perfringens A28 (BP6K)	21.0 ± 0.42	20.1 ± 0.31	16.2 ± 0.22
Staphylococcus aureus ATCC 25923	19.2 ± 0.20	19.6 ± 0.21	15.2 ± 0.50
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	20.1 ± 0.61	20.0 ± 0.52	16.0 ± 0.51
Proteus vulgaris ATCC 4636	20.2 ± 0.50	20.2 ± 0.61	15.0 ± 0.60

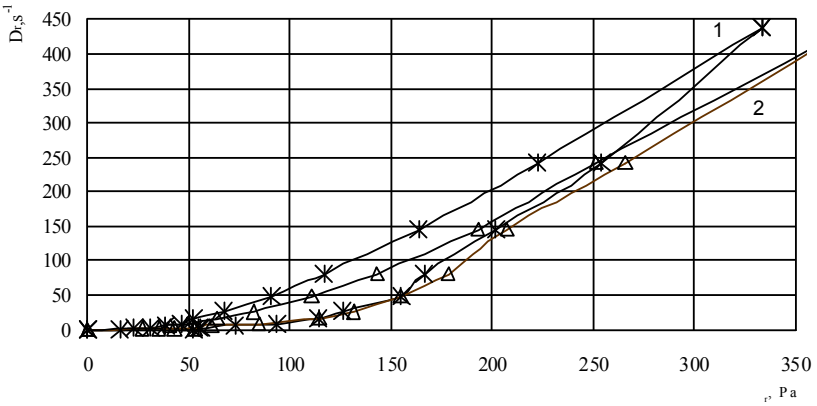


Fig. 5. Rheogram of ointment at different temperatures: 1 – 25 ºC; 2 – 30 ºC

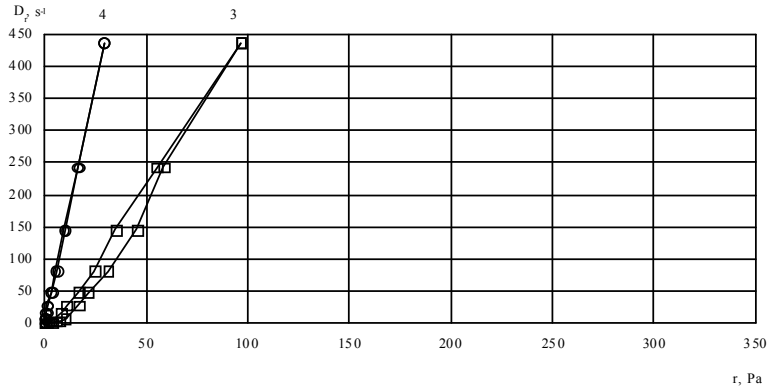


Fig. 6. Rheogram of ointment at different temperatures: 3 – 37 ºC; 4 – 40 ºC

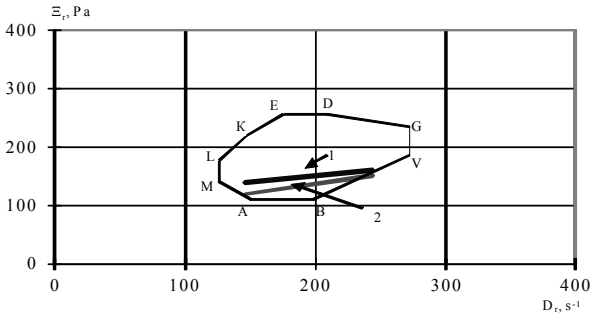


Fig. 7. Area distinguished by rheograms of effect of the ointment at 34 ºC: 1 – after 2–3 s; 2 – after 15 s

Discussion

Proving the composition of the base's compound. Recent biopharmaceutical studies on pharmaceutical preparations of local application have shown that with a well reasoned selection of the base, it is possible to provide a strong and sometimes intensified effect of the medical substances included in the compound. The authors (Rudenko, 2013; Trostrup et al., 2013) introduced new polyethylene-based ointments (combinations of polyethylene oxides with molecular weight of 400 and 1500) into clinical practice. Polyethylene oxides are of low toxicity and express clearly visible osmotic properties (Farooq et al., 2014).

