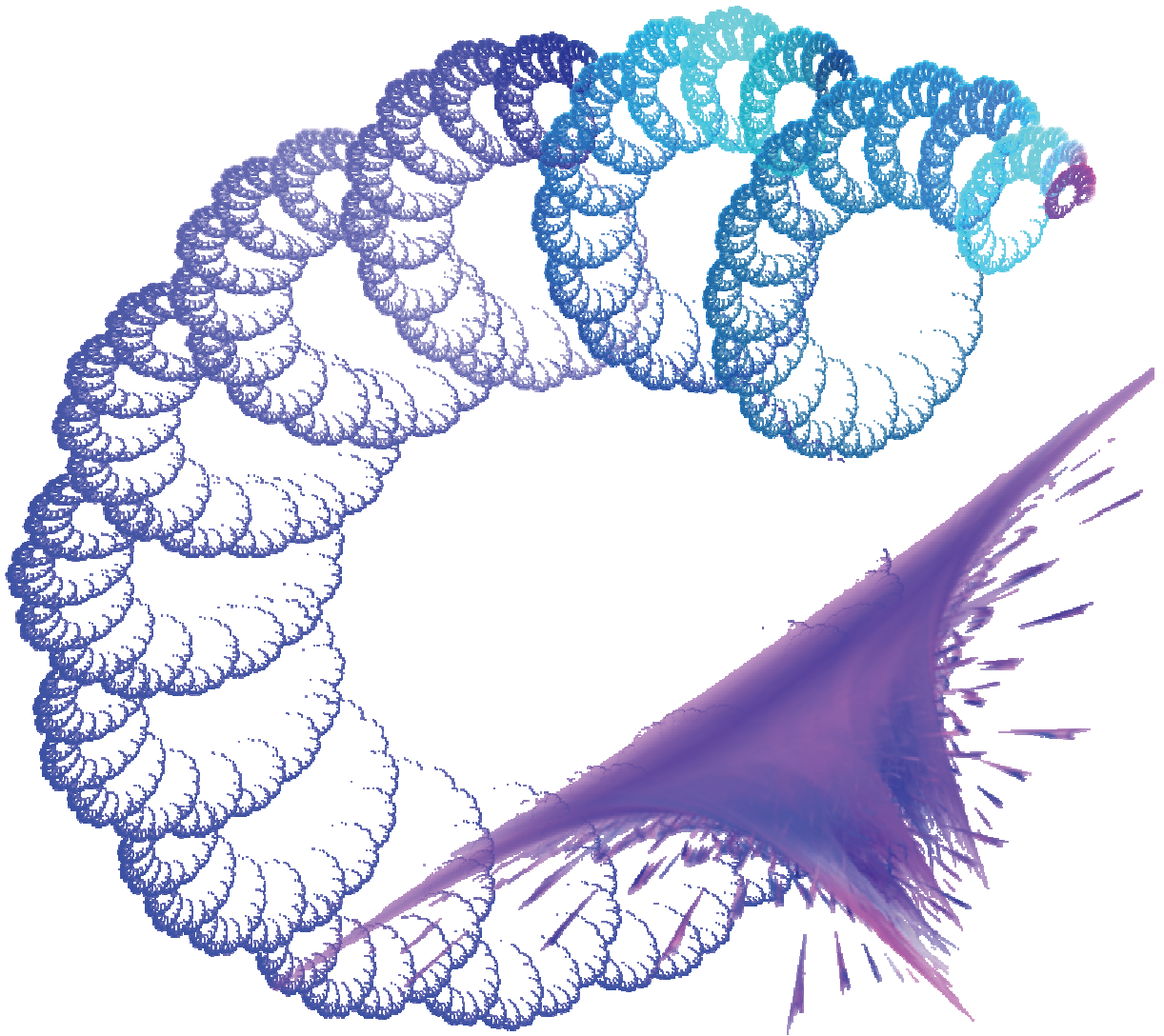


ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Regulatory Mechanisms in Biosystems



Volume 9(2)



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

Deputy Editors:

Prof. I. M. Bondarenko, D. Sc., Department of Oncology,
Dnipro State Medical Academy, Dnipro, Ukraine;

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

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

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

Executive Editor:

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

Editorial Board:

As. Prof. A. Amnattallah, Ph. D., Department of Veterinary Pathology,
Islamic Azad University, Urmia Branch, Iran;

As. Prof. W. Barg, D. Sc., Department of Physiology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland;

Prof. N. M. Bilko, D. Sc., Department Laboratory of Diagnostics of Biological Systems,
National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine;

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

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

Prof. P. Dite, D. Sc., Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic;

Prof. O. I. Fediv, D. Sc., Department of Internal Medicine,
Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine;

Prof. O. V. Fedonenko, D. Sc., Department of General Biology and Aquatic Bioresources,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

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

Prof. P. M. Gavrilin, D. Sc., Department of Normal and Pathological Anatomy of Agricultural
Animals, Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine;

As. Prof. O. G. Gavrilina, Ph. D., Department of Parasitology, Veterinary and Sanitary Expertise,
Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine;

Prof. T. S. Golovko, D. Sc., Research Department of Radiodiagnostics,
National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine;

Prof. B. Gutji, D. Sc., Department of Pharmacology and Toxicology,
Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine;

As. Prof. A. P. Harrison, Faculty of Health and Medical Science,
Copenhagen University, Copenhagen, Danish;

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

Prof. M. Itabashi, Ph. D., Pathology and Cytology Center, LSI Medience Corporation,
International University of Health and Welfare, Mita Hospital, Tokyo, Japan;

As. Prof. T. Kendzerska, Ph. D., Division of Respiriology, University of Ottawa, Ottawa, Canada;

As. Prof. N. O. Kikodze, Ph. D., Department of Immunology,
Tbilisi State Medical University, Tbilisi, Georgia;

Prof. V. Kováč, D. Sc., Department of Ecology, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic;

As. Prof. V. Krashevskaya, Ph. D., J. F. Blumenbach Institute of Zoology and Anthropology,
University of Göttingen, Göttingen, Germany;

As. Prof. S. V. Kyrychenko, Ph. D., Department of Biophysics and Biochemistry,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

Prof. M. Leja, D. Sc., Scientific Department, Riga Eastern Clinical University Hospital, Riga, Latvia;

Prof. O. Y. Loskutov, D. Sc., Department of Traumatology and Orthopaedics,
Dnipro State Medical Academy, Dnipro, Ukraine;

As. Prof. I. A. Lupasco, D. Sc., State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemitanu",
Chişinău, Republica Moldova;

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

Prof. Y. V. Lykholat, D. Sc., Department of Physiology and Introduction of Plants,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

As. Prof. O. M. Marenkov, Ph. D., Department of General Biology and Aquatic Bioresources,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

Prof. V. O. Moysyenko, D. Sc., Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine;

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

Prof. J. Paidere, D. Sc., Department of Ecology, Daugavpils University, Daugavpils, Latvia;

Prof. T. O. Pertseva, D. Sc., Dnipro Medical Academy, Dnipro, Ukraine;

Prof. S. I. Pimanov, D. Sc., Department of Therapy, Vitebsk State Medical University,
Vitebsk, Republic of Belarus;

Prof. T. M. Satarova, D. Sc., Biotechnology Laboratory, Institute of Grain Cultures, Dnipro, Ukraine;

Prof. O. V. Severynska, D. Sc., Department of Human and Animal Physiology,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

Prof. O. P. Sharmazanova, D. Sc., Department of Diagnostic Radiology,
Kharkiv Medical Academy of Post-Graduate Education, Kharkiv, Ukraine;

Prof. M. B. Shcherbynina, D. Sc., Faculty of Medical Technologies of Diagnostics and Rehabilitation,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

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

Senior Research A. P. Shoko, Ph. D., Tanzania Fisheries Research Institute, Dar es Salaam, Tanzania;

Prof. Y. V. Shiparyk, D. Sc., Chemotherapy Department,
Lviv State Oncological Regional Treatment and Diagnostic Center, Lviv, Ukraine;

As. Prof. S. Smetana, Ph. D., Food Data Group,
German Institute of Food Technologies, Quakenbrück, Germany;

Prof. A. F. Tabaran, Ph. D., Masonic Cancer Center, University of Minnesota, Minneapolis, USA;

As. Prof. V. Tamutis, Ph. D., Faculty Agronomy, Aleksandras Stulginskis University, Kaunas, Lithuania;

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

M. O. Tikhomyrov, Translation Department, National Technical University Dnipro Polytechnic,
Dnipro, Ukraine;

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

As. Prof. O. S. Voronkova, Ph. D., Department of Clinical and Laboratory Diagnostics,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

As. Prof. N. B. Yesipova, Ph. D., Department of General Biology and Aquatic Bioresources,
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine;

Prof. G. V. Zolape, D. Sc., Departments of Zoology, Shivaji University, Kolhapur, India.

Literary Editors: P. W. Bradbeer, M. O. Tikhomyrov. **Cover Design:** A. O. Hushytsyi, 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



The effects of melatonin on the activity of the c-fos gene in the structures of the hypothalamic paraventricular nucleus under prolonged lighting

R. Y. Bulyk*, A. V. Abramov**, T. S. Bulyk*, M. I. Kryvchanska*, K. V. Vlasova*

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

**Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, Ukraine

Article info

Received 24.02.2018

Received in revised form
14.03.2018

Accepted 17.03.2018

Bukovinian State Medical
University, Theatralna sq., 2,
Chernivtsi, 58002, Ukraine.
Tel.: +38-037-255-37-54.
E-mail: bulyk@bsmu.edu.ua

Zaporizhzhya State Medical
University, Mayakovsky ave., 26,
Zaporizhzhya, 69035, Ukraine.
Tel.: +38-061-224-63-91.

Bulyk, R. Y., Abramov, A. V., Bulyk, T. S., Kryvchanska, M. I., & Vlasova, K. V. (2018). The effects of melatonin on the activity of the c-fos gene in the structures of the hypothalamic paraventricular nucleus under prolonged lighting. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 131–134. doi:10.15421/021819

The effect of constant illumination as a stress factor on the state of the "early response" c-fos gene in the lateral magnocellular subnuclei of the paraventricular nucleus (ImPVN) of the hypothalamus of rats at different time intervals (day and night) has been studied. To identify c-Fos in histological sections of the hypothalamus, a secondary (indirect) immunofluorescence method is used. Expression of the product of this gene, the c-Fos protein, in animals kept under normal conditions of alternation of illumination and darkness, shows a clear-cut circadian character. There was a significant decrease in the area of the immunopositive sites of structures at night by 19.4% compared to daytime measurements. The average values of the areas of such immunopositive subnuclei sites varied also in subgroups of rats under light stimulation conditions, in which samples of ImPVN were selected for study at 2 pm and 2 am, but the differences between groups did not reach the level of reliability. Under conditions of light stress, the c-Fos concentration index decreased by 29.4% during the day, and by 16.5% at night in relation to similar values in the intact group. In animals that were in the standard light mode, the c-Fos protein concentration index was significantly higher during the day than at night. In the intact group, the night value of the c-Fos concentration index averaged only 71.5% of the daily value. In rats subjected to constant illumination, the day and night values of the c-Fos concentration index did not differ reliably. To correct stress-induced changes in the activity of the "early response" c-fos gene in the rat hypothalamus, melatonin (0.5 mg/kg body weight of the animal) was used. Injections of melatonin to rats exposed to constant illumination normalized the circadian rhythm of the area of the material immunoreactive to c-Fos, compared to the group of animals that did not receive melatonin. When using melatonin against the background of constant illumination, a sharp increase of the protein concentration in the ImPVN subnuclei of hypothalamus in daytime and less pronounced at night intervals was detected. Injections of melatonin to animals were also reflected in the daily dynamics of the index of c-Fos protein content in the ImPVN subnuclei under conditions of constant illumination. In the daytime observation period, the index was almost twice the experimental data on stressed animals without the introduction of the hormone, bringing it closer to normal. Prospects for further research in this sphere will allow us to better understand the place and role of subnuclei of paraventricular nuclei of the hypothalamus in the mechanisms of the formation of circadian rhythms of the rat brain.

Keywords: lateral magnocellular subnuclei; gene expression; c-Fos protein; photoperiod

Introduction

Within a wide range of environmental parameters, the photoperiod is the most reliable and stable synchronizing factor for homeothermic animals, including humans (Abreu & Bragança, 2015; Lacoste et al., 2015; Arushanyan & Shchetinin, 2016). Changes in the duration of the main timer, photoperiod, as a stress factor, desynchronize the rhythms of somatic and visceral functions (Houdek & Sumová, 2014; Bedont & Blackshaw, 2015; Wang et al., 2015), as well as coordination and modulation of the mechanisms of adaptation of the organism to the influence of various factors (Kobayashi et al., 2015; Kozaki et al., 2015). The pineal gland is actively involved in the stress response, being responsible for triggering a stress reaction and ensures adaptation of the body to changing environmental conditions (Zamorskiy et al., 2012; Erren & Reiter, 2015).

One of the important links of the neuroendocrine system of the hypothalamus is the paraventricular nucleus (PVN) (Toshinai et al., 2014; Bains et al., 2015). These structures are the vegetative centers of

coordination of functions and consist of a number of neuronal populations, subnuclei, which differ in structural-functional features and the nature of the neural connections with various parts of the nervous and neuroendocrine systems (Miklos et al., 2014; Bedont et al., 2015). Disruptions of the light regime (prolonged illumination, constant darkness) cause immediate changes in the expression of the c-fos gene in the PVN. The increase of its expression intensifies the synthesis of the corresponding immunospecific protein, c-Fos (Tymofii et al., 2015). This peptide participates in the mechanisms of synchronization of this activity with external cyclic influences, including circadian ones, associated with alternation of light and darkness (Reiter et al., 2014; Robinson & Reddy, 2014).

When studying stress reactions and the action of stress-limiting factors (in particular, the hormone of the pineal gland, melatonin), studies of these subpopulations of neurons of the hypothalamus, PVN, are especially important. It is of interest to define the influence of the light stressor on the state of these subnuclei of PVN. It is important to study the changes in morphofunctional activity and the level of

expression of the c-fos early-response gene in structures, and also to analyze the possibilities of increasing the adaptation of neurosecretory cells to the damaging effect of constant illumination as a stress factor. At the same time, the information on the effect of melatonin on the activity of these subpopulations of neurons of the hypothalamic PVN under different illumination conditions remains relatively limited.

The aim of the study was to evaluate the effect of constant illumination on the state of the early functional activity gene, c-fos, in the lateral magnocellular subnuclei of the paraventricular nucleus (ImPVN) of the rat hypothalamus at different time intervals and to analyze the change in the activity of this gene when melatonin is applied against the background of the light stressor.

Material and methods

Experiments were carried out on 48 mature male outbred white rats weighing 0.15–0.18 kg. The animals were kept in standard animal facility conditions at a constant temperature and humidity and free access to water and food. The experimental rats were divided into four groups, each of which, in turn, consisted of two subgroups (six animals each).

The animals of the first group (intact) were kept for seven days in the conditions of the usual light regime (light-dark for 12 hours, illumination from 8 am to 8 pm with fluorescent lamps, the illumination level in cages with animals was 500 lux). Rats of the second group were kept for seven days in conditions of constant illumination of similar intensity (induction of the hypofunction of the pineal gland). The animals of No. 3 series (control) were under the same experimental conditions as the rats of No. 1 series, but 1.0 ml of the solvent (0.9% ethanol solution in normal saline) was injected intraperitoneally daily at 19.00. The animals of series 4 were under experimental conditions, as were the rats of series 2. Melatonin was injected intraperitoneally at 19.00 (Sigma, USA, purification rate – 99.5%) at a dose of 0.5 mg/kg, in 1.0 ml of solvent (0.9% solution of ethanol in normal saline).

On the eighth day at 2 pm and 2 am the animals were taken out of the experiment, and subjected to instant decapitation under Nembutal anesthesia (40.0 mg/kg, ip). The animal's brain was immediately withdrawn and placed in a 10% phosphate-buffered formalin solution (0.1 M, pH 7.2) for 20 hours at room temperature. After a standard procedure of dehydration and impregnation with chloroform and paraffin, the samples were poured into paraffin. All stages of the experiment were carried out in compliance with the basic requirements of the European Convention on Humane Treatment of Animals.

To identify c-Fos, a secondary (indirect) immunofluorescence method was used in the histological sections of the hypothalamus. Sections of 14 μ m in thickness were first dewaxed in xylene, then rehydrated in ethanol solutions of six descending concentrations (100–40%) and washed three times for 10 min in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2).

As primary antibodies, rabbit polyclonal antibodies (immunoglobulin-IGG) to c-Fos ("Sigma-Aldrich", USA) were used. First, the sections were incubated for 45 minutes at 37 °C in 0.3% Triton X-100 ("Sigma-Aldrich", USA) on 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) with the addition of 1% goat serum. Then, primary antibodies to c-Fos (1:1000) were applied to successive serial sections and incubated for 24 hours in a humid box at a reduced temperature (4 °C). After washing the excess primary antibodies in 0.1 M phosphate buffer, the sections were incubated for 60 min at 37 °C with secondary antibodies at 1 : 200 dilution. As secondary antibodies, goat gamma globulin was used which is a rabbit globulin antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, "Sigma-Aldrich", USA). After incubation, the sections were washed with phosphate buffer (0.1 M) and placed in a mixture of glycerol and phosphate buffer (9 : 1) for further investigation by luminescence microscopy. Control of antibody binding specificity was carried out in a similar manner, except for the incubation step with the primary antibodies to c-Fos.

Identification of c-Fos in neurons of the hypothalamus and determination of the content of this protein was carried out using VIDAS-386, the computer-aided digital image analysis system ("Kontron Elektronik", Germany) in the ultraviolet spectrum. To produce a fluorescent image, a high-viscous filter with excitation and emission bands of 370–

390 and 420–450 nm, respectively, and a specialized lens with a wide aperture were used. Images made by using COHU-4922, an 8-bit CCD camera ("COHU Inc.", USA) were introduced into a computer image analysis system VIDAS-386. In this case, the effect of "burnout" of the drug, associated with the gradual destruction of FITC molecules under the influence of prolonged ultraviolet irradiation, is impossible. The introduced immunofluorescence image was digitized on a densitometric scale with 256 shades of grey. Image analysis was carried out in an automatic mode using VIDAS-2.5, the application software package ("Kontron Elektronik", Germany). Areas of samples in which the fluorescence intensity significantly exceeded the background values (inherent in the so-called nonspecific fluorescence), were identified. The area of these sections and the total cross-sectional area of the subnuclei of the PVN neurons containing the immunopositive material were measured (S_i and S_n , respectively, μm^2). Taking into account the fluorescence intensity in the immunopositive areas and the fluorescence intensity of the background (D_i and D_0), the indices characterizing the concentration of c-Fos and the content of this protein in the nuclei of immunopositive cells were calculated: $K_i = \lg(D_i/D_0)$ and $C_i = K_i \cdot S_i$ (conventional units – c.u.), respectively. Since these indices are relative, rather than absolute values, we will further refer to them as indices of concentration and content of c-Fos in immunopositive cells.

The topographic affiliation of the immunopositive neurons to the individual structures of the hypothalamus was mapped according to the stereotactic atlas of the rat brain.

The obtained experimental data was processed using a package of applied and statistical program VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Germany). For the samples of all indices, the mean, standard deviation and average error were calculated. Samples of immunopositive cells of ImPVN, in which S_i and S_n were measured, and the values of K_i and C_i in various groups of experimental animals were calculated, consisted of 120–153 units.

In addition, we calculated the localization density of c-Fos-immunopositive neurons within the investigated sections of the given nucleus. For this, the number of such cells was preliminarily determined in several (four to seven for each animal) randomly chosen fields of vision, and the average number of similar neurons per 1 mm^2 of the cut area was calculated. The normality verification of the distribution of samples was carried out using the Shapiro-Wilk criterion. Since the distribution of most samples was not normal, the probability of differences in the values in the research and control groups of animals was determined at a significance level of $P = 0.05$ according to the Wilcoxon-Mann-Whitney U-criterion.

Results

By identifying the product of the expression of the "early response" gene c-fos by the immunofluorescence method in the lateral magnocellular subnuclei of the paraventricular nucleus (ImPVN) of the hypothalamus of intact animals, a significant decrease in the area of immunopositive sites of the structures at night was detected by 19.4% ($P < 0.05$) compared to daytime values. The mean values of the areas of such immunopositive subnuclei sites varied somewhat and in subgroups of rats that were under light stimulation conditions, in which ImPVN samples were taken for study at 2 pm and 2 am, but the intergroup differences did not reach the level of probability (Table 1).

Averaged over the entire group (without taking into account the time of day), the cross-sectional area of the subnuclei neurons of ImPVN in the animals modeled for epiphyseal hypofunction was significantly higher than the corresponding values in the intact group. The circadian dynamics of variations in the cross-sectional area of subnuclei was also different. In intact rats, the area at 2 am was 11.1% less than at 2 pm. In a group of animals that were in constant light, the average cross-sectional area of the subnuclei at night and day was almost the same. In the process of pairwise comparison of the corresponding values measured in different series at 2 pm, it was found that the area of the subnuclei in light-stressed rats almost coincides with what was observed under physiological conditions. Analyzing the values in the samples taken at night, with hypofunction of the pineal gland, the indices are significantly

larger (by 9.3%), in comparison with the intact group (Table 2). Simulation of epiphyseal hypofunction significantly influenced the concentration of c-Fos protein in subnuclei of neurons of ImPVN. Under conditions of light stress, the c-Fos concentration index decreased by 29.4% during the day, and by 16.5% at night in relation to similar values in the intact group. In animals under the conditions of the standard light regi-

me, the index of protein concentration c-Fos during the day was significantly higher ($P < 0.01$) than the analogous value at night. In the intact group, the night value of the c-Fos concentration index averaged only 71.5% of the daily value. In rats subjected to constant illumination, the day and night values of the c-Fos concentration index did not differ reliably (Table 1).

Table 1

Characterization of cFos-immunopositive neurons in the lateral magnocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus of rats for different durations of the photoperiod and administration of melatonin ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$)

Animals series	Material immunoreactive to c-Fos, μm^2	c-Fos protein concentration in neuron, U_{if}	c-Fos protein content in neuron, U_{if}	Size of c-Fos – immunopositive neurons, mm^2	Total content of c-Fos protein in the structure, U_{if}/mm^2
Intact, 2 pm	130.9 $\pm$ 24.3	0.30 $\pm$ 0.05	44.4 $\pm$ 12.5	190 $\pm$ 39	8436 $\pm$ 1731
Intact, 2 am	105.5 $\pm$ 12.2*	0.24 $\pm$ 0.03*	24.7 $\pm$ 3.9*	204 $\pm$ 27	5029 $\pm$ 665
Constant illumination, 2 pm	129.3 $\pm$ 25.6	0.23 $\pm$ 0.05*	29.7 $\pm$ 8.6*	127 $\pm$ 23	3775 $\pm$ 684*
Constant illumination, 2 am	124.3 $\pm$ 18.8	0.20 $\pm$ 0.03*	23.4 $\pm$ 3.4	120 $\pm$ 25*	2811 $\pm$ 586*
Constant illumination + melatonin, 2 pm	124.5 $\pm$ 29.4	0.47 $\pm$ 0.05 [#]	57.1 $\pm$ 13.7 [#]	120 $\pm$ 22	6854 $\pm$ 1257 [#]
Constant illumination + melatonin, 2 am	111.6 $\pm$ 38.9	0.28 $\pm$ 0.03 ^{#, **}	31.0 $\pm$ 10.5**	132 $\pm$ 12	4087 $\pm$ 372

Note: * – probable changes in the parameters of intact animals group of the same time interval at the level of $P < 0.05$; ** – regarding the parameters of the animals of the previous time interval within the series at the level $P < 0.05$; [#] – for animals exposed to constant illumination at a level of $P < 0.05$.

Table 2

Effect of light stress on the neuron area of the lateral magnocellular subnuclei of the paraventricular nucleus (ImPVN) in rats ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$)

Experimental animals series	Neuron area, μm^2
Intact, 2 pm	91.1 $\pm$ 3.2
Intact, 2 am	81.0 $\pm$ 4.9**
Constant illumination, 2 pm	88.7 $\pm$ 3.4
Constant illumination, 2 am	88.5 $\pm$ 3.9*

Notes: * – difference from intact animals group of the same time interval at the level $P < 0.05$; ** – difference from intact group animals of the previous time interval within the series at the level $P < 0.05$.

Under these experimental conditions, the index of the c-Fos protein content in the subnuclei of neurons of ImPVN in the intact group at 2 am was significantly less (by 44.5%, $P < 0.01$) than in the day. In individuals under conditions of light stress, the daily index of the c-Fos content was 33.0% lower than that in the intact group, and the night value was close to the value in this comparison group. The diurnal dynamics of this parameter turned out to be similar, however, there was no significant difference between day and night levels in the series of light-stressed animals.

As to the integrated density of the material immunoreactive to c-Fos in ImPVN tissue, this parameter varied from 120 to 204 neurons per $1 mm^2$ of the cut-off area in the subgroups studied. Note that in the intact rats, large values of the localization density of c-Fos-positive neurons in ImPVN were observed at night, and in the group of animals under hyperillumination, the circadian dynamics of this index acquired the reverse character: the density was large in the afternoon. While determining the density of these neurons, we have not established intergroup differences in the experimental series (Table 1).

An important effect on the index of c-Fos integrated density in the ImPVN tissue of the hypothalamus was the changes in the concentration of this protein and the index of its content in the subnuclei of neurons. The index of c-Fos total protein density in rats exposed to light stimulation was 55.3% lower in the afternoon and 44.1% lower at night than the same value in the intact group.

Injections to rats under standard light conditions, of a solvent (1.0 ml of a 0.9% solution of ethanol in normal saline) for seven days, did not significantly change the characteristics of c-Fos-immunopositive neurons in the ImPVN of hypothalamus. Therefore, the experimental data obtained in the next stages of the study will be compared with the parameters of the activity of the "early response" c-fos gene activity and the product of its expression, the c-Fos protein of intact animals.

Injections of melatonin (0.5 mg/kg body weight of the animal) to rats subjected to constant illumination normalized the circadian rhythm of the area of the material immunoreactive to c-Fos compared to the group of animals to which melatonin was not administered. When melatonin was used against a background of constant illumination, the

hormone led to a sharp increase ($0.47 \pm 0.05 U_{if}$) of protein concentration in the ImPVN subnuclei of the hypothalamus in the daytime and less pronounced ($0.28 \pm 0.03 U_{if}$) at night. Injections of melatonin to animals were also reflected in the daily dynamics of the index of protein content of c-Fos in the ImPVN subnuclei under the conditions of hypofunction of the pineal gland. So, at 2 pm the index almost twice exceeded the experimental data on stressed animals without the introduction of the hormone, bringing it closer to normal. In addition, it was significantly higher compared with that in sections taken at 2 am (Table 1).

The injection of the hormone to animals with epiphyseal hypofunction restored the daily rhythm of the integrated density of the material immunoreactive to c-Fos, but at 2 pm it caused a decrease (by 5.5%), and at 2 am a moderate increase (by 10.0%) compared to the stressed animals without correction. The calculation of the index of total density of c-Fos in the ImPVN subnuclei of the hypothalamus showed that during the weekly administration of melatonin in daytime, the indicator was $6854 \pm 1257 U_{if}/mm^2$, and at night $4087 \pm 372 U_{if}/mm^2$. Thus melatonin on a background of constant illumination restored indices both at 2 pm and 2 am relative to these indices in intact animals (Table 1).

Taking into account the results of the daily expression of the c-fos gene of the early functional activity in the ImPVN of the hypothalamus, we note its probable growth in the daytime. In individuals under conditions of light stress, the daily index of the c-Fos content was 33.0% lower, and at night it approached the control values of the recorded diurnal dynamics. Injections of melatonin (0.5 mg/kg body weight) to light-sensitive animals affected the diurnal dynamics of the index of c-Fos protein content in ImPVN subnuclei of the hypothalamus. In particular, at 2 pm the index was approaching the norm. In addition, it was significantly higher in comparison with that in the sections taken at 2 am.

Discussion

The leading structure, the pacemaker of circadian periodicity in mammals, is the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, and the role of the main neuroendocrine mediator in providing circadian periodicity is assigned to the pineal gland (epiphysis of the brain) (Zamorskiy et al., 2012; Abreu & Bragança, 2015; Erren & Reiter, 2015; Lacoste et al., 2015; Arushanyan & Shchetinin, 2016). Through the retino-hypothalamic tract, the SCN receives information on the level of external illumination. Fluctuations of this level, perceived by the photoreceptors of the retina, are the main timer for the "biological clock" of the SCN (Robinson & Reddy, 2014; Bedont & Blackshaw, 2015; Wang et al., 2015). Paraventricular nuclei of the hypothalamus are also involved in the formation of the temporal organization of physiological functions. As is known, these structures have complex cellular organization and include magnocellular and parvocellular subnuclei, whose neurons differ not only in size and efferent innervation but also in the spectrum of synthesized neuropeptides (Flak et al., 2014;

Fan et al., 2016; Franco et al., 2016; Chun et al., 2017). These features determine the important role of PVN not only in the endocrine regulation of the trophic functions of the adenohypophysis, but also in the realization of the neuroendocrine response of the body to stress of various genesis, including prolonged illumination (Daubert et al., 2014; Herman et al., 2016; Miyake et al., 2016; Ordyan et al., 2016).

Analysis of the data obtained in this study indicates a clear circadian character of the expression of the product of the "early response" gene of the *c-fos*, *c-Fos* protein in animals kept under normal conditions of alternation of illumination and darkness. Taking into account the results of the daily expression of the gene of the early functional activity of *c-fos* in the hypothalamus *ImPVN*, its probable growth in the daytime should be noted. In animals exposed to light stress, the daily index of the *c-Fos* content was 33.0% lower, and in the night time it was approaching the control values of the registered diurnal dynamics. Injections of melatonin (0.5 mg/kg of mass) to light-stressed animals reflected on the daily dynamics of the studied parameters, including the index of *c-Fos* protein content in the subnucleus of the hypothalamus *ImPVN*. In particular, at 2 pm the index was approaching the norm. In addition, it was significantly higher and in comparison with that in the sections taken at 2 am.

Changes in the geometric dimensions of cells and intracellular organelles are probably a very important phenomenon, which has not yet attracted due attention. As for the changes in the size of the nuclei of neurons, the most likely common cause of this can be considered changes in the intensity of protein synthesis, that is, the intensity of expression of certain genes in the nucleus. Obviously, specific mechanisms of dependence of nuclear sizes on intranuclear processes will be the subject of special studies.

Conclusion

Expression of the product of the "early response" *c-fos* gene, *c-Fos* protein in animals kept under normal conditions of alternation of illumination and darkness, showed a clear circadian character. A significant decrease of 19.4% in the area of the immunopositive sites of structures was found at night compared to daytime measurements. In individuals under conditions of light stress, the daily index of the *c-Fos* content was 33.0% lower, and at night it approached the control values. Injections of melatonin (0.5 mg/kg body weight) to stress-sensitive animals were reflected at 2 pm by exceeding the index of *c-Fos* protein content in the *ImPVN* subnuclei almost twice as compared to the experimental data on stressed animals without hormone administration. At the same time, the trend towards normalization of the circadian dynamics of the gene expression was revealed.

Prospects for further research in this area will allow us to better understand the place and role of the subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the mechanisms of the formation of circadian rhythms of the mammals' brain.

References

- Abreu, T., & Bragança, M. (2015). The bipolarity of light and dark: A review on bipolar disorder and circadian cycles. *Journal of Affective Disorders*, 185, 219–229.
- Arushanyan, E. B., & Shchetinin, E. V. (2016). Melatonin kak universal'nyy modulyator lyubykh patologicheskikh protsessov [Melatonin as a universal modulator of any pathological processes]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*, 60(1), 79–88 (in Russian).
- Bains, J. S., Wamsteeker Cusulin, J. I., & Inoue, W. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(7), 377–388.
- Bedont, J. L., & Blackshaw, S. (2015). Constructing the suprachiasmatic nucleus: A watchmaker's perspective on the central clockworks. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, 74.
- Bedont, J. L., Newman, E. A., & Blackshaw, S. (2015). Patterning, specification, and differentiation in the developing hypothalamus. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 4(5), 445–468.
- Chun, L. E., Christensen, J., Woodruff, E. R., Morton, S. J., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2017). Adrenal-dependent and independent stress-induced *Per1* mRNA in hypothalamic paraventricular nucleus and prefrontal cortex of male and female rats. *Stress*, 22, 1–15.
- Daubert, D. L., Looney, B. M., Clifton, R. R., Cho, J. N., & Scheuer, D. A. (2014). Elevated corticosterone in the dorsal hindbrain increases plasma norepinephrine and neuropeptide Y, and recruits a vasopressin response to stress. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(2), R212–224.
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin: A universal time messenger. *Neuroendocrinology Letters*, 36(3), 187–192.
- Fan, S., Dakshinamoorthy, J., Kim, E. R., Xu, Y., Huang, C., & Tong, Q. (2016). An indirect action contributes to *c-fos* induction in paraventricular hypothalamic nucleus by neuropeptide Y. *Scientific Reports*, 6, 19980.
- Flak, J. N., Myers, B., Solomon, M. B., McKlveen, J. M., Krause, E. G., & Herman, J. P. (2014). Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress. *European Journal of Neuroscience*, 39(11), 1903–1911.
- Franco, A. J., Chen, C., Scullen, T., Zsombok, A., Salahudeen, A. A., Di, S., Herman, J. P., & Tasker, J. G. (2016). Sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a male rat chronic stress model. *Endocrinology*, 157(6), 2346–2355.
- Furlong, T. M., McDowall, L. M., Horiuchi, J., Polson, J. W., & Dampney, R. A. (2014). The effect of air puff stress on *c-Fos* expression in rat hypothalamus and brainstem: Central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. *European Journal of Neuroscience*, 39(9), 1429–1438.
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621.
- Houdek, P., & Sumová, A. (2014). *In vivo* initiation of clock gene expression rhythmicity in fetal rat suprachiasmatic nuclei. *PLoS One*, 9(9), e107360.
- Inta, I., Bettendorf, M., & Gass, P. (2016). Conserved hypothalamic *c-fos* activation pattern induced by the MGLU5 receptor antagonist MPEP during peripubertal development in mice. *Pharmacopsychiatry*, 49(4), 142–145.
- Kobayashi, Y., Ye, Z., & Hensch, T. K. (2015). Clock genes control cortical critical period timing. *Neuron*, 86(1), 264–275.
- Kozaki, T., Kubokawa, A., Taketomi, R., & Hatae, K. (2015). Effects of day-time exposure to different light intensities on light-induced melatonin suppression at night. *Journal of Physiological Anthropology*, 34(1), 27.
- Lacoste, B., Angeloni, D., Dominguez-Lopez, S., Calderoni, S., Mauro, A., Franchini, F., Descaries, L., & Gobbi, G. (2015). Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *Journal of Pineal Research*, 58(4), 397–417.
- Miklos, Z., Flynn, F., & Lessard, A. (2014). Stress-induced dendritic internalization and nuclear translocation of the neurokinin-3 (NK3) receptor in vasopressin-ergic profiles of the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*, 1590, 31–44.
- Miyake, H., Mori, D., Katayama, T., Fujiwara, S., Sato, Y., Azuma, K., & Kubo, K. Y. (2016). Novel stress increases hypothalamic-pituitary-adrenal activity in mice with a raised bite. *Archives of Oral Biology*, 68, 55–60.
- Ordyan, N. E., Pivina, S. G., Rakitskaya, V. V., & Akulova, V. K. (2016). Harakteristika aktivnosti gipotalamo-gipofizamo-nadpochechnikovoy sistemy prenatal'no stressirovannykh samcov krys v jeksperimental'noj modeli depressii [Activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis of prenatally stressed male rats in experimental model of depression]. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, 52(1), 51–57 (in Russian).
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Galano, A. (2014). Melatonin: Exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)*, 29(5), 325–333.
- Robinson, I., & Reddy, A. (2014). Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS Letters*, 588(15), 2477–2483.
- Toshinai, K., Saito, T., Yamaguchi, H., Sasaki, K., Tsuchimochi, W., Minamino, N., Ueta, Y., & Nakazato, M. (2014). Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 (NERPs) inhibit the excitability of magnocellular neurosecretory cells in the hypothalamus. *Brain Research*, 1563, 52–60.
- Tymofii, O. V., Bulyk, R. Y., & Lomakina, Y. V. (2015). Efekty melatoninu na ekspresiiu hena *c-Fos* u neuronakh medial'noho dibrnoklitynnoho sub'iadra paraventrykuliamoho yadra hipotalamusa schuriv pry zminenomu fotoperiodi [Melatonin's effects on the *c-fos* gene expression in neurons of the medial small subnucleus of hypothalamus paraventricular nucleus of rats under altered light condition]. *Svit Medytyny ta Biolohii*, 2(50), 187–191 (in Ukrainian).
- Wang, J. L., Lim, A. S., Chiang, W. Y., Hsieh, W. H., Lo, M. T., Schneider, J. A., Buchman, A. S., Bennett, D. A., Hu, K., & Saper, C. B. (2015). Suprachiasmatic neuron numbers and rest-activity circadian rhythms in older humans. *Annals of Neurology*, 78(2), 317–322.
- Zamorskiy, I. I., Sopova, I. Y., & Khavinson, V. K. (2012). Vliyanie melatonina i epitalamina na sodержanie produktov belkovoy i lipidnoy peroksidatsii v kore bol'shikh polushariy i gippokampe mozga krys v usloviyakh ostroy gipoksii [Effects of melatonin and epitalamin on the content of protein and lipid peroxidation products in rat cortex and hippocampus under conditions of acute hypoxia]. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*, 154(7), 59–61 (in Russian).



Effect of sodium chloride on oxidative stress biomarkers of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*

D. S. Pesnya*, A. V. Romanovsky*, Y. S. Klimova*, R. A. Fedorov*, E. S. Ivanova**

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Borok, Russia

**Cherepovets State University, Cherepovets, Russia

Article info

Received 27.01.2018

Received in revised form
07.03.2018

Accepted 09.03.2018

Papanin Institute for
Biology of Inland Waters,
Russian Academy of
Sciences, Borok, 152742,
Russia.

Cherepovets State
University, Cherepovets,
162600, Russia.
E-mail:
24pesnya@gmail.com

Pesnya, D. S., Romanovsky, A. V., Klimova, Y. S., Fedorov, R. A., & Ivanova, E. S. (2018). Effect of sodium chloride on oxidative stress biomarkers of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 135–140. doi:10.15421/021820

For the first time a study was conducted of the effects of the change in the concentration of sodium chloride in water on the biomarkers of oxidative stress (enzymes: catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), and the levels of reduced glutathione (GSH), and a marker of peroxidation lipids (LPO) – malonic dialdehyde (MDA)) in the gills of the freshwater mollusc *Anodonta cygnea*. Adult specimens of *A. cygnea* of both sexes with a shell length of 70–100 mm were selected for the study, a total of 36 individuals. The molluscs were collected in one of the bays on the southwestern coast of the Volga reaches of the Rybinsk Reservoir (reservoir of the cascade of the upper Volga). The molluscs were kept in the laboratory in aquariums with river water and sand collected from the place of the molluscs' collection. During the experiment, a solution of NaCl 3 g/l in river water was introduced into the container with molluscs. Samples of molluscs' tissues were taken before application of the saline solution, 40 and 120 min after changing the salt concentration to 3 g/l, and 20 and 60 min after changing the NaCl solution to river water. The change in the concentration of NaCl in water (0–3 g/l) did not affect the content of water-soluble protein in the gills of molluscs during short-term exposure. The change in NaCl concentration in water caused the intensification of LPO processes in the gills of *A. cygnea*. The change in the activity of the enzymes of the antioxidant system and the increase in the concentration of GSH in *A. cygnea* gills, indicates their involvement in protecting freshwater molluscs from NaCl-induced oxidative stress. The change in the functioning of the glutathione system may be a compensatory mechanism for changing the NaCl concentration in water. Such biomarkers of oxidative stress as malonic dialdehyde and enzymes of the antioxidant system are sensitive indicators of changes in NaCl concentration in water in freshwater bivalve molluscs, for example *A. cygnea*.