Kadajji and Betageri (2011) and Merkle (2015) emphasize that polyethylene-based combined ointments are highly promising, being different from traditional preparations due, first of all, to their multidirec-

tional effect. In particular, these preparations allow management of the intensity and the direction of the diffusion process after applying the formulation to the wound for differential usage at different stages of the wound process. The authors consider (Owens and Stoessel, 2008; Rüttermann, 2013) that intensified efficiency of the prevention and treatment of the infectious complications in wounds is currently impossible without radically new combined ointments on modern bases, which include highly efficient antibacterial preparations: Levomycetin (Levosin, Levomecol), Dioxydin (5% Dioxydin ointment, Dioxycolum), Nltazolum (Nitacid) (Maisch, 2007; Barajas-Nava et al., 2013). Also, the new ointments include such preparations as trimecaine hydrochloride for providing an anesthetic effect of the ointment and methyluracil, which is capable of anabolic and anti-catabolic activity for stimulating processes of cell regeneration (Atiyeh et al., 2009; Nishio and Suzuki, 2009). In our research, for achieving optimum pharmaceutical effect, particularly antibacterial, anti-inflammatory, and analgesic effects, the compound of the studied ointment included active pharmaceutical ingredients, which are commonly used and which proved to work well in dermatological and surgical practice: ofloxacin, nimesulide, lidocaine (Barajas-Nava et al., 2013; Victorov and Kashuba, 2014).

Analysis of the osmotic properties of model samples of the bases. Maisch (2007) determined the goals of pharmacotherapy in the first phase of the wound process: decreasing inflammatory reactions (skin edemas, transudation, and painfulness), providing antibacterial protection of the wound and cleaning necrotic formations from the wound. Over recent years, we have seen a tendency towards more optimum usage of ointments, considering not only their pharmacotherapy characteristics, but also other indicators: the type of base, pH, dispersity, osmotic properties, etc. The authors (Rudenko et al., 2013; Swarbrick, 2013) described medical-biological requirements to ointments, including osmotic activity. Manifestation of high osmotic activity of anti-inflammatory and antibacterial preparations is considered to provide intense outflow of exudates from the depth of the wound onto the bandage, rejecting and melting of the necrotic tissues and evacuation of the wound contents, and also contributes to dehydration in the inflammatory zone, which causes reduction of edema and accelerates metabolic processes in the tissues (Chauhan et al., 2016; Lindley et al., 2016). They quickly cause osmotic balance, which prevents dehydration of the wound tissues; the ointment base efficiently absorbs the wound content and the active pharmaceutical ingredients penetrate to deep layers of the wound. Osmotic effect lasts for 18 hours, which allows the bandage to be changed only once a day.

In previous studies by Davtian (2009) the osmotic activity of soft pharmaceutical formulations was conditionally divided into low (to 83%), average (to 19%) and clearly manifested osmotic activity (from 240%). Therefore, considering this and the results of our studies, the ointment we have developed is capable of clear osmotic activity. In our case, this was conditioned by the pharmaceutical form and adjuvants.

Reasoning behind the selection of emulsifiers for stabilizing the hydrophilic base. Many studies (Mastropietro et al., 2013; Merkle, 2015) have proved that emulsifiers have a key role in pharmacodynamics of emulsion preparations. Surfactants in soft pharmaceutical forms always positively affect the processes of absorption of active pharmaceutical ingredients, and greatly contribute to manifestation of their activity. A number of studies (Kukhtenko et al., 2012; Rudenko, 2012) have proved that obtaining a stable emulsion with satisfactory consumer indicators and viscous-flexible characteristics is possible at concentration of the oil phase of 20%.

The authors (Mastropietro et al., 2013; Abrantes et al., 2015) have mentioned that the stability and the best viscous-flexible and thixotropic properties of emulsions provide usage of the mixtures of surfactants of the first and the second generations in certain proportions, leaving their total concentration constant (8%). Due to this fact, when selecting emulsifiers for stabilizing the emulsion, we analyzed the dependency of rheological indicators of emulsions on the nature, ratio and the number of emulsifiers of the first and the second generations. For accuracy of the analysis, we changed the nature of the surfactants at their constant total concentration of 8%, and the content of the other components (liquid paraffin – 20%, PEO-1500 – 1%, PEO-400 – 4%, glycerine – 5%, purified water – to 100%). The results of our research have shown that the structural viscosity of the system depends on the concentration of emulsifiers. It should mentioned that the highest viscosity among the combinations of emulsifiers was observed in the model compositions 4 and 6 with concentration of cetostearyl alcohol and monoglyceryl stearate in the ratios 70% / 1%, 5% / 3% respectively. Increase or decrease in the concentrations of emulsifier combinations causes significant increase or decrease in the structural viscosity of the systems. The character of the rheograms indicates that the increase of the shear speed involves occurrence of a directly proportional dependency of shear stress on the deformation speed. This also indicates the relation of the ointment bases to viscous-flexible bodies with a certain structure.