Keywords: antioxidant; catalase; glutathione-s-transferase; glutathione reductase; reduced glutathione; malonic dialdehyde

Влияние хлорида натрия на биомаркеры окислительного стресса пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea*

Д. С. Песня*, А. В. Романовский*, Я. С. Климова*, Р. А. Федоров*, Е. С. Иванова**

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

**Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия

Впервые исследовано влияние изменения концентрации хлорида натрия в воде на биомаркеры окислительного стресса (антиоксидантные ферменты (каталаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза), а также уровни восстановленного глутатиона и маркера перекисного окисления липидов – малонового диальдегида в жабрах пресноводного моллюска *Anodonta cygnea*. Для исследований отобрали 36 взрослых особей *A. cygnea* обоего пола с длиной раковины 70–100 мм. Моллюски собраны в одном из заливов юго-западного побережья Волжского плеса Рыбинского водохранилища (водохранилище каскада верхней Волги). Моллюсков содержали в лабораторных условиях в аквариумах с речной водой и песком, собранным из места их обитания. Во время эксперимента в емкости с моллюсками вносили раствор NaCl (3 г/л) на речной воде. Пробы тканей моллюсков отбирали до внесения солевого раствора, через 40 и 120 мин после изменения концентрации соли до 3 г/л, и через 20 и 60 мин после смены раствора NaCl на речную воду. Изменение концентрации NaCl в воде (0–3 г/л) не повлияло на содержание водорастворимого белка в жабрах моллюсков при краткосрочном воздействии. Изменение концентрации NaCl в воде вызвало усиление процессов перекисного окисления липидов в жабрах *A. cygnea*. Изменение активности ферментов антиоксидантной системы и увеличение концентрации восстановленного глутатиона в жабрах *A. cygnea* указывает на их участие в защите пресноводного моллюска от NaCl-индуцированного окислительного стресса. Изменение в функционировании глутатионовой системы может являться компенсаторным механизмом на изменение концентрации NaCl в воде. Такие биомаркеры окислительного стресса как малоновый диальдегид и ферменты антиоксидантной системы являются чувствительными индикаторами изменения концентрации NaCl в воде у пресноводных двустворчатых моллюсков на примере *A. cygnea*.

Ключевые слова: антиоксидантная система; каталаза; глутатион-S-трансфераза; глутатионредуктаза; глутатион; малоновый диальдегид

Введение

Молекулярный кислород (O_2) составляет основу биоэнергетики в аэробных организмах. Однако его неполное восстановление неферментативными и ферментативными процессами приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) (Winston & Di Giulio, 1991). В процессе эволюции у аэробных организмов выработалась антиоксидантная система (АОС), которая обезвреживает АФК и обеспечивает защиту клеток от окислительных повреждений. Таким образом, АОС играет важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза (Baysou et al., 2012).

Антиоксидантная система защиты включает в себя антиоксидантные ферменты, а также такие низкомолекулярные вещества как восстановленный глутатион (ГЛТ), некоторые витамины (Е, С и т. д.). Фермент супероксиддисмутаза восстанавливает $O_2^{\cdot-}$ с образованием перекиси водорода. Каталаза, глутатионредуктазы и трансферазы участвуют в утилизации H_2O_2 (Falfushynska et al., 2012). Глутатион-S-трансфераза катализирует реакции восстановления органических пероксидов и трансформации ксенобиотиков, при этом источником водорода является восстановленный глутатион (Liu et al., 2017). В этом случае восстановленный глутатион переходит в окисленную форму. Восстанавливает его фермент глутатионредуктаза (Canesi et al., 1999). Восстановленный глутатион также обладает антиоксидантной активностью, выступая нейтрализатором АФК (Viarengo et al., 1997). Поэтому многие звенья антиоксидантной системы могут применяться как индикаторы загрязнения. Также одним из способов оценки эффективности работы системы АОС является определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). При взаимодействии АФК с липидами клеток образуются продукты ПОЛ, такие как шиффовы основания, диеновые конъюгаты, гидроперекиси, малоновый диальдегид (рис. 1).

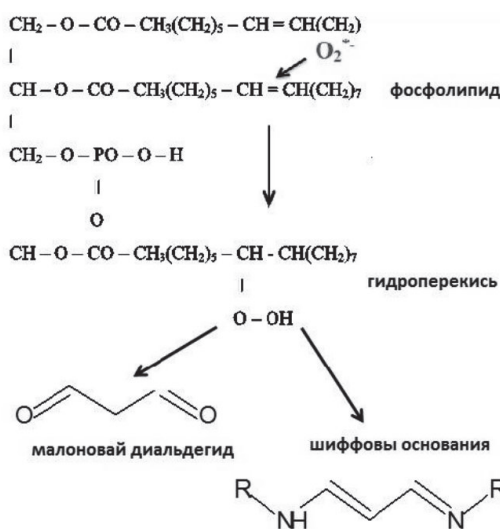


Рис. 1. Схема развития процессов образования продуктов перекисного окисления липидов

При действии различных факторов (температура, соленость, доступность кислорода, половой цикл, химическое загрязнение и т. д.) в организме изменяется функционирование биохимических регуляторных систем, что сопровождается повышенной продукцией АФК (Lushchak, 2011). Их усиленное образование может привести к развитию окислительного стресса и повреждению ДНК. Окислительный стресс характеризуется накоплением в клетке продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), при одновременном уменьшении эффективности функционирования АОС. Интенсивность окислительных повреждений при этом зависит от эффективности АОС, которая поддерживает окислительно-восстановительный баланс клетки. Таким образом, если АОС не справляется с избыточной продукцией АФК, это может привести к окислительным повреждениям клеточных структур: перекисно-

му окислению липидов клеточных мембран, нарушению работы ферментов, окислению структурных белков и повреждению ДНК (Halliwell & Gutteridge, 1999). Поэтому АОС играет важную роль в адаптационном потенциале аэробных организмов (Valavanidis et al., 2006).

Соленость – важный абиотический фактор, который влияет на многие физиологические функции организма водных животных. Засоление пресноводных экосистем недавно признано серьезной угрозой здоровью этих экосистем (Beggel & Geist, 2015). Соленость пресных водоемов может повышаться в результате антропогенного воздействия: сельскохозяйственного орошения, добычи полезных ископаемых, отходов промышленных предприятий, сточных вод и смывов соли с дорог. Зимние стоки с автомагистралей с высокой концентрацией противобледенительной соли приводят к значительному увеличению уровней солёности окружающих вод (Koryak et al., 2001; Norrström, 2005). Концентрация хлоридов в северо-восточной части США достигает в городских стоках 5 г/л (Novotny et al., 2008). Изменение солёности может привести к нарушению структуры экосистем, видового состава, изменению метаболизма пресноводных животных, что может в конечном итоге отразиться на их антиоксидантном статусе (Choi et al., 2008; Baysou et al., 2012).

Униониды (Unionidae) являются одной из наиболее чувствительных к антропогенным загрязнениям групп пресноводных двусторчатых моллюсков, численность которых стремительно сокращается в Европе и Америке. Там эти виды имеют статус в зависимости от региона, от «вымерших» и «находящихся под угрозой исчезновения» до «уязвимых» (IUCN). В связи с этим важно понять причины, приводящие к сокращению их численности (Strayer et al., 2004; Geist, 2010).

Пресноводные моллюски играют важную роль в экосистемных процессах благодаря их влиянию на циклирование питательных веществ, биотурбацию и осаждение взвешенной органики (Vaughn, 2010). К сожалению, места их обитания все чаще страдают из-за стоков различных загрязнителей (Liu et al., 2017). Изменения в среде обитания приводят к быстрым изменениям в метаболизме пресноводных моллюсков на разных уровнях: биохимическом, клеточном и физиологическом. Поэтому различные представители пресноводных унионид, такие как *Anodonta* spp. и *Unio* spp., предложены в качестве чувствительных объектов в биомониторинге, биоиндикации и биотестировании (Guidi et al., 2010). Исследования выявили способность представителей рода *Anodonta* (на примере *A. woodiana*) накапливать микроэлементы и пестициды, а также их потенциал для обнаружения мутагенов (Liu et al., 2017). Из данных литературы известно, что униониды рода *Anodonta* (на примере *A. imbecilis*) также высокочувствительны к тяжелым металлам, как и зоопланктон (*Daphnia*), и более чувствительны, чем рыбы и водные насекомые (Keller & Zam, 1991). А для *Unio pictorum* при сравнительно высокой чувствительности к антропогенным загрязнениям выявлена невысокая способность к аккумуляции тяжелых металлов, что следует учитывать при выборе тестового объекта для оценки биодоступности этих элементов в пресноводных экосистемах. В целом униониды являются чувствительными и удобными модельными организмами в лабораторных и полевых исследованиях (Doucet-Beaupre et al., 2010; Guidi et al., 2010).

Знание экотоксикологической значимости солёности в жизни пресноводных двусторчатых моллюсков особенно важно для установления научно обоснованных пороговых значений для регуляции окружающей среды. К настоящему моменту отрицательные эффекты воздействия NaCl представлены в основном для североамериканских видов пресноводных моллюсков (Gillis, 2011; Pandolfo et al., 2012; Blakeslee et al., 2013; Fritts et al., 2014). Исследовано воздействие разных концентраций хлоридов на глохидии *Anodonta anatina*, а также влияние на скорость прикрепления глохидий к их хозяину. После 24-часовой экспозиции при концентрации хлоридов выше 727 мг/л отмечено достоверное угнетение жизнеспособности глохидий, а LD_{50} зарегистрирована при концентрации хлоридов 2 505 мг/л, что соответствует 4 129 мг/л

чистого NaCl. Успешное присоединение глобидий к хозяину *Phoxinus phoxinus* отрицательно коррелировало с увеличением концентрации хлоридов и стало значительным при концентрации 2 909 мг/л (Beggel & Geist, 2015).

Повышение концентрации NaCl в воде приводит к снижению осмотического градиента между организмом гидробионта и средой, что сопровождается ухудшением условий диффузии воды в клетки. При приближении концентрации натрия в воде к таковой гемолимфы пресноводные моллюски начинают повышать соленость внутренней среды, что сопровождается нарастанием энергетического обмена и ЧСС (частоты сердечных сокращений). Повышение концентрации натрия в гемолимфе моллюсков происходит в пределах физиологических особенностей конкретного вида. Превышение этого предела приводит к защитно-оборонительной реакции моллюска, его изоляции от окружающей среды путем плотного закрывания створок и переходу на анаэробный обмен, что сопровождается снижением ЧСС (Martemyanov, 2011).

Для *Anodonta cygnea* предел толерантности к солености воды составляет около 2‰ (Shkhorbatov & Starobogatov, 1990; Khlebovich, 2013). Данный вид пресноводных моллюсков имеет соленость внутренней среды около 1,7‰ и поэтому является исключением из правила Бидла, которое постулирует отсутствие в природе организмов с внутренней соленостью ниже 5‰. То обстоятельство, что пресноводные двустворчатые моллюски характеризуются исключительно низкой внутренней соленостью, не может быть объяснено большей древностью обитания этих организмов в пресных водах и требует специального исследования (Khlebovich, 2013). В экспериментах по изучению влияния солености на ЧСС быстрое повышение содержания NaCl в воде до 3 г/л сопровождалось повышением ЧСС (тахикардия) у *A. cygnea*, а более высокие концентрации (5–8 г/л) всегда приводили к снижению ЧСС (брадикардия) (Sharov & Kholodkevich, 2015). Узкий диапазон солености около 5–8‰ носит критический характер и является универсальным барьером, при переходе через который изменяется ряд биологических свойств на разных уровнях биологической интеграции. Увеличение солености до 5–7‰ вызывает у *A. cygnea* закрытие створок и существенное уменьшение потребляемого кислорода (гипоксия).

Жабры являются одним из органов пресноводных двустворчатых моллюсков, ответственных за детоксикацию и аккумуляцию чужеродных веществ. При этом жабры прежде всего контактируют с веществами, содержащимися в воде, и для них показана наиболее высокая активность ферментов АОС (Prevodnik et al., 2007). За последние годы накопилось много данных о влиянии загрязнителей на особенности оксидативного стресса у некоторых видов пресноводных моллюсков. При оценке биологических эффектов загрязнителей в полевых условиях следует учитывать наложение абиотических факторов (сезонность, течения, соленость). Это приводит к разнонаправленной реакции антиоксидантной системы, что может вызвать сложности в интерпретации результатов полевых исследований (Falfushynska et al., 2010). Участие абиотических факторов в окислительном стрессе у пресноводных моллюсков исследовано недостаточно. В литературе также мало данных и о влиянии изменений солености на показатели антиоксидантной системы у пресноводных двустворчатых моллюсков (Binelli et al., 2015).

Цель данной работы – исследование влияния изменения концентрации хлорида натрия в воде на интенсивность образования малонового диальдегида, активность ферментов антиоксидантной системы в жабрах пресноводного двустворчатого моллюска *A. cygnea*. Данный вид хорошо подходит для изучения биомаркеров окислительного стресса, благодаря его высокой чувствительности (Robillard et al., 2003).

Материал и методы исследований

Исследования проводили на взрослых особях *A. cygnea* с длиной раковины 70–100 мм. Животные были собраны в одном из заливов юго-западного побережья Волжского плеса Рыбинского

водохранилища (одного из водохранилищ каскада верхней Волги) вблизи пос. Борок (58°03'45" с. ш. 38°14'23" в. д.) в сентябре 2012 г. (рис. 2).



Рис. 2. Схема Рыбинского водохранилища: красной точкой отмечено место сбора моллюсков

В течение 30 мин после отлова моллюсков доставляли в лабораторию в пластиковых изотермических контейнерах объемом 10 л. После вылова и транспортировки в лабораторию моллюсков в течение двух недель для их адаптации содержали в статических условиях в аквариуме со 150 л речной воды и песчаным грунтом, собранным в месте их обитания, с заменой 50 л воды каждые 2 суток, которая подавалась постепенно через резиновый шланг. Во время частичной смены воды моллюсков не извлекали из аквариума, чтобы не вызвать закрытия створок. Сливали воду через отверстие, закрываемое резиновой пробкой, в углу на дне аквариума. Условия содержания следующие: содержание растворенного кислорода на уровне насыщения за счет принудительной аэрации воды, температура воды – 21 °C, pH – 7. Моллюсков кормили два раза в неделю хлореллой из лабораторной культуры с добавлением кормовых дрожжей, в соотношении 50 г сухих дрожжей и 50 мл хлореллы на одно кормление. Хлореллу концентрировали центрифугированием и промывали дистиллированной водой.

В эксперименте использовано 36 особей. Во время опыта в емкости с моллюсками вносили раствор NaCl (х. ч.) 3 г/л на речной воде. Раствор вносили через резиновую трубку, равномерно и осторожно распределяя по всему объему воды в аквариуме. После повышения концентрации соли в воде и смены воды створки у моллюсков оставались открытыми. Отбирали пробы по схеме, представленной в таблице, используя выборки по 6 моллюсков. Для унификации условий отбора проб и минимизации изменений биохимических параметров каждую группу моллюсков отбирали одновременно и сразу помещали в жидкий азот (температура – –196 °C) на 10 мин. Для последующего анализа использовали жабры. Препарировали при 4 °C. Образцы тканей жабр упаковывали в пластиковые пробирки и хранили в жидком азоте до проведения биохимического анализа.

Исследованы биомаркеры окислительного стресса, такие как антиоксидантные ферменты: каталаза (CAT) – пероксид : пероксид оксидоредуктаза (EC 1.11.1.6), которая участвует в утилизации H₂O₂; глутатионредуктаза (GR) – НАД(Ф)Н: окисленный глутатион оксидоредуктаза (EC 1.8.1.7), который восстанавливает окисленный глутатион; глутатион-S-трансфераза (GST) (EC 2.5.1.18), которая принимает участие в нейтрализации органических гидроперекисей и является ферментом II фазы биотрансформации ксенобиотиков (Halliwell & Gutteridge, 1999), а также уровень низкомолекулярного антиоксиданта – восстановленного глутатиона (GSH), и маркер перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малоновый диальдегид (MDA) (Faria et al., 2009).

Для биохимического анализа навеску ткани, к которой добавляли 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,5, в объемном соотношении 1 : 4, используя диспергатор биологических тканей IKA T10 Ultra Turax (Laboratory Equipment, Germany). Для получения суперна-

танта гомогенат центрифугировали при 15 000 g и $t = 4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин (Мисто 22 R, Германия).

Все измерения концентрации и активности ферментов проводили на аналитическом спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, USA). В цельном гомогенате определяли содержание MDA – по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при $\lambda = 532$ нм и GSH по реакции с 5,5'-дитио(бис)-2-нитробензойной кислотой (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) при $\lambda = 412$ нм. В супернатанте определяли активность ферментов: CAT – по убыли перекиси водорода при 25°C и длине волны $\lambda = 410$ нм, GR – по убыли NADPH при 25°C и $\lambda = 349$ нм, GST – по реакции с 1-хлор-2,4-динитробензолом (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) при 27°C и $\lambda = 349$ нм (Klimova et al., 2017). Концентрацию белка в пробах измеряли методом Брэдфорд с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Температура инкубационной среды при определении активности ферментов поддерживалась на уровне $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Morozov et al., 2012).

Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n = 6$). Достоверность различий между выборками оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $P = 0,05$. Объем выборочных совокупностей составил 6 особей на каждую экспериментальную группу. В таблице 1 под значениями биомаркеров приведены данные процентного изменения показателей от контрольного уровня.

Результаты

Сравнение двух опытных групп животных, которые находились в условиях воздействия соли в концентрации 3 г/л при экспозиции 40 и 120 мин, не выявили достоверных отличий биомаркеров от контрольных значений. При этом можно отметить следующие тенденции в изменении биомаркеров: концентрации MDA и GSH, а также активность GR возрастают, а активность GST и CAT уменьшается (табл. 1).

Таблица 1

Значения параметров перекисного окисления липидов (%) и антиоксидантной системы в жабрах *Anodonta cygnea* при действии солевого стресса в эксперименте ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n = 6$)

Экспозиция, мин	Водорастворимый белок, мкг/мг	MDA пкмоль/мкг белка	GSH пкмоль/мкг белка	GR нмоль/мкг белка	GST нмоль/мкг белка	CAT
До внесения NaCl						
0	334,8 ± 39,3	1,3 ± 0,2	3,9 ± 0,5	1,8 ± 0,6	3,4 ± 0,6	40,4 ± 3,3
После добавления NaCl						
40	347,4 ± 53,2 103,8	1,7 ± 0,2 130,8	5,1 ± 0,9 130,7	3,0 ± 0,4 166,7	3,1 ± 0,7 91,2	36,8 ± 4,1 91,1
120	405,7 ± 47,2 121,2	1,5 ± 0,2 115,4	4,8 ± 0,6 123,1	3,2 ± 0,6 178,8	3,1 ± 0,5 91,2	34,4 ± 3,9 85,1
После смены раствора NaCl на отстоянную речную воду						
20	352,6 ± 31,4 105,3	2,0 ± 0,9* 153,8	5,2 ± 0,6 132,3	2,8 ± 0,5 155,5	1,6 ± 0,2* 47,1	38,8 ± 3,1 96,0
60	435,9 ± 26,6 130,2	1,6 ± 0,1 123,1	5,0 ± 0,3 128,2	3,3 ± 0,7 183,3	2,5 ± 0,3 73,5	28,6 ± 1,8* 70,8
120	382,1 ± 24,6 114,1	1,6 ± 0,2 123,1	6,1 ± 0,7* 156,4	4,3 ± 1,0* 238,9	2,2 ± 0,4 64,7	32,9 ± 3,2 81,4

Примечание: * – обозначает достоверное отличие от фонового варианта, т.е. до внесения хлорида натрия.

После смены воды с соленой на речную при экспозициях 20, 60 и 120 мин зарегистрировано достоверное изменение уровня биохимических показателей. Так через 20 мин после смены воды отмечается достоверное увеличение концентрации MDA в 1,5 раза и уменьшение активности GST в 2 раза по сравнению с контрольным уровнем. Через 60 мин зарегистрировано достоверное уменьшение активности CAT при отсутствии достоверных изменений других показателей. Через 120 мин отмечено достоверное

увеличение концентрации GSH в 1,5 раза и активности GR более чем в два раза по сравнению с контрольными значениями, в то время как значения остальных показателей достоверно не отличаются от контрольных.

Обсуждение

При концентрации соли 3 г/л в воде повышается солёность внутренней среды моллюска *A. cygnea* (путем увеличения концентрации натрия в гемолимфе), что сопровождается повышением энергетического обмена и ЧСС. При такой концентрации соли в воде у моллюска еще не наступает таких последствий, как закрытие створок и гипоксия, которые отмечаются при концентрации соли 5–8 г/л (Guidi et al., 2010; Binelli et al., 2015). В настоящем эксперименте выявлено, что воздействие NaCl в концентрации 3 г/л у *A. cygnea* на биохимическом уровне приводит к повышению концентрации MDA, ключевого продукта ПОЛ. У двусторчатых моллюсков определение концентрации MDA используется как чувствительный показатель качества воды в гидроекосистемах (Fernandez et al., 2010). У *Scylla serrata* при высокой солёности 35‰ и 17‰ отмечаются значительно более высокие уровни перекисного окисления липидов по сравнению с более низкой солёностью 10‰. При этом активность антиоксидантных ферментов GR, SOD, CAT, GPx, наоборот, в целом более высокая при солёности 10‰, чем при 17‰ и 35‰. Это показывает, что высокая солёность 35‰ индуцирует более значительный окислительный стресс, чем более низкие солёности (Paital & Chainy, 2010). Повышение солёности воды способно повлиять на биодоступность и увеличение токсичности тяжелых металлов, которые могут конкурировать с ионами металлов при образовании биомолекул. Так, в одном из исследований зарегистрировано отрицательное влияние на темпы роста популяции *B. rotundiformis* совместного действия изменения температуры, повышения солёности и как результат – увеличения степени токсичности ионов меди (Gama-Flores et al., 2005). В исследовании на *Penaus monodon* показано, что совместное действие пестицида дельтаметрина, солёности и температуры способно индуцировать более выраженный окислительный стресс. Это исследование показало, что при анализе биомаркеров окислительного стресса следует учитывать взаимодействие между абиотическими факторами и такими поллютантами как пестициды (Tu et al., 2012). В другом исследовании установлено, что у двусторчатого моллюска *Unio tumidus* изменение концентрации MDA напрямую коррелирует с концентрацией 8-оксо-7,8-дигидро-2'-деоксигуанозина, продукта окисления ДНК (Charissou et al., 2004). Таким образом, повышение уровня MDA может сопровождаться окислительным повреждением ДНК.

Изменение концентрации хлорида натрия в настоящем эксперименте привело к достоверному уменьшению активности CAT в жабрах. Понижение активности CAT может быть связано с появлением супероксидных радикалов, которые, как известно, ингибируют активность каталазы (Koprucu et al., 2008). Аналогичное изменение активности CAT описано у *Acipenser naccarii*, выращенного в пресной воде, а затем помещенного в морскую воду (35‰) (Martínez-Álvarez et al., 2002). В условиях эксперимента пестицид дельтаметрин вызывал значительное снижение активности CAT у пресноводного моллюска *Unio elongatulus eucirrus* (Koprucu et al., 2008). В другом исследовании обнаружено, что при изучении влияния выбросов пестицидов в окружающую среду среди ферментов АОС у *A. cygnea* активность каталазы не коррелировала со степенью загрязнения пестицидами, а отражала естественные вариации в годовом физиологическом цикле вида и была сильно подвержена влиянию абиотических факторов (Robillard et al., 2003). CAT, так же как и MDA, – маркер оксидативных поражений, причинами которых могут быть и поллютанты, и изменения солёности (Fernandez et al., 2010).

Нами зарегистрировано понижение активности GST в жабрах *A. cygnea*, что указывает на восприимчивость данного биомаркера к изменениям солёности. Глутатион-S-трансфераза является ферментом, катализирующим антиоксидантный метаболизм тиоловых

соединений, что, в свою очередь, защищает клетку от электрофилов, повреждения свободными радикалами и окислительного стресса. Значительное уменьшение активности GST может привести к формированию реактивных форм кислорода (ROS), образованию высокотоксичных гидроксильных радикалов и целому каскаду реакций, повреждающих клеточную мембрану, то есть повышению концентрации ПОЛ (Limón-Pacheco & Gonshebbat, 2009). У *A. cygnea* данный биомаркер чувствителен к антропогенным загрязнениям и выбросам ксенобиотиков (Falfuchynska et al., 2010; Falfuchynska et al., 2012). В исследовании влияния изменений солености на *Paralichthys olivaceus* зарегистрировано изменение экспрессии mRNA глутатион-S-трансферазы и глутатионовой пероксидазы, что привело к выводу о том, что данные ферменты играют важную роль в детоксикации АФК и могут быть индикаторами окислительного стресса, индуцированного изменениями солености (Choi et al., 2008).

Восстановленный глутатион связывает металлы, CO₃ (стойкие органические загрязнители) и улавливает ROS, поэтому составляет первую линию защиты от их токсического воздействия. Как видно из таблицы 1, увеличение концентрации GSH соответствует повышению активности GR. Известно, что GR опосредованно участвует в инактивации ROS. GR восстанавливает окисленный глутатион (GSSG) в NADPH-зависимой реакции, поддерживая важный для клеточного гомеостаза и работы других ферментов баланс GSSG/GSH, и поэтому играет важную роль в системе антиоксидантной защиты клетки (Fernandez et al., 2010). Достоверное увеличение значений данных показателей указывает на то, что GSH может являться важным звеном АОС в защите от NaCl-индуцированного стресса.

Тенденция повышения уровня GSH обнаружена у *M. galloprovincialis* на загрязненных станциях в естественной среде, в результате накопления в моллюсках Cr, Fe и Mn (Regoli et al., 2004). В других работах на моллюсках *M. galloprovincialis* и рыбах *Abramis brama* и *Dicentrarchus labrax* отмечено уменьшение концентрации GSH в результате влияния тяжелых металлов и CO₃ в полевых и лабораторных условиях (Canesi et al., 1999; Morozov et al., 2012). В некоторых исследованиях сообщалось о кратковременном повышении концентрации GSH и последующем уменьшении у разных видов растений и животных. В результате анализа данных литературы и результатов настоящего исследования можно предположить, что изменение концентрации GSH зависит от типа загрязнителя и продолжительности экспозиции. В наших лабораторных экспериментах краткосрочное изменение концентрации хлорида натрия в воде приводило к увеличению уровня GSH и повышению активности GR у *A. cygnea*, что может являться адаптивной реакцией. Так как эндогенный синтез глутатиона осуществляется ферментами с-глутамин-цистеинсинтетазы и глутатионсинтетазой, а GR восстанавливает его окисленную форму, можно предположить, что на момент эксперимента данные ферменты за счет совместного функционирования обеспечивали достаточное возобновление восстановленного глутатиона (GSH) в тканях моллюсков, при повышенных концентрациях хлорида натрия в окружающей среде (Klimova et al., 2017).

Выводы

Исследовано влияние краткосрочного изменения концентрации хлорида натрия в воде (концентрация NaCl – 3 г/л) на биохимические маркеры окислительного стресса пресноводного моллюска *A. cygnea*. Изменение концентрации хлорида натрия до 3 г/л не влияет на концентрацию водорастворимого белка. Изменение концентрации хлорида натрия повышает концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в жабрах *A. cygnea*, что указывает на вероятное участие окислительного стресса в механизмах токсичности хлорида натрия у пресноводных двусторчатых моллюсков. Изменение активности ферментов антиоксидантной системы и увеличение концентрации GSH в жабрах *A. cygnea*, указывает на их участие в защите пресноводного моллюска от NaCl-индуцированного окислительного стресса. Краткосрочное

изменение концентрации хлорида натрия в воде вызвало усиление процессов ПОЛ у *A. cygnea*. Это предполагает неспособность АОС устранять избыток ROS, что приводит к окислению липидов. Но при этом степень окислительных повреждений не настолько высока, чтобы инактивировать ферменты антиоксидантной системы. В результате изменилось функционирование глутатионовой системы, что может являться компенсаторным механизмом на изменение концентрации хлорида натрия в воде. Таким образом, биомаркеры окислительного стресса пресноводных двусторчатых моллюсков *A. cygnea* являются чувствительными показателями изменения концентрации NaCl в воде.

Мы признательны В. Б. Вербицкому, С. Быковой, Г. М. Чуйко, А. Н. Шарову и С. В. Холодкевич. Источник бюджетного финансирования – АААА-А18-118012690101-2.

References

- Baysoy, E., Atli, G., Gürlü, C. Ö., Dogan, Z., Eroglu, A., Kocalar, K., & Canli, M. (2012). The effects of increased freshwater salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34(84), 249–253.
- Beggel, S., & Geist, J. (2015). Acute effects of salinity exposure on glochidia viability and host infection of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). *Science of the Total Environment*, 502, 659–665.
- Binelli, A., Torre, C. D., Magni, S., & Parolini, M. (2015). Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution*, 196, 386–403.
- Blakeslee, C. J., Galbraith, H. S., Robertson, L. S., & White, B. S. J. (2013). The effects of salinity exposure on multiple life stages of a common freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(12), 2849–2854.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., & Gallo, G. (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46(1), 67–76.
- Charissou, A. M., Cossu-Leguille, C., & Vasseur, P. (2004). Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Science of The Total Environment*, 322, 109–122.
- Choi, C. Y., An, K. W., & An, M. I. (2008). Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 149, 330–337.
- Doucet-Beaupre, H., Dubé, C., Breton, S., Pörtner, H. O., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Thermal Biology*, 35(1), 11–20.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Farkas, A., Vehovszky, A., Gyor, J., & Stoliar, O. B. (2010). Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country. *Chemosphere*, 81(10), 1342–1351.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Golubev, A. P., & Stoliar, O. B. (2012). Main partitioning criteria for the characterization of the health status in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* from spontaneously polluted area in Western Ukraine. *Environmental Toxicology*, 27(8), 485–494.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M. C., Bayona, J. M., & Barata, C. (2009). Multibiomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 149, 281–288.
- Fernandez, B., Campillo, J. A., Martinez-Gomez, C., & Benedicto, J. (2010). Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology*, 99, 186–197.
- Fritts, A. K., Bamhart, C., Bradley, M., Liu, N., Cope, W. G., Hammer, E., & Brin-golf, R. B. (2014). Assessment of toxicity test endpoints for freshwater mussel larvae (glochidia). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 199–207.
- Gama-Flores, J. L., Sama, S. S. S., & Nandini, S. (2005). Interaction among copper toxicity, temperature and salinity on the population dynamics of *Brachionus rotundiformis* (Rotifera). *Hydrobiologia*, 546, 559–568.
- Geist, J. (2010). Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): A synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia*, 644, 69–88.
- Gillis, P. (2011). Assessing the toxicity of sodium chloride to the glochidia of freshwater mussels: Implications for salinization of surface waters. *Environmental Pollution*, 159, 1702–1708.

- Guidi, P., Frenzzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., & Nigro, M. (2010). Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology*, 100, 75–83.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Keller, E. A., & Zam, S. G. (1999). The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Toxicology and Chemistry*, 10(4), 539–546.
- Khlebovich, V. V. (2013). Kriticheskaya solenost' – gomeostaz – ustoichivoe razvitiye [Critical salinity – homeostasis – sustainable development]. *Trudy Zoologicheskogo Instituta RAN, Prirojenie*, 3, 3–6 (in Russian).
- Klimova, Y. S., Chuiko, G. M., Gapeeva, M. V., & Pesnya, D. S. (2017). The use of biomarkers of oxidative stress in zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) for chronic anthropogenic pollution assessment of the Rybinsk Reservoir. *Contemporary Problems of Ecology*, 24(2), 210–217.
- Koprucu, S. S., Yonar, E., & Seker, E. (2008). Effects of deltamethrin on antioxidant status and oxidative stress biomarkers in freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 253–257.
- Koryak, M., Stafford, L. J., Reilly, R. J., & Magnuson, P. M. (2001). Highway deicing salt runoff events and major ion concentrations along a small urban stream. *Journal of Freshwater Ecology*, 16(1), 125–134.
- Limón-Pacheco, J., & Gonshebat, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674, 137–147.
- Liu, Q., Shang, X., Ma, Y., Xia, X., Xue, S., Hua, C., Liang, G., Yao, L., & Guo, L. (2017). Isolation and characterization of two glutathione S-transferases from freshwater bivalve *Anodonta woodiana*: Chronic effects of pentachlorophenol on gene expression profiles. *Fish and Shellfish Immunology*, 64, 339–351.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30.
- Martemyanov, V. I. (2011). Influence of environmental mineral composition on the indices of water-salt metabolism in *Dreissena polymorpha* Pallas introduced to Rybinsk Reservoir. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2, 120–134.
- Martínez-Álvarez, R. M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., Morales, A. E., García-Gallego, M., & Sanz, A. (2002). Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *The Journal of Experimental Biology*, 205, 3699–3706.
- Morozov, A. A., Chuiko, G. M., & Brodskii, E. S. (2012). Functional state of the liver antioxidant system of the Bream *Abramis brama* (L.) from Rybinsk reservoir regions with different anthropogenic loads. *Inland Water Biology*, 5(1), 147–152.
- Norstrom, A. C. (2005). Metal mobility by de-icing salt from an infiltration trench for highway runoff. *Applied Geochemistry*, 20(10), 1907–1919.
- Novotny, E. V., Murphy, D., & Stefan, H. G. (2008). Increase of urban lake salinity by road deicing salt. *Science of the Total Environment*, 406, 131–144.
- Paital, B., & Chainy, G. B. N. (2010). Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 151, 142–151.
- Pandolfo, T. J., Cope, W. G., Young, G. B., Jones, J. W., Hua, D., & Lingenfelser, S. F. (2012). Acute effects of road salts and associated cyanide compounds on the early life stages of the unionid mussel *Villosa iris*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1801–1806.
- Prevodnik, A., Gardestrom, J., Lilja, K., Elfving, T., McDonagh, B., Petrovi, N., Tedengren, M., Sheehan, D., & Bollner, T. (2007). Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquatic Toxicology*, 82, 63–71.
- Regoli, F., Frenzzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., & Nigro, M. (2004). Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology*, 68, 167–178.
- Robillard, S., Beauchamp, G., & Laulier, M. (2003). The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 135(1), 49–59.
- Sharov, A. N., & Kholodkevich, S. V. (2015). O nekotorykh osobennostyakh ispol'zovaniya presnovodnykh dvustvorchatykh molluskov pri provedeniiy ekotoksikologicheskikh issledovaniy na osnove monitoringa ih kardioritma volokonno-opticheskim metodom [Some features of using heart rate monitoring of freshwater bivalve molluscs with a fiber-optical method for ecotoxicological research]. *Principy Ecologii*, 2, 21–28 (in Russian).
- Shkorbatov, G. L., & Starobogatov, Y. I. (1990). *Metody izucheniya dvustvorchatykh molluskov* [Method of investigation of bivalves]. *Trudy Zoologicheskogo Instituta AN SSSR*, 219, 208 (in Russian).
- Strayer, D. L., Downing, J. A., Haag, W. R., King, T. L., Layzer, J. B., Newton, T. J., & Nichols, J. S. (2004). Changing perspectives on pearly mussels, North America's most imperiled animals. *Bioscience*, 54(1), 429–439.
- Tu, H. T., Silvestre, F., Meulder, B. D., Thome, J.-P., Phuong, N. T., & Kestemont, P. (2012). Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*, 86, 83–91.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178–189.
- Vaughn, C. C. (2010). Biodiversity losses and ecosystem function in freshwaters: Emerging conclusions and research directions. *Bioscience*, 60, 25–35.
- Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B., & Lafaurie, M. (1997). Heavy metal inhibition of EROD activity in liver micomes from the Bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Marine Environmental Research*, 44(1), 1–11.
- Winston, G. W., & Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19, 137–161.



Biotechnology for obtaining hybrid positive control samples for immunoassay for detecting antibodies against *Chlamydia trachomatis*

O. Y. Galkin*, Y. V. Gorshunov**, O. B. Besarab*, K. O. Shchurska*

*National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

**Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 15.01.2018

Received in revised form
21.03.2018

Accepted 22.03.2018

National Technical University
of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv
Polytechnic Institute",
Peremohy av., 37,
Kyiv, 03056, Ukraine.
Tel.: +38-044-232-05-46.
E-mail: a.galkin@kpi.ua

Research and Technology
Institute of Urban Development,
Mytropolyta Vasylia
Lytkovskoho st., 35,
Kyiv, 03035, Ukraine.
Tel.: +38-044-248-23-39.
E-mail: y.gorshunov@gmail.com

Galkin, O. Y., Gorshunov, Y. V., Besarab, O. B., & Shchurska, K. O. (2018). Biotechnology for obtaining hybrid positive control samples for immunoassay for detecting antibodies against *Chlamydia trachomatis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 141–147. doi:10.15421/021821

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most informative and versatile method of serological diagnostics. The possibility of detection by ELISA of specific antibodies of different classes allow one to differentiate primary infectious processes and their remission, exacerbation and chronic disease (holding of differential diagnosis). This approach is implemented in the methodology for evaluation of patients for the presence of humoral immune response against TORCH-infections pathogens (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex viruses infections, and some others). Therefore, testing for the presence of specific IgG and IgM antibodies against TORCH-infection pathogens in blood serum is an important element of mother and child protection. The essential problem in the production of IgM-capture ELISA diagnostic kits is obtaining positive control. The classic version of positive control is human blood serum (plasma) containing specific antibodies. But specific IgM-positive sera are insignificant raw material. This fact can significantly limit the production of diagnostic kits, especially in case of large-scale manufacture. We have suggested a methodological approach to the use of synthetic positive controls in IgM-capture ELISA kits based on conjugate of normal human IgM and monoclonal antibodies against horseradish peroxidase. It was found that it is possible to realize such a task by means of NHS ester-maleimide-mediated conjugation (by sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), reductive amination-mediated conjugation (by sodium periodate) and glutaraldehyde-mediated conjugation. It was found that conjugates of normal human IgM and monoclonal antibodies against horseradish peroxidase obtained using NHS ester-mediated maleimide conjugation and periodate method are homogeneous in molecular weight, whereas conjugate synthesized by glutaraldehyde method comprises at least three types of biopolymers with close molecular weight. It was found that synthetic positive control obtained by different methods are characterized by higher titre compared to IgM-positive high-titre serum. However, positive control obtained by NHS ester-mediated maleimide conjugation has the best titration profile characteristics. We have suggested a methodological approach to the use of synthetic positive controls in indirect ELISA kits based on conjugate of normal human IgM (IgA) and monoclonal antibodies against major outer membrane protein of *Ch. trachomatis*. It was found that it is possible to realize such task by means of NHS ester-maleimide-mediated conjugation (by sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) and reductive amination-mediated conjugation (by sodium periodate). It was found that synthetic positive control obtained by different methods are characterized by higher titre compared to IgM- and IgA-positive high-titre serum. However, positive control obtained by NHS ester-mediated maleimide conjugation has the best titration profile characteristics, both at the release time and after a week's storage at 37 °C.

Keywords: ELISA; human immunoglobulins; synthetic control; *Chlamydia trachomatis*; conjugation

Introduction

Laboratory diagnosis is an integral part of the clinical examination of a patient, since without a laboratory examination it is neither possible to establish a clinical diagnosis nor to monitor the effectiveness and safety of therapeutic measures. Among the whole complex of methods of clinical laboratory diagnostics, there are serological methods, which are based on the identification of serological markers (antigens, allergens, antibodies) of infectious (viral, bacterial, fungal, and parasitic) and non-infectious (including autoimmune, allergic, endocrine and oncological) diseases. The most informative, universal and, as a consequence, widespread serology test is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Nikolaenko et al., 2005; Galkin et al., 2017). The possibility of detecting by means of ELISA specific antibodies of different classes can differentiate the primary infectious process and its remission, exacerbation or chronicization of the disease

(that is, to conduct a differential diagnosis). Such an approach is realized in the methodology of patient survey for the presence of a humoral immune response to TORCH-infectious agents (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex virus infections and others) that can infect the fetus and cause developmental defects (Numan et al., 2015; Lu et al., 2016; De Carolis et al., 2017). That is why testing for the presence of specific antibodies against TORCH-infectious agents is an important element in the mother and child protection system.

According to available literature data (Holmes et al., 2005; Vazquez et al., 2007; Hunsperger et al., 2009), many of ELISA kits for the detection of specific IgM antibodies against certain pathogens in human serum (plasma) infectious diseases are constructed according to the principle of IgM-capture assay. This modification of ELISA allows for the first stage to fix the total pool of IgM antibodies on the solid phase (the concentration of which in serum is much less than the content of

IgG), and the second – the detection of specific IgM. In other cases (Reesink-Peters et al., 2001; Kamel, 2013; Galkin et al., 2018), there are immuno-enzyme kits, in particular for the detection of specific IgM and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in human serum (plasma), based on the principle of indirect ELISA.

Obtaining positive controls (PCs) is a significant problem in the production of diagnostic kits intended for the detection of IgA and IgM specific antibodies against different pathogens (including *Ch. trachomatis* infection). The classic version of PC is the serum (plasma) of human blood containing specific antibodies of a certain class. However, the frequency of detection of IgA- and IgM-positive sera is negligible. The relevant biological material as a raw material for obtaining PC is extremely scarce. This circumstance can significantly limit the production of diagnostic kits, especially in the context of large-scale production.

In order to increase the efficiency of ELISA test kits production, we proposed a methodological approach that addresses the use of synthetic PCs: for the ELISA test kits based on the principle of IgM-capture assay – the use of a conjugate of normal immunoglobulins of the IgM class and monoclonal antibodies (McAbs) to the enzyme horseradish peroxidase (HRP); and for the ELISA test kit for the diagnosis of urogenital chlamydia, based on the principle of indirect ELISA, – the use of a conjugate of IgM (IgA) normal immunoglobulins and McAbs to *Ch. trachomatis* major external membrane protein (MOMP).

The aim of the work was to develop the biotechnological approach for hybrid (synthetic) positive control samples for the ELISA test kits based on IgM-capture modification, as well as on the indirect variant for the detection of IgA and IgM antibodies to *Ch. trachomatis*.

Materials and methods

NHS ester-maleimide-mediated conjugation. Synthesis of the conjugate was performed using the basic method (Hermanson, 2008) with our own modifications. In the first step, activation of the normal human IgM was carried out by NHS ester-maleimide cross-linker – sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC). 2–3 ml of a solution of IgM (400–420 mg/ml) was used in 0.1 M phosphate saline buffer with 0.15 M NaCl, pH 7.2 (PBS). To the solution of immunoglobulins, 6 mg of sulfo-SMCC was added, stirred until complete dissolution, and held for 30 min at room temperature. The unreacted sulfo-SMCC compartment was conducted on a column of 2.5 × 100 cm with sephacryl S-300 using PBS. Active immunoglobulins were eluted from the column, diluted to a concentration of 20 mg/ml, and immediately used for synthesis of the conjugate.

The conjugation of activated IgM and McAbs with reduced sulfhydryl groups was carried out as follows. A solution of McAbs against HRP with a concentration of 5 mg/ml was used in PBS with 10 mmol/L EDTA. 18 ml of mercaptoethylamine (MEA) was added to 3 ml of McAbs solution, incubated for 90 min at a temperature of 37 °C. A 1.5 × 40 cm chromatography column with Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) using PBS with 10 mmol/L EDTA was used for separation of non-reactive MEA. The elution of the reduced antibodies was performed at a rate of 2 ml/min. Fractions were collected in a volume of 0.5 ml and the optical density (OD) was measured at 280 nm. The collected fractions of reduced McAbs were immediately mixed with activated human IgM in a molar ratio of IgM : McAbs equal to 1 : 4. The reaction mixture was maintained at room temperature for 2 h. The resulting conjugate was purified by immunoaffinity chromatography on a 6-B Sepharose column, which immobilized McAbs against horseradish peroxidase (HRP).

Periodate conjugation method. Conjugation of McAbs against HRP with normal human IgM was performed in a molar ratio of McAbs to IgM 1 : 1 by periodate oxidation (Tijssen, 1985) with our own modifications (Galkin et al., 2013). At oxidation of human IgM (15 mg/ml), 0.1 M bicarbonate buffer, pH 8.3, was used, adding the same volume of 14 mM aqueous solution of sodium periodate. The mixture was incubated for 2 h at room temperature. The thus obtained solution of activated human IgM was added to a solution of McAbs, which was pre-dialyzed against a 0.1 M carbonate solution, pH 9.2. The mixture was transferred to a chromatographic column and 1/3 part of dry sephadex G-25 was

added and incubated for 3 h at room temperature. Upon completion of the incubation, the conjugate solution was eluted from the column and the reaction stopped by the addition of 1/20 parts by volume of aqueous NaBH₄ solution (5 mg/ml), leaving for 30 min at room temperature. After that, 3/20 parts of sodium hydroxide solution was added, incubated for 60 min. The resulting conjugate solution was transferred to a 0.02 M phosphate buffer with 0.15 M NaCl by dialysis.

Conjugation with glutaraldehyde. Synthesis of the conjugate was performed using a basic two-step method (Hermanson, 2008) with our own modifications. A human IgM solution at a concentration of 10 mg/ml in the PBS, pH 6.8, was used. Glutaraldehyde was added to the solution of the immunoglobulin to glutaraldehyde final concentration of 1% and maintained overnight at room temperature. Purification of the activated immunoglobulin from the excess of glutaraldehyde was carried out using gel filtration on a column of 2.5 × 100 cm with sephacryl S-300 using PBS, pH 6.8. For further conjugation, a solution of McAbs to HRP was used at a concentration of 10 mg/ml in 0.5 M carbonate buffer solution, pH 9.5. The activated human IgM was mixed with McAbs in a molar ratio of 1 : 1 and maintained overnight at 4 °C. The restoration of Schiff bases and probable traces of glutaraldehyde was carried out by adding NaBH₄ (10 mg/ml) and holding for 1.5 h at 4 °C. To separate the probable insoluble forms, the solution of the resulting conjugate was centrifuged at 10,000 rpm and purified on a column of 2.5 × 100 cm with sephacryl S-300 using PBS, pH 7.4.

IgM-capture ELISA. Monoclonal antibodies specific to human IgM were sorbed in a 0.02 M carbonate-bicarbonate buffer at a concentration of 2 µg/ml on a 96-well polystyrene plate for high-sorption capacity ELISA (Suzhou Conrem Biomedical Technology Co., China). The plate was incubated for 12 h at 4 °C, then washed three times with 0.02 M phosphate buffered saline with 0.15 M NaCl and 0.2% Tween-20 (PBST) and kept in a solution of bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL in PBS) for 1 h at 37 °C. After four-fold well washings with PBST, the plate was filled with 100 µl of a solution of normal IgM and McAbs to HRP in a reaction buffer solution (0.05 M tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 mg/ml BSA, 0.2% Tween-20). The plates were incubated for 30 min at 37 °C and washed 4 times with PBST. After washing, a solution of the conjugate of *Ch. trachomatis* recombinant antigens and HRP (100 µl/well) was added, which was incubated for 30 min at a temperature of 37 °C. Plates were three times washed with PBST and twice with distilled water, and then 100 µl of substrate-chromogenic mixture (solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 0.25 mg/ml in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 4, 5, with addition of 10 µl of a 33% solution of hydrogen peroxide). The reaction was displayed for 20 min in the dark and stopped by adding 50 µl of 2 M sulfuric acid. The optical density was measured at 450 nm/620 nm.

Indirect ELISA. The recombinant MOMP was adsorbed in a 0.02 M carbonate bicarbonate buffer at a concentration of 2 µg/ml on a 96-well polystyrene plate for high-sorption capacity ELISA (Suzhou Conrem Biomedical Technology Co., China). The plate was incubated for 12 h at 4 °C, then washed three times with PBST and kept in a solution of BSA (10 mg/mL in PBST) for 1 h at 37 °C. After four-fold washings with PBST, the wells were filled with 100 µl of a solution of the conjugate of normal human IgM (IgA) and McAbs to the MOMP in a reaction buffer solution (0.05 M tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 mg/ml BSA, 0.2% Tween-20). The plates were incubated for 30 min at 37 °C and washed 4 times with PBST. After washing, a solution of peroxidase conjugate of monoclonal antibodies to human IgM (IgA) (100 µl/well) was added which was incubated for 30 min at a temperature of 37 °C. The following procedure was similar to the IgM-capture analysis.

Results

Characteristics of biological components. The following biological components were required for synthetic positive controls: monoclonal antibodies against HRP and *Ch. trachomatis* MOMP; purified preparations of human IgA and IgM. Some of these components were obtained by us earlier. The characteristics of the panels of monoclonal antibodies against are shown in Table 1–2. Table 1 presents the results of the study

of the specificity of anti-HRP McAbs – testing of supernatants of hybridomas' clones to: apoenzyme (apoHRP), chemically modified (modHRP) and recombinant (deglycosylated) enzyme (rHRP). McAbs were divided into three groups of specificity: group I was characterized by positive signals when tested for all variants of the enzyme; group II was characterized by positive signals when testing only on native HRP; group III was represented by 1 clone, which was characterized by positive signals when tested for native and chemically modified HRP (195C10). Consequently, the first group of antibodies is directed to the protein part of the antigen, the second group is directed to the carbohydrate residues attached to the HRP, and the third group is specific to the prosthetic group of the enzyme. The composite characteristic of McAbs (ELISA activity, isotype, titre and affinity constant) allowed us to form the

McAbs panel, which is promising for the development of biotechnology for hybrid positive control samples for immunoassay analysis. The characterization of the McAbs by titre and affinity made it possible to assess the prospects for the use of such McAbs in immunoassay. The isotype of antibodies, on the one hand, affects the feasibility of using McAbs in various bioanalytical methods, and, on the other hand, is an important prerequisite for choosing the next method of isolation and antibodies purification. The developed antibody panel included only those with a high titre ($\geq 1 : 400$) and an affinity constant ($\geq 8.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), as well as an intense signal from the indirect ELISA.

Other biological components used to achieve this goal were monoclonal antibodies to the main protein of the *Ch. trachomatis* outer membrane; their characteristics are given in Table. 2.

Table 1
Characteristics of the panel monoclonal antibodies to the horseradish peroxidase

McAbs	OD ¹⁾ in indirect ELISA when testing on				Isotype	Titre ¹⁾	Affinity constant ¹⁾ , 10 ⁹ M ⁻¹	Epitope	Group of epitope specificity
	nHRP	apoHRP	modHRP	rHRP					
192F10	1.542	1.472	1.242	1.117	IgG _{2b}	1 : 400	11.3	P1	I
193C7	1.466	1.561	1.334	1.241	IgG _{2b}	1 : 400	9.0	P3	I
196B7	2.071	2.119	1.815	1.091	IgG ₁	1 : 800	20.0	P2	I
191D5	2.341	2.048	0.050	0.099	IgG _{2a}	1 : 800	20.0	P4.2	II
194H10	1.574	1.120	0.079	0.025	IgG ₃	1 : 800	12.7	P4.1	II
195D5	1.943	1.777	0.033	0.045	IgG _{2b}	1 : 1600	37.4	P4.1	II
197F4	2.348	1.325	0.054	0.031	IgG _{2a}	1 : 800	6.5	P5.1	II
195C10	2.324	0.220	1.042	0.072	IgG _{2a}	—	—	—	III
213B3	1.988	1.544	1.891	1.405	IgG _{2b}	1 : 800	12.0	P1	I
213F7	2.025	1.974	1.744	1.465	IgG ₁	1 : 800	11.5	P2	I
211F9	2.565	2.272	0.063	0.047	IgG ₃	1 : 1600	10.0	P4.2	II
212H8	2.221	2.144	0.047	0.052	IgG _{2a}	1 : 1600	28.5	P4.2	II
214C4	1.994	1.754	0.035	0.034	IgG ₁	1 : 800	19.0	P4.2	II
215B8	1.758	1.621	0.073	0.136	IgG ₁	1 : 400	17.5	P5.3	II
215G7	1.533	1.602	0.035	0.055	IgG ₁	1 : 800	18.2	P4.1	II

Note: ¹⁾ – the average values of the quantities based on the results of the study of hybridoma supernatants in 4 replicates are given ($P < 0.05$).

For isolation and purification of human IgM, the following scheme was used: serum passing through column with immobilized mouse McAbs of another specificity; serum brought into the immunoaffinity column with anti-IgM McAbs; washing the column with phosphate buffer; elution of IgM with magnesium chloride; washing the column with phosphate buffer; transfer of IgM to phosphate buffer on sephadex G-25. This scheme of immunoaffinity allocation and purification of human IgM allows us to get well-reproduced results when using different serums. The original scheme has tangible advantages compared with the schemes based on nonspecific biochemical and physico-chemical methods of isolating this immunoglobulin. It does not require significant amounts of serum, the loss of the target product is minimized, and the technique as a whole is simpler. The degree of purity obtained by this scheme of IgM does not vary from batch to batch and reaches about 100%, which makes possible its use for immunization of animals and immunoassay. Obtaining human IgA was carried out in a fundamentally similar scheme.

Obtaining of synthetic positive controls for the IgM-capture immunoassay. The purpose of the first stage of work was the comparative characterization of various methods of bioconjugation as a method of synthesis of hybrid positive controls for the immunoassay test kits of the IgM-capture modification, based on the evaluation of the biochemical and immunochemical properties of the resulting bioconjugates.

The possibility of detecting by means of ELISA-specific antibodies of different classes can differentiate the primary infectious process and its remission, exacerbation or chronicization of the disease, that is, to conduct a differential diagnosis. This approach is realized when patients are examined for the presence of a humoral immune response to TORCH infections (toxoplasmosis, rubella, cytomegaly, herpes simplex virus infections, and some others) that can infect the fetus and cause developmental defects (Numan et al., 2015; Lu et al., 2016; De Carolis et al., 2017). That is why testing for the presence of specific IgG and IgM antibodies against TORCH-infectious agents is an important diagnostic approach in the mother and child protection system.

Table 2
Characteristics of the panel monoclonal antibodies to *Ch. trachomatis* MOMP

McAbs	OD ¹⁾ in indirect ELISA	Isotype	Titre ¹⁾	Affinity constant ¹⁾ , 10 ⁹ M ⁻¹	Competition with polyclonal antibodies
291B2	2.588	IgG _{2a}	1:800	16.0	—
291F8	2.805	IgG _{2a}	1:1600	16.0	+
293C8	2.496	IgG ₁	1:800	8.0	—
293D2	2.402	IgG ₁	1:800	8.0	—
293F4	2.789	IgG _{2a}	1:1600	16.0	++
294F5	2.602	IgG _{2b}	1:800	8.0	+
296B11	2.407	IgG _{2a}	1:800	8.0	+
296G2	2.890	IgG _{2a}	1:1600	16.0	—
296H8	2.224	IgG _{2a}	1:800	16.0	+

Note: ¹⁾ – the average values of the quantities based on the results of the study of hybridoma supernatants in 4 replicates are given ($P < 0.05$).

Based on literature data and our own experience (Galkin et al., 2013; Dovgan et al., 2016; Yang et al., 2016; Kalayu Yirga et al., 2017), we selected three principal methodological approaches for the synthesis of antibody-antibody conjugates that was evaluated for the synthesis of the appropriate PCs (non-specific IgM/IgA + anti-HRP McAbs): 1) NHS ether-maleimide mediated conjugation on the example of succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) as a cross linker; 2) glutaraldehyde method; 3) periodate conjugation method. The use of the above methodological techniques is possible through the following prerequisites. NHS ether-maleimide conjugate-mediated conjugation is possible with the participation of two biomolecules, one of which has free amino groups, and the other has free sulfhydryl groups (Fig. 1). Obviously, human IgM and mouse monoclonal antibodies have appropriate groups that can be involved in this technique. Glutaraldehyde reacts with ϵ -amino groups of lysine residues of the protein molecule. It is important to note that several reactions occur simultaneously, the result of which is the formation of a product that contains stronger chemical bonds than Schiff simple bases (Hermanson,

2008). The potential possibility of using the trial method is due to the fact that the human IgM molecule contains up to 12% of carbohydrate residues (Nikolayenko et al., 2005). This, in turn, allows for the modification of the IgM molecule to form active aldehyde groups, which will subsequently react with amino groups of antibodies to form the Schiff base. Aldehyde groups in the IgM molecule are formed by oxidation of sodium periodate of their carbohydrate components, amino groups which are pre-blocked or 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, or protonated (Hermanson, 2008). Thus, we should in practice evaluate the acceptability of these techniques for the synthesis of antibody-antibody bioconjugates.

Let's dwell on the choice of McAbs specific to the horseradish peroxidase, which will be used to synthesize the corresponding hybrid (synthetic) controls for ELISA kits. When forming the selection criteria, the following was taken into account. First, among all the immunochemical McAbs characteristics, which were pre-established (Table 1), the affinity of antibodies is the most important, since this property to a large extent depends on the stability of the immunochemical complex, which includes HRP, anti-HRP McAbs, human normal IgM. Secondly, their equally important characteristic of anti-HRP McAbs is their epitope specificity. Monoclonal antibodies directed to the carbohydrate residues of HRP (P4 and P5 epitopic regions) are characterized by higher affinity constants, compared to McAbs that interact with the polypeptide chain of the enzyme (P1, P2, and P3 epitopic regions). At the same time, the constants of affinity for all the McAbs are rather large (10^9 – 10^{10} M⁻¹). It should be noted that the McAbs of both groups of epitopic specificities from the theoretical point of view is promising for the creation of hybrid controls on their basis. Possible limitations include the following. A part of the carbohydrate residues of the enzyme may not be available for interaction with anti-HRP antibodies, since the formation of a peroxidase conjugate is the most important method precisely because of the carbohydrate residues of the enzyme. At the same time, the interaction of anti-HRP antibodies with the protein part of the enzyme may potentially change the enzyme activity.

Based on the foregoing, among the obtained anti-HRP McAbs panel, we have chosen the most affinity antibodies directed both to carbohydrate (McAb 195D5) and to the polypeptide portion (McAb 196B7) of the enzyme of horseradish peroxidase. The further tactic of research was as follows: parallel assessment of synthetic control based on each individual McAb, as well as on the basis of their mixture. At the same time, this unit of research was preceded by a comparative assessment of various methods for obtaining conjugates of murine McAbs to normal human immunoglobulins.

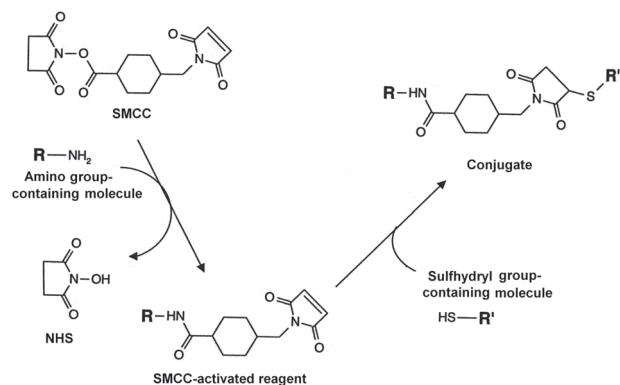


Fig. 1. Principle of SMCC mediated bioconjugation (by Hermanson, 2008)

Fig. 2 shows the results of the isolation of reduced (monovalent) anti-HRP McAbs 196B7 and mercaptoethylamine (MEA) residues by gel filtration on Sephadex G-25 in the production of a NHS-ether-maleimide-mediated method. As seen from the chromatogram, the reduced antibodies emerged from the column in the form of a clear homogeneous molecular weight of the peak. The non-reactive MEA, which is smaller than its molecular weight, descended from the chromatographic column somewhat.

The results of purification of the conjugate obtained by glutaraldehyde, gel filtration on sephacryl S-300 (Fig. 3) were interesting. The re-

sulting conjugate was not homogeneous in molecular weight: it detected at least three groups of conjugated molecules with close molecular weights. Similar studies with the conjugate obtained using the instant method were not carried out, since previous studies indicated the conjugates of the homogeneous composition (Nikolaenko et al., 2005).

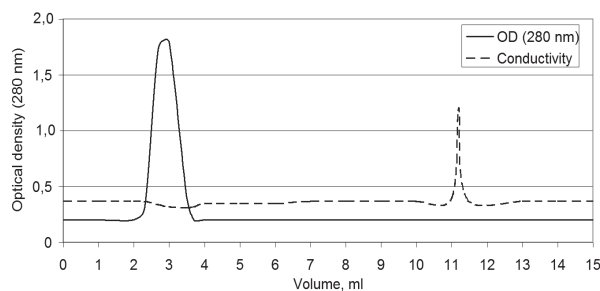


Fig. 2. Isolation of reduced anti-HRP McAbs 196B7 and mercaptoethylamine residues by gel filtration on Sephadex G-25 (NHS ether-maleimide-mediated conjugation)

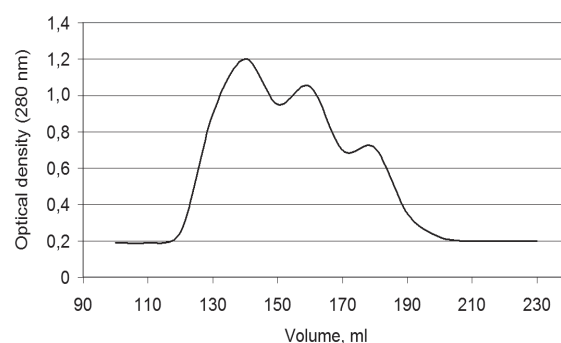


Fig. 3. Final gel filtration purification (Sephacryl S-300) of the antibody-antibody conjugate obtained by the glutaraldehyde method

Hybrid positive controls obtained by different methods were evaluated by titration in an enzyme-linked immunosorbent assay designed to detect IgM antibodies to the *Ch. trachomatis* that we developed earlier. This study was conducted in comparison with titration of high-titrated serum containing IgM specific to *Ch. trachomatis*, as well as negative serum (Fig. 4).

The results of the experiment showed the following: the best result was the PCs obtained by means of SMCC as a cross-linker (NHS-ether-maleimide-mediated conjugation); the decrease in the activity of diluted PCs obtained by other methods was more intense. At the same time, all variants of synthesized PCs were characterized by a more favourable signal in the ELISA than high-titrer IgM-positive serum.

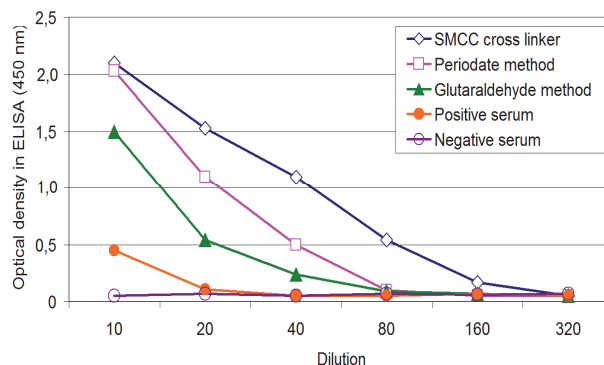


Fig. 4. Titration of hybrid positive controls based on McAb 196B7, obtained by different methods

At the next stage, titration of the hybrid positive controls obtained by the NHS-ester-maleimide-mediated method based on monoclonal antibodies 195D5 and 196B7, as well as their mixtures, was performed

(Fig. 5). Consequently, synthetic controls based on 195D5 (epitope P4.1 on the carbohydrate part of HRP) and 196B7 (epitope P2 on the protein part of HRP) show comparable results, while synthetic control based on a mixture of these McAbs at small dilutions (1 : 10 ... 1 : 20) provides a truly better result. Thus, the use of a McAb mixture aimed at different chemical properties of parts of the horseradish peroxidase for the synthesis of hybrid positive controls is justified.

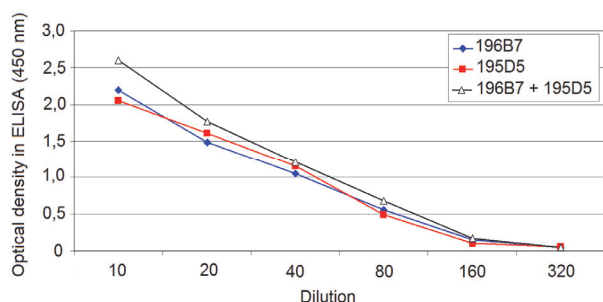


Fig. 5. Titration of synthetic controls obtained by the NHS-ether-maleimide-mediated method on the basis of different McAbs and their mixtures

Assessment of bioconjugation techniques for hybrid positive ELISA controls for detecting IgA and IgM antibodies to *Ch. trachomatis*. The purpose of the second stage of work was to compare the various methods of bioconjugation for the synthesis of hybrid positive controls of immune enzyme kits for detection of IgA and IgM antibodies to *Ch. trachomatis*, based on indirect ELISA. To evaluate the hybrid controls obtained, their immunochemical properties were used.

We have already described in detail the methodological approaches that can be used to synthesize antibody-antibody type conjugates (in this case, nonspecific human IgM/IgA + murine McAb to *Ch. trachomatis* MOMP). The most suitable methods are NHS-ester-maleimide-mediated conjugation with succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) as a cross-linking agent, as well as a reagent method (restorative amination). Thus, at this stage of work it was necessary in practice to evaluate the acceptability of these techniques for the synthesis of synthetic PCs of ELISA kits for detection of IgA and IgM antibodies to *Ch. trachomatis*.

In the synthesis of synthetic positive controls, anti-HPP McAb 296G2 was used. The main prerequisite for the use of this particular antibody was that McAb 296G2 did not show active competition with polyclonal antibodies from serum of *Ch. trachomatis* infected individuals, which, in turn, minimized the likelihood of PC competition for the site of binding to antigen that is sorbed to the solid phase or steric constraints in such interaction.

Hybrid PCs obtained by different methods were evaluated by titration in an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM and IgA antibodies to the urogenital chlamydial pathogen. This study was conducted in comparison with the titration of highly traceable serum containing relevant specific antibodies, as well as negative serum (Fig. 6). The results of the experiment indicated the following: the best result was a PC obtained by means of SMCC as a cross-linker (NHS-ether-maleimide-mediated conjugation). Decrease of immunological activity at dilution of the PC, obtained by the first method, was more intense. At the same time, all variants of the received PCs were characterized by a more favourable signal in the ELISA than high-titred IgM and IgA-positive serums.

Similar studies were carried out after a test of accelerated stability (storage for a week at a temperature of 37 °C). The results of the corresponding tests (Fig. 7) showed that the decrease in the activity of hybrid PCs occurs less slowly than the positive serums containing the corresponding specific antibodies. Such results determine the promising use of the described method for the development and production of immuno-enzyme kits for the diagnosis of urogenital chlamydiosis.

Thus, at this stage of work, methodological approaches to obtaining hybrid positive controls for indirect immunoassay analysis, which are intended to detect IgM and IgA antibodies to the pathogen of urogenital

chlamydia, have been substantiated, namely: NHS-ether-maleimide-mediated conjugation on an example of SMCC as a cross-linking agent and periodate method of bioconjugation. It has been established that hybrid positive controls, obtained by different methods, are characterized by a higher titre compared to high-titre serum containing IgM and IgA antibodies to *Ch. trachomatis*. However, the positive control obtained by means of SMCC was characterized by the best titration profile (a slower decrease in the activity of the ELISA during its dilution) both at the time of its obtaining and after its storage at increased temperature.

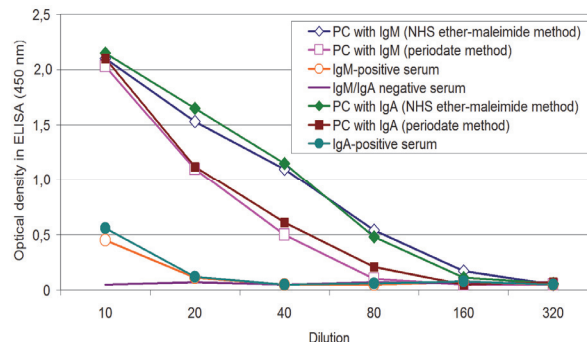


Fig. 6. Titration of synthetic controls obtained by different methods

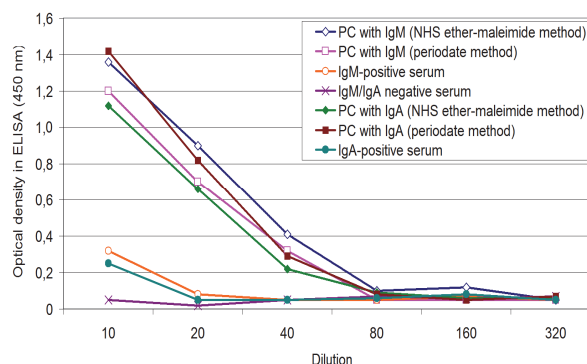


Fig. 7. Titration of hybrid controls obtained by different methods after its storage at 37 °C

Discussion

Among the whole complex of methods of clinical laboratory diagnostics, one of the earliest surgical methods of serologic diagnostics was proposed and introduced, which remain extremely relevant to the present day. Serological methods are used for diagnostics as infectious (bacterial, viral, fungal, parasitic), and non-infectious (oncological, endocrine, allergic) diseases. A significant proportion of diagnostic examinations carried out by the laboratory service relates precisely to serological tests. Serological methods remain an indispensable part of ensuring the sanitary and epidemiological well-being of any country (Cosgun et al., 2018; Di Poto et al., 2018; Riboldi et al., 2018).

It should be noted that since the expiry of the introduction of a laboratory examination of patients with a diagnostic purpose, the range of used methods and technologies has significantly expanded. Scientific and technological progress has considerably increased the possibilities of laboratory diagnosis – almost all chemical and cellular components of biological materials have become available for evaluation, and available methods, technologies and equipment have made it possible to accurately characterize the state of organs and systems of the organism with a fair degree of accuracy. A whole branch of scientific and production activity was formed, which is engaged in development and manufacture of means for clinical laboratory diagnostics. Appropriate scientific and technological developments are the subject of biotechnology. Development of serological diagnostics kits is the subject of immunobiotechnology – a section of biotechnology, which aims to create diagnostic and immune drugs for the diagnosis, treatment and

prevention of human and animal diseases. From the biotechnological position, the starting point for any serological method is the immune response. And hence one of the most important fundamental foundations of the development of serological diagnostic kits is the understanding of the pattern of the immune response to one or another antigen. Given this circumstance, information about the antigenic structure of various proteins and substances of another chemical composition that may have a diagnostic value acquires special significance. Relevant fundamental and applied research is usually preceded by the development of serological tests. Important “tools” in the development of diagnostic products are the actual carriers of the immune response – immunoglobulins. At present, the use of polyclonal antibodies in the total volume of serological studies has significantly decreased – monoclonal antibodies have appeared on the foreground, which have undeniable advantages both from the point of view of their production technology and their biological and immunochemical properties. Hybrid technology has been one of the most used biotechnology for the fourth decade (Mao et al., 2017; Camacho et al., 2018; Cortez et al., 2018). With the advent of genetic engineering, a unique opportunity was created for the purposeful design of molecular genetic systems and the production of recombinant proteins, including diagnostic purpose. Without the use of recombinant protein antigens of various origins, it is not possible to present a modern serological diagnosis. It should be noted that biomolecules used in serological tests (antibodies, antigens, etc.) do not always “work” in their free form. Often the need arises to combine such biomolecules with one another or with substances of chemical origin. To solve such problems, a wide arsenal of methods of bioorganic chemistry is used – the conjugates of biomolecules of different qualitative and quantitative composition are obtained. The development of new and improved existing methods of conjugation of biomolecules is an urgent task of biotechnology.

The works were devoted to the development of biotechnology for hybrid (synthetic) positive control samples for ELISA test-kits. The composition of the immunoassay kits have to include control samples (negative and positive). The latter is either directly to the serum (plasma) of the blood of infected persons, or a solution of specific antibodies derived from such a serum. As already noted, in the case of producing ELISA kits intended to detect specific IgG antibodies, there is no problem in obtaining positive controls, since immunoglobulins of the IgG class are the major protective antibodies in the serum of infected individuals and convulsants in relatively high titres. At the same time, for the large-scale production of immunoassay kits designed for detection of IgA and IgM antibodies, there are limitations on the availability of large amounts of starting material – IgA and IgM positive sera (Galkin & Gorshunov, 2014; Galkin et al., 2015). An adjuvant that solves such a disorder is the usage of hybrid positive controls, including: universal synthetic positive control for IgM capture ELISA – a conjugate of normal human IgM and McAbs to the horseradish peroxidase, as well as synthetic positive control for indirect ELISA, which is designed for detection of IgM and IgA antibodies to *Ch. trachomatis* – a conjugate of normal human IgM (or IgA) and McAbs to the *Ch. trachomatis* MOMP.

Solving the task started with characterization of McAbs to HRP. For further synthesis of hybrid positive controls for IgM-capture ELISA kits the most affinity antibodies directed both to carbohydrate (McAb 195D5) and to the polypeptide portion (McAb 196B7) of HRP were used. These studies were conducted in parallel for three different methods of obtaining antibody-antibody conjugates that are widely used in biochemistry and biotechnology: 1) NHS-ether-maleimide-mediated conjugation, using succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) as a cross-linking agent; 2) glutaraldehyde conjugation method; and 3) periodate conjugation method. It has been shown that the use of SMCC as a cross-linking agent provides the formation of more active conjugates that formed one peak during chromatographic purification. At the same time, the conjugate obtained by the glutaraldehyde method was inhomogeneous – during chromatography, it formed three groups of molecules with different molecular weights. Such results correlate somehow with the data of authors (Raev et al., 2015) who studied the size distribution of carbon nanoparticles that were covalently functionalized by protein macromolecules with glutaraldehyde, as well as with recommendations (Hermanson, 2008).

To obtain hybrid positive controls for the ELISA kits for detecting

IgA and IgM antibodies to *Ch. trachomatis* needed to get McAbs to the *Ch. trachomatis* MOMP and examine their immunochemical properties. To solve this problem, mice of the Balb/c lines and the immunization scheme, such as the one receiving antibody antibodies, were used. As in the case of McAbs of other specificity, the required characteristic of the panel of antibodies obtained was their epitopic specificity. At the same time, analyzing the data of various authors regarding the structure and localization of MOMP in the cytoplasmic membrane, the features of the human humoral immune response to this protein (Wang et al., 2006; Vasilevsky et al., 2016), as well as the results of their own research on the competition of some McAbs with polyclonal sera of patients with urogenital chlamydiosis, it was decided to use the method of epitope mapping based on the technology of phage display (the establishment of directly amino acid residues with which antibodies interact). This study was conducted for the most affinity antibodies that competed (McAbs 291F8 and 293F4) and did not compete (McAb 296G2) with the polyclonal antibodies of the serum at the sites of antigen binding.

Consequently, at the first stage of the work, methodological approaches to obtaining hybrid positive controls for the IgM-capture ELISA kits were theoretically substantiated. It has been established that conjugates of normal human IgM and McAbs to HRP, obtained with NHS-ether-maleimide-conjugation and periodate conjugation method, are homogeneous in molecular weight, whereas the conjugate synthesized by the glutaraldehyde method contains at least three groups of close molecular mass biopolymers. Hybrid positive controls, obtained by different methods, are characterized by a higher titre compared to high titer IgM-positive serum. However, the positive control obtained with the help of the SMCC is characterized by the best titration profile (a slower decrease in the activity of the ELISA during its dilution). The feasibility has also been proved of synthesizing positive controls on the basis of MAT, aimed at the various chemical nature of the epitopes of the hormone peroxidase molecule: carbohydrate residues and the polypeptide chain.

The resulting set of data allowed us to reasonably select McAb 296G2 for use in hybrid positive control for ELISA kits as this antibody in the positive control should not compete with polyclonal antibodies at the site of binding to the sorbed antigen. Further experiments to determine the optimal method for obtaining hybrid controls also confirmed the greater effectiveness of the NHS-ether-maleimide-mediated conjugation method.

Conclusions

The methodological approaches to obtaining synthetic positive controls for the IgM-capture immuno-enzymatic analysis are theoretically substantiated, namely: NHS ether-maleimide-mediated conjugation, using SMCC as a cross-linking agent, glutaraldehyde and periodate bioconjugation methods. It has been established that conjugates of normal human IgM and monoclonal antibodies to the horseradish peroxidase obtained with NHS ether-maleimide-mediated conjugation and periodate method are homogeneous in molecular weight, whereas the conjugate synthesized by the glutaraldehyde method contains at least three groups of close molecular biopolymers masses. Synthetic positive controls, obtained by different methods, are characterized by a higher titre compared to highly-labeled IgM-positive serum. However, the positive control obtained with the help of SMCC is characterized by the best titration profile (more slowly decreasing the activity of the ELISA during its dilution). The methodological approaches to obtaining synthetic positive controls for indirect enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of IgM and IgA antibodies to *Ch. trachomatis* are substantiated, namely: NHS ether-maleimide-mediated conjugation, using SMCC as a cross-linking agent, glutaraldehyde and periodate bioconjugation methods. It was found that synthetic positive controls obtained by different methods are characterized by a higher titre compared to high-level serum containing IgM and IgA antibodies to *Ch. trachomatis*. However, the positive control obtained with SMCC is characterized by the best titration profile (slower decrease in activity of ELISA during its dilution) both at the time of its receipt and after its storage at elevated temperature. The high activity of hybrid positive controls open up opportunities for increasing the efficiency of ELISA kits.