Proving the selection of hydrophilic non-aqueous solvents for the ointment composition. A number of authors (Maitz, 2015; Kiamahalleh et al., 2017) mention glycerine as one of the most common hydrophilic non-aqueous solvents in production of pharmaceutical formulations of local application. It is able to affect the main technological and biopharmaceutical characteristics of a preparation. Also, glycerine is recognized as a classic moisturizing and softening pharmaceutical agent and is capable of being a penetrant and a solubilizer. When it is applied to the skin, this compound absorbs water from the subepidermal layers, forming a hydrogen bond with it. Therefore, it prevents the loss of moisture by keeping the water in the derma. Another significant peculiarity of glycerine is that its molecules structure the extracellular fluid and protect the cells against damage from excessively high osmotic impact. Moreover, glycerine increases transepidermal penetration of water and other substances (Rudenko et al., 2013; Swarbrick, 2013). Like the other hydrophilic non-aqueous solvents, glycerine influences the frost-resistance and osmotic properties of the base, and also the absorption of active pharmaceutical ingredients (Haag and Kratz, 2006).

Introducing glycerine to the compound of the developed pharmaceutical form was mostly conditioned by the necessity to heighten the moisturizing and softening properties of the base. These indicators were the main criteria. Also, the inclusion of glycerine in the proposed composition positively affects the following characteristics of the base: viscosity and other rheological indicators, speed of absorption of active pharmaceutical ingredients; adhesion on application; osmotic properties. It should be mentioned that when using glycerine included in the ointment base, the phase of active osmosis is followed by the phase of "reverse osmosis". This solvent is capable of a penetrating effect, which allows its molecules enter the aqueous environment through the membrane. Due to these properties, glycerine allows the creation of ointment bases with a prolonged but a mild dehydrating effect (Swarbrick, 2013; Sheskey et al., 2017). According to the authors (Rudenko, 2013; Islam et al., 2014), it is recommended that cosmetic and pharmaceutical preparations for external application should include glycerine as an active moisturizing component in the amount of up to 15%. At higher content, surplus glycerine forms a non-drying membrane on the skin. Generally, for providing moisturizing and alleviating properties, glycerine is used in concentrations of 5% or 10% (Cardinal et al., 2009).

Determining the optimum concentration of active pharmaceutical ingredients in the compound of the developed ointment. The data from the literature on the treatment of purulent inflectional skin processes caused by a wide range of bacteria and associations with pathogenic fungi have shown the advantages of using broad-spectrum antibiotics in combinations with non-steroidal anti-inflammatory preparations (Biryukova et al., 2009; Barajas-Nava et al., 2013). Considering the etiopathogenesis of development of purulent-inflammatory processes of the skin, the antibacterial component the authors used was ofloxacin (such choice was based on the practical absence of resistance to it, both natural and obtained, among bacterial associations), and a non-steroidal anti-inflammatory preparation – nimesulide, which is able to inhibit proteolytic enzymes, stabilizes protein structures of cell membranes (Dohmen, 2008; Kopenkin and Talitsky, 2013). Research on using *in vitro* and *in vivo* ofloxacin-nimesulide combinations of active pharmaceutical ingredients in the compound of the studied ointment was conducted by the authors for the first time. Experimental studies determined that under the impact of Oflocain ointment the speed of wound

healing was insignificantly higher that the wound-healing speed among the animals treated with Nimulid gel. It should be mentioned that all tested compositions showed higher anti-alternative activity compared to Oflocain and Nimulid, which showed the speed of wound-healing of 76% and 92% respectively on the 15th day of treatment, whereas the tested combinations achieved full healing on the 11th day of treatment. Thus, we found that combining active substances of antibacterial and anti-inflammatory effect in one pharmaceutical form reduces the concentration of antibacterial preparation at nearly the same indicators of anti-alternative activity compared to the comparative preparation.