References

- Camacho, S. A., Sobral-Filho, R. G., Aoki, P. H. B., Constantino, C. J. L., & Brolo, A. G. (2018). Zika immunoassay based on surface-enhanced raman scattering nanoprobe. *ACS Sensors*.
- Cortez, M. M., Rojas, G. C., Parkhouse, R. M. E. (2018). The HP10 *Taenia* monoclonal antibody-based ELISA detects a similar protein in the vesicular fluid of *Taenia hydatigena*. *Tropical Animal Health and Production*, 50(3), 697–700.
- Cosgun, Y., Guldemir, D., Coskun, A., Yorbakan, S., Kalaycioglu, A. T., Korukluoglu, G., & Durmaz, R. (2018). The importance of serological and molecular analyses for the diagnosis of measles cases and for meeting elimination targets in Turkey from 2007 to 2015. *Epidemiology and Infection*, 14, 1–6.
- De Carolis, S., Tabacco, S., Rizzo, F., Perrone, G., Garufi, C., Botta, A., Salvi, S., Benedetti Panici, P., & Lanzone, A. (2017). Association between false-positive TORCH and antiphospholipid antibodies in healthy pregnant women. *Lupus*, 961203317741564.
- Di Poto, C., He, S., Varghese, R. S., Zhao, Y., Ferrarini, A., Su, S., Karabala, A., Redi, M., Mamo, H., Rangnekar, A. S., Fishbein, T. M., Kroemer, A. H., Tadesse, M. G., Roy, R., Sherif, Z. A., Kumar, D., & Ransom, H. W. (2018). Identification of race-associated metabolite biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis and hepatitis C virus infection. *PLoS One*, 13(3), e0192748.
- Dovgan, I., Kolodych, S., Koniev, O., & Wagner, A. (2016). 2-(Maleimidomethyl)-1,3-dioxanes (MD): A serum-stable self-hydrolysable hydrophilic alternative to classical maleimide conjugation. *Scientific Reports*, 6, 30835.
- Galkin, O. Y., & Gorshunov, Y. V. (2014). Otsinka metodiv biokoniuhatzii dlia otrymannia syntetychnykh pozytyvnykh kontroliv dlia imunofementnoho analizu modifikatsii "IgM-pastka" [Evaluation of bio-conjugation methods for obtaining of synthetic positive control for IgM-capture ELISA]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University, Biology, Medicine*, 5(2), 85–89 (in Ukrainian).
- Galkin, O. Y., Besarab, A. B., & Lutsenko, T. N. (2017). Characteristics of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG antibodies specific to *Chlamydia trachomatis* heat shock protein (HSP-60). *Ukrainian Biochemical Journal*, 89(1), 22–30.
- Galkin, O. Y., Gorshunov, Y. V., & Besarab, O. B. (2015). Syntetychni pozytyvni kontroli imunofementnykh naboriv dlia vyavlennia IgA ta IgM antytil do *Chlamydia trachomatis* [Synthetic positive controls for ELISA test kits for detection of IgA and IgM antibodies to *Chlamydia trachomatis*]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University, Biology, Medicine*, 6(1), 3–8 (in Ukrainian).
- Galkin, O. Y., Gorshunov, Y. V., Besarab, O. B., & Ivanova, O. M. (2018). Development and characterization of highly informative ELISA for the detection of IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *Ukrainian Biochemical Journal*, 90(3), 49–62.
- Galkin, O. Y., Savchenko, A. A., Nikitina, K. I., & Dugan, O. M. (2013). Obtaining and study of properties of new monoclonal antibodies against human IgE. *Ukrainian Biochemical Journal*, 85(5), 81–87.
- Hermanson, G. T. (2008). *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.
- Holmes, D. A., Purdy, D. E., Chao, D. Y., Noga, A. J., & Chang, G. J. (2005). Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3227–3236.
- Hunsperger, E. A., Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V. C., Sekaran, S. D., Enria, D. A., Pelegriño, J. L., Vázquez, S., Artsob, H., Drebot, M., Gubler, D. J., Halstead, S. B., Guzmán, M. G., Margolis, H. S., Nathanson, C. M., Rizzo, L. N. R., Bessoff, K. E., Kliks, S., & Peeling, R. W. (2009). Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 436–440.
- Kalayu Yirga, S., Ling, S., Yang, Y., Yuan, J., & Wang, S. (2017). The preparation and identification of a monoclonal antibody against citrinin and the development of detection via indirect competitive ELISA. *Toxins (Basel)*, 9(3), e110.
- Kamel, R. M. (2013). Screening for *Chlamydia trachomatis* infection among infertile women in Saudi Arabia. *International Journal Women's Health*, 5, 277–284.
- Lu, B., & Yang, Y. (2016). Detection of TORCH pathogens in children with congenital cataracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(2), 1159–1164.
- Mao, L., Li, W., Zhou, T., Yang, L., Hao, F., Li, J., Zhang, W., Luo, X., & Jiang, J. (2017). Development of a blocking ELISA for Caprine parainfluenza virus type 3. *Journal of Virological Methods*, 250, 59–65.
- Nikolaenko, I. V., Galkin, A. J., Raevskaja, G. E., Donskaja, E. S., Kas'janenko, T. V., Tereshchenko, M. I., & Spivak, N. J. (2005). Poluchenie monoklonalnykh antitel k Fc-fragmentu IgG cheloveka i primenenie imunofementnykh kon'yugatov na ih osnove [Preparation of monoclonal antibodies to Fc-fragments of human IgG and usage of its conjugates in immunoassays]. *Clinical Laboratory Diagnostics*, 11, 8–11 (in Russian).
- Nikolayenko, I. V., Galkin, O. Y., Grabchenko, N. I., & Spivak, M. Y. (2005). Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta*, 2(2), 3–11.
- Numan, O., Vural, F., Aka, N., Alp, M., & Coskun, A. D. (2015). TORCH seroprevalence among patients attending Obstetric Care Clinic of Haydarpaşa Training and Research Hospital affiliated to Association of Istanbul Northern Anatolia Public Hospitals. *Northern Clinics of İstanbul*, 2(3), 203–209.
- Raev, M. B., Khramtsov, P. V., & Bochkova, M. S. (2015). Investigation into size distribution of carbon nanoparticles covalently functionalized with proteins. *Nanotechnologies in Russia*, 10, 140–148.
- Reesink-Peters, N., Ossewaarde, J., Van Der Zee, A. G. J., Quint, W., Burger, M., & Adriaanse, A. (2001). No association of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies and severity of cervical neoplasia. *Sexually Transmitted Infections*, 77(2), 101–102.
- Riboldi, E., Carvalho, F., Romão, P. R. T., Barcellos, R. B., Bello, G. L., Ramos, R. R., de Oliveira, R. T., Júnior, J. P. A., Rossetti, M. L., & Dallegrave, E. (2018). Molecular method confirms canine *Leishmania* infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. *Korean Journal of Parasitology*, 56(1), 11–19.
- Tijssen, P. (1985). Practice and theory of enzyme immunoassays. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 15, 674.
- Vasilevsky, S., Stojanov, M., Greub, G., & Baud, D. (2016). Chlamydial polymorphic membrane proteins: Regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence*, 7(1), 11–22.
- Vazquez, S., Hafner, G., Ruiz, D., Calzada, N., & Guzman, M. G. (2007). Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. *Journal of Clinical Virology*, 39(3), 194–198.
- Wang, Y., Berg, E. A., Feng, X., Shen, L., Smith, T., Costello, C. E., & Zhang, Y. X. (2006). Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Science*, 15(1), 122–134.
- Yang, H., Dai, R., Zhang, H., Li, C., Zhang, X., Shen, J., Wen, K., & Wang, Z. (2016). Production of monoclonal antibodies with broad specificity and development of an immunoassay for microcystins and nodularin in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(22), 6037–6044.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 148–155
doi: 10.15421/021822

Activity of nitrogen fixation and antioxidant enzymes in symbiotic systems *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* for complex treatment with lectin and fungicides

S. Y. Kots, T. P. Mamenko, A. V. Pavlyshche

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 02.02.2018

Received in revised form

27.03.2018

Accepted 29.03.2018

*Institute of Plant Physiology
and Genetics, National
Academy of Sciences of Ukraine,
Vasylkivska st., 31/17, Kyiv,
03022, Ukraine.
Tel.: +38-044-257-51-50.
E-mail: t_mamenko@ukr.net*

Kots, S. Y., Mamenko, T. P., & Pavlyshche, A. V. (2018). Activity of nitrogen fixation and antioxidant enzymes in symbiotic systems *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* for complex treatment with lectin and fungicides. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 148–155. doi:10.15421/021822

The dynamics of the nitrogen fixation activity of the root nodules, the growth of the vegetative mass of plants and the change in the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, ascorbate and guaiacol peroxidase) in different soybean organs for treatment of seeds by rhizobia incubated with lectin, in combination with fungicides have been studied. The objects of the study were symbiotic systems formed with the participation of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Almaz and *Bradyrhizobium japonicum* (standard strain 634b) incubated with lectin. As disinfectants of soybean seeds, the following preparations with fungicidal activity were used – Maxim XL 035 PS, Fever, Standak Top according to one rate of active substance consumption of each preparation specified by the manufacturer. One part of the seeds treated with fungicides was inoculated with pure culture of suspension of rhizobia for one hour (titre of suspension concentration was 10^8 cells/ml). Another part of the seeds treated with fungicides was inoculated with rhizobia suspension, which was previously incubated with a solution of commercial lectin soybean at a concentration of 100 µg/ml. The research was conducted in strictly controlled conditions of a model vegetative experiment using microbiological, physiological, biochemical methods, gas chromatography, spectrophotometry. It was found that processing of soybean seeds with fungicides (Fever and Maxim XL) together with rhizobium inoculation contributed to the preservation of the nitrogen fixation activity of the root nodules and the growth of vegetative mass of plants. Under these conditions, the intensification of the activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase was observed, as well as inhibition of the activity of guaiacol peroxidase in soybean root nodules in the phase of three true leaves and increased activity of all investigated enzymes in the phase of mass flowering. It has been established that the use of complex treatment of seeds by soybean rhizobia incubated with lectin and fungicides leads to an increase in the activity of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase in root nodules in the phase of three true leaves and the growth of the activity of ascorbate peroxidase in the phase of mass flowering. At the same time, the inhibition of the growth of vegetative mass of plants and their symbiotic properties occurred, as evidenced by the decrease in the nitrogen fixation activity of the root nodules for the joint treatment of seeds with fungicides and lectin. A specific reaction of investigated enzymes in the roots and leaves of soybean was shown, which was more pronounced in the phase of three true leaves, indicating the development of a typical antioxidant reaction to a complex treatment, as a kind of stress that is leveled to the phase of mass flowering. The degree of reaction of antioxidant enzymes in the studied symbiotic systems *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* depends on the nature of the active substance fungicides and the manifestation of their joint effect in a complex with rhizobia incubated with lectin.

Keywords: soybean; rhizobia; superoxide dismutase; guaiacol peroxidase; ascorbate peroxidase; symbiosis

Активність азотфіксації та антиоксидантних ферментів у симбіотичних системах *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* за комплексної обробки лектином і фунгіцидами

С. Я. Коць, Т. П. Маменко, А. В. Павлище

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна

Досліджено динаміку азотфіксуючої активності кореневих бульбочок, наростання вегетативної маси рослин та зміни активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, аскорбат- і гуаяколлапероксидази) у різних органах сої за обробки насіння ризобіями, інкубованими з лектином, у комплексі з фунгіцидами. Об'єкти дослідження – симбіотичні системи, утворені за участю сої (*Glycine max*

(L.) Merr.) сорту Алмаз і *Bradyrhizobium japonicum* (штам-стандарт 6346), інкубованих із лектином. Як протруювачі насіння сої використано препарати з фунгіцидною активністю Максим XL 035 PS, Февер, Стандак Топ із розрахунку однієї норми витрат діючої речовини кожного препарату, вказаної виробником. Одну частину обробленого фунгіцидами насіння інокулювали чистою культурою суспензії ризобій протягом однієї години (титр концентрації суспензії становив 10^8 кл./мл). Іншу частину обробленого фунгіцидами насіння інокулювали суспензією ризобій, яка попередньо була інкубована з розчином комерційного лектину сої у концентрації 100 мкг/мл. Дослідження проводили у суворо контрольованих умовах модельного вегетаційного досліду з використанням мікробіологічних, фізіологічних, біохімічних методів, газової хроматографії, спектрофотометрії. Обробка насіння сої фунгіцидами (Февер і Максим XL) спільно з інокуляцією ризобіями сприяла збереженню азотфіксувальної активності корневих бульбочок і наростанню вегетативної маси рослин. За таких умов обробки відбувалась інтенсифікація активності супероксиддисмутази та аскорбатпероксидази, а також пригнічення активності гваяколпероксидази в корневих бульбочках сої у фазу трьох справжніх листків та підвищення активності всіх досліджуваних ферментів у фазу масового цвітіння. Комплексна обробка насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, і фунгіцидами, підвищувала активність супероксиддисмутази та гваяколпероксидази в корневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків та сприяла зростанню активності аскорбатпероксидази у фазу масового цвітіння. При цьому відбувалось пригнічення наростання вегетативної маси рослин та їх симбіотичних властивостей, що проявлялось у зниженні азотфіксувальної активності корневих бульбочок за спільної обробки насіння фунгіцидами та лектином. Показано специфічну реакцію досліджуваних ферментів у коренях і листках сої, яка була більш вираженою у фазу трьох справжніх листків. Це свідчить про розвиток типової антиоксидантної реакції на комплексну обробку як своєрідний стрес, який нівелювався до фази масового цвітіння. Ступінь реакції досліджуваних антиоксидантних ферментів у симбіотичних системах *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* залежав від характеру діючої речовини фунгіцидів та прояву їх впливу в комплексі з ризобіями, інкубованими з лектином.

Ключові слова: соя; ризобії; супероксиддисмутаза; гваяколпероксидаза; аскорбатпероксидаза; симбіоз

Вступ

Соя – одна з найбільш високорентабельних передових культур у сільськогосподарському виробництві України та світу в цілому, цікавість до вирощування якої з кожним роком інтенсивно зростає, що відмічається зростанням посівних площ і урожайності насіння (Sergienko, 2012; Kobak et al., 2016). Одна з причин недобору врожаю сої – ураження її фітопатогенними мікроорганізмами – втрати врожаю зерна від хвороб досягають 30–40%. Тому важлива складова технології вирощування сої – захист її від фітопатогенних організмів (Sergienko, 2012).

Все більша увага дослідників спрямовна до вирішення питання порушення рівноваги в системі «рослина – патоген – довкілля» (Kobak et al., 2016). У період вегетації рослин варто проводити інтегровану систему захисту посівів, залежно від їх фітосанітарного стану. Це гармонійно поєднані усі сучасні методи захисту: організаційно-господарські, агротехнічні, імунологічні, біологічні та хімічні засоби (Marco, 2013). Разом із тим, одна з основних проблем захисту рослин – не стільки використання хімічних засобів захисту рослин, скільки пошук шляхів зниження рівня їх шкодоцильності для навколишнього середовища (Mohammadi et al., 2012; Petrichenko & Kots, 2014).

Один із важливих факторів захисту рослин сої від хвороб і шкідників – обробка насіння протруйниками в комплексі із застосуванням інокулянтів на основі мікросимбіонтів *B. japonicum*, які, у свою чергу, сприяють підвищенню стресостійкості та продуктивності рослин (Nikolaevsky et al., 2017). Рослини сої з активним симбіотичним апаратом стійкіші до ураження широким спектром хвороб, а чітке поєднання всіх заходів, направлених на оптимізацію симбіозу, сприяє формуванню потужного симбіотичного апарату, поліпшенню фітосанітарного стану посівів, підвищенню родючості ґрунту та отриманню високих урожаїв сої з найкращими якісними показниками (Nikolaevsky et al., 2017).

Розкриття особливостей формування захисних реакцій у симбіозі бобових рослин із штамами бульбочкових бактерій важливе для пошуку ефективних симбіотичних систем, здатних реалізувати свій адаптивний потенціал за дії стрес-факторів, а розширення та поглиблення досліджень у цьому напрямку передбачає удосконалення існуючих і створення нових фізіолого-біохімічних засобів регуляції їх адаптаційної здатності у стресових умовах (Mohammadi et al., 2012).

Інвазія ризобій у клітини корневих волосків бобових подібна до процесу патогенезу – це своєрідний стрес для рослини, який може викликати інтенсифікацію окисних процесів та підвищення вмісту активних форм кисню (АФК) (Iturbe-Omaetxe et al., 2001; Zhiznevskaya, 2001; Matamoros et al., 2003). У свою чергу, АФК можуть виступати як сигнальні молекули, що беруть участь в активації захисних систем за дії стресу, зокрема, індукувати синтез ферментів антиоксидантів (Mittler, 2002). Основний ініціатор вільнорадикального окиснення ліпідів мембран – супероксид, що ге-

нерується у багатьох спонтанних і ензиматичних реакціях окиснення, причому продуктами його вторинного перетворення можуть бути синглетний кисень, гідроксильний радикал, пероксид водню, органічні пероксиди та їх радикали (Shao et al., 2008; Sharma et al., 2012). Тому ключовий ензим захисту живих організмів від окисної деструкції – супероксиддисмутаза (СОД), яка каталізує утворення пероксиду водню та кисню з аніон-радикалів супероксиду (Raychaudhuri & Deng, 2000; Alser et al., 2002). Для утилізації пероксиду водню (H_2O_2) включається комплекс ензимів: каталаза, родина пероксидаз – аскорбатпероксидаза (АПО) та гваяколпероксидаза (ГПО). У літературі пероксидазну реакцію розглядають як відповідь на проникнення ризобій у рослинну клітину (Zhiznevskaya, 2001). Водночас пероксидази можуть нести достатньо інформації про фізіологічний стан рослини та слугувати критерієм стійкості до дії стресових чинників (Matamoros et al., 2003).

Існує три ізоформи СОД (CuZn-СОД, Fe-СОД і Mn-СОД) у рослинних клітинах, які відрізняються наявністю металу в активному центрі ензиму. Всі вони виявлені в рослинних фракціях корневих бульбочок бобових рослин (Moran et al., 2003; Rubio et al., 2004). Різна локалізація ізоензимів СОД у тканинах корневих бульбочок зумовлює їх специфічні функції. Зокрема, CuZn-СОД переважає в апексі бульбочок, особливо в інфекційних нитках, у цитозолі, розташованому поряд із клітинними оболонками, та апопласті. Функція CuZn-СОД може бути пов'язана з ростом клітинних стінок у меристемах, інфекційних нитках і апопласті, а також із відповіддю рослин на бактеріальну інфекцію. Mn-СОД присутній в інфікованих клітинах корневих бульбочок і бере участь у процесах, пов'язаних із захистом і функціонуванням симбіозу у зрілих бульбочках. Fe-СОД локалізований винятково у стромі хлоропластів, його функції менш за все вивчено у бобових рослин. Бактерії містять Mn-СОД у цитозолі та CuZn-СОД у периплазматичному просторі. Ці ензими кодується відповідними бактеріальними *sodA* і *sodC* генами (Moran et al., 2003; Rubio et al., 2004).

АПО – ключовий фермент аскорбат-глутатионового циклу утилізації H_2O_2 , основа функціонування корневих бульбочок (Dalton et al., 1993). В інфікованих клітинах фермент захищає леггемоглобін та інші білки від H_2O_2 , тоді як у паренхімі клітин бульбочок він бере участь у створенні дифузійного бар'єру для кисню, контролюючи таким чином його надходження в інфіковану зону (Schmitz et al., 1997; Dalton et al., 1998).

У рослинних клітинах існує так званий III клас пероксидаз, які використовують як субстрати похідні фенолів. Ще їх називають неспецифічними чи класичними. Вони містяться у вакуолях і цитоплазмі, залучені до великої кількості процесів у рослинних клітинах, зокрема, лігніфікації, обробковиння, катаболізму ауксину, захисту проти дії патогенів і окисного стресу (Erofeeva, 2015; Parsiavash et al., 2015). До них відносять і ГПО.

Важливу роль у формуванні захисної відповіді рослин за дії стресових чинників біотичної та абіотичної природи відіграють поліфункціональні білки – фітолектини (Baboshia, 2008; Hivrale &

Ingale, 2013). Лектини здатні оборотно та неспецифічно зв'язувати вуглеводні залишки різної хімічної природи, завдяки чому взаємодіють із поверхневими вуглеводами бактеріальної клітини під час утворення бобово-ризобіального симбіозу (Hoff et al., 2009; Kutyshenko, 2014). Разом із цим, саме лектин-вуглеводна взаємодія забезпечує зв'язування бактерій і викликає несумісну взаємодію партнерів, індукуючи захисні механізми рослин на ураження патогеном (Chrispeels & Raikhel, 1991; Lehotzky et al., 2010).

Фізіологічна дія лектинів не обмежується лише властивостями лектинів зв'язувати вуглеводні залишки. Їх розглядають як сигнальні молекули, здатні індукувати складний ланцюг внутрішніх перетворень у клітині та її відповідь (Owens et al., 2001; Kutyshenko, 2014). Припускають, що характерна особливість структури рослинних лектинів – це наявність центрів гідрофобного зв'язування, що вказує на наявність у них самостійних сайтів, які відповідають за гідрофобну взаємодію з молекулами неуглеводної природи, внаслідок чого вони можуть активно включатися в систему гормональної регуляції процесів росту та розвитку рослин (Moreira et al., 1991; Hoff et al., 2009). Зокрема, маючи два центри зв'язування, лектин одним із них вибірково взаємодіє з кислими ізоформами пероксидази, а другим – із хітином. У відповідь на інфікування патогенами в рослинах активуються кислі ізоформи пероксидази (аніонні), які в комплексі з лектином виконують захисну функцію (Hoff et al., 2009; Kutyshenko, 2014).

Численними дослідженнями показано, що за використання екзогенної обробки лектинами (передпосівна обробка насіння чи обприскування рослин після вегетації) змінюються ростові процеси та метаболізм рослин (Owens et al., 2001), азотфіксувальних мікроорганізмів (Kutyshenko, 2014), фітопатогенних грибів (Hoff et al., 2009), індукуються формування захисних реакцій рослин на дію стресових чинників (Baboshia, 2008). Як вважає Kutyshenko (2014), це розкриває перспективність практичного використання таких білків як природних регуляторів росту.

У зв'язку з вищевказаним мета нашої роботи – дослідити зміни активності АПО та ГПО в різних органах рослин сої за обробки насіння ризобіями, інкубованими з лектином спільно з фунгіцидами. Це дозволить з'ясувати додаткові аспекти ролі цього білка у формуванні захисних реакцій симбіотичних систем за участю сполук із фунгіцидною дією.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкти дослідження – симбіотичні системи, утворені за участю сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Алмаз і *B. japonicum* (штам-стандарт 6346), інкубовані з лектином. Як протруювачі насіння сої використали препарати з фунгіцидною активністю Февер (Bayer CropScience AG, Німеччина), Максим XL (Syngenta, Швейцарія), Стандак Топ (BASF, Німеччина). Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на твердому манітно-дріжджовому середовищі протягом 7 діб за 26–28 °С.

Перед посівом насіння стерилізували 70% розчином етанолу та промивали проточною водою. Потім насіння сої обробляли розчинами фунгіцидів – Максим XL 035 PS (флудіоксоніл, 25 г/л, металаксил, 10 г/л), Февер (протіоконазол, 300 г/л), Стандак Топ (фіпроніл, 250 г/л, тіофанат-метил, 225 г/л, піраклостробін, 25 г/л) із розрахунку однієї норми витрат діючої речовини кожного препарату, вказаної виробником. Одну частину обробленого фунгіцидами насіння інокулювали чистою культурою суспензії ризобій протягом однієї години (титр концентрації суспензії становив 10^8 кл./мл). Іншу частину обробленого фунгіцидами насіння інокулювали суспензією ризобій, яка попередньо була інкубована з розчином комерційного лектину сої («Лектиногест», м. Львів) у концентрації 100 мкг/мл. Тривалість інкубації з лектином становила 20 годин за температури 28 °С.

Рослини вирощували у 4-кілограмових посудинах у піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту за природного освітлення та оптимального водозабезпечення (70% від повної вологості). Контролем слугував варіант з інокуляцією насіння ризобіями без використання лектину та без

обробки фунгіцидами. Азотфіксувальну активність (АФА) визначали ацетиленовим методом (Hardy, 1968) на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Розділення газів проводили на колонці (Supelco Porapak N) за температури термостата 55 °С і детектора – 150 °С. Газом-носієм був гелій (20 мл/хв). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 см³. Як стандарт використовували чистий етилен (Sigma-Aldrich, № 536164, США). Наростання вегетативної маси рослин контролювали ваговим методом. Вимірювання показників АФА, надземної маси та маси кореня проводили у 6-разовій повторності.

Для отримання ензимного екстракту наважку рослинного матеріалу (0,2 г) розтирали у ступці з 4 мл охолодженого 50 мМ фосфатного буферу (pH 7,5), який містив 2 мМ етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА), 1 мМ фенілметилсульфонілфторид, 5 мМ β-меркаптоетанол і 1% (в/о) полівінілпіролідон. Гомогенат центрифугували за 10 000 об/хв протягом 20 хв за 4 °С. Супернатант використовували для визначення активності ензимів за допомогою спектрофотометра «Smart Spec Plus» (США).

Активність АПО (КФ 1.11.1.11) визначали за зменшенням оптичної густини за довжини хвилі 290 нм протягом хвилини у результаті окиснення аскорбату ($\epsilon = 2,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) (Nakano & Asada, 1981). Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 0,2 мМ аскорбат, 0,1 мМ H₂O₂. Реакцію ініціювали додаванням 150 мкл супернатанта. Активність ГПО (КФ 1.11.1.7) – за збільшенням оптичної густини за 470 нм протягом хвилини у результаті окиснення гваяколу ($\epsilon = 26,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) (Egley et al., 1983). Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 0,5% гваякол, 10 мМ H₂O₂. Реакцію ініціювали додаванням 50 мкл супернатанта. Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали за здатністю ензиму інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолію (Rayschaubi & Deng, 2000). Реакційна суміш містила 50 мМ фосфатний буфер (pH 7,8), 13 мМ метіонін, 2 мкМ рибофлавін, 63 мкМ р-нітросиній тетразолій, 0,1 мМ ЕДТА і 100 мкл ферментного екстракту. Реакція тривала протягом 15 хвилин за інтенсивності світла 70 мкмоль квантів/(м² • с) освітлення флуоресцентними лампами потужністю 15 Вт. Оптичну густину вимірювали за 560 нм. Вміст загального розчинного протеїну у ферментному екстракті визначали за Bradford (1976). Активність ферментів визначали у 4-кратній повторності. Одержані дані оброблені статистично, значення $P < 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. У таблицях 1–4 і на рисунках 1–4 наведено середні арифметичні значення та їх стандартні похибки (SE).

Результати

Інокуляція насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, сприяла підвищенню ефективності симбіотичного апарату. Це проявлялось у стимуляції АФА корневих бульбочок, яка зростала за дії лектину на 20% порівняно з контролем у фазу трьох справжніх листків та масового цвітіння (рис. 1). Разом із тим, у фазу бутонізації не зафіксовано істотної різниці АФА між варіантами з використанням лектину та без його участі.

Обробка насіння сої фунгіцидами по-різному впливала на процеси функціонування симбіотичного апарату в рослин на фоні бактеризації ризобіями. Серед усіх досліджуваних препаратів із фунгіцидною активністю у варіанті з обробкою насіння фунгіцидом Стандак Топ зафіксоване найбільше пригнічення АФА корневих бульбочок, особливо у фазу трьох справжніх листків (на 60% порівняно з контрольними рослинами, рис. 1).

Передпосівна обробка насіння фунгіцидами Февер і Максим XL проявляла меншу токсичну дію на АФА корневих бульбочок. У фазу трьох справжніх листків у варіантах з обробкою цими препаратами спостерігали незначне підвищення АФА, показники якої у наступні фази онтогенезу дещо знижувались порівняно з контрольним варіантом (за дії Максиму XL), або були в межах похибки досліді (за дії Феверу). Обробка насіння сої досліджуваними фунгіцидами на фоні бактеризації *B. japonicum*, інкубованих із лек-

тином, викликала пригнічення ефективності роботи симбіотичного апарату, про що свідчить суттєве зниження процесів азотфіксації корневих бульбочок порівняно з рослинами контрольного варіанта (рис. 1). Зокрема, у варіанті з обробкою насіння Стандак Топом і ризобіями, інкубованими з лектином, виявлене найбільше зниження АФА (до 70%) корневих бульбочок упродовж онтогенезу.

Водночас, оброблення насіння сої фунгіцидами Февер і Максим XL спільно з інокуляцією ризобіями, інкубованими з лектином, чинила менш виражений токсичний вплив на симбіотичний апарат. У фазі трьох справжніх листків і бутонізації АФА корневих бульбочок знижувалась порівняно з контролем (на 40% – Февер та 47% – Максим, тоді як у фазу цвітіння – на 25% і 27%, відповідно).

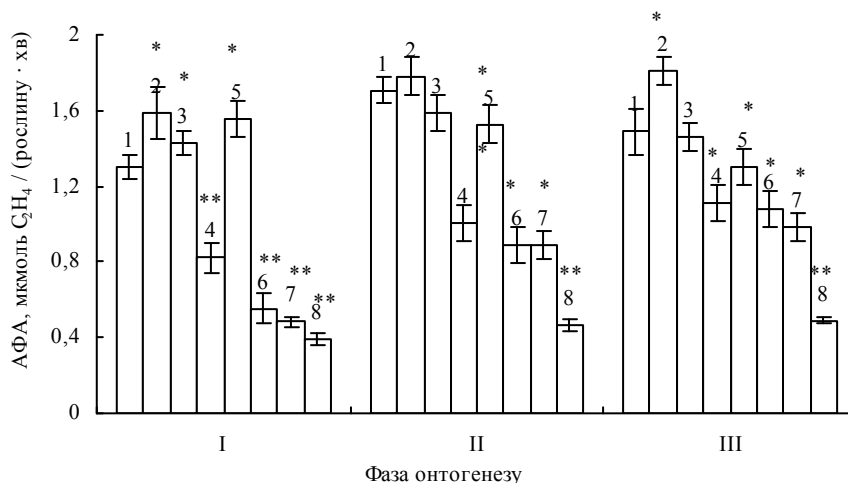


Рис. 1. Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованими з лектином, спільно із фунгіцидами на азотфіксуючу активність (АФА) корневих бульбочок у фазу трьох справжніх листків (I), бутонізації (II) та масового цвітіння (III) ($n = 6$, $x \pm SE$): тут і на рис. 2–4: 1 – ризобії (контроль), 2 – (ризобії + лектин)_i, 3 – ризобії + Максим XL, 4 – (ризобії + лектин)_i + Максим XL, 5 – ризобії + Февер, 6 – (ризобії + лектин)_i + Февер, 7 – ризобії + Стандак Топ, 8 – (ризобії + лектин)_i + Стандак Топ; i – інкубація компонентів протягом 20 годин за 28 °С; дані порівняно з контролем вірогідні за * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$

У рослин, насіння яких піддавали обробці фунгіцидами та інокулювали суспензією ризобій, інкубованих із лектином, відбулось пригнічення ростових процесів у фазі трьох справжніх листків і бутонізації (табл. 1). У фазу цвітіння такий ефект впливу комплексної обробки вже був не так сильно виражений. Найбільшу токсичну дію на наростання надземної маси та маси кореневої системи чинив подібний комплекс із протруйником Стандак Топ. У фазу трьох справжніх листків ці показники були нижчими до 40% від контролю, а у фазу бутонізації – до 30%. Поєднання подібного комплексу з фунгіцидом Максим викликало зниження кореневої маси рослин сої на 29% порівняно з контрольними рослинами у фазу трьох справжніх листків. У фазу бутонізації рослини цього

варіанта досліджу характеризувались нижчою масою як надземних органів (на 12%), так і кореневої системи (на 16% порівняно з контролем). Лише комбінація обробки насіння Февером спільно з ризобіями, інкубованими з лектином, не впливала на досліджувані показники. У варіантах досліджу без використання лектину не зафіксовано подібного інгібувального ефекту від досліджуваних фунгіцидів на ростові параметри рослин (табл. 1). Інокуляція сої ризобіями, інкубованими з лектином, індукувала різку інтенсифікацію активності СОД у корневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків, майже удвічі порівняно з контролем (табл. 2). У фазу масового цвітіння активність ферменту не суттєво зростала, однак була на 23% вищою за рівень контрольних рослин.

Таблиця 1

Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованими з лектином, спільно з фунгіцидами, на наростання вегетативної маси рослин (г/рослину, $n = 6$, $x \pm SE$)

Варіант	Фаза онтогенезу					
	трьох справжніх листків		бутонізації		масового цвітіння	
	надземна маса	маса кореня	надземна маса	маса кореня	надземна маса	маса кореня
ризобії (контроль)	3,52 ± 0,21	2,71 ± 0,18	3,63 ± 0,25	2,71 ± 0,21	4,80 ± 0,28	2,50 ± 0,18
(ризобії + лектин) _i	3,87 ± 0,30*	2,58 ± 0,20*	3,91 ± 0,22*	3,55 ± 0,14**	5,70 ± 0,36*	4,07 ± 0,33***
ризобії + Февер	3,52 ± 0,14	2,46 ± 0,22*	3,60 ± 0,28	3,48 ± 0,27**	5,54 ± 0,22*	3,53 ± 0,29**
ризобії + Максим XL	3,49 ± 0,33	2,60 ± 0,19*	4,48 ± 0,33**	3,30 ± 0,27**	4,70 ± 0,16	4,66 ± 0,29***
ризобії + Стандак Топ	3,11 ± 0,17*	2,11 ± 0,17**	3,30 ± 0,14*	3,06 ± 0,28**	4,93 ± 0,13	3,19 ± 0,29**
(ризобії + лектин) _i + Февер	3,41 ± 0,27	2,26 ± 0,18**	3,43 ± 0,19*	2,40 ± 0,23*	4,83 ± 0,23	3,10 ± 0,21**
(ризобії + лектин) _i + Максим XL	3,18 ± 0,17*	1,94 ± 0,08**	3,20 ± 0,12*	2,28 ± 0,18*	5,15 ± 0,29*	2,68 ± 0,25
(ризобії + лектин) _i + Стандак Топ	2,25 ± 0,22***	1,71 ± 0,09***	2,46 ± 0,19***	2,25 ± 0,19*	4,24 ± 0,32*	2,24 ± 0,11*

Примітка: тут і в табл. 2–4 i – інкубація компонентів протягом 20 годин за 28 °С; дані порівняно з контролем вірогідні за * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

Обробка насіння сої фунгіцидами спільно з ризобіями спричиняла підвищення активності СОД у корневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків. За таких умов обробки активність ферменту не суттєво зростала у фазу масового цвітіння. Подібну тенденцію зміни активності СОД у корневих бульбочках зафіксовано за комплексної обробки насіння фунгіцидами спільно з ризобіями, інкубованими з лектином. Динаміка активності СОД за комплексної обробки насіння характеризувалась суттєвим зростанням у фазу трьох справжніх листків і незначним у фазу масового цвітіння, незалежно від характеру діючої речовини фунгіциду та їх спільного впливу з ризобіями, інкубованими з лектином.

Інокуляція сої ризобіями, інкубованими з лектином, спричиняла підвищення активності АПО в корневих бульбочках, порівняно з контролем у фазі трьох справжніх листків і масового цвітіння (табл. 3). При цьому ми не зафіксували суттєвих змін активності ГПО (у межах похибки досліджу) (табл. 4).

Обробка насіння сої препаратами з фунгіцидною дією на фоні бактеризації ризобіями індукувала підвищення активності АПО та різке пригнічення активності ГПО у корневих бульбочках порівняно з контрольними рослинами у фазу трьох справжніх листків (табл. 3, 4). У фазу масового цвітіння, відбувалась інтенсифікація активності АПО та наближення рівня активності ГПО до контролю.

Таблиця 2

Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованого з лектином, спільно із фунгіцидами, на активність супероксиддисмутази (СОД) у кореневих бульбочках (од. а./мг білка, $n = 4$, $x \pm SE$)

Варіант	Фаза онтогенезу	
	три справжні листки	масового цвітіння
ризобії (контроль)	24,3 $\pm$ 1,2	20,4 $\pm$ 1,2
(ризобії + лектин) ₁	46,5 $\pm$ 3,1***	25,1 $\pm$ 1,5*
ризобії + Февер	43,2 $\pm$ 2,6***	23,8 $\pm$ 1,4*
ризобії + Максим XL	40,4 $\pm$ 3,6***	23,3 $\pm$ 1,4*
ризобії + Стандак Топ	35,5 $\pm$ 1,5**	26,9 $\pm$ 1,6*
(ризобії + лектин) ₁ + Февер	33,3 $\pm$ 1,6**	22,9 $\pm$ 1,4*
(ризобії + лектин) ₁ + Максим XL	38,8 $\pm$ 3,8**	24,5 $\pm$ 1,5*
(ризобії + лектин) ₁ + Стандак Топ	33,9 $\pm$ 2,5**	23,1 $\pm$ 1,4*

Таблиця 3

Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованого з лектином, спільно із фунгіцидами, на активність аскорбатпероксидази (АПО) у кореневих бульбочках (мкмоль аскорбату/мг білка $\cdot$ хв, $n = 4$, $x \pm SE$)

Варіант	Фаза онтогенезу	
	три справжні листки	масового цвітіння
ризобії (контроль)	0,038 $\pm$ 0,009	0,096 $\pm$ 0,018
(ризобії + лектин) ₁	0,091 $\pm$ 0,020***	0,155 $\pm$ 0,018**
ризобії + Февер	0,114 $\pm$ 0,006***	0,191 $\pm$ 0,016***
ризобії + Максим XL	0,115 $\pm$ 0,014***	0,140 $\pm$ 0,022**
ризобії + Стандак Топ	0,217 $\pm$ 0,020***	0,356 $\pm$ 0,040***
(ризобії + лектин) ₁ + Февер	0,039 $\pm$ 0,006	0,261 $\pm$ 0,030***
(ризобії + лектин) ₁ + Максим XL	0,089 $\pm$ 0,012***	0,194 $\pm$ 0,016***
(ризобії + лектин) ₁ + Стандак Топ	0,108 $\pm$ 0,011***	0,260 $\pm$ 0,030***

Таблиця 4

Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованого з лектином, спільно з фунгіцидами, на активність гваяколпероксидази (ГПО) у кореневих бульбочках (мкмоль гваяколу/мг білка $\cdot$ хв, $n = 4$, $x \pm SE$)

Варіант	Фаза онтогенезу	
	три справжні листки	масового цвітіння
ризобії (контроль)	0,145 $\pm$ 0,011	0,283 $\pm$ 0,027
(ризобії + лектин) ₁	0,162 $\pm$ 0,010*	0,204 $\pm$ 0,014*
ризобії + Февер	0,078 $\pm$ 0,018**	0,225 $\pm$ 0,007*
ризобії + Максим XL	0,046 $\pm$ 0,008***	0,173 $\pm$ 0,013**
ризобії + Стандак Топ	0,041 $\pm$ 0,008***	0,266 $\pm$ 0,030*
(ризобії + лектин) ₁ + Февер	0,151 $\pm$ 0,010*	0,176 $\pm$ 0,016**
(ризобії + лектин) ₁ + Максим XL	0,268 $\pm$ 0,011***	0,173 $\pm$ 0,014**
(ризобії + лектин) ₁ + Стандак Топ	0,072 $\pm$ 0,013**	0,177 $\pm$ 0,020**

Обробка насіння сої фунгіцидами Максим XL і Стандак Топ спільно з ризобіями, інкубованими з лектином, спричинила підвищення активності АПО в кореневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків (табл. 3). У варіанті з подібною обробкою за використання фунгіциду Февер активність ферменту в кореневих бульбочках сої перебувала на рівні контрольних рослин. У фазу масового цвітіння його активність зростала в усіх варіантах з обробкою насіння досліджуваними фунгіцидами та інокуляцією *B. japonicum*, інкубованими з лектином.

Обробка насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, у комплексі з фунгіцидом Максим XL спричиняла підвищення активності ГПО в кореневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків (табл. 4). За таких умов вирощування рослин та використання обробки насіння фунгіцидом Февер активність ферменту була на рівні контрольних рослин, тоді як за дії Стандак Топу – знижувалась. У фазу масового цвітіння в усіх варіантах з обробкою насіння досліджуваними фунгіцидами спільно з ризобіями, інкубованими з лектином, активність ГПО у кореневих бульбочках знижувалась.

За інокуляції насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, активність СОД у коренях зростала у фазу трьох справжніх листків і досягала рівня контрольних рослин у фазу масового цвітіння (рис. 2). Обробка насіння сої фунгіцидами спільно з інокуляцією

B. japonicum викликала підвищення активності ферменту в коренях порівняно з контролем у фазу трьох справжніх листків за дії Максиму (на 97%) та Феверу (на 23%). Однак до зниження його активності за дії Стандак Топу на 23%. У фазу масового цвітіння за таких умов обробки насіння активність ферменту в коренях сої знижувалась, особливо різко за дії Стандак Топу (на 42%), Феверу (на 35%), та незначно за дії Максиму (на 15%) (рис. 2).

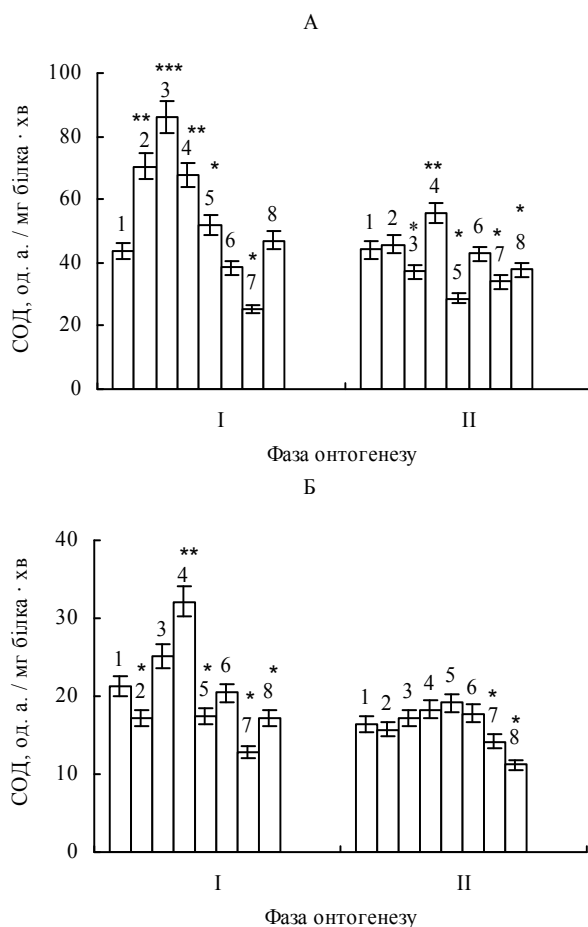


Рис. 2. Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованими з лектином, спільно із фунгіцидами, на активність супероксиддисмутази (СОД) у коренях (А) і листках (Б) у фазу трьох справжніх листків (I) і масового цвітіння (II): $n = 4$, $x \pm SE$

Використання лектину як компонента інокуляційної суспензії спільно з обробкою насіння сої фунгіцидами індукувало підвищення активності СОД у коренях рослин у фазу трьох справжніх листків за дії Максиму (на 55%) та не викликала суттєвих змін активності ферменту порівняно з контролем за дії Феверу та Стандак Топу. У фазу масового цвітіння тенденція активності СОД залишалась майже на такому ж рівні, як у фазу трьох справжніх листків, порівняно з контрольними рослинами.

Інокуляція насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, викликала незначне зниження активності СОД у листках у фазу трьох справжніх листків та наближення рівня активності ферменту до контрольного у фазу масового цвітіння (рис. 2).

Використання обробки насіння сої фунгіцидами спільно з інокуляцією ризобіями спричиняло незначне підвищення активності ферменту в листках за дії Максиму (на 18%), зниження його активності за дії Феверу (на 18%) та, особливо, за дії Стандак Топу (на 39%), порівняно з контролем у фазу трьох справжніх листків. Водночас у фазу масового цвітіння активність СОД у листках не суттєво відрізнялась від контролю за обробки Максимом і Февером і знижувалась за дії Стандак Топу.

Комплексна обробка насіння сої фунгіцидами і ризобіями, інкубованими з лектином, спричиняла підвищення активності СОД у листках у варіанті з Максимом (до 50%), зниження – за викорис-

тання Стандак Топу (до 32%) і незначних змін порівняно з контролем у варіанті з Февером у фазу трьох справжніх листків. У фазу масового цвітіння подібний комплекс обробки за використання ризобій, інкубованих із лектином, спричинив зниження активності СОД у листках за дії Стандак Топу (до 20%) і відсутність помітних змін активності ферменту за дії Максиму та Феверу.

Обробка насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, не викликала суттєвих змін активності АПО в коренях порівняно з контрольними рослинами (рис. 3). Водночас активність ферменту в листках за дії лектину зростала у фазу трьох справжніх листків і була на рівні контролю у фазу масового цвітіння.

У симбіотичних системах, утворених за участю сої, інокульованої *B. japonicum*, та за обробки насіння фунгіцидами, спостерігали підвищення активності ферменту в коренях за використання Максиму XL і зниження його активності за дії Феверу та Стандак Топу у фазу трьох справжніх листків (рис. 3). Реакція АПО в листках на обробку протилежна до зміни її активності в коренях: зростала за використання Феверу та Стандак Топу та знижувалась у варіанті з Максимом XL. У фазу масового цвітіння рівень активності ферменту в коренях дещо зростав або був у межах похибки досліді, тоді як його активність у листках знижувалась у всіх досліджуваних симбіотичних системах. Виняток – варіант із обробкою фунгіцидом Февер: активність ферменту знижувалась у коренях і листках порівняно з контрольними рослинами.

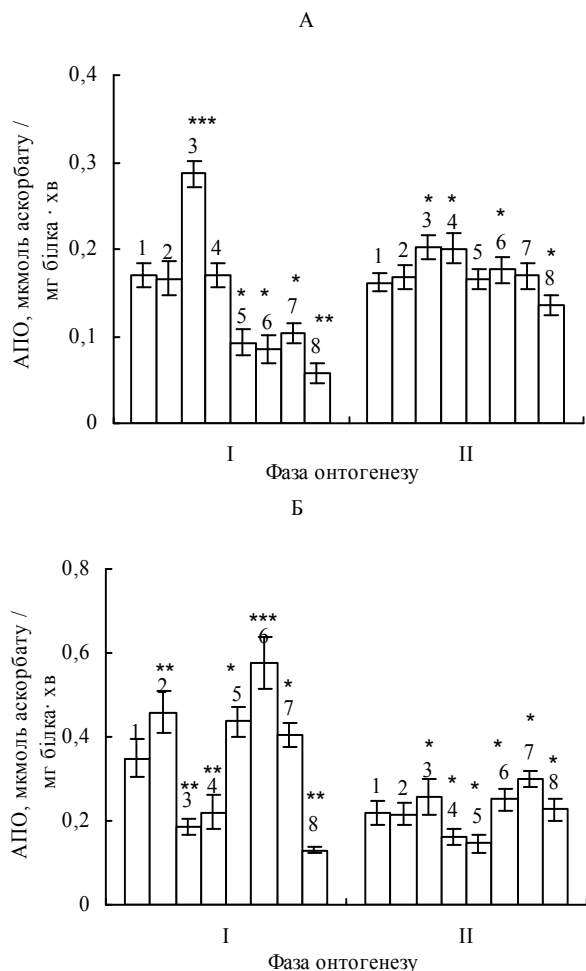


Рис. 3. Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованими з лектином, спільно з фунгіцидами, на активність АПО у коренях (А) і листках (Б) у фазу трьох справжніх листків (І) та масового цвітіння (ІІ): $n = 4$, $x \pm SE$

Виявлено подібну до обробки насіння ризобіями з фунгіцидами тенденцію зміни активності АПО в коренях і листках за комплексної обробки сої за участю лектинів (рис. 3). Іншу тенденцію спостерігали лише у фазу трьох справжніх листків у варіантах із

подібним комплексом обробки насіння та використання Максиму XL і Феверу: активність ферменту в листках досягала рівня контрольних рослин.

За інокуляції насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, не відбувалось суттєвих змін активності ГПО в коренях, порівняно з контрольними рослинами (рис. 4). При цьому активність ферменту в листках підвищувалася у фазу трьох листків та знижувалася у фазу масового цвітіння. Комплексна обробка насіння сої ризобіями та фунгіцидами Стандак Топ і Максим XL індукувала різку інтенсифікацію активності ГПО в коренях у фазу трьох справжніх листків (рис. 4). За дії фунгіциду Февер активність ферменту в коренях залишалась на рівні контрольних рослин.

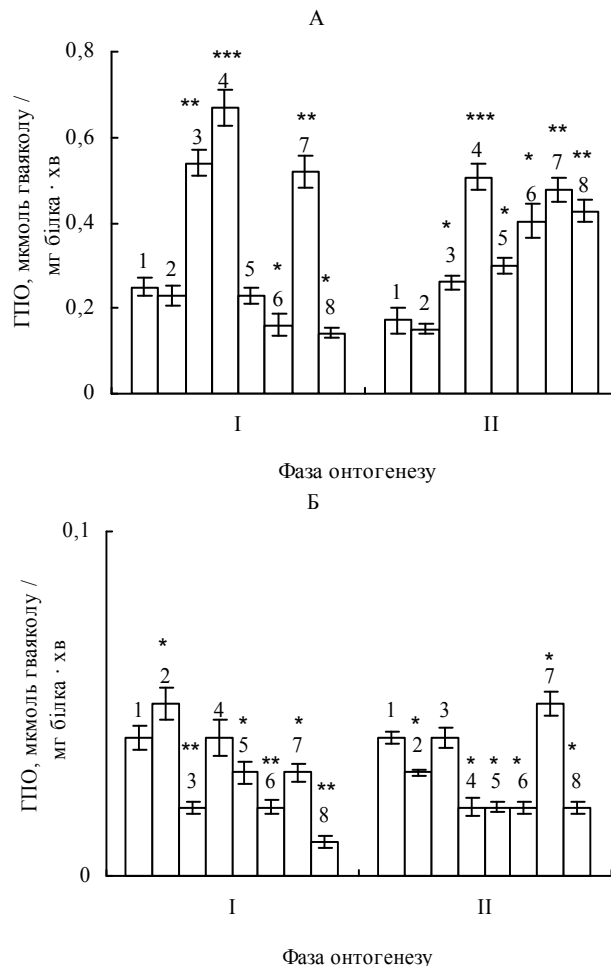


Рис. 4. Вплив обробки насіння сої *B. japonicum* 6346, інкубованими з лектином, спільно із фунгіцидами, на активність ГПО в коренях (А) і листках (Б) у фазу трьох справжніх листків (І) та масового цвітіння (ІІ): $n = 4$, $x \pm SE$

У фазу масового цвітіння рівень його активності в коренях зростав у всіх досліджуваних симбіотичних системах за участі ризобій і фунгіцидів, особливо за дії Стандак Топу. За комплексної обробки насіння ризобіями та фунгіцидами активність ГПО в листках істотно знижувалась у фазу трьох справжніх листків. У фазу масового цвітіння його активність наближалася до контрольної за дії Максиму XL, залишалась на низькому рівні за дії Феверу та зростала за дії Стандак Топу.

Обробка насіння ризобіями, інкубованими з лектином, спільно з фунгіцидом Максим XL спричиняла стрімке зростання активності ГПО в коренях у фазу трьох справжніх листків, тоді як подібна обробка за участю фунгіцидів Февер і Стандак Топ індукувала зниження активності ферменту в коренях порівняно з контролем. У фазу масового цвітіння активність ферменту в коренях перебувала на досить високому рівні в цих симбіотичних системах. Інокуляція сої ризобіями, інкубованими з лектином, спільно з

обробкою насіння фунгіцидами індукувала зниження активності ГПО в листках порівняно з контролем як у фазу трьох справжніх листків, так і у фазу масового цвітіння. Особливо у варіанті з комплексною обробкою насіння зі Стандак Топом, у фазу трьох справжніх листків.

Обговорення

Складові механізмів дії лектинів на рослини – їх залучення до сигнальної системи регуляції росту та розвитку за безпосередньої взаємодії з фітогормонами. Рістестимулювальна дія лектинів пов'язана зі змінами балансу фітогормонів у бік накопичення індолил оцтової кислоти (ІОК) та цитокинінів у рослині (Кутушенко, 2014). Підвищення активності пероксидази як поліфункціонального ферменту розглядають серед інших її функцій у клітині ще й як відповідь на збільшення вмісту ендogenous ауксину, а за рівнем активності пероксидази у рослинах можна судити про вміст у них ауксину, зокрема ІОК (Fedorova et al., 2000). Зафіксовані нами зміни активності антиоксидантних ферментів у створених симбіотичних системах за обробки насіння ризобіями, інкубованими з лектином, спільно з фунгіцидами, можуть бути пов'язані саме з порушенням регуляторної функції ендogenous лектинів.

Як зазначено вище, характерна особливість структури рослинних лектинів – наявність центрів гідрофобного зв'язування. Це вказує на наявність у них самостійних сайтів, які відповідають за гідрофобну взаємодію з молекулами неуглеводної природи, зокрема фітогормонами, внаслідок чого вони можуть активно включатися в систему гормональної регуляції процесів росту та розвитку рослин (Babosha, 2008; Кутушенко, 2014). Можна припустити, що діючі речовини досліджуваних фунгіцидів індукували блокування гідрофобних сайтів зв'язування в молекулі білка, чим створювалась своєрідна конкуренція за сайти зв'язування з іншими хімічними сполуками, що спричинило зміни процесів формування та функціонування соєво-ризобіального симбіозу.

Дослідженнями останніх років показано, що негативний вплив препаратів із фунгіцидною активністю на ефективність бобово-ризобіального симбіозу пов'язаний із порушенням регуляторної системи сигналів між макро- та мікросимбіонтами, блокуванням активності генів нодуляції та зменшенням рівня ризобіального Nod-фактора (Bikrol et al., 2005; Fox et al., 2007; Araujo et al., 2017). Пестициди можуть впливати через інгібування флавоноїдного Nod-рецептора, індукуючи пригнічення синтезу та секреції флавоноїдних речовин, що виробляються рослиною, тим самим порушуючи бобово-ризобіальну взаємодію (Bikrol et al., 2005; Fox et al., 2007; Araujo et al., 2017). Кожна з досліджуваних хімічних речовин конкурентно обмежувала активацію генного Nod-фактора залежно від її концентрації та інгібувальної дії.

Отримані нами дані свідчать, що використання інокуляційної суспензії ризобій, інкубованих із лектином, у комплексі з фунгіцидами пригнічувало ріст сої (надземної маси та маси кореня), що супроводжувалось зниженням ефективності роботи симбіотичного апарату. Крім того зафіксовано різний ступінь впливу досліджуваних препаратів із фунгіцидною дією на ефективність функціонування соєво-ризобіального симбіозу. На нашу думку, такий вплив препаратів залежав від характеру діючих речовин, що входять до їх складу, та здатності утворених симбіотичних систем реалізувати свої симбіотичні властивості за певних умов вирощування.

Аналіз отриманих результатів показав, що обробка насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, у комплексі з фунгіцидами підвищує активність СОД і ГПО в корневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків і стимулює зростання активності АПО у фазу масового цвітіння. Це свідчить про активацію захисних реакцій рослин на рівні роботи ферментів з антиоксидантною активністю, ступінь якої відрізняється залежно від характеру впливу діючої речовини досліджуваних фунгіцидів. Специфічною реакцією ферментів (СОД, АПО та ГПО) на комплексну обробку відрізнявся варіант із використанням фунгіциду Стандак Топ. На нашу думку це пов'язано з хімічним складом зазначеного препарату, присутністю трьох діючих речовин (фіпронілу, тіофанат-метилу,

піраклостробіну), які поєднують фунгіцидну та інсектицидну дію. Поєднання такого комплексу хімічних сполук негативно впливає на метаболічні процеси рослин сої в симбіозі з ризобіями. При цьому найсильніший негативний вплив на соєво-ризобіальний симбіоз, очевидно, спричинений саме наявністю у складі препарату діючої речовини тіофанат-метилу, який належить до класу бензімідазолів, що відрізняються низькою хімічною стабільністю та під час попадання у ґрунт швидко (протягом декількох годин або навіть хвилин) гідролізуються до стійкішої сполуки – карбендазіму з періодом напіврозпаду ($T_{0.5}$) 3–6 місяців (Evtushenko et al., 2004). Як зазначають літературні джерела, тіофанат-метил потрапляє через коріння та переміщується в рослині в акропетальному напрямку ксилемою, точніше, його метаболіт карбендазім, який характеризується тератогенними, ембріотоксичними, гонадотоксичними та канцерогенними властивостями (www.demetra-agra.com.ua).

Вплив діючої речовини (протіокназолу, клас триазолі), що входить до складу препарату Февер, полягає в інгібуванні диметиллази – ферменту, який відповідає за біосинтез стеролів (будівельний матеріал клітин патогену) та спричиняє порушення цілісності клітинних стінок грибів, їх загибель (Kobak et al., 2016). Проникаючи в рослини, триазолі можуть порушувати синтез гіберелінів у рослині та діяти як регулятори росту, спричиняючи ретардантний ефект. Тривалість $T_{0.5}$ цієї речовини залежить від рН навколишнього середовища: у лужному – понад рік, у кислому – до 120 діб, у водних фотолітичних умовах – до 48 годин (Evtushenko et al., 2004). У наших дослідженнях застосовано обробку насіння чистою культурою *B. japonicum* 6346 (рН 7,2) спільно з водним розчином препарату Февер, із наступним вирощуванням рослин у піщаній культурі зі внесенням поживної суміші Гельрігеля, тобто були створені контрольовані умови з підтриманням нейтрального рН ґрунту, що могло бути причиною для нетривалого періоду дії препарату та його менш шкодочинного впливу на соєво-ризобіальний симбіоз порівняно з іншими досліджуваними фунгіцидами.

До складу препарату Максим XL входять дві діючі речовини (флудіоксоніл і металаксил), одна з яких, флудіоксоніл, – аналог природного антибіотика, що виділяється ґрунтовими бактеріями *Pseudomonas pyrocinia*, які пригнічують ріст патогенних грибів (www.demetra-agra.com.ua). Вплив речовин підкласу триазолінтіонів на ріст і розмноження патогену пов'язують із порушенням функції клітинних мембран. Однак, вбиваючи збудників хвороб, цей препарат безпечний, не пригнічує корисну мікрофлору ґрунту. Тривалість $T_{0.5}$ в ґрунті – 10–25 діб (Evtushenko et al., 2004). Тому фунгіцидна дія Максиму не проявляла значного токсичного впливу на реалізацію симбіотичних властивостей сої.

Реакція антиоксидантних ферментів (СОД, АПО і ГПО) в коренях і листках сої як на спільну обробку ризобіями та фунгіцидами, так і на комплексну обробку за участю гомологічного лектину більш виражена у фазу трьох справжніх листків порівняно з фазою масового цвітіння. Очевидно, це пов'язано з реакцією ферментів на обробку як своєрідний стрес для рослини, який нівелюється до фази масового цвітіння. При цьому ступінь прояву активності досліджуваних ферментів відрізнявся між варіантами залежно від характеру впливу діючої речовини досліджуваних фунгіцидів, а також специфічності прояву їх спільного впливу з ризобіями, інкубованими з лектином. У фазу масового цвітіння у досліджуваних симбіотичних системах спостерігали зниження рівня активності ферментів (СОД, АПО і ГПО) в листках незалежно від хімічної природи фунгіцидних препаратів та прояву їх дії в комплексі з ризобіями, інкубованими з лектином. З одного боку, це може бути пов'язано з онтогенетичними перебудовами метаболізму рослин і переходом їх у генеративну фазу онтогенезу, з іншого – зі зниженням хімічної активності діючих речовин препаратів унаслідок їх повного чи часткового розпаду у ґрунті ($T_{0.5}$).

Висновки

Інтенсифікація активності СОД, АПО та пригнічення активності ГПО в корневих бульбочках сої за дії фунгіцидів у фазу трьох справжніх листків та підвищення активності всіх досліджу-

ваних ферментів у фазу масового цвітіння вказує на суттєвий розвиток стресзахисних реакцій у відповідь на обробку. При цьому використання комплексної обробки насіння сої фунгіцидами (Февер і Максим XL) та інокулянтном (штам *B. japonicum* 6346) сприяє збереженню АФА корневих бульбочок і наростанню вегетативної маси рослин.

Обробка насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, спільно з фунгіцидами викликає підвищення активності СОД і ГПО в корневих бульбочках у фазу трьох справжніх листків і зростання активності АПО у фазу масового цвітіння, що свідчить про розвиток типової антиоксидантної реакції у відповідь на комплексну обробку. Водночас, використання гомологічного лектину сої в концентрації 100 мкг/мл як компонента інокуляційної суспензії для пом'якшення токсичної дії досліджуваних фунгіцидів на функціонування соєво-ризобіального симбіозу не виправдало очікуваних результатів у суворо контрольованих умовах модельного вегетаційного досліді та потребує подальших досліджень у ґрунтовій культурі.

Активність антиоксидантних ферментів (СОД, АПО і ГПО) в коренях і листках сої як на спільну обробку ризобіями та фунгіцидами, так і на комплексну обробку за участю гомологічного лектину була вираженішою у фазу трьох справжніх листків порівняно з фазою масового цвітіння, що пов'язано з реакцією ферментів на обробку як своєрідний стрес для рослини, який нівелюється до фази масового цвітіння.

References

- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331–1341.
- Araujo, R. S., Cruz, S. P., Soucie, E. L., Martin, T. N., Nakatani, A. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2017). Preinoculation of soybean seeds treated with agrichemicals up to 30 days before sowing: Technological innovation for large-scale agriculture. *International Journal of Microbiology*, 1–11.
- Babosha, A. V. (2008). Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. *Biochemistry*, 73(7), 812–825 (in Russian).
- Bikrol, A., Saxena, N., & Singh, K. (2005). Response of *Glycine max* in relation to nitrogen fixation as influenced by fungicide seed treatment. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 667–671.
- Bradford, M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: The principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes and their role in plant defence. *Plant Cell*, 3, 1–9.
- Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeber, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P., & Sarath, G. (1993). Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) root nodules. *Plant Physiology*, 102(1), 481–489.
- Dalton, D., Joyner, S. L., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., & Chatfield, J. M. (1998). Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiology*, 116, 37–43.
- Egley, G. H., Paul, R. N., Vaughn, K. C., & Duke, S. O. (1983). Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. *Planta*, 157(1), 224–232.
- Erofěeva, E. A. (2015). Dependence of guaiacol peroxidase activity and lipid peroxidation rate in drooping birch (*Betula pendula* Roth) and tillet (*Tilia cordata* Mill.) leaf on motor traffic pollution intensity. Dose-Response: An International Journal, 1–6.
- Evtushenko, M. D., Marutin, F. M., Turenko, V. P., Zhrebko, V. M., & Sekun, M. P. (2004). *Phytopharmacologia*. Vusha Osyta, Kyiv (in Ukrainian).
- Fedorova, E. E., Zhivnevskaya, G. Y., Kalibermaya, Z. V., Artemenko, E. N., Izmailov, S. F., & Gus'kov, A. V. (2000). Metabolism of IOA with the establishment of symbiosis between *Phaseolus vulgaris* and *Rhizobium phaseoli*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 47(2), 231–235 (in Russian).
- Fox, J. E., Gullledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M. E., & McLachlan, J. A. (2007). Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 104(24), 10282–10287.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43(8), 1185–1207.
- Hivrale, A. U., & Ingale, A. G. (2013). Plant as a plenteous reserve of lectin. *Plant Signaling and Behavior*, 8(12), 1–7.
- Hoff, P. L. D., Brill, L. M., & Hirsch, A. M. (2009). Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics Genomics*, 282(1), 1–15.
- Iturbe-Ormaetxe, J., Matamoros, M. A., Rubio, M. C., Dalton, D. A., & Becana, M. (2001). The antioxidant of legume nodule mitochondria. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 14(10), 1189–1196.
- Kobak, S. Y., Kolisnik, S. I., & Serevetnyk, O. V. (2016). The most common diseases of soybean and the effectiveness of BASF products for their control. *Agrobusiness Today*, 10(329), 46–47 (in Ukrainian).
- Kyrychenko, E. V. (2014). Phytolectines and diazotrophs – polyfunctional components of complex biological compositions. *Biotechnologia Acta*, 7(1), 40–53 (in Ukrainian).
- Lehotzky, R. E., Partch, C. L., Mukherjee, S., Cash, H. L., Goldman, W. E., Gardner, K. H., & Hooper, L. V. (2010). Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 107(17), 7722–7727.
- Marco, I. (2013). Integrated soybean protection against diseases. *Agrobusiness Today*, 11(258), 16–21 (in Ukrainian).
- Matamoros, M. A., Dalton, D. A., Ramos, J., Clemente, M. R., Rubio, M. C., & Becana, M. (2003). Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia – legume symbiosis. *Plant Physiology*, 133(2), 499–509.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sciences*, 7, 405–410.
- Mohammadi, K., Sohrabi, Y., Heidari, G., Khalesro, S., & Majidi, M. (2012). Effective factors on biological fixation. *Agricultural Research*, 7(12), 1782–1788.
- Moran, J. F., James, E. K., Rubio, M. C., Sarath, G., Klucas, R. V., & Becana, M. (2003). Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiology*, 133(2), 773–782.
- Moreira, R. A., Ainouz, I. L., Oliveira, J. T., & Cavada, B. S. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 86(2).
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
- Nikolaevsky, V., Sirenko, V., & Titova, L. (2017). Effect of pre-seed bacterialization of seeds on disease development and yield of soybean. *Stiinta Agricola*, 1, 55–59.
- Owens, R. A., Bleckum, M., & Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance varied movement. *Molecular Plant Microbe Interact*, 14(7), 905–909.
- Parsiavash, L., Saboori, A., & Nejad, S. Z. M. (2015). Investigating on the stability of peroxidase extracted from soybean (*Glycine max* var. *williams*) and effects of Na⁺ and K⁺ ions on its activity. *Journal of Cell and Molecular Research*, 7(2), 94–101.
- Petrichenko, V. F., & Kots, S. Y. (2014). Symbiotic systems in modern agricultural production. *Bulletin of NAS of Ukraine*, 3, 57–66 (in Ukrainian).
- Raychauri, S. S., & Deng, X. W. (2000). The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The Botanical Review*, 66(1), 89–98.
- Rubio, M. C., James, E. K., Clemente, M. R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C. P., & Becana, M. (2004). Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *The American Phytopathological Society*, 17(12), 1294–1305.
- Schmitz, N., Huystee, R., & Gijzen, M. (1997). Characterization of anionic soybean (*Glycine max*) seed coat peroxidase. *Canadian Journal of Botany*, 75(8), 1336–1341.
- Sergienko, V. (2012). Diseases of soybeans and measures of its limitation. *Agrobusiness Today*, 11(234), 28–30 (in Ukrainian).
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Lu, Z.-H., & Kang, C.-M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4(1), 8–14.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 20(12), 1–26.
- Zhiznevskaya, G. Y., Troitskaya, G. N., Borodenko, L. I., & Izmailov, S. F. (2001). Peroxidase and catalase in root nodules of fodder beans at an effective and ineffective symbiosis with rhizobia. *Physiology and Biochemistry of Cultural Plants*, 33(4), 285–290 (in Ukrainian).



Effect of agrotechnological elements on milk thistle (*Silynum marianum*) productivity

R. A. Vozhehova*, M. I. Fedorchuk**, Y. O. Lavrynenko*,
S. V. Kokovikhin*, P. V. Lykhovyd*, I. M. Biliaieva*, V. V. Nesterchuk*

*Institute of Irrigated Agriculture, Kherson, Ukraine

**Mykolaiv National Agrarian University, Mykolaiv, Ukraine

Article info

Received 04.04.2018

Received in revised form

26.04.2018

Accepted 29.04.2018

Institute of Irrigated
Agriculture, Kherson,
Naddniprianske, 73483,
Ukraine.
Tel.: +38-066-062-98-97.
E-mail:
pavel.likhovid@gmail.com

Mykolaiv National
Agrarian University,
Heorhiya Honhadze st., 9,
Mykolaiv, 54000, Ukraine.

Vozhehova, R. A., Fedorchuk, M. I., Lavrynenko, Y. O., Kokovikhin, S. V., Lykhovyd, P. V., Biliaieva, I. M., & Nesterchuk, V. V. (2018). Effect of agrotechnological elements on milk thistle (*Silynum marianum*) productivity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 156–160. doi:10.15421/021823

The milk thistle is a highly valuable medicinal plant, widely used in treatment of liver diseases. Soil-climate conditions of the steppe zone of Ukraine are favourable for crop cultivation. The goal of the study was to determine relations between milk thistle productivity and elements of cultivation technology, viz., primary tillage depth (14–16 and 20–22 cm), inter-row spacing (30, 45, 60 cm), timing of sowing (3rd decade of March, middle of April, 3rd decade of April) and mineral fertilizer application doses (no fertilizers, $N_{45}P_{45}$, $N_{90}P_{90}$). Field trials were carried out during the period from 2010 to 2012 on the irrigated lands of the Institute of Rice of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine by using the split plot design method in four replications. The climate of the territory of the trials is typical for the steppe zone. The soil type was dark-chestnut residual solonetz middle-loamy soil. We used the Yuhoslava variety of milk thistle in the trials. Cultivation technology was standard, excluding the studied factors. The results of the trials showed significant impact of all the studied cultivation technology elements on milk thistle seed and oil yields. The maximum average seed (1.66 t/ha) and oil (489 kg/ha) yields were obtained under the primary tillage at the depth of 20–22 cm, inter-row spacing of 60 cm, sowing in the 3rd decade of March, applying mineral fertilizers in a dose of $N_{90}P_{90}$. The highest input in seed and oil yields rise was made by the mineral fertilizers, which increased milk thistle productivity by 1.57 times comparatively with non-fertilized treatments. We also established a strong direct interrelationship between seed and oil yield: coefficient of determination was 0.96. Results of the current study are slightly limited, so further investigations in the field of milk thistle cultivation technology development and improvement are required to provide Ukrainian farmers with scientifically grounded agrotechnology of this valuable medicinal plant.

Keywords: primary tillage depth; inter-row spacing; timing of sowing; mineral fertilizers dose; medicinal plant; seed yield; oil yield

Introduction

Medicinal plants have been widely used by humanity for treatment of various diseases since ancient times. The development of modern chemistry has moved them to the background, but no chemical drugs can replace the natural mild treatment provided by the medicinal plant-based drugs. Nowadays, interest in medicinal plants is growing. Questions dedicated to production of high-quality plant raw materials are of great relevance. At the moment, China and India are the leading countries in production of the medicinal plants, and the main consumers are Japan and the Republic of Korea. Germany is considered to be an important European center of trading and usage of medicinal plants (Lange, 2002). Ukraine has favourable soil-climate conditions for successful production of major medicinal plants, especially, on the South. Domestic cultivation of medicinal and aromatic plants provides great opportunities for export of the raw materials to developed countries of Europe and Asia and for native production of perfumes and plant-based drugs.

Among the medicinal plants a special place is occupied by the milk thistle (*Silynum marianum* L. Gaertn.). The milk thistle is a member of the Asteraceae family. It is considered that it originated in the Mediterranean Basin. The milk thistle grows as a wild weed in many European countries, North Africa, Southern and Northern America, Central and Western Asia, Southern Australia (Chiavari et al., 1991;

Morazzoni & Bombardelli, 1995; Carrier et al., 2002). In Pakistan and Iran it is well-known as a troublesome weed in wheat crops (Khan et al., 2009; Shamsi, 2009). But on the other hand, the milk thistle is a highly valuable medicinal plant, well-known among health-care specialists from ancient times (Barnes et al., 2003; Ross, 2008). It is used in treatment of different liver and biliary diseases, mainly, because of the silymarin content in seeds (Flora et al., 1998; Siegel & Stebbing, 2013; Saki et al., 2015). Some studies report the high efficiency of treatment with milk thistle medicine even in case of chronic liver diseases (Seeff et al., 2001). It is proved that it can prevent liver cancer (Tamayo & Diamond, 2007) and has a lot of other advantages over many conventional drugs (Post-White et al., 2007). Scientific studies of the use of milk thistle use in medicine are still being carried out (Albassam et al., 2017), particularly, in the field of appropriation of the different crop cultivars for preparing drugs (Lucini et al., 2016). To supply medicine with high-quality raw material, cultivation technologies of the medicinal plants should be carefully studied. And milk thistle is no exception. Lack of scientifically grounded information on the cultivation technologies of medicinal plants is one of the main obstacles in their production (Smatana & Macák, 2011). There are only a few reports about peculiarities of the crop cultivation under different conditions, for example, of salt stress (Ghavami & Ramin, 2007). The above-mentioned fact defines the relevance of our study.

Materials and methods

The goal of the study was to determine the influence of the cultivation technology elements on seed productivity and oil yield of the milk thistle crops grown on irrigated lands in the South of Ukraine. The studied factors were: A – primary tillage (treatment 1: shallow tillage at the depth of 14–16 cm; treatment 2: moldboard plowing at the depth of 20–22 cm); B – inter-row spacing (treatment 1 : 30 cm, treatment 2 : 45 cm, treatment 3 : 60 cm); C – timing of sowing (treatment 1 : 3rd decade of March, treatment 2 : middle of April, treatment 3 : 3rd decade of April); D – mineral fertilizer application doses (treatment 1 : no fertilizers applied, treatment 2 : $N_{45}P_{45}$, treatment 3 : $N_{90}P_{90}$). The field trials were held during the period from 2010 to 2012 at the experimental fields of the Institute of Rice of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (latitude 46°08'34" N, longitude 32°57'15" E, altitude 8 m). The split plot design method of the trials in four replications was used. The sown area of the 4th rank was 70 m², and yield registration area was 55 m².

The climate of the zone is moderately continental, and is characterized as dry and warm. Climate conditions form under the influence of the Black Sea. Weather conditions during the period of the trials were unstable and contrasting. Meteorological indices and long-term mean values were obtained from the Kherson Regional Hydro-meteorological Center. As a matter of fact, 2010 was hot and well-supplied with precipitation, 2011 was moderately warm and comparatively dry, while 2012 was the hottest year (Tables 1, 2).

Table 1

Precipitation amounts during the period of milk thistle growth and development in the field trials (mm)

Months	Long-term mean values	Years of the study			Average for the studied period ± standard deviation
		2010	2011	2012	
March	19	6.0	9.6	20.0	11.9 ± 7.1
April	24	23.8	37.8	12.5	24.7 ± 0.7
May	28	33.9	58.5	144.6	79.0 ± 51.0
June	36	108.8	34.8	29.3	57.6 ± 21.6
July	29	137.6	12.8	12.2	54.2 ± 25.2
August	27	0.6	3.0	54.2	19.3 ± 7.7
September	28	47.2	12.0	0.0	19.7 ± 8.3
Total annual	307	544.0	225.3	311.8	360.4 ± 53.4

Table 2

Air temperature during the period of milk thistle growth and development in the field trials (°C)

Months	Long-term mean values	Years of the study			Average for the studied period ± standard deviation
		2010	2011	2012	
March	2.3	3.4	2.8	3.0	3.1 ± 0.8
April	10.0	10.7	10.1	11.6	10.8 ± 0.8
May	16.0	17.6	16.5	19.8	18.0 ± 2.0
June	19.9	22.5	21.5	22.0	22.0 ± 2.1
July	21.9	24.7	24.5	26.0	25.1 ± 3.2
August	21.3	26.1	22.6	23.5	24.1 ± 2.8
September	16.4	17.7	18.7	19.0	18.5 ± 2.1
Average annual	9.8	11.7	11.7	11.8	11.7 ± 1.9

Ground water and irrigation water were analyzed in the certified laboratory of the Kherson Office of the Institute of Land Management of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine using the standard methods. Calcium and magnesium concentrations were determined by Ethylenediaminetetraacetic acid titration. Sodium concentration was determined on a flame photometer. Chloride concentration was determined by silver nitrate titration. Carbonate and hydro-carbonate concentrations were determined by hydrochloric acid titration. Sulphate concentration was determined by barium chloride titration. Irrigation water used in the trials had a favourable chemical composition and was suitable for irrigation without limitation (Table 3). Ground water lay at the depth of 5 m and was not involved in the water supply of the cultivated crop. All the analyses were carried out within agrochemical inspections of the fields and water of the Institute of Rice of the National

Academy of Agrarian Sciences of Ukraine. Soil in the trials was represented by the dark-chestnut residual solonetz middle-loamy soil. Power of hydrogen of the soil in the upper layer fluctuated between 7.0–7.5 units. Humus content (determined by the method of Tiurin) in the upper arable layer (0–30 cm) was 2.25%. Phosphorus (determined by the method of Machygin) and nitrogen content (determined by the method of Tiurin and Kononova) was low, and potassium content (determined by the method of Machygin at the flame photometer) was quite high in the arable soil layer of 0–30 cm (Table 4).

Table 3

Chemical composition and total dissoluble solids content in the ground water and irrigation water used in the field trials

Qualitative parameters, g/L	Ground water	Irrigation water
CO ₃ ²⁻	absent	absent
HCO ₃ ⁻	0.472	0.152
Cl ⁻	0.182	0.036
SO ₄ ²⁻	0.868	0.054
Ca ²⁺	0.196	0.040
Mg ²⁺	0.082	0.017
Na ⁺	0.328	0.028
Total dissoluble solids content	1.969	0.252

Table 4

Humus and nutritive elements content in the arable soil layer of 0–30 cm in the field trials

Humus, %	Nitrogen (NO ₃), mg/kg	Nitrogen (NH ₄), mg/kg	Total mineral Nitrofen, mg/kg	Mobile Phosphorus, mg/kg	Exchangeable Potassium, mg/kg
2.25	39.0	4.0	26.0	29.0	332.0

The cultivation technology used in the trials was standard for milk thistle growing under irrigated conditions. We cultivated the milk thistle variety Yuhoslava, which has been included on the State Register of Plant Varieties of Ukraine since 2006. The previous crop was winter wheat. After harvesting of the winter wheat, harrowing at the depth of 8–10 cm was conducted. Then mineral fertilizers were applied in accordance with the trials' design doses, and primary tillage was conducted. Field planning and leveling were carried out before frosts in the pre-winter period. Early spring started with dragging at the depth of 4–6 cm. The crop was sown after pre-sowing cultivation in three terms with accordance to the trials' design by the means of SN-16 drill. After-sowing, rolling was carried out to obtain good push-outs. Pre-sprouting dragging was conducted to clear the fields from weeds. The plots were dragged again at the stage of two leaves of the crop. Inter-row cultivations until the milk thistle leaves had closed up were conducted by means of inter-row cultivator. We maintained the soil moisture in the 0.5–0.7 m layer at the level of 75–80% of the field water-holding capacity by means of a frontal sprinkler irrigation machine. Total volume of the irrigation water applied was 1100 m³/ha in 2010 and 2012, 1650 m³/ha in 2011 (or 1283 m³/ha in average for the studied period). Seed yields was estimated by the means of "Sampo" self-propelled combine harvester, and then recalculated for the standard seed moisture (12%) and 100% of seeds purity. Harvesting of the crop was carried out in the period from the 1st to 2nd decades of September. The oil content in the seeds was determined by using the Klevenger apparatus in the certified laboratory. The yield data was processed by using the multiple analyses of variance (ANOVA) and simple paired correlation analyses within AgroStat MS Excel add-on and LibreOffice Calc 5 software applications. The least significant difference (LSD) between the studied variants was calculated for level of reliability of 95% ($P < 0.05$).

Results

The results of the study proved that milk thistle productivity significantly depends on the cultivation technology treatments (Table 5). Considerable increase in seed yields was achieved by: increasing the primary tillage depth to 20–22 cm (from 1.12 to 1.17 t/ha on average); increasing inter-row spacing to 45 and, especially, 60 cm (from 1.09 to 1.15 and 1.21 t/ha on average, respectively); the earliest sowing period in the 3rd decade of March, comparatively to delayed sowing (from

0.92 to 1.33 t/ha in average); mineral fertilizers' application at a dose of N₉₀P₉₀, comparatively with lower nutritive background (from 0.88 to 1.18 and 1.38 t/ha in average).

Table 5

Seed yields of milk thistle in the trials depending on primary tillage depth, inter-row spacing, timing of sowing and mineral fertilizers' application doses at the irrigated lands of the Steppe Zone (t/ha, all the studies were conducted in four replications)

Primary tillage (Factor A)	Inter-row spacing, cm (Factor B)	Terms of sowing (Factor C)	Mineral fertilizers application doses (Factor D)	Years of study				average yields $\pm$ standard deviation
				2010	2011	2012		
Shallow tillage at the depth of 14–16 cm	30	3rd decade of March	No fertilizers	0.92	1.01	0.99		0.97 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.22	1.34	1.32		1.29 $\pm$ 0.06
			N ₉₀ P ₉₀	1.39	1.53	1.49		1.47 $\pm$ 0.07
		Middle of April	No fertilizers	0.85	0.93	0.90		0.89 $\pm$ 0.04
			N ₄₅ P ₄₅	1.07	1.18	1.17		1.14 $\pm$ 0.06
			N ₉₀ P ₉₀	1.23	1.35	1.31		1.30 $\pm$ 0.06
		3rd decade of April	No fertilizers	0.52	0.67	0.64		0.61 $\pm$ 0.08
			N ₄₅ P ₄₅	0.79	0.87	0.83		0.83 $\pm$ 0.04
			N ₉₀ P ₉₀	1.01	1.18	1.13		1.11 $\pm$ 0.09
	45	3rd decade of March	No fertilizers	1.00	1.10	1.05		1.05 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.28	1.41	1.36		1.35 $\pm$ 0.07
			N ₉₀ P ₉₀	1.46	1.60	1.55		1.54 $\pm$ 0.07
		Middle of April	No fertilizers	0.85	0.96	0.91		0.91 $\pm$ 0.06
			N ₄₅ P ₄₅	1.16	1.27	1.22		1.21 $\pm$ 0.06
			N ₉₀ P ₉₀	1.35	1.40	1.39		1.38 $\pm$ 0.03
		3rd decade of April	No fertilizers	0.61	0.68	0.66		0.65 $\pm$ 0.04
			N ₄₅ P ₄₅	0.83	0.91	0.89		0.87 $\pm$ 0.04
			N ₉₀ P ₉₀	1.08	1.20	1.16		1.15 $\pm$ 0.06
	60	3rd decade of March	No fertilizers	1.02	1.14	1.10		1.09 $\pm$ 0.06
			N ₄₅ P ₄₅	1.33	1.47	1.42		1.41 $\pm$ 0.07
			N ₉₀ P ₉₀	1.54	1.65	1.61		1.60 $\pm$ 0.06
		Middle of April	No fertilizers	0.89	0.96	0.94		0.93 $\pm$ 0.04
			N ₄₅ P ₄₅	1.22	1.36	1.31		1.30 $\pm$ 0.07
			N ₉₀ P ₉₀	1.41	1.51	1.45		1.46 $\pm$ 0.05
		3rd decade of April	No fertilizers	0.64	0.69	0.67		0.67 $\pm$ 0.03
			N ₄₅ P ₄₅	0.92	1.01	0.97		0.97 $\pm$ 0.05
			N ₉₀ P ₉₀	1.13	1.29	1.23		1.21 $\pm$ 0.08
Moldboard plowing at the depth of 20–22 cm	30	3rd decade of March	No fertilizers	0.94	1.04	1.01		1.00 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.26	1.39	1.35		1.33 $\pm$ 0.07
			N ₉₀ P ₉₀	1.44	1.58	1.54		1.52 $\pm$ 0.07
		Middle of April	No fertilizers	0.88	0.98	0.96		0.94 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.14	1.24	1.21		1.19 $\pm$ 0.05
			N ₉₀ P ₉₀	1.30	1.40	1.34		1.35 $\pm$ 0.05
		3rd decade of April	No fertilizers	0.60	0.69	0.65		0.65 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	0.85	0.97	0.92		0.91 $\pm$ 0.06
			N ₉₀ P ₉₀	1.06	1.22	1.18		1.15 $\pm$ 0.08
	45	3rd decade of March	No fertilizers	1.02	1.12	1.09		1.07 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.32	1.49	1.40		1.40 $\pm$ 0.09
			N ₉₀ P ₉₀	1.51	1.62	1.58		1.57 $\pm$ 0.06
		Middle of April	No fertilizers	0.87	0.99	0.93		0.93 $\pm$ 0.06
			N ₄₅ P ₄₅	1.20	1.32	1.28		1.26 $\pm$ 0.06
			N ₉₀ P ₉₀	1.39	1.43	1.41		1.41 $\pm$ 0.02
		3rd decade of April	No fertilizers	0.66	0.72	0.71		0.70 $\pm$ 0.03
			N ₄₅ P ₄₅	0.91	1.04	0.95		0.97 $\pm$ 0.07
			N ₉₀ P ₉₀	1.14	1.27	1.22		1.21 $\pm$ 0.07
	60	3rd decade of March	No fertilizers	1.06	1.16	1.13		1.12 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.40	1.55	1.48		1.48 $\pm$ 0.08
			N ₉₀ P ₉₀	1.61	1.73	1.65		1.66 $\pm$ 0.06
		Middle of April	No fertilizers	0.94	1.04	1.01		0.99 $\pm$ 0.05
			N ₄₅ P ₄₅	1.29	1.42	1.34		1.35 $\pm$ 0.07
			N ₉₀ P ₉₀	1.42	1.55	1.49		1.49 $\pm$ 0.07
		3rd decade of April	No fertilizers	0.69	0.77	0.75		0.74 $\pm$ 0.04
			N ₄₅ P ₄₅	0.97	1.10	1.05		1.04 $\pm$ 0.06
			N ₉₀ P ₉₀	1.21	1.33	1.28		1.28 $\pm$ 0.07

We consider, that moldboard plowing at the depth of 20–22 cm creates more favorable conditions for good development of the root system of the crop. At the same time, wider inter-row spacing provides better facilities for growth and development of the overground vegetative mass of milk thistle plants, which can be explained by better

nutritive, air and light regimes in the crops, owing to lower density of plants per unit area. Delayed sowing subjects the crops to unfavourable weather conditions for vegetation, thus it leads to productivity decrease. And the more mineral fertilizers we used, the higher the seeds yields were, because of considerable improvement of the crops nutrition. The maximum input in seed yields was made by the mineral fertilizers at a dose of N₉₀P₉₀: seed yields increased by 1.57 times comparatively to non-fertilized treatment. The results of the study established an opportunity of considerably raising the milk thistle seed yields through use of rational cultivation technology, for example, in our case up to 1.05 t/ha (from 0.61 to 1.66 t/ha). Results of ANOVA milk thistle seed yields data processing are represented in Table 7.