The selection of an anesthetic pharmaceutical substance in the compound of the ointment. Contemporary medicine possesses a variety of pharmaceutical formulations for local anesthesia, which are used in different pharmaceutical forms (Atiyeh et al., 2009). The effect of local anesthetics is classified according to its depth, efficiency, duration and reverse anesthetic effect, for only a few of them are widely used in practical medicine. Data from the literature indicates that the anesthetic effect and toxicity of local anesthetics is usually compared to Novocaine, the forefather of this group of preparations; its indicators are considered to equal one (Rüttermann et al., 2013; Sheskey et al., 2017). The conducted experiment showed that with lidocaine concentrations from 1% to 4%, the depth and duration of anesthesia increases and the time of beginning significantly decreases. Further increase in the content of lidocaine (4% to 10%) affects the local anesthetic effect insignificantly.

Determining the impact of the method of introducing the active pharmaceutical ingredients to the ointment compound and their antibacterial effect. A significant feature of modern applicatory pharmaceutical forms is regulation of the speed of provision and concentration of the active pharmaceutical ingredients in the blood circulation system. None of the traditionally used transdermal pharmaceutical forms possesses such property. For this purpose, different methods were used (Davtian, 2009; Maitz, 2015). The regulation of release of active pharmaceutical ingredients from the ointment is suggested to be done either through using different ratios of the bases, or through introduction of dimethyl sulfoxide (Abrantes et al., 2016). Considering the physical-chemical properties of active pharmaceutical ingredients for determining the optimum method of their introduction to the compound of the base, ofloxacin and nimesulide were introduced in a form of a solution in dimethyl sulfoxide, suspension with PEO-400, suspension with glycerine and suspension with liquid paraffin (Biryukova et al., 2009). Lidocaine is easily soluble in water and hydrophilic non-aqueous solutions; therefore it was introduced to the ointment base in the form of solution in water, solution in dimethyl sulfoxide and solution in PEO-400 (Debjit et al., 2012; Chauhan et al., 2016).

The analysis of antibacterial activity of the samples in relation to the method of introducing active pharmaceutical ingredients showed that when ofloxacin and nimesulide were introduced in the form of suspension with glycerine, with PEO-400, and with liquid paraffin, the zone of strain growth inhibition around the wounds did not exceed those present when ofloxacin and nimesulide were introduced in the form of solution in dimethyl sulfoxide and equalled 24.3 ± 0.2, 24.2 ± 0.5, 23.4 ± 0.6, 24.0 ± 0.6, 23.3 ± 0.5 mm for *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* respectively.

Proving the selection of temperature regime for the technology of preparing the ointment. The research we conducted showed that the temperature affects the antibacterial activity of ointment and this proves the statements of particular authors (Davtian, 2009; Swarbrick, 2013). The lowest antibacterial activity in the samples is related to the decomposition of the active pharmaceutical ingredients included in the ointment. The National Pharmacopoeia of Ukraine (Hryzodub et al., 2015) requires all ointments to possess constant rheological characteristics, for the latter reflect both medical and consumer properties of pharmaceutical formulations. This requirement is related to obtaining a pharmaceutical composition with optimum structural-mechanical (rheological) properties in the course of its development, reproducing and maintaining its capacities in the process of technical processing of its components and production of drugs, and also to maintenance and use of pharmaceutical formulations by consumers. The authors (Gullapalli, 2010; Sheskey et al., 2017) mention that this aspect should consider both the interaction of the components and external factors (temperature, method and duration of processing, conditions and time of maintenance, transportation, etc.), which affect the quality of the product. The research we conducted fulfills the requirement of the National Pharmacopoeia of Ukraine.

Analysis of the results (Fig. 5 and 6) showed that all curves were characterized by gradual increase in the deformation speed. Further, the rheograms turn into a straight line; this indicates full decomposition of the structure. As the results suggest, the studied ointment is a non-Newtonian fluid. Its fluidity begins after a certain mechanical pressure is reached, i.e. after increasing kinetic energy of the particles of the structural framework, which leads to rupture of connections among its elements. After increase in the shear speed, the shear curves gradually increase, and further gradually turn into straight lines; this indicates gradual full decomposition of the structure. The developed curves also indicate that their flow does not start rapidly, but after certain applied pressure required for a rupture in the structural elements. Over a period of decreasing stress, the viscosity of the samples gradually recovers. This proves the flexible-viscous and thixotropic properties of the samples. Over the period of shear stress reduction, the previous structure recovers later. On downward and upward rheograms, the curves form "hysteresis loops"; this proves the thixotropy of the studied systems.