Table 6

Average seed yields of milk thistle in the trials depending on primary tillage depth, inter-row spacing, timing of sowing and mineral fertilizers' application doses at the irrigated lands of the Steppe Zone (t/ha)

Factors signatures	Treatments	Seed yields of milk thistle
A	Shallow tillage at the depth of 14–16 cm	1.12
	Moldboard plowing at the depth of 20–22 cm	1.17
B	Inter-row spacing of 30 cm	1.09
	Inter-row spacing of 45 cm	1.15
	Inter-row spacing of 60 cm	1.21
C	Sowing in the 3rd decade of March	1.33
	Sowing in the middle of April	1.19
	Sowing in the 3rd decade of April	0.92
D	No mineral fertilizers applied	0.88
	Mineral fertilizers dose of N ₄₅ P ₄₅	1.18
	Mineral fertilizers dose of N ₉₀ P ₉₀	1.38

Notes. For the average milk thistle seed yields LSD at $P < 0.05$ for the major effects of the studied factors (t/ha): A = 0.034; B = 0.008; C = 0.005; D = 0.007. LSD at $P < 0.05$ for the partial effects of the studied factors (t/ha): A = 0.177; B = 0.033; C = 0.023; D = 0.030. All the studied factors had significant influence on the milk thistle seeds yield.

The above-mentioned statements are true for the milk thistle oil yields too (Table 7). The highest oil yield of 489 kg/ha on average was obtained under the moldboard plowing at the depth of 20–22 cm, inter-row spacing 60 cm, sowing in the 3rd decade of March and applying mineral fertilizers at the dose of N₉₀P₉₀. Increase of the primary tillage depth raised oil yields up to 4.66%; cultivation under wider inter-row spacing increased oil yields up to 5.11% and 5.47%; delayed sowing resulted in oil yields decrease down to 11.73% and 28.20%. The maximum input in oil yields was provided by the mineral fertilizers that increased the latter up to 37.55% and 20.47%. A strong direct dependence of the milk thistle seed yields and oil yields was determined: correlation coefficient between this features was 0.98, coefficient of determination – 0.96.

Discussion

For the first time we established relations between milk thistle productivity and cultivation technology elements, viz., primary tillage depth, inter-row spacing, timing of sowing, mineral fertilizers' application doses, on irrigated lands in the steppe zone. Connecting our results to those of other similar studies, we found a lot of common and also quite different features and points. One of the divergences is that the results of our study prove a considerable difference in milk thistle yields depending on timing of sowing. But some studies do not mention any significant influence of sowing timing on milk thistle productivity (Andrzejewska et al., 2011). On the other hand, research works of another team of authors proved that a delayed sowing date obviously resulted in a significant reduction in fruit per inflorescence (Rahimi & Kamali, 2012). The above-mentioned discrepancy between the studies can be referred to difference in soil-climate conditions of the studies.

The common points of almost all the scientific studies is the significant productivity increase of the milk thistle crops, achieved due to use of mineral and organic fertilizers in proper doses and preparative

forms, especially, Nitrogen (Wierzbowska et al., 2012), manures (Haban et al., 2009; Asfar et al., 2014; Haban et al., 2015) and natural stimulants (Saad-Allah et al., 2017). There is a study proving the high efficiency of foliage fertilizers (Stancheva et al., 2010).

Table 7

Milk thistle oil yields in the trials depending on primary tillage depth, inter-row spacing, timing of sowing and mineral fertilizers application doses at the irrigated lands of the Steppe Zone (kg/ha, all the studies were conducted in four replications)

Primary tillage (Factor A)	Inter-row spacing, cm (Factor B)	Terms of sowing (Factor C)	Mineral fertilizers application doses (Factor D)	Years of study				average yields $\pm$ standard deviation
				2010	2011	2012		
Shallow tillage at the depth of 14–16 cm	30	3rd decade of March	No fertilizers	256	281	274		270 $\pm$ 12.9
			N ₄₅ P ₄₅	347	382	376		368 $\pm$ 18.7
			N ₉₀ P ₉₀	410	450	438		433 $\pm$ 20.5
		Middle of April	No fertilizers	235	259	251		248 $\pm$ 12.2
			N ₄₅ P ₄₅	306	337	333		325 $\pm$ 16.9
			N ₉₀ P ₉₀	362	398	384		381 $\pm$ 18.1
	45	3rd decade of April	No fertilizers	143	187	177		169 $\pm$ 23.1
			N ₄₅ P ₄₅	224	247	237		236 $\pm$ 11.5
			N ₉₀ P ₉₀	298	346	332		325 $\pm$ 24.7
		3rd decade of March	No fertilizers	277	305	293		292 $\pm$ 14.0
			N ₄₅ P ₄₅	365	402	388		385 $\pm$ 18.7
			N ₉₀ P ₉₀	428	470	456		451 $\pm$ 21.4
Moldboard plowing at the depth of 20–22 cm	60	Middle of April	No fertilizers	237	266	252		252 $\pm$ 14.5
			N ₄₅ P ₄₅	329	362	346		346 $\pm$ 16.5
			N ₉₀ P ₉₀	396	412	410		406 $\pm$ 8.7
		3rd decade of April	No fertilizers	170	190	183		181 $\pm$ 10.1
			N ₄₅ P ₄₅	236	260	252		249 $\pm$ 12.2
			N ₉₀ P ₉₀	319	354	342		338 $\pm$ 17.8
	30	3rd decade of March	No fertilizers	285	317	306		303 $\pm$ 16.3
			N ₄₅ P ₄₅	380	418	405		401 $\pm$ 19.3
			N ₉₀ P ₉₀	451	484	472		469 $\pm$ 16.7
		Middle of April	No fertilizers	248	266	260		258 $\pm$ 9.2
			N ₄₅ P ₄₅	348	388	373		370 $\pm$ 20.2
			N ₉₀ P ₉₀	415	443	427		428 $\pm$ 14.0
	45	3rd decade of April	No fertilizers	177	192	187		185 $\pm$ 7.6
			N ₄₅ P ₄₅	262	288	278		276 $\pm$ 13.1
			N ₉₀ P ₉₀	331	380	361		357 $\pm$ 24.7
		3rd decade of March	No fertilizers	262	288	281		277 $\pm$ 13.5
			N ₄₅ P ₄₅	359	395	386		380 $\pm$ 18.7
			N ₉₀ P ₉₀	422	464	452		446 $\pm$ 21.6
	60	Middle of April	No fertilizers	245	273	266		261 $\pm$ 14.6
			N ₄₅ P ₄₅	323	352	345		340 $\pm$ 15.1
			N ₉₀ P ₉₀	382	410	395		396 $\pm$ 14.0
		3rd decade of April	No fertilizers	166	193	179		179 $\pm$ 13.5
			N ₄₅ P ₄₅	241	276	261		259 $\pm$ 17.6
			N ₉₀ P ₉₀	312	357	347		339 $\pm$ 23.6
Moldboard plowing at the depth of 20–22 cm	45	3rd decade of March	No fertilizers	283	311	302		299 $\pm$ 14.3
			N ₄₅ P ₄₅	376	424	400		400 $\pm$ 24.0
			N ₉₀ P ₉₀	444	477	464		462 $\pm$ 16.6
		Middle of April	No fertilizers	243	275	257		258 $\pm$ 16.0
			N ₄₅ P ₄₅	341	375	363		360 $\pm$ 17.2
			N ₉₀ P ₉₀	410	421	414		415 $\pm$ 5.6
	60	3rd decade of April	No fertilizers	182	201	197		193 $\pm$ 10.0
			N ₄₅ P ₄₅	260	295	271		275 $\pm$ 17.9
			N ₉₀ P ₉₀	336	372	359		356 $\pm$ 18.2
		3rd decade of March	No fertilizers	294	323	314		310 $\pm$ 14.8
			N ₄₅ P ₄₅	400	442	422		421 $\pm$ 21.0
			N ₉₀ P ₉₀	473	509	485		489 $\pm$ 18.3
Moldboard plowing at the depth of 20–22 cm	30	Middle of April	No fertilizers	262	288	279		276 $\pm$ 13.2
			N ₄₅ P ₄₅	366	406	381		384 $\pm$ 20.2
			N ₉₀ P ₉₀	418	455	438		437 $\pm$ 18.5
		3rd decade of April	No fertilizers	192	214	209		205 $\pm$ 11.5
			N ₄₅ P ₄₅	278	312	298		296 $\pm$ 17.1
			N ₉₀ P ₉₀	356	392	377		375 $\pm$ 18.1

Application of fertilizers significantly improved roots growth and development, which resulted in higher crop productivity (Angelopoulou et al., 2014). Some of the studies also report an earlier start of the flowering stage and generally stronger and healthier plants due to treatment with fertilizers (Nasrabadi et al., 2014). It was also established by some scientists, that milk thistle oil yields are higher under treatments with

fertilizers (Asfar et al., 2014). It was proved, that for obtaining high yields of milk thistle in dry zones with little rainfall, the crop should be cultivated under irrigated conditions (Karkanis et al., 2011; Asfar et al., 2015). In spite of the fact that the milk thistle needs proper soil moisture for better productivity, the crop can be successfully cultivated under the moderate deficit irrigation (Keshavarz Afshar et al., 2015). Drought stress can even increase oil quality of milk thistle (Malekzadeh et al., 2011). We should point out that we were the first to pay particular attention to the reaction of milk thistle on the inter-row spacing and primary tillage depth in irrigated conditions of the steppe zone. But it should be mentioned here, that some scientific studies report contradictory data to our results, that is to say that higher milk thistle seed yields were obtained under the narrow inter-row spacing (25 cm), while we obtained the maximum yields at the widest inter-row spacing treatments (60 cm). It has also been stated, that wider inter-row spacing is considered as worse treatment for seed yields, but not for the oil content in the seeds (Omer et al., 1993). Concerning the primary tillage depth, our results are in tune with some other studies reporting the maximum milk thistle seed yields were obtained under the plowing at a depth of 25–27 cm, comparative to the shallow tillage on 18–20 cm (Nikolaychenko et al., 2018). Results of ANOVA data processing of milk thistle oil yields are represented in Table 8.

Table 8

Average milk thistle oil yields in the trials depending on primary tillage depth, inter-row spacing, timing of sowing and mineral fertilizers application doses at the irrigated lands of the Steppe Zone (kg/ha)

Factors signatures	Treatments	Milk thistle oil yields
A	Shallow tillage at the depth of 14–16 cm	322
	Moldboard plowing at the depth of 20–22 cm	337
B	Inter-row spacing of 30 cm	313
	Inter-row spacing of 45 cm	329
C	Inter-row spacing of 60 cm	347
	Sowing in the 3rd decade of March	381
D	Sowing in the middle of April	341
	Sowing in the 3rd decade of April	266
D	No mineral fertilizers applied	245
	Mineral fertilizers dose of N ₄₅ P ₄₅	337
	Mineral fertilizers dose of N ₉₀ P ₉₀	406

Notes. For the average milk thistle oil yields LSD at $P < 0.05$ for the major effects of the studied factors (kg/ha): A = 9.2; B = 2.3; C = 1.6; D = 2.0. LSD at $P < 0.05$ for the partial effects of the studied factors (kg/ha): A = 47.8; B = 9.8; C = 6.7; D = 8.5. All the studied factors had significant influence on the milk thistle oil yield.

A strong point of our study, compared with others, is the multi-factorial design of the trials, which allowed us to estimate crop productivity under the influence of interacting cultivation technology elements. Understanding the presence of some limitations in the current study, we are going to continue scientific research in the field of milk thistle cultivation technology. We hope that our study will give a powerful incentive to production of milk thistle, as a highly valuable medicinal plant.

Conclusions

Milk thistle productivity was considerably affected by all the studied cultivation technology elements, which has been proved by the ANOVA results. The highest average seed yield (1.66 t/ha) and oil yield (489 kg/ha) was obtained under moldboard plowing at the depth of 20–22 cm, mineral fertilizer application at a dose of N₉₀P₉₀, sowing in the third decade of March with inter-row spacing of 60 cm. The maximum input in raising the crop productivity was made by fertilization. We recommend the cultivation of milk thistle by the above-mentioned agrotechnical complex on irrigated lands in the South of Ukraine.

References

- Afshar, R. K., Chaichi, M. R., Alipour, A., Jovini, M. A., Dashtaki, M., & Hashemi, M. (2015). Potential of milk thistle for biomass production in semiarid regions. *Crop Science*, 55(3), 1295–1301.

- Afshar, R. K., Chaichi, M. R., Assareh, M. H., Hashemi, M., & Liaghat, A. (2014). Interactive effect of deficit irrigation and soil organic amendments on seed yield and flavonolignan production of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Industrial Crops and Products*, 58, 166–172.
- Albassam, A. A., Frye, R. F., & Markowitz, J. S. (2017). The effect of milk thistle (*Silybum marianum*) and its main flavonolignans on CYP2C8 enzyme activity in human liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 271, 24–29.
- Andrzejewska, J., Sadowska, K., & Mielcarek, S. (2011). Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 462–468.
- Angelopoulou, F., Kakabouki, I., Papastyliou, P., Papatheohari, Y., Konstantas, A., Karkanis, A., Travlos, I., & Bilalis, D. J. (2014). Effect of organic fertilization on growth and development of the root system of two medicinal plants, oregano (*Origanum vulgare* L.) and milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Bulletin UASVM Horticulture*, 71, 2.
- Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2003). *Herbal medicines: A guide for healthcare professionals*. Pharmaceutical Press, London.
- Carrier, D. J., Crowe, T., Sokhansanj, S., Wahab, J., & Barl, B. (2002). Milk thistle, *Silybum marianum* L. Gaertn., flower head development and associated marker compound profile. *Journal of Herbs, Spices and Medical Plants*, 10, 65–74.
- Chiavari, G., Galletti, G. C., Marotti, M., & Piccaglia, R. (1991). Silymarin content of different *Silybum marianum* L. Gaertn. cultivars. *Herba Hungarica*, 1–2, 23–27.
- Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., & Benner, K. (1998). Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) for the therapy and liver disease. *American Journal of Gastroenterology*, 93(2), 139–143.
- Ghavami, N., & Ramin, A. A. (2007). Salinity and temperature effects on seed germination of milk thistle. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38, 2681–2691.
- Habán, M., Luščáková, D., Habánová, M., Macák, M., & Kobidová, R. (2015). Yield potential of milk thistle production in south western Slovakia. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 18(4), 79–82.
- Haban, M., Otepka, P., Kobida, L., & Habanova, M. (2009). Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion. *Horticultural Science*, 36(2), 69–74.
- Karkanis, A., Bilalis, D., & Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 825–830.
- Keshavarz Afshar, R., Chaichi, M. R., Rezaei, K., Asareh, M. H., Karimi, M., & Hashemi, M. (2015). Irrigation regime and organic fertilizers influence on oil content and fatty acid composition of milk thistle seeds. *Agronomy Journal*, 107(1), 187–194.
- Khan, M. A., Blackshaw, R. E., & Marwat, K. B. (2009). Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-Western Pakistan. *Weed Biology and Management*, 9(2), 99–105.
- Lange, D. (2002). Medicinal and aromatic plants: Trade, production, and management of botanical resources. XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants, 629, 177–197.
- Lucini, L., Kane, D., Pellizzoni, M., Ferrari, A., Trevisi, E., Ruzickova, G., & Arslan, D. (2016). Phenolic profile and *in vitro* antioxidant power of different milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] cultivars. *Industrial Crops and Products*, 83, 11–16.
- Malekzadeh, M., Mirmazloum, S. I., Mortazavi, S. N., Panahi, M., & Angorani, H. R. (2011). Physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn. cv. Budakalszi) under drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2886–2889.
- Morazzoni, P., & Bombardelli, E. (1995). *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*, 66, 3–42.
- Nasrabadi, S. E., Ghorbani, R., Moghaddam, P. R., & Mahallati, M. N. (2014). Phenological response of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) to different nutrition systems. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(4), 148–151.
- Nikolaychenko, N. V., Eskov, I. D., Druzhkin, A. F., Kishnikatina, A. N., Strizhkov, N. I., & Shyurova, N. A. (2018). Yield, oil content and biochemical composition of seeds of milk thistle, depending on the methods of soil cultivation in the Volga region steppe zone. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(1), 223–227.
- Omer, E. A., Refaat, A. M., Ahmed, S. S., Kamel, A., & Hammouda, F. M. (1993). Effect of spacing and fertilization on the yield and active constituents of milk thistle, *Silybum marianum*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 1(4), 17–23.
- Post-White, J., Ladas, E. J., & Kelly, K. M. (2007). Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integrative Cancer Therapies*, 6(2), 104–109.
- Rahimi, A., & Kamali, M. (2012). Different planting date and fertilizing system effects on the seed yield, essential oil and nutrition uptake of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Advances in Environmental Biology*, 6(5), 1789–1796.
- Ross, S. M. (2008). Milk thistle (*Silybum marianum*): An ancient botanical medicine for modern times. *Holistic Nursing Practice*, 22(5), 299–300.
- Saad-Allah, K. M., Fetouh, M. I., & Elhaak, M. A. (2017). Induction of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) growth and phytochemicals production by natural stimulants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 101–110.
- Saki, K., Eftekhari, Z., Jelodari, M., Shahsavari, S., Moradifar, M., & Bahmani, M. (2015). Therapeutic effects and pharmaceutical products manufactured from milk thistle (*Silybum marianum*) in Iran. *Advanced Herbal Medicine*, 1(2), 1–3.
- Seeff, L. B., Lindsay, K. L., Bacon, B. R., Kresina, T. F., & Hoofnagle, J. H. (2001). Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. *Hepatology*, 34(3), 595–603.
- Shamsi, K. (2009). Effect of planting date and density on the yield and yield components of milk thistle (*Silybum marianum* L.). *Journal of Applied Biosciences*, 16, 862–863.
- Siegel, A. B., & Stebbing, J. (2013). Milk thistle: Early seeds of potential. *The Lancet Oncology*, 14(10), 929.
- Smatana, J., & Macák, M. (2011). Analysis of cropping patterns of medicinal and spices plants growing on prime arable land. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 14(2), 37–40.
- Stancheva, I., Georgiev, G., Geneva, M., Ivanova, A., Dolezal, M., & Tumova, L. (2010). Influence of foliar fertilization and growth regulator on milk thistle seed yield and quality. *Journal of Plant Nutrition*, 33(6), 818–830.
- Tamayo, C., & Diamond, S. (2007). Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.). *Integrative Cancer Therapies*, 6(2), 146–157.
- Wierzbowska, J., Bowszys, T., & Sternik, P. (2012). Effect of a nitrogen fertilization rate on the yield and yield structure of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Ecological Chemistry and Engineering A*, 19(3), 295–300.



Modeling the invasiveness of *Ulmus pumila* in urban ecosystems in conditions of climate change

Y. Lykholat, N. Khromykh, O. Didur, A. Alexeyeva, T. Lykholat, V. Davydov

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 11.03.2018

Received in revised form
02.05.2018

Accepted 06.05.2018

Oles Honchar Dnipro
National University,
Gagarin av., 72,
Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-229-20-48.
E-mail: lykholat2006@ukr.net

Lykholat, Y., Khromykh, N., Didur, O., Alexeyeva, A., Lykholat, T., & Davydov, V. (2018). Modeling the invasiveness of *Ulmus pumila* in urban ecosystems under climate change. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 161–166. doi:10.15421/021824

Climatic change can influence the boundaries of the natural and alien plant species distribution. Fluctuations in air temperature, relative humidity and other factors can become a stimulus to initiation and / or intensification of the invasive nature of some adventive plant species, especially in areas with a high degree of anthropogenic transformation. This paper presents an analysis of the current state and a forecast of the invasiveness of the alien species *Ulmus pumila* L. (Asiatic elm) in the Northern Steppe Dnieper under conditions of climatic change. Two local *U. pumila* populations consisting of young different age trees were found during a route survey in the territory of the large industrial city Dnipro (48°28'00" N, 35°01'05" E) in its left-bank and right-bank parts. The seed origin of both local populations of Asiatic elm is confirmed by the fact that the young plants were spaced at a distance of 50 to 120 m from adult trees, which could potentially be parent plants. Both the left-bank and right-bank populations of *U. pumila* were located on abandoned construction sites, where there were numerous reinforced concrete slabs, piles and abundant construction debris. In both *U. pumila* local populations, 100 different-aged trees were randomly selected throughout the site, and their age and the morphometric parameters were measured to simulate the development process of the detected populations, provided the current trends of climate change continue. Analytical dependence of the number of trees in the left-bank local *U. pumila* population on development time was described by a polynomial model with a determination coefficient of 98.3%. The graphic representation of this model had a sinusoidal character, and a similar dynamic of left-bank population growth in the subsequent years was suggested. The dynamic of the number of trees in the right-bank local Asiatic elm population was described by an exponential model with a determination coefficient of 84.4%, and its graphical representation was exponential. According to the forecast, by 2020, the number of plants in the right-bank local population of *U. pumila* can increase 4-fold in comparison with 2015 while maintaining the current dynamic of population development. Thus, the created mathematical models adequately described the dynamics of development of both local populations during the last 15 years and predicted their subsequent intensive growth, confirming the initiation and intensification of the invasive nature of the alien species *U. pumila* by climatic change in the Steppe Dnieper.

Keywords: Asiatic elm; invasiveness; modeling; local population; climatic change

Introduction

Penetration of organisms into new territories has long acquired a global character and often provokes severe consequences for natural ecosystems, primarily, threatening the conservation of biodiversity at all levels (Blackburn et al., 2014; Dimalisile & Somers, 2017; Fateryga & Bagrikova, 2017; Foxcroft et al., 2017). Identification of invasive species and the ways of their introduction and spreading, implementation of measures to regulate or eradicate priority invasive species are today one of the urgent general tasks specified in a number of international documents. The European Convention on the Conservation of Wild Fauna and Flora and Natural Habitats (Berne, 1979) ratified by Ukraine in 1999, and the UN Convention on Biological Diversity (1992) ratified by Ukraine in 1994 call for the prevention of invasions, control or destruction of those alien species that threaten ecosystems, habitats, groupings and species.

In view of the above problem, the attention of researchers is attracted by the significant rate of degradation of the natural phytocenoses due to constant invasion of alien plant species in the natural communities (Pyšek and Richardson, 2006; Chytrý et al., 2009; Richardson & Rejmánek, 2011; Vilà et al., 2011; Kowarik & Pyšek, 2012; Pyšek

et al., 2012; Wagner et al., 2017). The consequences of introducing invasive plant species into phytocenoses are numerous and not only ecological (Lockwood et al., 2006; Abramova, 2012), but also economic (van Wilgen et al., 2001; Olson, 2006) and social (Pimentel et al., 2005; Olson, 2006). The economic consequences of invasions, directly caused by human economic activity, usually lead to financial losses (de Lange et al., 2010). Social consequences mainly affect human health and safety, as well as the quality of life in general (Lykholat et al., 2016); cultural heritage and other aspects of the social order (Marbua et al., 2014). Thus, alien species damage agriculture (Pratt et al., 2017) and forestry (Borisova, 2016), negatively transform the functioning of urban ecosystems and adversely affect human health by becoming a source of allergies and other diseases (Guzzetti et al., 2017; Pismarkina & Silaeva, 2018).

Alien species displaced by human activity beyond their native geographical range (Blackburn et al., 2014), behave differently in their new habitats. Some of the aliens quickly drop out of plant communities, others capture a significant part of the new territory, beyond which they do not or very rarely venture, others acclimatize, naturalize, displace the native species, and even take their place in the natural plant communities. Thence, invasive alien species are rightly considered the second

most important threat to biodiversity after the destruction of habitats. Habitat transformed under the influence of invasive species creates opportunities for the manifestation of aggressive qualities of those native species that can change their range, moving northward or appearing in a favourable environment for them in the urban phytocenoses and in private plots as well. Therefore, studies of the transformation of biological diversity (Nazarenko et al., 2018) and the geography of invasions (Maslyakov & Izhevsky, 2009; Lykholat et al., 2017; Pismarkina & Silaeva, 2018) are critically important. One of the key aspects of study of invasions is their quantitative assessment to determine the effect of different stages of invasion from species penetration (introduction) to the time when direct environmental impact occurs (Rouget et al., 2016).

The highest concentration of alien and invasive plant species is observed in urbanized areas (Trentanovi et al., 2013; Baranova & Bralagina, 2015; Baranovski et al., 2017), where the invasive processes manifest themselves specifically, differing from invasions in the natural communities (Gaertner et al., 2017). The variety of immigration paths for plants and their sprouts, the large number of disturbed habitats, high mobility of the human population and many similar factors lead to the fact that urbanized territories become the plots for the emergence of plant invasions and their further settlement (Fuentes et al., 2015; Lykholat et al., 2017).

Changes in the climatic conditions in the direction of increasing temperature and aridity that have occurred over the past decades have led to altered population dynamics of the native plant species (Hou et al., 2014; Bahguna & Jagadish, 2015; Sperlich et al., 2015; Mech et al., 2018). However, climate change can affect the likelihood of alien species invading a territory, as well as their chances of naturalization. In previous studies, we established the extremely high sensitivity of the autochthonous (Lykholat et al., 2016a) and alien (Lykholat et al., 2016b) woody plant species, even to minor fluctuations in the microclimate and illumination in the Steppe Dnieper. Given the continental nature of the regional climate, one should expect that strengthening of its aridity traits may be an effective stimulus in influencing the boundaries of plant species distribution. We suggested the possibility for some plant species to gain advantages for their survival and spread in the conditions of climatic change over recent years. To test the hypothesis, the present distribution of the alien woody plant species with an early association with artificially created habitats was investigated. The aim of this work was to identify, assess the current state and predict the dynamics of increase in the number of plants of alien tree species *Ulmus pumila* L. under the conditions of climatic change.

Materials and methods

Study area. Population studies were conducted in 2017 by the field route method in the territory of the large industrial city Dnipro (48°28'00" N, 35°01'05" E), which covers an area of 405 km² within the geographic zone of the Northern Steppe Dnieper. The city of Dnipro is divided by the Dnieper River into the right and left parts, so two study sites were selected, respectively, in the right-bank and left-bank part of the city (Fig. 1).

Considering that most of the research on the impact of climate change on plants is focused on the effects of temperature increase (Walther et al., 2009; Bahuguna & Jagadish, 2015), a comparative analysis of air temperature, precipitation level and number of dry days (relative humidity below 30%) during the vegetation period of woody plants was carried out. In this paper, the analysis was based on the data of the Hydrometeorological Service in Dnipropetrovsk region. Fluctuations in temperature (Fig. 2a) and in precipitation (Fig. 2b) in the recent years have been correlated with the climatic norm, which reflects the averaged data of 50 years of observations.

Data collection. The test objects were local populations of alien woody plant species of Asiatic elm (*Ulmus pumila* L.), which is of Central Asian origin and was introduced into the Steppe Dnieper in the middle of the last century. This species requires a lot of sunlight, demonstrating rapid growth, and does not tolerate shading. *U. pumila* plants also are rather intolerant of wet soil conditions, preferring well-drained soils. While this species is very resistant to drought and severe cold and is able to grow on poor soils, its short period of dormancy, flowering in

early spring, and subsequent continuous growth until the first autumn frosts, makes it vulnerable to the influence of cold.

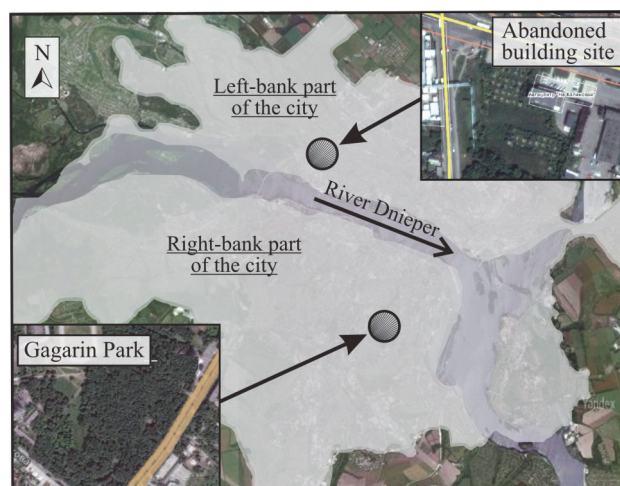


Fig. 1. Local populations of alien species *Ulmus pumila* L. in the city of Dnipro: ○ – investigated sites in the urban areas

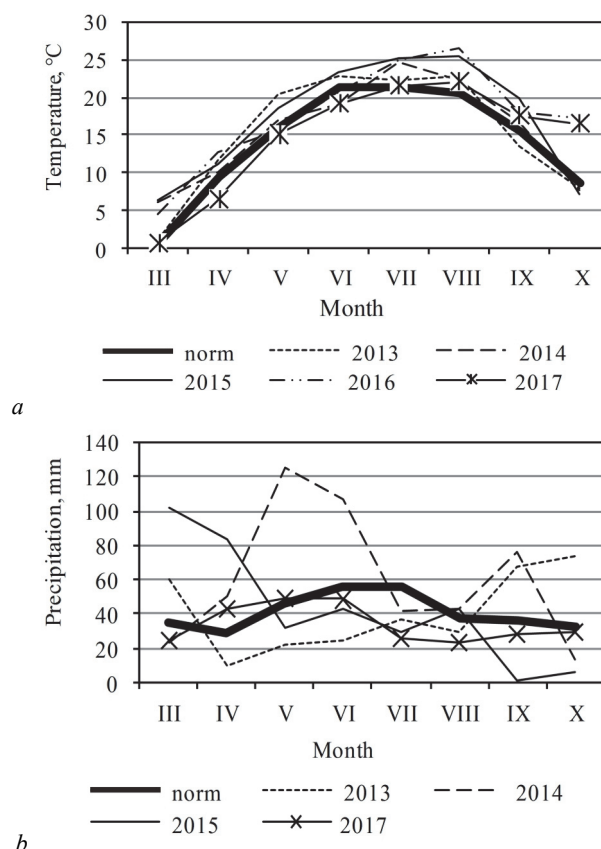


Fig. 2. Fluctuations in air temperature (a) and rainfall (b) relative to the climatic norm

The urban left-bank local population of *U. pumila* (48°30'58.5" N, 35°02'46.3" E) was found during a survey of an abandoned construction site on which piles were heaped and reinforced concrete construction panels were laid. The site was rectangular in shape with dimensions of 80 × 90 m, and it was covered with herbaceous vegetation represented by ruderal-steppe and ruderal-meadow species of plants. The pipes of the heating main were located along the two sides of the plot, and the other two sides adjoined steep slopes. The local population of *U. pumila* contained a large number of young trees of different ages, dispersed across the abandoned construction site. Adult, artificially planted plants of Asiatic elm were discovered outside the site at a distance of more than 50 m, which indicates the seed origin of the young plants of *U. pumila*.

The urban right-bank local population of *U. pumila* (48°26'07.9" N, 35°02'07.8" E) was identified on a site with unfinished construction on the territory of Gagarin Park. The size of the plot was about 80 × 70 m; the original soil cover (ordinary chernozem loam moderately low humus content, or Calcic Chernozem in WRB) was anthropogenically transformed due to the laying of concrete slabs at a depth of 5 to 20 cm, as well as due to the presence of construction debris. The different-aged young plants of Asiatic elm were spaced at a distance of 50 to 120 m from a single adult 50-year-old tree, which could potentially be the parent plant. This circumstance is a convincing proof of the seed origin of the local population of *U. pumila* on the plot in Gagarin Park.

In the left-bank and right-bank local populations, 100 young different-aged plants of Asiatic elm were randomly selected throughout the site. For each of *U. pumila* trees, the age, tree height, tree stem diameter at the level of 1.3 m, as well as the diameter of the root collar of the stem were measured.

Data analysis. The invasive status of *U. pumila* was determined in accordance with the generally accepted interpretation (Blackburn et al., 2014) as the ability of the species to form the populations of seed origin at a considerable distance from the parent plants.

In modern scientific research, mathematical modeling is used to study systems of varying complexity and nature, including biological ones. Simulation is carried out to achieve one of two purposes: either to predict the behaviour of various objects, or to optimize their functioning (Zamin et al., 2013). Since the models of prediction of species propagation are standard instruments in environmental studies used to solve a number of applied and conservation-related problems (Hanspach et al., 2010), we applied a standard approach. For this, the regression analysis methods implemented in the Excel and Statgraphics Centurion space were applied. The use of regression allows us to display the relationship of two variables in an analytical expression, to select a model with the best approximation of the data, and to make a prediction about the dependent variable (Frye, 2013). In our study, a forecast was carried out on the possible growth in the number of plants in the local populations of *U. pumila* at the study sites until 2020.

Results

The local population of young *U. pumila*, found in the left-bank part of the city of Dnipro on the abandoned construction site, was represented by trees of different age status and the morphometric parameters as well (Table 1).

Table 1
Morphometric parameters of plants
of the *U. pumila* left-bank local population

Tree age, year	Number of trees, % of total	Tree height, m	Root collar diameter, cm	Stem diameter, cm (at 1.3 m)
4	4	0.6–1.5	0.6–2.5	0.2–0.9
5	14	0.8–3.0	1.3–5.5	0.4–1.4
6	23	1.4–3.4	1.4–4.0	0.9–1.9
7	10	1.4–4.1	1.2–4.5	0.4–2.5
8	15	1.4–3.5	2.5–6.0	0.6–2.5
9	20	1.5–3.5	2.5–10.0	0.6–4.6
10	3	1.8–2.0	3.5–5.5	1.0–2.0
11	11	3.1–18.0	4.0–30.0	1.8–12.6

The largest part of the left-bank local population of Asiatic elm was composed of trees that are in the age range from 5 to 9 years. Morphometric indices of the young plants in the local population of *U. pumila* varied in a fairly wide range, which may reflect differences in growing conditions. Here we can talk about the unevenness of anthropogenically transformed soil conditions, the influence of the heating main and other factors. For instance, it was established that a group of young trees of *U. pumila*, represented for the most part by 11-year-old plants, grew in close proximity to concrete slabs laid on the abandoned building site (Fig. 3).

Thus, the local population of *U. pumila* young plants found on the abandoned building site in the left-bank part of the city of Dnipro had a seed origin and was formed over the last 12 to 15 years at a considerable distance from the potential parent plants, which indicates the invasive

nature of the population. Since the most important stage of this study was to predict the further development of the invasiveness of alien species, the obtained results were used to create a mathematical model of the invasion process in the local populations of *U. pumila* during conditions of change the regional climatic conditions.



Fig. 3. Growth of the young trees of *U. pumila* in the left-bank local population

The analytical dependence of the number of young plants of *U. pumila* on the time, during which the trees in the left-bank local population had been growing on the construction site, was described by the following equation:

$$y = 0,1063x^6 - 1281,8x^5 + 6 \cdot 10^6x^4 - 2 \cdot 10^{10}x^3 + 3 \cdot 10^{13}x^2 - 2 \cdot 10^{16}x + 7 \cdot 10^{18} \quad (R^2 = 98.3\%),$$

where, y is the number of plants (a specimen); x – study period (year).

Several different types of simple regression models (linear, polynomial, and logarithmic) were created, but they had a very low degree of data approximation. Of these, the polynomial model has revealed acceptable statistical estimates that allow predicting the development of invasiveness of the alien species Asiatic elm, provided that the current trends of climate change are maintained, in particular if the air temperature rises compared to the climatic norm. The graphic representation of the proposed polynomial model of the dependence of number of the trees on the formation time of the left-bank local *U. pumila* population has a sinusoidal character (Fig. 4).

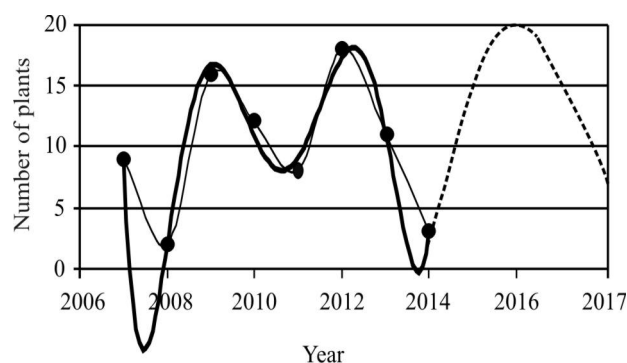


Fig. 4. Empirical and theoretical distribution of number of the trees by the years in the left-bank local population of alien species *U. pumila*: the thin solid line is empirical data, the thick line is a theoretical curve, and the discontinuous line is a predicted curve

The creation of this graphic model was based on the assumption that during the two years preceding the year of research (that is, in 2015 and 2016), the number of young plants in the left-bank local population of *U. pumila* continued to increase, in other words, the tendency to

increase in the invasiveness of the alien species persisted. The young trees of Asiatic elm on the abandoned construction site in the right-bank part of the city of Dnipro (the territory of the Gagarin Park) formed dense thickets of seed origin, in which the plants' density reached a level of 11,875 pieces $\cdot$ ha⁻¹.

The age of the Asiatic elm young plants that formed the right-bank local population ranged from 2 to 13 years. The wide range of variability of height and stem diameter of *U. pumila* young plants was revealed during the survey of the right-bank local population in the Gagarin Park (Table 2).

Table 2
Morphometric parameters of plants
in the *U. pumila* right-bank local population

Tree age, year	Number of trees, % of total	Tree height, m	Root collar diameter, cm	Stem diameter, cm (at 1.3 m)
2	10	2.4–5.4	1.8–2.0	0.4–0.6
3	26	5.1–6.9	2.0–2.3	0.5–0.7
4	10	6.7–9.0	2.0–2.4	0.6–0.9
5	16	3.2–4.9	1.2–2.2	0.8–1.4
6	10	6.0–7.2	2.8–3.9	1.2–2.0
7	6	4.0–4.6	3.8–5.5	2.8–4.0
8	5	6.8–7.3	6.8–7.8	6.8–7.3
9	4	6.2–6.5	7.2–8.0	6.3–6.9
10	4	6.5–6.9	7.8–8.4	6.8–7.5
11	4	5.7–6.6	13.8–15.5	9.5–11.2
12	3	9.1–9.8	16.5–18.0	11.5–12.6
13	2	8.9–9.3	21.0–22.5	12.2–12.5

Young plants aged from 3 to 5 years constituted the dominant group in the right-bank local population of Asiatic elm on the site with unfinished construction in the Gagarin Park. The obtained results testify to intensive development of the right-bank local population during the last 15 years preceding the research. The revealed dynamics of development of the young plants' local population indicates a progressive character of the population and confirms the invasive status of the alien species *U. pumila*.