Analysis of the structural-mechanical properties of the developed ointment. From a practical perspective, a number of authors (Islam et al., 2014; Isaac et al. 2015) have mentioned that study of such properties of ointment bases as ease of application, extrusion from the tubes is of great importance; these properties are defined by the extent of thixotropy of the studied systems. The obtained results led to the conclusion that the consistency of the ointment base and the ointment itself is satisfactory (Fig. 7). Determining the structural-mechanical properties of the ointment indicate that it is a structured system, possesses thixotropic properties, which provide good consumer (ease and convenience in application) and technological (packaging) properties.

Conclusions

To sum up the accumulated experience in treating wounds and modern knowledge on the wound process and biology of the wound, the conclusion can be drawn that successful prevention and fast treatment of the mentioned pathological condition is possible using a complex method and taking general measures. A significant increase in the effectiveness of treating wound infections could be provided by using the combined ointment developed by the authors. Its composition was scientifically proven in relation to the pathogenesis of the wound process, taking into account its phases and the character of the microflora.

According to the results of microbiological studies (*in vitro*), we selected an optimum concentration of an antibacterial substance – ofloxacin (0.05 g), for the ointment compound and developed an optimum method of introducing active pharmaceutical ingredients to the ointment base (solution in dimethyl sulfoxide).

Pre-clinical studies (*in vivo*) proved that combining active substances of antibacterial and anti-inflammatory effect in one pharmaceutical form reduces the concentration of the antibacterial preparation at nearly the same indicators of anti-alternative activity compared to the comparative preparation.

Physical-chemical studies proved PEO-1500 and PEO-400 (1 : 4) to be the optimum base for the ointment; its osmotic properties eliminate purulent discharge. By forming complexes with antibacterial compounds, PEO-400 provides uniform and prolonged absorption of the exudates. Structural-mechanical research proved the concentration of the mixtures of emulsifiers of the first and the second generations – cetylstearyl alcohol and monoglyceryl stearate in the ratios of 3% and 5% respectively at 20% concentration of oil phase.

The conducted rheological research on the developed preparation proved that it corresponds to the requirements we set. It was proved that the developed preparation's consistency is satisfactory, for the shear stress curves fully fit the range of rheological optimum for hydrophilic ointments. The areas of the rheograms of the ointment's effect are situa-

ted in the zone of rheological optimum, which proves its satisfactory application ability.

It was proved that the temperature factor in the technological process affects the antibacterial properties of the ointment. The obtained results of our biological and biopharmaceutical research on developing a complex ointment for wound treatment could be a basis for clinical studies and introduction to serial industrial production.

References

Abrantes, C. G., Duarte, D., & Reis, C. P. (2016). An overview of pharmaceutical excipients: Safe or not safe. Journal Pharmaceutical Science, 105(7), 2019–2026.

Alves, M. P., Scarrone, A. L., Santos, M., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2007). Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. Pharmaceutical Nanotechnology, 341(1–2), 215–220.

Atiyeh, B. S., Dibo, S. A., & Hayek, S. N. (2009). Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. International Wound Journal, 6(6), 420–430.

Barajas-Nava, L. A., López-Alcalde, J., Solà, I., Roqué i Figuls, M., & Bonfill Cosp, X. (2013). Antibiotic prophylaxis for preventing burn wound infection. Cochrane Database of Systematic Reviews, 6.

Biryukova, S. V., Tarasenko, V. A., Kolokova, A. B., & Davtyan, L. L. (2009). Vyvchennya antymikrobnoyi aktyvnosti kremu ta helyu na osnovi tseftryaksonu ta nimesulidu [Study of the antimicrobial activity of the cream and gel on the basis of ceftriaxone and nimesulide]. Farmatsevtychnyy Chasopys, 9(1), 52–56 (in Ukrainian).

Cardinal, M. M., Eisenbud, D. E., & Armstrong, D. G. (2009). Serial surgical debridement: A retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds. Wound Repair and Regeneration, 17(3), 306–311.

Chan, B. A., Xuan, S., Li, A., Simpson, J. M., Sternhagen, G. L., Yu, T., Darvish, O. A., Naisheng, J., & Zhang, D. (2017). Polypeptid polymers: Synthesis, characterization, and properties. Biopolymers, e23070.

Chauhan, N. P. S., Pathak, A. K., & Bhanat, K. (2016). Encyclopedia of biomedical polymers and polymeric biomaterials. Taylor & Francis, New York.

Davtian, L. L. (2009). Tekhnolohichnyy sposib vvedennya diyuchykh rechovyn do osnovy preparatu [Technological method of introduction of active substances to the basis of the preparation]. Military Medicine of Ukraine, 12(4), 61–63 (in Ukrainian).

Debjit, B., Harish, G., Pragati, K. S., Duraivel, K. P., & Sampath, K. (2012). Recept advances in novel topical drug delivery system. The Pharma Innovation, 1(9), 12–31.

Dohmen, P. M. (2008). Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimize surgical site infections. Journal of Hospital Infection, 70(2), 15–20.

Farooq, U., Rishabh, M., Bansal, V., & Pragati, K. S. (2014). Characterization of some polymers as pharmaceutical excipient. Advances in Biological Research, 8(3), 123–126.

Gullapalli, R. P. (2010). Soft gelatin capsules (softgels). Journal Pharmaceutical Science, 99(10), 4107–4148.

Haag, R., & Kratz, F. (2006). Polymer therapeutics: Concepts and applications. Angewandte Chemie International Edition in English, 45(8), 1198–1215.

Healy, B. M., & Freedman, A. M. (2010). ABC of wound healing infections. British Medical Journal, 332, 838–841.

Hotz, B. V., Visekruna, A. A., Buhr, H. J., & Hotz, H. G. (2010). Beyond epithelial to mesenchymal transition: A novel role for the transcription factor snail in inflammation and wound healing. World Journal of Gastrointestinal Surgery, 14(2), 388–397.

Hryzodub, O. I. (ed.), (2015). Derzhavna farmakopeya Ukrayiny [State pharmacopoeia of Ukraine]. Ukrayins'kiy Naukoviy Farmakopeyniy Tsentr Yakosti Likars'kykh Zasobiv, Kharkiv (in Ukrainian).

Isaac, V. L. B., Chiari-Andreo, B. G., Marto, J. M., Moraes, J. D. D., Leone, B. A., Correa, M. A., & Ribeiro, H. M. (2015). Rheology as a tool to predict the release of alfa-lipoic acid from emulsions used for the prevention of skin aging. BioMed Research International, 2015, 1–8.

Islam, M. T., Rodríguez-Hornedo, N. P., & Ciotti, S. E. (2014). Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. Journal Pharmaceutical Research, 7(21), 1192–1199.

Janis, J. E., & Harrison, B. (2016). Wound healing: part I. Basic science. Plastic and Reconstructuctive Surgery, 138(3), 9–17.

Kadajji, V. G., & Betageri, G. V. (2011). Water soluble polymers for pharmaceutical applications. Polymers, 3(4), 1972–2009.

Kiamahalleh, M. V., Mellati, A., Madani, S. A., Pendleton, P., Zhang, H., & Hadi Madani, S. H. (2017). Smart carriers for controlled drug delivery: Thermosensitive polymers embedded in ordered mesoporous carbon. Journal of Pharmaceutical Science, 106(6), 1545–1562.

Kopenkin, S. S., & Talitsky, K. A. (2013). Mestnoye primeneniye nesteroidnykh protivovospalitel'nykh sredstv v travmatologii i ortopedii [Local use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in traumatology and orthopedics]. Visnyk Ortopedii, Travmatologii i Protezuvannya, 1, 77–80 (in Ukrainian).

Lindley, L. E., Stojadinovic, O., Pastar, I., & Tomic-Canic, M. (2016). Biology and biomarkers for wound healing. Plastic and Reconstructive Surgery, 138(3), 18–28.

Maisch, T. (2007). Anti-microbial photodynamic therapy: Useful in the future. Lasers in Medical Science, 22(2), 83–91.

Maitz, M. F. (2015). Applications of synthetic polymers in clinical medicine. Biosurface and Biotribology, 1(3), 161–176.

Mastropietro, D. J., Nimroozi, R., & Omidian, H. (2013). Rheology in pharmaceutical formulations – A perspective. Journal of Developing Drugs, 2(2), 108.

Merkle, H. P. (2015). Drug delivery's quest for polymers: Where are the frontiers? European Journal Pharmaceutical Biopharmaceutics, 97, 293–303.

Mincer, O. P., Voronenko, Y. V., & Vlasov, V. V. (2003). Obroblennya klinichnykh i eksperymental'nykh danykh u medytsyni [Treatment of clinical and experimental data in medicine]. Vishha Shkola, Kyiv (in Ukrainian).