The results of the study were used to create a mathematical model for the development of the right-bank local population of *U. pumila*. Various regression models were used to find the analytical expression of the dynamics of the invasive process in the local population of the alien species on the site in Gagarin Park. In comparison with other types of regression models (linear, polynomial, logarithmic, and others), the exponential model revealed acceptable statistical estimates. This model allowed us not only to get an idea of the dynamics of the number of Asiatic elm plants, but also to predict the development of invasiveness in the case of the current trends of climate change.

The analytical dependence between the number of young plants of seed origin in the right-bank local population of *U. pumila* and the time of population development was described by the following equation:

$$y = \exp(0.266653 \cdot x - 533.977) \quad (R^2 = 84.4\%),$$

where, y is the number of plants (a specimen); x – study period (year).

The mathematical model calculated for the right-bank local population of Asiatic elm has a high coefficient of determination (84.4%) and adequately approximates empirical data with a significance level ($P < 0.001$).

The graphic representation of the proposed model, describing the dynamics of the development of *U. pumila* local population on the site in Gagarin Park, was of an exponential nature (Fig. 5).

According to the created mathematical model, the number of the young plants of seed origin in the right-bank local population of Asiatic elm on the territory of Gagarin Park tends to increase up to 2020 inclusive. The forecast was made that in 2020 the local population of the alien species *U. pumila* on the site with unfinished construction in Gagarin Park will increase 4 times in comparison with 2015, 15 times in comparison with 2010, and more than 50 times in comparison with 2005.

Discussion

The specific feature of the Asiatic elm is that the phenological phases of tree flowering and seed formation occur in early spring, and that the seeds have a very short life span. Like recalcitrant seeds of other plant species, seeds of *U. pumila* lose their ability to germinate after a

few months in the open air (Copeland & McDonald, 2012). Consequently, the abundant appearance of *U. pumila* young plants of seed origin could be due to the favourable climatic conditions for the germination of seeds, the rapid growth of seedlings and the successful wintering of young plants. It follows that the necessary conditions for air temperature, relative humidity and other climatic factors should have been present in the area of research at a time when the local populations of *U. pumila* began to form, that is, in the last 15 years.

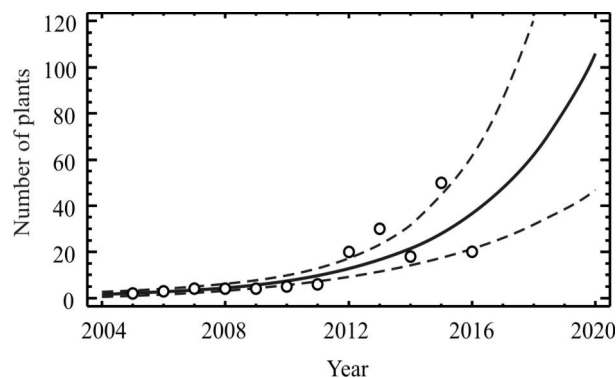


Fig. 5. Empirical and theoretical distribution of number of the trees by years in the right-bank local population of invasive alien species *U. pumila*: circles are empirical data, the thick line is a theoretical curve, and the discontinuous line is 95% confidence interval

Analysis of temperature curves (Fig. 2a) allows us to state that over the previous years, an excess of the temperature norm was observed during the periods corresponding to the beginning and the end of the Asiatic elm plants' vegetation. It is likely that this rise in air temperature could have played a key role in initiating the invasion of alien species *U. pumila* and the formation of both local populations on the abandoned construction sites found simultaneously in two different parts of the city of Dnipro. Our conclusion is supported by the results of an experiment with 8 different species of shrubby and herbaceous plants, which showed that the most common response to the effect of warming was the acceleration of spring growth (Prieto et al., 2009).

Comparison of the graphic model of the Asiatic elm invasion process in the left-bank local population with the meteorological data given above (Fig. 2b) allowed us to conclude that the increase or decrease in the number of young plants of seed origin coincides, respectively, with the increase or decrease in the amount of precipitation during the growing season. Obviously, the functional traits of plants that determine the development dynamics of the *U. pumila* left-bank local population were more sensitive to the moisture of the environment, including anthropogenically transformed soil on the site. Similar conclusions were made in studying the relationship between leaf anatomy variations and local climatic conditions; it was found that an approach that focuses on the functional traits of plants can be an effective modeling tool for assessing the potential consequences of climate change impacts on plant communities (Küster et al., 2011). These assumptions are consistent with the data (Zamin et al, 2013; Lindner et al., 2014) on the high level of influence of both rainfall and temperature on forest development.

Thus, the tendency for the increase in invasiveness, common to both local populations of alien species *U. pumila*, was found to differ in the nature of its manifestation due to the soil and microclimatic conditions of the given urbanscape. The growth in the number of young plants of seed origin in the left-bank local population of Asiatic elm has positively correlated with the amount of precipitation during the vegetative period, together with an increase in air temperature relative to the climatic norm. With regard to the right-bank local population of *U. pumila*, we should expect an exponential growth in the number, provided that the current trends of climate change continue. Differences in the dynamics of two local populations of one species, located in different microclimatic and soil conditions, do not contradict the data of other authors. According to a report (Hanspach et al., 2010), generalized linear models created using data on the distribution of the European plant species and climatic parameters had different levels of reliability.

The reason for this, according to the authors, was the dependence of the reliability of the model on the functional characteristics of plants, as well as the effect of ecology of the species.

At the same time, our study reflected the common problems that accompany the use of simple predictive models to assess the effects of global phenomena, and which are inevitable at the moment. So, according to Prieto et al. (2009), extrapolation of the consequences of global climate change to plant phenology is fraught with difficulties and inaccuracies, since various combinations of environmental factors occur simultaneously. Hanspach et al. (2010) take a similar view, believing that when creating temporal or spatial predictions, uncertainty is inevitable, and prediction errors can depend not only on the quality of the data and on the modeling algorithm used, but also on the different characteristics of the species.

Conclusion

Local populations of Asiatic elm found during the route surveys had a seed origin, were at a considerable distance from the potential parent adult trees, and consisted of young virgin and generative plants. It has been established that the number of the young plants in the local populations has been steadily increasing during the last 10–15 years, demonstrating the invasive nature of the alien species *U. pumila*. Mathematical models of the local population's dynamics in two different ecotopes confirm the increase in invasiveness of the alien species and predict the preservation of this trend in the subsequent period of development of local populations of *U. pumila* under the influence of climatic changes in the teppe Dnieper.

This work was carried out with the support of the State Fund for Fundamental Research of the Ministry of Education of Ukraine (Grant No. F76/103-2017).

References

- Abramova, L. M. (2012). Expansion of invasive alien plant species in the republic of Bashkortostan, the Southern Urals: Analysis of causes and ecological consequences. *Russian Journal of Ecology*, 43(5), 352–357.
- Bahuguna, R. N., & Jagdish, K. S. V. (2015). Temperature regulation of plant phenological development. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 83–90.
- Baranova, O. G., & Bralagina (Zyankina), E. N. (2015). Invazionnye vidy rastenij v tryoh gorodah Udmurtskoj Respubliki [Invasive plant species in three cities of Udmurt Republic]. *Russian Journal of Biological Invasions*, 4, 14–20 (in Russian).
- Blackburn, T. M., Essl, F., Evans, T., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., Kühn, I., Kumschick, S., Marková, Z., Mrugała, A., Nentwig, W., Pergl, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., & Bacher, S. (2014). A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PloS Biology*, 12(5), e1001850.
- Borisova, E. A. (2016). Woody plant invasions into the Upper Volga natural communities. *Russian Journal of Biological Invasions*, 1, 24–30 (in Russian).
- Burda, R. I. (2014). Evropejskaya politika botanicheskikh sadov po invazivnym chuzherodnym vidam [European policy of botanical gardens on invasive alien species]. *Industrial Botany*, 14, 3–14 (in Russian).
- Chytrý, M., Pyšek, P., Wild, J., Pino, J., Maskell, L. C., & Vilà, M. (2009). European map of alien plant invasions based on the quantitative assessment across habitats. *Diversity and Distributions*, 15(1), 98–107.
- Copeland, L. O., & McDonald, M. F. (2012). *Principles of seed science and technology*. Springer Science and Business Media.
- de Lange, W. J., & van Wilgen, B. W. (2010). An economic assessment of the contribution of biological control to the management of invasive alien plants and to the protection of ecosystem services in South Africa. *Biological Invasions*, 12(12), 4113–4124.
- Dumalisile, L., & Somers, M. J. (2017). The effects of an invasive alien plant (*Chromolaena odorata*) on large African mammals. *Nature Conservation Research: Zapovedna Nauka*, 2(4), 102–108.
- Fateryga, V. V., & Bagrikova, N. A. (2017). Invasion of *Opuntia humifusa* and *O. phaeacantha* (Cactaceae) into plant communities of the Karadag Nature Reserve. *Nature Conservation Research: Zapovedna Nauka*, 2(4), 26–39.
- Foxcroft, L. C., Pyšek, P., Richardson, D. M., Genovesi, P., & MacFadyen, S. (2017). Plant invasion science in protected areas: Progress and priorities. *Biological Invasions*, 19(5), 1353–1378.
- Fuentes, N., Saldaña, A., Kühn, I., & Klotz, S. (2015). Climatic and socioeconomic factors determine the level of invasion by alien plants in Chile. *Plant Ecology and Diversity*, 8(3), 371–377.
- Gaertner, M., Wilson, J. R. U., Cadotte, M. W., MacIvor, J. S., Zenni, R. D., & Richardson, D. M. (2017). Non-native species in urban environments: Patterns, processes, impacts and challenges. *Biological Invasions*, 19(12), 3461–3469.
- Guzzetti, L., Galimberti, A., Bruni, I., Magoni, C., Ferri, M., Tassoni, A., Sangiovanni, E., Agli, M. D., & Labra, M. (2017). Bioprospecting on invasive plant species to prevent seed dispersal. *Scientific Reports*, 7, 13799.
- Hanspach, J., Kühn, I., Pompe, S., & Klotz, S. (2010). Predictive performance of plant species distribution models depends on species traits. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12(3), 219–225.
- Hou, Q. Q., Chen, B. M., Peng, S.-L., & Chen, L.-Y. (2014). Effects of extreme temperature on seedling establishment of nonnative invasive plants. *Biological Invasions*, 16(10), 2049–2061.
- Kowarik, I., & Pyšek, P. (2012). The first steps towards unifying concepts in invasion ecology were made one hundred years ago: Revisiting the work of the Swiss botanist Albert Thellung. *Diversity and Distributions*, 18(12), 1243–1252.
- Küster, E. C., Bierman, S. M., Klotz, S., & Kühn, I. (2011). Modelling the impact of climate and land use change on the geographical distribution of leaf anatomy in a temperate flora. *Ecography*, 34(3), 507–518.
- Lindner, M., Fitzgerald, J. B., Zimmermann, N. E., Reyer, C., Delzon, S., van der Maaten, E., Schelhaas, M.-J., Lasch, P., Eggers, J., der Maaten-Theunissen, M., Suckow, F., Psomas, A., Poulter, B., & Hanewinkel, M. (2014). Climate change and European forests: What do we know, what are the uncertainties, and what are the implications for forest management? *Journal of Environmental Management*, 146, 69–83.
- Lockwood, J. L., Hoopes, M. F., & Marchetti, M. P. (2007). *Invasion Ecology*. Blackwell Publishing, Malden (Massachusetts).
- Lykholat, T., Lykholat, O., & Antonyuk, S. (2016). Immunohistochemical and biochemical analysis of mammary gland tumours of different age patients. *Cytology and Genetic*, 50(1), 32–41.
- Lykholat, Y. V., Khromykh, N. A., Ivan'ko, I. A., Matyukha, V. L., Kravets, S. S., Didur, O. O., Alexeyeva, A. A., & Shupranova, L. V. (2017). Otsinka i prohnoz invaziynosti deiakyykh adventyvnnykh roslin za vplyvu klimatichnykh zmin u Stepovomu Prydniprovi [Assessment and prediction of the invasiveness of some alien plants in conditions of climate change in the steppe Dnieper region]. *Biosystems Diversity*, 25(1), 52–59.
- Lykholat, Y. V., Khromykh, N., Ivanko, I., Kovalenko, I., Shupranova, L., & Kharytonov, M. (2016a). Metabolic responses of steppe forest trees to altitude-associated local environmental changes. *Agriculture and Forestry*, 62(2), 163–171.
- Lykholat, Y., Alekseeva, A., Khromykh, N., Ivan'ko, I., Kharytonov, M., & Kovalenko, I. (2016b). Assessment and prediction of viability and metabolic activity of *Tilia platyphyllos* in arid steppe climate of Ukraine. *Agriculture and Forestry*, 62(3), 55–64.
- Marbuah, G., Gren, I.-M., & McKie, B. (2014). Economics of harmful invasive species: A review. *Diversity*, 6(3), 500–523.
- Masyakov, V. Y., & Izhevsky, S. S. (2011). Invazii rastitel'noyadnykh nasekomykh v evropeyskoj chasti Rossii [Alien phytophagous insects invasions in the European Part of Russia]. *IGRAS, Moscow* (in Russian).
- Mech, A. M., Tobin, P. C., Teskey, R. O., Rhea, J. R., & Gandhi, K. J. K. (2018). Increases in summer temperatures decrease the survival of an invasive forest insect. *Biological Invasions*, 20(2), 365–374.
- Nazarenko, M., Lykholat, Y., Grigoryuk, I., & Khromykh, N. (2018). Optimal doses and concentrations of mutagens for winter wheat breeding purposes. Part I. Grain productivity. *Journal of Central European Agriculture*, 19(1), 194–205.
- Olson, L. J. (2006). The economics of terrestrial invasive species: A review of the literature. *Agricultural and Resource Economics Review*, 35(1), 178–194.
- Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52(3), 273–288.
- Pismarkina, E. V., & Silaeva, T. B. (2018). Osobennosti naturalizatsii chuzherodnykh rastenij na severo-zapade Privolzhskoj vozvysshennosti [Features of naturalization of alien plants in the North-West of Privolzhskaya Uplands]. *Journal of Biological Invasions*, 1, 88–102 (in Russian).
- Pratt, C. F., Constantine, K. L., & Murphy, S. T. (2017). Economic impacts of invasive alien species on African smallholder livelihoods. *Global Food Security*, 14, 31–37.
- Prieto, P., Penuelas, J., Niinemets, Ü., Ogaya, R., Schmidt, I. K., Beier, C., Tietema, A., Sowerby, A., Emmett, B. A., Lång, E. K., Kröel-Dulay, G., Lhotsky, B., Cesaraccio, C., Pellizzaro, G., De Dato, G., Sirca, C., & Estiarte, M. (2009). Changes in the onset of spring growth in shrubland species in response to experimental warming along a north-south gradient in Europe. *Global Ecology and Biogeography*, 18(4), 473–484.
- Pyšek, P., & Richardson, D. M. (2006). The biogeography of naturalization in alien plants. *Journal of Biogeography*, 33(12), 2040–2050.
- Pyšek, P., Jarošík, V., Hulme, P. E., Hejda, M., Schaffner, U., & Vilà, M. (2012). A global assessment of invasive plant impacts on resident species, communities and ecosystems: The interaction of impact measures, invading species' traits and environment. *Global Change Biology*, 18(5), 1725–1737.

- Richardson, D. M., & Rejmánek, M. (2011). Trees and shrubs as invasive alien species – a global review. *Diversity and Distributions*, 17(5), 788–809.
- Rouget, M., Robertson, M. P., Wilson, J. R. U., Hui, C., Essl, F., Renteria, J. L., & Richardson, D. M. (2016). Invasion debt – quantifying future biological invasions. *Diversity and Distributions*, 22(4), 445–456.
- Sperlich, D., Chang, C. T., Peñuelas, J., Gracia, C., & Sabaté, S. (2015). Seasonal variability of foliar photosynthetic and morphological traits and drought impacts in a Mediterranean mixed forest. *Tree Physiology*, 35(5), 501–520.
- Trentanovi, G., von der Lippe, M., Sitzia, T., Ziechmann, U., Kowarik, I., & Cierjacks, A. (2013). Biotic homogenization at the community scale: Disentangling the roles of urbanization and plant invasion. *Diversity and Distributions*, 19(7), 738–748.
- van Wilgen, B., Richardson, D., Le Maitre, D., Marais, C., & Magadela, D. (2001). Environment, development and sustainability, 3(2), 145–168.
- Vilà, M., Espinar, J. L., Hejda, M., Hulme, P. E., Jarošík, V., Maron, J. L., Pergl, J., Schaffner, U., Sun, Y., & Pyšek, P. (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: A meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters*, 14(7), 702–708.
- Wagner, V., Chytrý, M., Jiménez-Alfaro, B., Pergl, J., Hennekens, S., Biurrun, I., Knollová, I., Berg, C., Vassilev, K., Rodwell, J. S., Škvorec, Ž., Jandt, U., Ewald, J., Jansen, F., Tsiropidis, I., Botta-Dukát, Z., Casella, L., Attorre, F., Rašomavičius, V., Čuštėrevska, R., Schaminée, J. H. J., Brunet, J., Lenoir, J., Svenning, J.-C., Kački, Z., Petrášová-Šibíková, M., Šile, U., García-Mijangos, I., Campos, J. A., Fernández-González, F., Wohlgemuth, T., Onyshchenko, V., & Pyšek, P. (2017). Alien plant invasions in European woodlands. *Diversity and Distributions*, 23(9), 969–981.
- Walther, G.-R., Roques, A., Hulme, P. E., Sykes, M. T., Pyšek, P., Kuhn, I., Zobel, M., Bacher, S., Botta-Dukát, Z., Bugmann, H., Czucz, B., Dauber, J., Hickler, T., Jarošík, V., Kenis, M., Klotz, S., Minchin, D., Moora, M., Nentwig, W., Ott, J., Panov, V. E., Reineking, B., Robinet, C., Semchenko, V., Solarz, W., Thuiller, W., Vilà, M., Vohland, K., & Settele, J. (2009). Alien species in a warmer world: Risks and opportunities. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(12), 686–693.
- Zamin, N. T., Machado do Amaral, S., Filho, A. F., & Koehler, H. S. (2013). Effect of climate variables on monthly growth in modeling biological yield of *Araucaria angustifolia* and pinus taeda in the juvenile phase. *International Journal of Forestry Research*, 2013, Article ID 646759.



Interconnection of the immune system and the intensity of the oxidative processes under conditions of prolonged exposure to small doses of radiation

V. L. Sokolenko*, S. V. Sokolenko*, V. I. Sheiko**, O. V. Kovalenko**

*Bohdan Khmelnytsky National University of Cherkasy, Cherkasy, Ukraine

**Sumy State A. S. Makarenko Pedagogical University, Sumy, Ukraine

Article info

Received 29.03.2018

Received in revised form
07.05.2018

Accepted 11.05.2018

Bohdan Khmelnytsky
National University of Cherkasy,
Shevchenko st., 81,
Cherkasy, 18031, Ukraine.
Tel.: +38-067-869-17-91.
E-mail: sokolenko@ukr.net

Sumy State A. S. Makarenko
Pedagogical University,
Romenska st., 87,
Sumy, 40002, Ukraine.
Tel.: +38-067-266-70-99.
E-mail: interlycin@ukr.net

Sokolenko, V. L., Sokolenko, S. V., Sheiko, V. I., & Kovalenko, O. V. (2018). Interconnection of the immune system and the intensity of the oxidative processes under conditions of prolonged exposure to small doses of radiation. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 167–176. doi:10.15421/021825

This research studied the interrelationship between the immune and oxidative-antioxidant systems in a group of individuals who had lived for a long time in areas contaminated with radionuclides after the Chernobyl catastrophe and as a result experienced prolonged exposure to small doses of ionizing radiation. We have examined a group of 100 students aged 18–24, where 50 of them formed the control group and the remaining 50 belonged to the experimental group as they arrived from the territories of enhanced radioecological control (IV radiation zone, density of soil contamination by isotope ^{137}Cs $3.7 \times 10^4 - 18.5 \times 10^4 \text{ Bq/m}^2$). Here we determined the level of cortisol, leukocytes and their populations, the levels of lymphocyte subpopulations with phenotypes CD3+, CD5+, CD4+, CD8+, CD16+, CD72+, immunoregulatory index CD4+/CD8+, indicators of phagocytic activity of neutrophils and monocytes, IgG (H), IgM (H), IgA (H), malondialdehyde (MDA), ceruloplasmin (CP), transferrin (Tr), sulfhydryl (SH); and also calculated the oxidative stress index (OSI). We performed the analysis twice: in the absence/presence of additional emotional stress such as an examination session. The studies showed an increase in the oxidative stress index in the group examined from the experimental cluster, especially in terms of emotional stress. At the same time, the neutrophil level increased, but phagocytic activity of neutrophils and monocytes, the relative and absolute number of lymphocytes with phenotypes CD3+, CD5+, CD4+, CD4+/CD8+, and IgG levels decreased. Consequently we revealed the negative correlation between the indexes of oxidative stress in the group of examined (the oxidative stress index (ISO)/the level of malonic dialdehyde (MDA)) and the parameters of phagocytic activity of monocytes, the immunoregulatory index CD4+/CD8+, and the number of lymphocytes with the CD16+ phenotype. In this study we demonstrated the decrease in the participation of ceruloplasmin (CP) as an important antioxidant factor in maintaining the immune homeostasis of the group examined from radiation-contaminated areas compared with control group. The evidence of this is the lack of reliable correlation between ceruloplasmin level and immune system parameters. Moreover we found that radiation-induced intensification of oxidative processes in the experimental group grew in conditions of additional stresses of an emotional nature. Besides, it was accompanied by a significant correlation in the level of oxidative stress and phagocytic activity parameters. Reducing phagocytic activity and the CD4+/CD8+ index on the background of oxidative stress increase can be considered as a sign of immune system ageing, while a decrease in the number of lymphocytes with the CD16+ phenotype is a sign of antitumor defense inhibition. Thus, we draw the conclusion that the inhabitants of the territories of strengthened radioecological control, undergoing exposure to small doses of ionizing radiation from birth, show a significant imbalance of redox homeostasis, which creates the preconditions for immunoreactivity pathology development at the level of both innate and acquired immunity.

Keywords: Chernobyl accident; malonic dialdehyde; ceruloplasmin; T-lymphocytes; phagocytic activity; emotional stress

Introduction

The question of the medical status of the population living on the territories contaminated by radionuclides as the result of the Chernobyl catastrophe is quite controversial. At present, separate settlements of the IV radiation zone are deprived of the status of being affected by the Chernobyl catastrophe. However, some definite changes in the bodies of the local population caused by chronic irradiation in low doses (due to the soil activity of long-lived ^{137}Cs isotope, inhaled radionuclides and radionuclide intakes in food) may be manifested through a remote period of time in the form of more or less pronounced pathologies or pre-pathological conditions (Eheman et al., 2003; Davis et al., 2004). In particular, this concerns the state of the immune system, where significant radiation-induced structural and metabolic dysfunctions in

immune-competent cells are probable. Taking into account the integrative activity of the immune system as a factor in maintaining the antigenic homeostasis of the body, any disturbances in one of its components can be reflected in the work of the system as a whole (Manuck et al., 1991; Sheikh Sajjadih et al., 2009; Balogh et al., 2013).

The results of assessing the effects of major radiation catastrophes really indicate the possibility of immediate and long-term effects on the immune status of the affected people (Kusunoki & Hayashi, 2008; Kusunoki et al., 2010). At the level of nonspecific protection factors, adaptive or pathological changes induced by ionizing radiation are possible (Wang et al., 2013).

It should be taken into consideration that ionizing radiation is considered to be a very powerful stress factor, which potentially can lead to a decrease in immunological surveillance (Duffner, 2004), and

also to cause activation of oxidative processes (Nylund et al., 2014). With additional exogenous effects of a stress character, the risk of immune system impairment increases (Gleeson, 2007). In particular, this relates to the psycho-emotional load, which is considered to be one of the most common modern immune suppressants and stimulating agents to trigger adaptive reactions in the body (Segerstrom & Miller, 2004; Viru & Viru, 2004; Filaire et al., 2009). In parallel, the risk of further activation of oxidative processes increases. Indeed, chronic neural-psychological stress, interacting with adverse environmental factors, can lead to the formation of metabolic syndrome (Beckham et al., 2003). It is known that oxidative stress is involved in the development of metabolic syndrome (Roberts & Sindhu, 2009; Furukawa et al., 2017).

The oxidative processes in the body are normal physiological and biochemical phenomena. In particular, they include the process of lipid peroxidation. In this case, antioxidant systems provide realization of these reactions within the limits of the homeostatic norm. Under conditions of ionizing radiation influence, the development of oxidative processes qualitatively different from spontaneous cells, is probable. Radiolysis products with high oxidation or reduction activity can initiate them. Radiation-induced oxidative processes are particularly clearly manifested in cases of acute irradiation (Combs & Combs, 1986). In the range of small doses, the consequences are rather ambiguous and, obviously, depend on certain additional factors (Stone & Dratz, 1982). Definitely, ionizing radiation, even in small doses, leads to the activation of lipid peroxidation reactions, while the surplus of their products can have a damaging effect, on the background of exhaustion of enzyme and non-enzyme antioxidant systems (Dostert et al., 1991). In addition, among people affected by radiation catastrophes, a significant decrease in the level of haptoglobin in plasma as an important antioxidant protection factor is observed (Nylund et al., 2014).

There is much evidence of the interaction between the immune system and oxidative stress in terms of diseases of different etiologies. Active forms of oxygen are involved in early T-cell activation and proliferation processes modulation. During chronic oxidative stress, neoantigens that stimulate autoimmune reactions are formed (Stewart et al., 2004; Laddha et al., 2013). Acute oxidative stress can suppress immunity and create preconditions for the development of oncological diseases (Cooke et al., 2003; Reiche et al., 2005). Free radicals are produced by the immune cells themselves to kill infectious factors. However, strong oxidants, in particular, free radicals of oxygen, cause additional stressful effects on natural resistance factors, which results in a decrease in their response to antigens (Roy et al., 1991).

In our previous studies, typical signs of stress reactions among individuals aged 18–24 years old who lived on the territory of enhanced radiation control were marked, in particular, raised level of cortisol (Sokolenko & Sokolenko, 2015), which increased further in conditions of additional psycho-emotional stress (Sokolenko, 2015). As a result, signs of immunosuppression were observed in this group, which were accompanied by an imbalance of thyroid status and lipid metabolism, changes in oxidative and antioxidant activity (Sokolenko & Sokolenko, 2015, 2017a; 2017b; Sokolenko 2016).

The purpose of the work is to find out the specifics of interconnection between the parameters of immune and oxidative-antioxidant systems in a group of inhabitants from the radiation-polluted territories under conditions of additional psycho-emotional stress or its absence.

Materials and methods

We examined 100 persons, including a group of people from non-contaminated areas (control group, 50 persons) and inhabitants of territories of the strengthened radio-ecological control (IV radiation zone, density of soil pollution with isotopes ^{137}Cs $3.7 \times 10^4 - 18.5 \times 10^4$ Bq/m², 50 persons). All those examined were students of Cherkasy National University, aged 18–24, at the time of research not having any acute diseases. There was no statistically significant difference between volunteers of different sexes (females were examined in the follicular stage of the menstrual cycle), so they were considered as a single group in the future. The winter examination session played the role of additional stress factor, which predetermined the development of psycho-

emotional load. 15 ml of venous blood was taken in the morning, before eating. The first analysis of the blood parameters was made in the inter-session period, the second after the first exam. Medical examinations and blood were performed by qualified medical staff at “Edem” sanatorium at Cherkasy National University and the biochemical laboratory of the City Hospital №1 in Cherkasy.

The research was conducted in compliance with the ethical principles of the European Convention and the Helsinki Declaration, those examined agreed to be tested and that the results should be published. The cortisol content in serum was determined by immune enzyme method using “BIO-RAD” set (the USA).

The total number of white blood cells was calculated in Hemocytometer, absolute and relative number of their populations – based on a blood smear (painting by Romanovsky-Giemsa).

Expression of surface antigens by peripheral blood lymphocyte was determined using the immune fluorescence method using monoclonal antibodies to surface markers of immune cells LT1 (for evaluation of the expression of pan T cell marker CD5), LT3 (for evaluation of the expression of pan T cell marker CD3), LT4 (for evaluation of the expression of T cell helper activity marker CD4), LT8 (for evaluation of the expression of T cell marker of effector / suppressor activity CD8), LNK16 (for evaluation of the expression of natural killer activity marker CD16) and F(ab)2 -fragments of sheep antibody to mouse IgG labeled with FITC (“Sorbert”, Moscow). The level of immune globulins in serum was determined by radial immune diffusion on Mancini using monospecific serums against IgG (H), IgM (H), IgA (H).

The phagocytic index (FI is the average number of microorganisms absorbed by one leukocyte) and phagocytic number (FF – the rate of phagocytic leukocytes, which means the number of leukocytes with phagocytic activity to 100) of neutrophils and monocytes were calculated for their ability to absorb yeast cells (SNL “GRANUM”, Kharkiv) with smear painting by Romanovsky-Giemsa.

We studied the components of oxidative processes and antioxidant system in accordance with the method (Korol & Myhal, 2012). And there determined the content of malondialdehyde (MDA), ceruloplasmin (CP), transferrin (Tr) and sulfhydryl (SH) groups.

The calculation of the oxidative stress index (OSI) was made by formula: $OSI = MDA_e / MDA_c : [(C_{Pe} / C_{Pc} + T_d / Tr_k + SH_d / SH_k) : 3]$, where OSI is an index of oxidative stress; MDA_e – the content of MDA in the experimental group; MDA_c – MDA in the control group (average); C_{Pe} – content of CP in the experimental group; C_{Pc} – CP in control group (average); T_e – content of Tr in the experimental group; T_c – Tr in the control group (average); SH_e – the content of SH in the experimental group; SH_c – SH in the control group (average); 3 – number of components (Korol & Myhal, 2012).

The data are expressed as mean $\pm$ standard error ($M \pm SE$). One-way ANOVA was performed to detect statistical significance. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. Correlation analysis was performed using the Pearson correlation coefficient.

Results

It was established that the analyzed parameters in the control group were within the limits of the homeostatic norm. People, who had lived on the territories of enhanced radio-ecological control for a long time and were subjected to prolonged exposure to ionizing radiation in small doses showed a significant increase in relative and absolute number of stab and segmental neutrophils, eosinophils and decrease in the relative and absolute number of lymphocytes, phagocytic number of neutrophils, phagocytic index and phagocytic number of monocytes compared with the control group. Also, in the analyzed group, there was a relative suppression of the T-cell immunity, which manifests itself in a decrease of the relative and absolute number of lymphocytes expressing antigens of CD3, CD5, CD4 and CD16. Decreased immune regulatory index $CD4^+/CD8^+$ and increased serum immunoglobulin IgG concentration was marked (Table 1).

The analysis of the oxidative-antioxidant balance of the examined groups showed that the level of malondialdehyde in the experimental group had a tendency to increase; however, the difference with the control group did not have any statistical significance. Alongside this, there is no

significant difference from the control data for ceruloplasmin and transferrin; the content of sulfhydryl compounds was significantly lowered (Table 1).

Under conditions of increased psycho-emotional stress caused by the examination sessions, in the control group there were observed changes that did not lead to overrunning of the homeostatic norm. People undergoing prolonged exposure to small doses of ionizing radiation showed a significant increase in the relative and absolute number of stab and segmental neutrophils; reduction of the relative and absolute number of lymphocytes, lymphocytes with phenotypes CD3+, CD5+, CD4+, CD16+, immune regulatory index CD4+/CD8+, serum IgG, phagocytic index and phagocyte number of neutrophils and monocytes. There was also a tendency to increase in the level of malondialdehyde

in the control group and a significant increase of the parameter in the group of students who came to study from the territories of enhanced radio-ecological control. That is, peroxidation in this group was more intensive. In both groups, it was compensated by a significant increase in the content of sulfhydryl compounds in serum, however, in the experimental group; the index remained significantly lower than in the control before and after the psycho-emotional load (Table 1).

In the examined students from both groups there were no significant changes in ceruloplasmin. As a result, in the group of people who suffered chronic exposure to small doses of ionizing radiation, the index of oxidative stress increased significantly in comparison with the control group both before stress and after psycho-emotional load.

Table 1

Coefficient of cortisol, immune and oxidative-antioxidant systems of the examined students

Components	Control, n = 50, M ± SE		Experimental group: people undergoing prolonged influence of small radiation doses, n = 50, M ± SE	
	before emotional stress	during emotional stress	before emotional stress	during emotional stress
Cortisol, nmol/l	351.12 ± 10.136	801.25 ± 12.541 *	633.48 ± 22.156 *	884.97 ± 14.884 **, **
Leucocytes, x 10 ⁹ /l	6.60 ± 0.067	6.61 ± 0.055	6.91 ± 0.065 *	7.07 ± 0.166 *
Lymphocytes, %	26.52 ± 0.278	26.15 ± 0.285	23.52 ± 0.275 *	20.36 ± 0.397 **, **
Lymphocytes, x 10 ⁹ /l	1.80 ± 0.036	1.73 ± 0.035	1.66 ± 0.041 *	1.26 ± 0.046 **, **
Monocytes, %	5.71 ± 0.296	5.24 ± 0.310	6.12 ± 0.244	5.56 ± 0.239
Monocytes, x 10 ⁹ /l	0.41 ± 0.035	0.40 ± 0.041	0.43 ± 0.019	0.40 ± 0.045
Stab neutrophils, %	3.55 ± 0.275	4.02 ± 0.302	4.59 ± 0.061 *	7.15 ± 0.163 **, **
Stab neutrophils, x 10 ⁹ /l	0.25 ± 0.013	0.29 ± 0.024	0.31 ± 0.019 *	0.41 ± 0.029 **, **
Segmental neutrophils, %	62.85 ± 0.496	63.97 ± 0.587	65.22 ± 0.481 *	67.33 ± 0.496 **, **
Segmental neutrophils, x 10 ⁹ /l	4.18 ± 0.066	4.34 ± 0.089	4.47 ± 0.052 *	6.03 ± 0.096 **, **
Basophils, %	0.12 ± 0.071	0.15 ± 0.079	0.34 ± 0.101	0.41 ± 0.105
Basophils, x 10 ⁹ /l	0.01 ± 0.005	0.01 ± 0.007	0.02 ± 0.009	0.02 ± 0.009
Eosinophils, %	1.12 ± 0.298	1.23 ± 0.310	2.31 ± 0.206 *	2.86 ± 0.225 *
Eosinophils, x 10 ⁹ /l	0.07 ± 0.018	0.09 ± 0.021	0.12 ± 0.012 *	0.14 ± 0.021
Phagocytic index of neutrophils	5.71 ± 0.305	5.75 ± 0.387	4.70 ± 0.301 *	3.77 ± 0.294 **, **
Phagocytic number of neutrophils	76.05 ± 0.497	76.92 ± 0.524	74.52 ± 0.723	71.37 ± 0.755 **, **
Phagocytic index of monocytes	5.50 ± 0.417	5.39 ± 0.594	3.45 ± 0.410 *	2.47 ± 0.159 **, **
Phagocytic number of monocytes	75.33 ± 0.498	74.85 ± 0.513	71.36 ± 0.687 *	68.75 ± 0.801 **, **
CD3 ⁺ , %	66.02 ± 0.457	63.31 ± 0.410 *	62.55 ± 0.610 *	54.27 ± 1.156 **, **
CD3 ⁺ , x 10 ⁹ /l	1.12 ± 0.027	1.06 ± 0.033	1.00 ± 0.028 *	0.72 ± 0.061 **, **
CD5 ⁺ , %	69.51 ± 0.597	68.99 ± 0.315	65.69 ± 0.594 *	60.36 ± 1.113 **, **
CD5 ⁺ , x 10 ⁹ /l	1.36 ± 0.033	1.25 ± 0.054	1.13 ± 0.031 *	0.75 ± 0.073 **, **
CD4 ⁺ , %	40.29 ± 0.406	33.33 ± 0.455 *	33.77 ± 0.597 *	27.74 ± 1.145 **, **
CD4 ⁺ , x 10 ⁹ /l	0.80 ± 0.018	0.69 ± 0.058	0.60 ± 0.021 *	0.35 ± 0.031 **, **
CD8 ⁺ , %	27.48 ± 0.406	23.45 ± 0.310 *	26.85 ± 0.394	26.01 ± 0.518 *
CD8 ⁺ , x 10 ⁹ /l	0.49 ± 0.019	0.44 ± 0.021	0.49 ± 0.018	0.44 ± 0.036
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.67 ± 0.031	1.40 ± 0.022 *	1.38 ± 0.031 *	1.13 ± 0.029 **, **
CD16 ⁺ , %	18.55 ± 1.023	10.61 ± 0.195 *	14.71 ± 1.045 *	10.22 ± 1.096 **, **
CD16 ⁺ , x 10 ⁹ /l	0.35 ± 0.041	0.19 ± 0.021 *	0.25 ± 0.017 *	0.10 ± 0.018 **, **
CD72 ⁺ , %	9.88 ± 0.178	9.63 ± 0.199	10.33 ± 0.365	9.64 ± 1.012
CD72 ⁺ , x 10 ⁹ /l	0.17 ± 0.015	0.16 ± 0.014	0.19 ± 0.021	0.15 ± 0.026
IgG, mg/ml	10.15 ± 0.198	8.72 ± 0.136 *	11.37 ± 0.464 *	6.49 ± 0.991 **, **
IgM, mg/ml	1.66 ± 0.122	1.47 ± 0.041	1.89 ± 0.145	1.81 ± 0.154 *
IgA, mg/ml	1.81 ± 0.096	1.77 ± 0.055	1.70 ± 0.096	1.64 ± 0.099
Malondialdehyde (MDA), mmol/l	125.41 ± 27.510	150.75 ± 36.410	136.31 ± 14.145	200.65 ± 24.142 **, **
Ceruloplasmin (CP), g/l	0.24 ± 0.018	0.27 ± 0.029	0.22 ± 0.026	0.21 ± 0.022
Transferrin (Tr) cond. un.	5.33 ± 1.012	5.50 ± 1.018	4.39 ± 0.896	4.25 ± 1.151
SH-groups, mmol/l	2.52 ± 0.027	2.73 ± 0.068 *	1.70 ± 0.042 *	2.00 ± 0.061 **, **
Oxidative stress index (OSI), un.	1.03 ± 0.041	1.10 ± 0.053	1.41 ± 0.048 *	1.95 ± 0.059 **, **

Notes: * – P < 0.05 compared to control; ** – P < 0.05 compared to the coefficient before psycho-emotional load.

Correlation analysis in the inter-session period, under the conditions of absence of additional psycho-emotional load (the graphs show the most informative correlations), showed that there was a significant positive correlation between the level of malonic dialdehyde and the relative and the absolute number of neutrophils. A similar correlation with the level of neutrophils was noted for the index of oxidative stress, and the value of the correlation coefficient is slightly higher. However, the correlation of malonic dialdehyde index and index of oxidative stress with phagocytic activity of neutrophils (phagocytic index and phagocytic number) is negative and doesn't have any statistical significance (Fig. 1).

A slightly different situation is typical for correlations of another population of professional phagocytes of peripheral blood – monocytes. Their correlation (both relative and absolute) with the level of malonic dialdehyde and the index of oxidative stress was negative, and the reliability of the correlation coefficient was noted for the phagocytic index and

phagocytic number of monocytes (Fig. 2). The analysis of correlations between indices of oxidation-antioxidant system of the persons examined and lymphocyte subpopulations of peripheral blood showed the following: the malonic dialdehyde and oxidative stress index negatively correlated with the relative and absolute number of lymphocytes with phenotypes CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, and immunoregulatory index CD4+/CD8+. Correlation with the level of T lymphocytes with CD8+ phenotype was not statistically significant. In all cases, the negative correlation with the indices of oxidative stress was higher than with malonic dialdehyde level. The highest value of the correlation coefficient was noted for the immune regulatory index CD4+/CD8+ (Fig. 3, 4).