Nishio, N. S., & Suzuki, I. H. (2009). Antibodies to wounded tissue enhance cutaneous wound healing. Immunology, 128(3), 369–380.

Owens, C. D., & Stoessel, K. P. (2008). Surgical site infections: Epidemiology, microbiology and prevention. Journal of Hospital Infection, 70(2), 3–10.

Puoci, F., Piangiolino, C., Givigliano, F., Parisi, O. I., Cassano, R., Trombino, S., Curcio, M., Iemma, F., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., Restuccia, D., Muzzalupo, R., & Picci, N. (2012). Ciprofloxacin-collagen conjugate in the wound healing treatment. Journal of Functional Biomaterials, 3, 361–371.

Rudenko, V. V., Vlasenko, I. O., & Vashchuk, V. A. (2013). Vyvchennya osmotychnoyi aktyvnosti kombinatsiy hidrofil'nykh nevodnykh rozchynnykiv dly modelyuvannya preparatu, dlya likuvannya I fazy ranovoho protsesu [Study of osmotic activity of combinations of hydrophilic non-aqueous solvents for modeling a drug for treatment of phase I of the wound process]. Pharmaceutical Journal, 1, 46-49 (in Ukrainian).

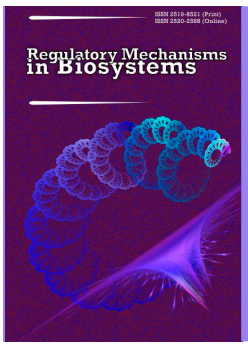
Sheskey, P. J., Cook, W. G., & Cable, C. G. (2017). Handbook of pharmaceutical excipients. APhA/Pharmaceutical Press, London.

Stefanov, O. V. (ed.), (2001). Doklinichni doslidzhennya likars'kih zasobiv [Preclinical studies of medicines]. Avicena, Kyiv (in Ukrainian).

Trostrup, H., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Hoiby, N., & Moser, C. (2013). What is new in the understanding of non-healing wounds epidemiology, pathophysiology and therapies. Ulcers, 2013, ID 625934.

Victorov, O. P., & Kashuba, O. V. (2014). Nimesulid: Otsinymo perspektyvy [Nimesulide: Assessment of the prospects]. Mystetstvo Likuvannya, 5, 20–22 (in Ukrainian).

Vyas, K. S., & Vasconez, H. C. (2014). Wound healing: Biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. Healthcare, 2(3), 356–400.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(4), –
doi: 10.15421/0217

Table of Contents

Mykchaylova, O. B., Bisko, N. A., Sukhomlyn, M. M., Lomberg, M. L., Pasaylyuk, M. V., Petrichuk, Y. V., & Gryganskyi, A. P. Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) on agar media and plant substrates 469

Lapirova, T. B. The reaction of immunophysiological parameters of carp yearlings (*Cyprinus carpio*) to intraperitoneal administration of Arochlore 476

Pavluchenko, O. V., & Yermoshyna, T. V. Parasites of unionid molluscs (Bivalvia, Unionidae) and their effect on the body of molluscs 482

Vlasenko, E. N., Stepnevskaya, J. V., & Kuznetcova, O. V. Influence of mineral substances on the synthesis of volatile organic compounds by *Pleurotus ostreatus* in the process of solid phase cultivation 489

Shevchenko, T. M., Rozhnyeva, I. L., Dyklenko, T. V., & Voronkova, O. S. Comparative characteristics of the composition of microbial associations of the gastrointestinal tract in humans in the norm and during dysbiosis 497

Aminov, R. F., & Frolov, A. K. Proliferative activity of bone marrow cells of rats under the influence of biologically active substances of a medical leech 501

Nuzhyna, N. V., Gaidarzhy, M. M., & Aviekin, Y. V. Species-specific response to acute hyperthermal stress of *Haworthia* (Asphodelaceae) plants 506

Potapenko, Y., Dyomshina, O., & Ushakova, G. The role of mitochondria in the myocardium of senescent *Meriones unguiculates* 512

Fafula, R. V., Meskalo, O. I., Lychkovskyy, E. I., Iefremova, U. P., Onufrovych, O. K., Maksymyuk, H. V., Melnyk, O. V., Nakonechnyi, I. A., Vorobets, D. Z., & Vorobets, Z. D. Effect of hydrogen peroxide on Na^+,K^+-ATPase activity in spermatozoa of infertile men 521

Shevchenko, T. M., Hovorukha, O. Y., Voronkova, Y. S., & Voronkova, O. S. Adhesive properties of film-forming strains of staphylococci, isolated from different compartments of the human gastrointestinal tract 527

Maltsev, Y. I., & Konovalenko, T. V. New finding of green algae with potential for algal biotechnology, *Chlorococcum oleofaciens* and its molecular investigation 532

Sklyar, T. V., Lavrentieva, K. V., Alyonkina, Y. A., Kolomoets, A. M., & Vinnikov, A. I. Resistance of nosocomial strains to antibacterial drugs and its link to biofilm formation 540

Zolotarova, K. O. Improving the quality of life of patients with stable angina pectoris using combined therapy 547

Arzhanov, I. Y., Buniatov, M. R., & Ushakova, G. A. The thyroid status of a conditionally healthy adult population of Prydniprovia 554

Berhilevych, O. M., Kasianchuk, V. V., Kukhtyn, M. D., Lotskin, I. M., Garkavenko, T. O., & Shubin, P. A. Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine 559

Roman'ko, M. Y. Biochemical markers of safety of nano-particles of metals on the model of isolated subcultural fractions of eukaryotes 564

Myhailiuk, V., Mykhailiuk, I., Hembarovskyi, M., Lebid, O., Duda, K., Patskan, L., & Shovkova, N. Hysto-ultrastructure of the facial nerve and mimic muscles in the norm and in the conditions of experimental neuropathy 569

Kozlovska, I. M., Romanjuk, N. Y., Romanjuk, L. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Karpyk, G. V. The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures 577

Miroshnichenko, A. G., Bulgakova, Y. S., Perfiliev, V. Y., & Bazarnova, N. G. Levosalbutamol as alternative to drugs on the basis of racemic salbutamol: Review of the results of pre-clinical research 583

Lavryk, G. S., Korniychuk, O. P., Besedina, A. S., & Vorobets, Z. D. The arginase pathway of L-arginine metabolism of peripheral blood lymphocytes in patients with acne vulgaris 596

Masiuk, D. M., Sosnitsky, O. I., Nedzvetsky, V. S., Kokarev, A. V., & Koliada, S. G. Epidemiology, etiology and gene analysis of spike S protein of porcine epidemic diarrhea virus infection in Ukraine during 2016–2017 602

Bezkrovna, Y. M., Golodok, L. P., & Vinnikov, A. I. Features of the microbiota of the urogenital tract of women with pathological conditions 611

Polishchuk, V. V., Karpuk, L. M., Mykolaiko, V. P., Polishchuk, A. A., & Mykolaiko, I. I. In vitro rhizogenesis of sugar beet microclones 616

Golovakha, V. I., Piddubnyak, O. V., Sliusarenko, S. V., Slivinska, L. G., Maksymovych, I. A., Shcherbatyy, A. R., & Gutyj, B. V. Acid resistance and population structure of erythrocytes in trotter horses during and after exercise 623
Marenkov, O. M., Holovoborodko, K. K., Voronkova, U. S., & Nesterenko, O. S. Impact of ions of zinc and cadmium on body weight, fertility and condition of the tissues and organs of *Procambarus virginalis* (Decapoda, Cambaridae) 628
Shcherbyna, V. V., Maltseva, I. A., Maltsev, Y. I., & Solonenko, A. N. Post-pyrogenic changes in vegetation cover and biological soil crust in steppe ecosystems 633
Averyanova, I. V., Maksimov, A. L., & Vdovenko, S. I. Morphofunctional indicators demonstrated by young students resident in Russia's Northeast 639
Perfil'ev, V. Y., Zverev, Y. F., Perfil'eva, D. Y., Lysenko, I. V., & Miroshnichenko, A. G. Metformin reduces urate nephropathy in experimental nephrolithiasis 644
Gavrylin, P. M., & Nikitina, M. O. Morphometric parameters of the intestine and aggregated lymphatic nodules of meat rabbits 649
Ali, K., Khan, S., Khan, N., Khan, W., Rahman, I. U., Ullah, F., Ali, K., & Nisar, M. Ethnobotanical and ecological study of *Punica granatum* in Dir district, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan 656
Tarasenko, V. O., Shmatenko, V. V., Kuchmistov, V. O., Koziko, N. O., Shmatenko, O. P., Drozdova, A. O., Rudenko, V. V., & Nehoda, T. S. Pharmaceutical development of complex wound-healing ointment for the needs of military medicine 662