The analysis of correlations, conducted under the conditions of additional psycho-emotional load (during the examination session), showed an increase of the interdependence between the analyzed indices, which was manifested by the increase in the values of the correlation coefficient

(Fig. 5–8). Negative correlations between the indices of oxidative stress and the indices of phagocytic activity of neutrophils (phagocytic index and phagocytic number) were statistically significant (Fig. 5).

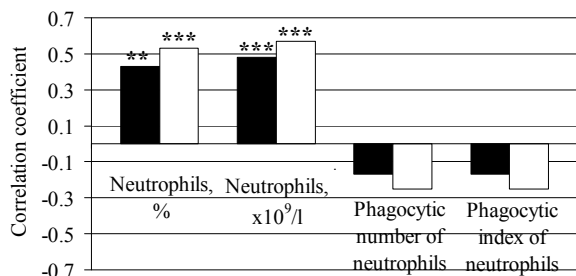


Fig. 1. Correlation between the level of neutrophils, their phagocytic activity and the level of malondialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation, to emotional stress (n = 50):
 ** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$;
 *** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.001$

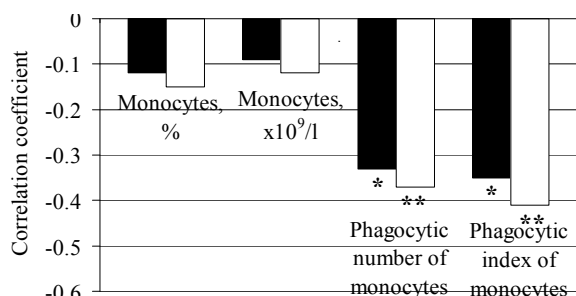


Fig. 2. Correlation between the level of monocytes, their phagocytic activity and the level of malondialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation, to emotional stress (n = 50):
 * – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.05$;
 ** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$

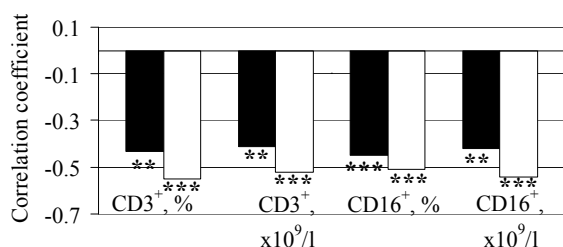


Fig. 3. Correlation between the level of lymphocytes with phenotypes CD3⁺, CD16⁺ and the level of malondialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation, to emotional stress (n = 50):
 ** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$;
 *** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.001$

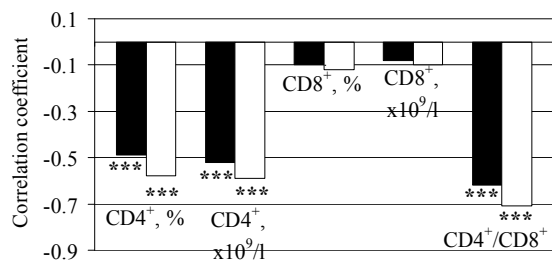


Fig. 4. Correlation between the level of lymphocytes with phenotypes CD4⁺, CD8⁺, the immunoregulatory index CD4⁺/CD8⁺ and level of malonic dialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation, to emotional stress (n = 50):
 *** – the reliability of the correlation coefficient, $P < 0.001$

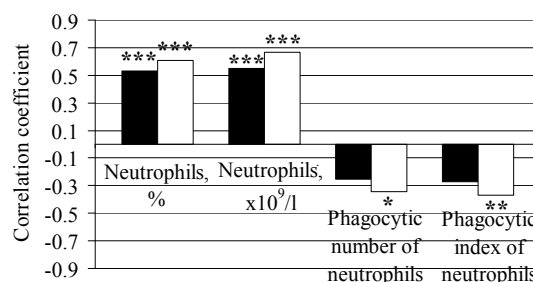


Fig. 5. Correlation between the level of neutrophils, their phagocytic activity and the level of malonic dialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation during emotional stress (n = 50):
 * – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.05$;
 ** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$;
 *** – the reliability of the correlation coefficient, $P < 0.001$

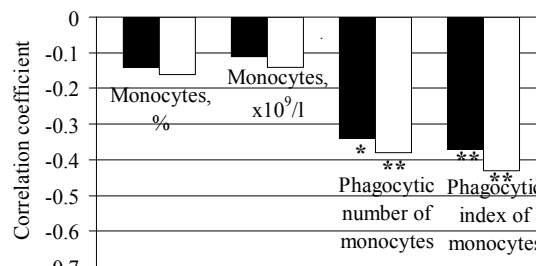


Fig. 6. Correlation between the level of monocytes, their phagocytic activity and the level of malonic dialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation during emotional stress:
 * – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.05$;
 ** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$

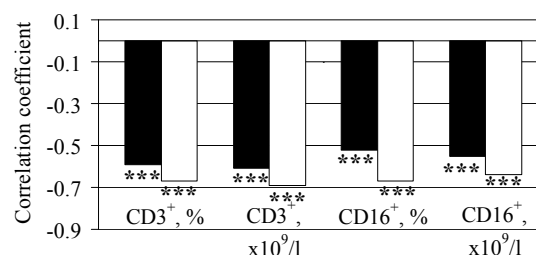


Fig. 7. Correlation between the level of lymphocytes with phenotypes CD3⁺, CD16⁺ and the level of malonic dialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation during emotional stress;
 *** – the reliability of the correlation coefficient, $P < 0.001$

The analysis of the correlation between the indices of the oxidative-antioxidant system and the level of serum immune globulins showed that during the inter-session period, the values of the coefficient were positive, however, they had no statistical significance (Fig. 9). Under conditions of additional psycho-emotional loading, the value of the correlation coefficient between the level of malonic dialdehyde, the oxidative stress index and the levels of serum immune globulins IgG and IgM changed the sign to negative; regarding IgG, the index has become statistically significant.

The statistical significance of the correlation between the level of ceruloplasmin as an important antioxidant factor and the analyzed immune system parameters was noted only for the control group during the period of intensified psycho-emotional stress (as to immune regulatory index CD4⁺/CD8⁺, the phagocytic index of neutrophils, relative and absolute number of lymphocytes with the CD16⁺) (Fig. 10, 11).

Discussion

Persons who had lived for a long time in the areas contaminated by radionuclides experienced the signs of a chronic stress state. In particu-

lar, we observed an increased level of cortisol and oxidative stress index. The increase in the oxidative stress index was, in turn, provoked by a tendency to increase of malondialdehyde (MDA) on the background of the absence of significant changes in the level of transferrin, ceruloplasmin, as well as a significant reduction of an important protector of oxide process – sulphhydryl compounds. Under the conditions of intensified psycho-emotional load, the intensification of stressful activity was marked. This is evidenced by further increase in the level of stress markers – cortisol and MDA (Table 1).

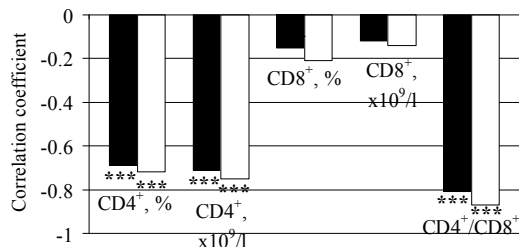


Fig. 8. Correlation between the level of lymphocytes with phenotypes CD4⁺, CD8⁺, the immunoregulatory index CD4⁺/CD8⁺ and the level of malonic dialdehyde (black) / oxidative stress index (white) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation during emotional stress (n = 50):

*** – the reliability of the correlation coefficient, $P < 0.001$

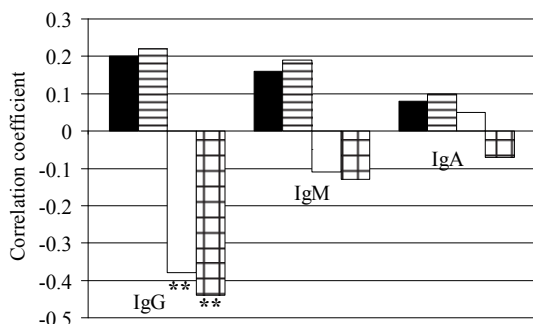


Fig. 9. Correlation between the level of serum immunoglobulins and the level of malodialdehyde (black – before emotional stress, white – during emotional stress) / oxidative stress index (striped – before emotional stress, checked – during emotional stress) in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation (n = 50); ** – the reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$

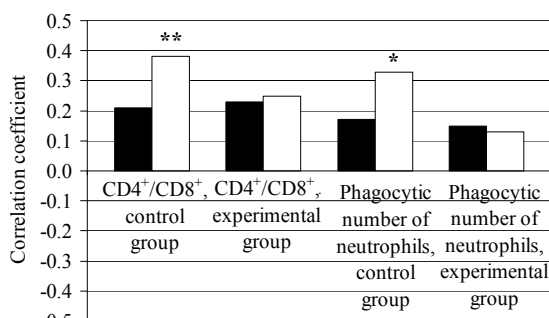


Fig. 10. Correlation between the level of ceruloplasmin and the immunoregulatory index CD4⁺/CD8⁺ (black – before emotional stress, white – during emotional stress), and also between ceruloplasmin and phagocytic number of neutrophils (black – before emotional stress, white – during emotional stress) in the control group (n = 50) and in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation (n = 50); * – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.05$; ** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$

Increase in corticosteroids level is considered to be one of the most common signs of stress, contributing to the adaptation of the body to environmental changes and reflecting the response to various exogenous stimuli (Filaire et al., 2009; Viru & Viru, 2004). Glucocorticoids are the key factors in stress-induced changes in immunoreactivity. In general,

despite the differences in physical and psychological stress factors, their biochemistry and the effects on the body are similar. Prolonged chronic stress results in the same effects that are typical for acute stress conditions. The indicated patterns apply, in particular, to immune system reactions to stress factors (Butcher & Lord, 2004).

Today, the concept of “stress” is defined as the process of modified biochemical homeostasis under the influence of psychological, physiological or environmental stress factors. Any factor potentially dangerous to the body can be classified as a stressor and may activate functioning of homeostatic systems in the body (Rahal et al., 2014).

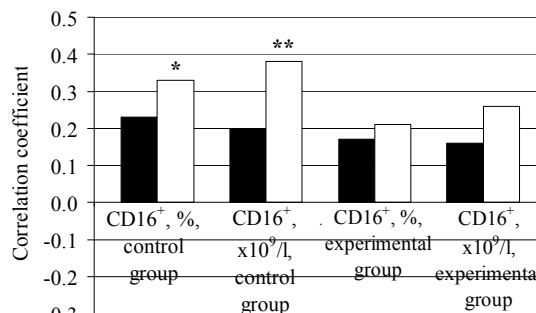


Fig. 11. Correlation between the level of ceruloplasmin and the level of lymphocytes with the CD16⁺ phenotype (relative and absolute number) in the control group (n = 50) and in the group of people who suffered prolonged exposure to small doses of ionizing radiation (n = 50), before (black) and during (white) emotional stress;

* – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.05$;

** – reliability of the correlation coefficient, $P < 0.01$

Definitely, ionizing radiation is among the recognized stressors (Duffner, 2004), and it stimulates the development of oxidative processes and, as a result, leads to the formation of oxidative stress (Stone & Dratz, 1982; Combs & Combs, 1986; Nylund et al., 2014). However, the activation of free radical processes (oxidative stress) is also a typical consequence of the influence of stress factors of another nature (Rahal et al., 2014). In particular, there are findings of immunity inhibition and oxidative DNA damage due to psychological stress (Cooke et al., 2003; Reiche et al., 2005).

Oxidative stress is associated with the etiopathogenesis of many chronic diseases and plays an important role in the aging process (Ceconi et al., 2003). One of the most common targets for oxidative stress are lipids. Their oxidation leads to the formation of a number of secondary metabolites able to exacerbate oxidative damage to biomolecules (Uchida, 2000). Malonic dialdehyde (MDA) is the main well-studied product of the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. It is not only a marker of oxidative processes. The interaction of MDA with DNA and proteins is potentially mutagenic and atherogenic (Del Rio & Pellegrini, 2005). We indicated that liquidators of the Chernobyl catastrophe consequences had an increased level of malonic dialdehyde, which created the risk of activation and of inflammatory processes and making them chronic (Emerit et al., 1995). In addition, for this group, an increase of ceruloplasmin and decrease of transferrin in serum was typical (Zueva et al., 2001).

Ceruloplasmin is the main carrier of copper in human plasma. This protein participates in the reaction of the acute phase to stress, and it is believed that some of its physiological functions remain questionable. The antioxidant activity of ceruloplasmin is described (Wood et al., 2006), but some findings suggest this protein may also have pro-oxidant effect and cause oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) (Fox et al., 1995). In physiological conditions, ceruloplasmin is an important factor in controlling membrane oxidation of lipids, preventing their peroxidation (Taysi et al., 2002). A significant increase in ceruloplasmin level may indicate an abnormally high oxidative stress (Cunningham et al., 1995). Normally, the level of ceruloplasmin correlates with the level of MDA and transferrin. Ceruloplasmin and transferrin are believed to be important antioxidants that act in interconsistency (Memişoğlu & Bakan, 2004; Somogyi et al., 2007). Important antioxidant components are sulphhydryl groups SH (Birben et al., 2012).

Under the influence of stress factors, all components of the immune response are included in the development of the adaptive response

(Freestone et al., 2008; Bailey, 2016). Indeed, the examined persons from the experimental group showed differences from the control group in parameters of both non-specific and specific immunity.

A significant growth of absolute and relative number of stab and segmental neutrophils on the background of a decrease in the relative and absolute number of lymphocytes is another clear sign of a stressful reaction of moderate intensity. Cortisol induces production of neutrophils in the bone marrow and inhibits their apoptosis in the peripheral blood (Butcher & Lord, 2004). At the same time, neutrophils are one of the important factors in stimulating oxidative stress, which includes myeloperoxidase – their lysosomal enzyme (Lutai et al., 2016). The formation of phagocytes with signs of raised oxidative reactivity may be evidenced by changes in lipid metabolism (Peluso et al., 2012). A positive relationship between the level of lipid peroxidation and the concentration of cholesterol in plasma is reported. Oxidative damage correlates with the level of cholesterol of low density lipoprotein (Hs-LDL) and triglycerides (Fernández-Sánchez et al., 2011). Indeed, we have already shown that the level of total cholesterol and Hc-LDL was increased in the experimental group, and so, the level of Hc-LDL positively correlated with the number of stab neutrophils (Sokolenko, 2016; Sokolenko & Sokolenko, 2017a). This may indicate stimulated by hypercholesterolemia activation in the development of neutrophils in the bone marrow and spleen, which, in turn, creates preconditions for the development of inflammatory reactions (Tall & Yvan-Charvet, 2015). Proinflammatory factors produced by monocytes and macrophages are involved in the development of oxidative stress that accompanies the process of obesity (Bondia-Pons et al., 2012).

The involvement of neutrophils to the development of oxidative stress in the examined group was confirmed by a positive correlation between the level of these leukocytes with the level of malonic dialdehyde and the oxidative stress index, the value of the correlation coefficient increased in conditions of additional psycho-emotional stress (Fig. 1, 5).

The increase in the level of neutrophils in the experimental group was accompanied by a decrease in their phagocyte number and phagocytic index (Table 1). Indicators of phagocytic activity negatively correlated with the level of malonic dialdehyde and the oxidative stress index, in terms of psychoemotional load, the correlation with the index of oxidative stress acquired statistical significance (Fig. 1, 5). Statistically significant correlation of malonic dialdehyde and oxidative stress index with indicators of phagocytic activity of another population of professional phagocytes – monocytes (both in conditions of additional psycho-emotional load presence/absence) was negative (Fig. 2, 6).

The literature gives contradictory data on the sensitivity of the phagocytic component of the natural resistance of the body to the effects of ionizing radiation, especially of low intensity (Liu et al., 2013; Wang et al., 2013; Wunderlich et al., 2015; Pinto et al., 2016). In chronic low-dose irradiation, neutrophil level often increases on the background of weakening of monocytic and lymphatic reactions (Jahns et al., 2011; Heylmann et al., 2014). However, radiation-induced stimulation of proliferative activity of granulocytic hemopoiesis is accompanied by a significant number of errors in mitosis (Ghosh & Pyasi, 2016). One of the reasons may be radiation induced free radical processes. On the one hand, free radicals, formed as a result of oxidative processes, are involved in the process of neutrophils and macrophages phagocytosis. On the other hand, oxidative stress, acting on certain nuclear factors of phagocytes, may negatively affect their activity. The autocatalytic free radical process, which is marked by MDA level, is peroxide oxidation of lipids, which damages the membranes of immune cells and leads to changes in their metabolic activity, the ability to recognize antigens, etc. (Knight, 2000).

Oxidative stress related to the etiopathogenesis of many chronic diseases plays an important role in the aging process (Ceconi et al., 2003) and has recently been considered to be its biomarker (Pandey & Rizvi, 2010). On the other hand, in the group of elderly people we note suppressing of phagocytosis by cortisol, which leads to inhibiting the production of active forms of oxygen by neutrophils. To the signs of ageing we also refer a decrease in the number of Toll-like receptors on macrophages, and, accordingly, a decrease in their phagocytic activity (Butcher & Lord, 2004). Thus, stress-induced inhibition of phagocytic

activity of neutrophils and monocytes on the background of raised cortisol level in the group of students examined from the territory of enhanced radio-ecological control can be characterized as a sign of immune system ageing.

To estimate the potential acceleration of the ageing processes, stimulated by oxidative stress and associated pathological processes (obesity, tumors, diabetes) the antioxidant capacity of blood plasma is marked (Pandey & Rizvi, 2010). One of its important indicators is the level of ceruloplasmin. The antioxidant function of ceruloplasmin in immune processes is caused by the ability to interact with oxygen radicals. In this case, the cells are protecting themselves from excessive peroxidation of lipids with superoxide and other radicals released by neutrophils and macrophages during the inflammation reaction. There are data as to ceruloplasmin participation in direct regulation of oxidative metabolism of phagocytes due to the impact on enzymes associated with their plasma molecule (Saenko et al., 1994). An increase of ceruloplasmin in serum helps to increase the phagocytic activity of neutrophils (Munoz et al., 2007), however, it can also lead to a decrease of their level in peripheral blood flow (Turmlund et al., 2004).

In our case, ceruloplasmin significantly correlated with the phagocytic index of neutrophils only in the control group under conditions of additional emotional stress (Fig. 10). Its level in the experimental group did not differ significantly from the control, and it did not change in conditions of additional emotional load. Taking into account the increased oxidative stress index in this group, this effect may indicate the leveling of this important antioxidant system factor in maintaining proper redox homeostasis and the activity of congenital immunity factors under prolonged influence of small doses of ionizing radiation.

The detected decrease of relative and absolute number of T-lymphocytes with CD3+, CD5+, CD4+ and immune regulatory index CD4+/CD8+ in the experimental group in comparison with the control corresponds with the literature as to selective elimination of the most radioluculent subpopulations of lymphocytes (Frenkel et al., 2005).

Antibody CD3 is a major marker of functionally mature T-lymphocytes and it is absolutely essential for the activation of $\alpha\beta$ -TCR T-cell receptor (Dopfer et al., 2014). Antibody CD5 plays an important role in the control of T-lymphocyte autotolerance (Henderson et al., 2015) and also in the regulation of integrated T-cell and B-cell homeostasis due to interaction with antigen CD72 (Zheng et al., 2014). Antigen CD4 is a marker of helper T-lymphocytes – a subpopulation that triggers the formation of the acquired immune response, stimulates B cells to antibody production, triggers and supports the reactions of effector CD8+ T cells, regulates the macrophage function and, at the same time, interacts with them, provides a comprehensive immune response against a wide range of pathogenic microorganisms, controls its intensity and duration. Lymphocytes with the CD4+ phenotype are important mediators of immunological memory, when their number is reduced or their function is depressed, the individual becomes more susceptible to a wide range of infectious factors (King et al., 2008; Zhu et al., 2010; Yamane & Paul, 2012). T-cells with the CD4+ phenotype have an increased susceptibility to radiation-induced selective elimination (Sheikh Sajjadiesh et al., 2009). The revealed negative correlation between the number of T-lymphocytes with the phenotypes of CD3+, CD4+ and the indices of oxidative processes in the experimental group (MDA level and the oxidative stress index) affirms the possibility of participation of lipid peroxidation oxidation activation under conditions of chronic radiation exposure in small doses. The effect is intensified in the conditions of an additional psycho-emotional load, as is shown by the growth in the value of the correlation coefficient (Fig. 3, 4, 7, 8).

According to the literature, the level of MDA and other oxidative factors may affect the proliferative activity of lymphocytes (Lee & Wan, 2000). Oxidative factors produced by phagocytes can induce early expression of genes and proliferation of T-lymphocytes, as well as determine their immune competence. In particular, it concerns helper T-cells (Staite et al., 1987). Excessive free radical and oxidative factors can damage the DNA and the integrity of cell membranes of immune cells (Backer & Weinstein, 1980).

The absence of a reliable correlation with the oxidation parameters of the second major subpopulation of functionally-mature T-lympho-

cytes with the CD8⁺ phenotype can be explained by their relative radio resistance (Bogdándi et al., 2010). T-lymphocytes with the CD8⁺ phenotype are able to produce suppressor influence, have an acute cytotoxic activity against infected and tumor cells (Joosten et al., 2007; Kapp & Bucy, 2008; Joosten et al., 2010; Davidsson et al., 2013; Boer et al. 2015). There is information as to the activation of CD8⁺ T cells in conditions of obesity (Nishimura et al., 2009), and the proatherogenic changes in the lipid profile that we earlier revealed, could be respectively involved in the implementation of the revealed effects on T-cell immunity.

The interrelation of lymphocytes with phenotypes CD4⁺ and CD8⁺ (immune regulatory index CD4⁺/CD8⁺) now is considered to be an important indicator of optimal activity of specific immunity or development of certain diseases (such as cancer), and it is also a marker of susceptibility to exogenous influences (Kidd & Vogt, 1989; Tinago et al., 2014). In our case, the reliable negative correlation of the immunoregulatory index with both the level of malonic dialdehyde and the oxidative stress index is observed (Fig. 4). The value of the correlation coefficient increased with additional emotional stress (Fig. 8). Taking into account the significant positive correlation between the immunoregulatory index and the level of ceruloplasmin in the control group (under conditions of emotional stress), we can talk about the importance of the antioxidant system in maintaining the balance of T-cell immunity. The absence of such a correlation in the experimental group indicates the inhibition of their redox homeostasis (Fig. 10).

Reduction in the CD4⁺/CD8⁺ index may be another sign of immune system ageing (Bellingrath et al., 2010; Nakata et al., 2011). As noted above, ageing of the immune system is also characterized by activation of oxidative processes. The ability of the body to maintain proper functional activity and the processes of T-lymphocytes differentiation largely depends on the ability to counteract the excessive peroxide oxidation of lipids (Wang et al., 2011). Taking into account the overrunning of CD4⁺/CD8⁺ immune regulatory index the lower limit of homeostatic norm (in conditions of additional emotional load), in many examined from the territory of enhanced radio-ecological control, we can speak about the preconditions for the development of their immunodeficient states, caused as well by stress-induced activation of oxidative processes.

One of the significantly lowered parameters in the experimental group compared to the control (with subsequent decrease in conditions of additional psycho-emotional loading), is the level of lymphocytes with the phenotype CD16⁺ (Table). Antigen CD16 is an important marker for natural killers (NK cells) (Romee et al., 2013). Natural killers are characterized by their high cytolytic activity against tumor cells and function on the edge of congenital and acquired immunity (Subleski et al., 2011). In the experimental group, the cells with the CD16⁺ phenotype showed a significant negative correlation with the level of malonic dialdehyde and the oxidative stress index, besides, the value of the correlation coefficient increased with additional psycho-emotional stress (Fig. 3, 7). In the control group, under the conditions of psycho-emotional stress, a significant positive correlation between the number of lymphocytes with the CD16⁺ phenotype and the level of ceruloplasmin was noted. For people from the experimental group, the effect was not marked (Fig. 11). According to the literature, natural killers have the highest level of ceruloplasmin expression on the membranes among all lymphocytes. So, these immune system cells have a greater potential for the anti- or prooxidant activity of the body's natural resistance (Banha et al., 2008). Thus, the individuals who have undergone prolonged influence of small doses of ionizing radiation, have inhibited function of lymphocytes with the CD16⁺ phenotype involvement in maintaining redox homeostasis under additional stressful effects.

The analysis of the humoral immunity revealed a significant correlation with the indices of oxidative processes in the experimental group: a negative correlation between the serum IgG level and the level of malonic dialdehyde and the oxidative stress index, in conditions of additional psycho-emotional stress (Fig. 9). Increased levels of IgG compared to controls, have been observed in the group of students examined from the territories of enhanced radio-ecological control, which was characterized as a compensatory factor of the cellular

immunity parameters decrease (Table 1). In addition, according to the literature, the increase in the level of IgG autoantibodies against oxidized low density lipoproteins, on the background of the growth level of malonic dialdehyde is possible (Leonard & Maes, 2012). In conditions of psycho-emotional stress, the level of IgG in the experimental group significantly decreased (Table 1). Taking into account the revealed correlations, one can make assumptions about the participation in this effect the further intensification of oxidative processes.

The growth of correlation interrelationship between the analyzed parameters of the immune system of the students examined from the experimental group and oxidation-antioxidant balance in terms of psychoemotional stress confirms the further intensification of oxidative processes induced by the chronic effects of low doses of radiation. Ionizing radiation is a recognized physical factor for the development of free radical processes and oxidative stress (Stone & Dratz, 1982; Combs & Combs, 1986; Robbins & Zhao, 2004; Nylund et al., 2014). The initiation of response to physiological and physical stress factors is often subconscious and of a purely biological nature (Filaire et al., 2009). However, the increase in the level of anxiety to the verge of depression in 10.0–20.6% (according to different criteria and depending on the age) of Ukrainian schoolchildren aged 7–17 years who are inhabitants of areas contaminated with radionuclides, testifies the presence of additional emotional reactions (Contis & Foley, 2015). Psychological stress factors provide an additional cognitive assessment with the prediction of adverse effects and are also evaluated as a risk factor for the organism, which allows for coordinated behavioural and physiological responses (Filaire et al., 2009).

In depressive states, oxidative stress is often the result of a biological imbalance between active forms of oxygen and antioxidants formed during the activation of immune factors. The inability of cells to adapt to the changes in redox homeostasis and their subsequent death stimulate the inflammation processes. Accordingly, the activation of immune proinflammatory factors and increased oxidative stress act synergistically in the pathogenesis of depression (Leonard & Maes, 2012; Bakunina et al., 2015).

Intensive physical activity can also activate oxidative stress. In this case, there are certain bonds between the oxidizing factors, the antioxidant system and the cellular immune response. In particular, athletes 30 minutes after training check peroxidation, an increase in antioxidant parameters and a decrease in the number of T-lymphocytes with the phenotypes CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, as well as NK cells. Mechanisms underlying the revealed changes are considered multifactorial and related not only to hormonal and metabolic changes due to muscle activity but also to oxidative stress reactions and changes in gene expression (Vider et al., 2001). In our previous research there was observed a moderate decrease in the cellular immunity indices for students from territories contaminated with radionuclides during physical training (Sokolenko & Sokolenko, 2016). However, such changes were effectively restored and, apparently, were induced not by oxidative processes, but by the migration of immune cells.

The involvement of their thyroid status in the revealed characteristics of the interrelationship between the oxidative processes and the immune system of the examined is possible. It is known that the thyroid gland takes part in the development of oxidative stress by stimulating several enzyme systems (De Vito et al., 2011), we also indicate the possibility of the impact of this phenomenon on immune cells proliferation and migration of (Barreiro et al., 2011). In our previous reports, the relationship between the thyroid status of individuals from radiation-contaminated territories, their lipid profiles and the immune system was characterized (Sokolenko & Sokolenko, 2017a, 2017b).

For a detailed analysis of the development of oxidative processes and their influence on the immune system at dosed physical loads of moderate intensity, and also, depending on the thyroid status, additional research is necessary.

In general we can mention that although reactive oxygen types are associated with the pathogenesis of many diseases, their absence in blocking free radicals release from activated phagocytes leads to a violation of the ability of innate immunity factors to eliminate pathogenic microorganisms. Thus, the balance between reactive oxygen

types production and antioxidant protection factors is important (Ferrari et al., 2011). The received data show some definite imbalance of this process in the population of the territories contaminated by radionuclides as a result of the Chernobyl accident.

Conclusions

The prolonged impact of small doses of ionizing radiation due to prolonged residence on the territories contaminated by radionuclides as a result of the Chernobyl accident leads to a stress-induced intensification of oxidative processes, which in turn is reflected on the immune system. Negative correlation of the oxidative stress index and the level of malondialdehyde with the parameters of phagocytic activity of neutrophils and monocytes, the immune regulatory index of CD4⁺/CD8⁺ and the number of lymphocytes with the phenotype CD16⁺ testifies to the participation of oxidative processes in reducing these parameters in individuals from territories with enhanced radio-ecological control. Radiation-induced intensification of oxidative processes grows in conditions of additional stresses of an emotional nature and causes effects that are a sign of ageing of the immune system and antitumor protection inhibition. The people undergoing the prolonged influence of small doses of ionizing radiation, show an imbalance of redox homeostasis, which creates preconditions for pathological development of immune reactivity both at the level of innate and acquired immunity.

References

- Backer, J. M., & Weinstein, I. B. (1980). Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo [a] pyrene. *Science*, 209(4453), 297–299.
- Bailey, M. T. (2016). Psychological stress, immunity, and the effects on indigenous microflora. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 874, 225–246.
- Bakunina, N., Pariante, C. M., & Zunszain, P. A. (2015). Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*, 144(3), 365–373.
- Balogh, A., Persa, E., Bogdándi, E. N., Benedek, A., Hegyesi, H., Sáfrány, G., & Lumniczky, K. (2013). The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells. *Inflammation Research*, 62(2), 201–212.
- Banha, J., Marques, L., Oliveira, R., de Fátima Martins, M., Paixão, E., Pereira, D., Malho, R., Penque, D., & Costa, L. (2008). Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: A new link between immunity and iron metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), 483–492.
- Barreiro Arcos, M. L., Sterle, H. A., Paulazo, M. A., Valli, E., Klecha, A. J., Isse, B., Pellizas, C. G., Farias, R. N., & Cremaschi, G. A. (2011). Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of Cellular Physiology*, 226(12), 3208–3218.
- Beckham, J. C., Taft, C. T., Vrana, S. R., Feldman, M. E., Barefoot, J. C., Moore, S. D., Mozley, S. L., Butterfield, M. I., & Calhoun, P. S. (2003). Ambulatory monitoring and physical health report in Vietnam veterans with and without chronic posttraumatic stress disorder. *Journal of Traumatic Stress*, 16(4), 329–335.
- Bellingrath, S., Rohleder, N., & Kudiela, B. M. (2010). Healthy working school teachers with high effort–reward-imbalance and overcommitment show increased pro-inflammatory immune activity and a dampened innate immune defence. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(8), 1332–1339.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.
- Boer, M. C., Joosten, S. A., & Ottenhoff, T. H. (2015). Regulatory T-cells at the interface between human host and pathogens in infectious diseases and vaccination. *Frontiers in Immunology*, 6, 217.
- Bogdándi, E. N., Balogh, A., Felgyinszki, N., Szatmári, T., Persa, E., Hildebrandt, G., Safrany, G., & Lumniczky, K. (2010). Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiation Research*, 174(4), 480–489.
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., & Martinez, J. A. (2012). Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68(4), 701–711.
- Butcher, S. K., & Lord, J. M. (2004). Stress responses and innate immunity: Aging as a contributory factor. *Aging Cell*, 3(4), 151–160.
- Ceconi, C., Boraso, A., Cargnoni, A., & Ferrari, R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: Myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 420(2), 217–221.
- Combs Jr, G. F., & Combs, S. B. (1986). The role of selenium in nutrition. Academic Press, Orlando.
- Contis, G., & Foley Jr, T. P. (2015). Depression, suicide ideation, and thyroid tumors among Ukrainian adolescents exposed as children to Chernobyl radiation. *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(5), 332.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdargolu, M., & June, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutations, and disease. *FABEB Journal*, 17, 1195–1214.
- Cunningham, J., Leffell, M., Mearkle, P., & Harmatz, P. (1995). Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: Evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism*, 44 (8), 996–999.
- Davidsson, S., Ohlson, A. L., Andersson, S. O., Fall, K., Meisner, A., Fiorentino, M., Andren, O., & Rider, J. R. (2013). CD₄ helper T cells, CD₈ cytotoxic T cells, and FOXP₃⁺ regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. *Modern Pathology*, 26(3), 448–455.
- Davis, S., Stepanenko, V., Rivkind, N., Kopecky, K. J., Voillequé, P., Shakhtarin, V., Parshkov, E., Kulicov, S., Lushnikov, E., Abrosimov, A., Troshin, V., Romanova, G., Doroschenko, V., Proshin, A., & Tsub, A. (2004). Risk of thyroid cancer in the Bryansk Oblast of the Russian Federation after the Chernobyl Power Station accident. *Radiation Research*, 162(3), 241–248.
- De Vito, P., Balducci, V., Leone, S., Percario, Z., Mangino, G., Davis, P. J., Davis, F. B., Affabris, E., Luly, P., Pedersen, J. Z., & Incerci, S. (2012). Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: new targets, old players. *Steroids*, 77(10), 988–995.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328.
- Dopfer, E. P., Hartl, F. A., Oberg, H. H., Siegers, G. M., Yousefi, O. S., Kock, S., Fiala, G. J., Garcilan, B., Sandstrom, A., Alarcon, B., Regueiro, J. R., Kabelitz, D., Adams, E. J., Minguet, S., Wesch, D., Fisch, P., & Schamel, W. W. A. (2014). The CD₃ conformational change in the $\gamma\delta$ T cell receptor is not triggered by antigens but can be enforced to enhance tumor killing. *Cell Reports*, 7(5), 1704–1715.
- Dostert, P., Benedetti, M. S., & Frigerio, E. (1991). Effect of L-dopa, oxyferriscorbate and ferrous iron on *in vivo* lipid peroxidation. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*, 84, 119–128.
- Duffner, P. K. (2004). Long-term effects of radiation therapy on cognitive and endocrine function in children with leukemia and brain tumors. *The Neurologist*, 10(6), 293–310.
- Eheman, C. R., Garbe, P., & Tuttle, R. M. (2003). Autoimmune thyroid disease associated with environmental thyroidal irradiation. *Thyroid*, 13(5), 453–464.
- Emerit, I., Oganessian, N., Sarkisian, T., Arutyunyan, R., Pogolian, A., Asrian, K., Levy, A., & Cemjovski, L. (1995). Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: Anticlastogenic effect of *Ginkgo biloba* extract. *Radiation Research*, 144(2), 198–205.
- Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., & Morales-González, J. A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3117–3132.
- Ferrari, C. K., Souto, P. C., França, E. L., & Honorio-França, A. C. (2011). Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: From effective defense to immunity evasion mechanisms. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 59(6), 441–448.
- Filaire, E., Alix, D., Ferrand, C., & Verger, M. (2009). Psychophysiological stress in tennis players during the first single match of a tournament. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1), 150–157.
- Fox, P. L., Mukhopadhyay, C., & Ehrenwald, E. (1995). Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sciences*, 56(21), 1749–1758.
- Freestone, P. P., Sandrini, S. M., Haigh, R. D., & Lyte, M. (2008). Microbial endocrinology: How stress influences susceptibility to infection. *Trends in Microbiology*, 16(2), 55–64.
- Frenkel, M., Ben-Arye, E., Baldwin, C. D., & Sierpina, V. (2005). Approach to communicating with patients about the use of nutritional supplements in cancer care. *Southern Medical Journal*, 98(3), 289–294.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761.
- Ghosh, B., & Pyasi, K. (2016). Phagocytic activity of neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung India*, 33(1), 114.
- Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103(2), 693–699.

- Henderson, J. G., Opejin, A., Jones, A., Gross, C., & Hawiger, D. (2015). CD₅ instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity*, 42(3), 471–483.
- Heylmann, D., Rödel, F., Kindler, T., & Kaina, B. (2014). Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*, 1846(1), 121–129.
- Jahns, J., Anderegg, U., Saalbach, A., Rosin, B., Patties, I., Glasow, A., Kamprad, M., Scholz, M., & Hildebrandt, G. (2011). Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 709, 32–39.
- Joosten, S. A., van Meijgaarden, K. E., Savage, N. D., de Boer, T., Triebel, F., van der Wal, A., de Heer, E., Klein, M. R., Geluk, A., & Ottenhoff, T. H. (2007). Identification of a human CD₈⁺ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8029–8034.
- Joosten, S. A., Van Meijgaarden, K. E., Van Weeren, P. C., Kazi, F., Geluk, A., Savage, N. D., Drijfhout, J. W., Flower, D. R., Hanekom, W. A., Klein, M. R., & Ottenhoff, T. H. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* peptides presented by HLA-E molecules are targets for human CD₈⁺ T-cells with cytotoxic as well as regulatory activity. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000782.
- Kapp, J. A., & Bucy, R. P. (2008). CD₈⁺ suppressor T cells resurrected. *Human Immunology*, 69(11), 715–720.
- Kidd, P. G., & Vogt Jr, R. F. (1989). Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 52(1), 3–9.
- King, C., Tangye, S. G., & Mackay, C. R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual Review of Immunology*, 26, 741–766.
- Knight, J. A. (2000). Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), 145–158.
- Korol, L. V., & Myhal, L. A. (2012). Sposib intehrlnoi otsynky oksydantno-antyoksydantnoho balansu u syrovatsi krovi [Method of integral evaluation of oxidant-antioxidant balance in blood serum]. Patent No 102192 UA, CIP G01N 33/48 (2006.01). No a201205647. 08.05.2012. Publ. 10.06.2013, Bul. No 11.111-117 (in Ukrainian).
- Kusunoki, Y., & Hayashi, T. (2008). Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors. *International Journal of Radiation Biology*, 84(1), 1–14.
- Kusunoki, Y., Yamaoka, M., Kubo, Y., Hayashi, T., Kasagi, F., Douple, E. B., & Nakachi, K. (2010). T-cell immunosenescence and inflammatory response in atomic bomb survivors. *Radiation Research*, 174(6b), 870–876.
- Laddha, N. C., Dwivedi, M., Mansuri, M. S., Gani, A. R., Ansarullah, M., Ramachandran, A. V., Dalai, S., & Begum, R. (2013). Vitiligo: Interplay between oxidative stress and immune system. *Experimental Dermatology*, 22(4), 245–250.
- Lee, C. Y. J., & Wan, F. (2000). Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 2932–2937.
- Leonard, B., & Maes, M. (2012). Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(2), 764–785.
- Liu, C., Zhang, C., Mitchel, R. E., Cui, J., Lin, J., Yang, Y., Liu, X., & Cai, J. (2013). A critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) and its *in vivo* ligands in basal radio-resistance. *Cell Death and Disease*, 4(5), e649.
- Lutai, Y. M., Parkhomeko, O. M., Ryzhkova, N. O., Havrylenko, T. I., Irkin, O. I., Kozhukhov, S. M., Stepura, A. O., & Bilyi, D. O. (2016). Vplyv terapii vnutrishnovennym inhibitorom 5-lipoksyhenazy kvartetsetnom na funktsiiu endoteliiu, vyrazhenist systemnoho zapalennia ta prooksydantnoho stresu pry hostromu infarkti miokarda z elevatsiieiu ST [Effects of intravenous 5-lipoxygenase inhibitor quercetin therapy on endothelial function, severity of systemic inflammation and oxidative stress in acute st elevation myocardial infarction]. *Medytsyna Nevdykladnykh Staniv*, 1, 111–119 (in Ukrainian).
- Manuck, S. B., Cohen, S., Rabin, B. S., Muldoon, M. F., & Bachen, E. A. (1991). Individual differences in cellular immune response to stress. *Psychological Science*, 2(2), 111–115.
- Memişoğlu, R., & Bakan, E. (2004). Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 18(4), 193–197.
- Munoz, C., Rios, E., Olivos, J., Brunser, O., & Olivares, M. (2007). Iron, copper and immunocompetence. *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S24–S28.
- Nakata, A., Takahashi, M., & Irie, M. (2011). Effort-reward imbalance, overcommitment, and cellular immune measures among white-collar employees. *Biological Psychology*, 88(2–3), 270–279.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD₈⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*, 15(8), 914–920.
- Nylund, R., Lemola, E., Hartwig, S., Lehr, S., Acheva, A., Jahns, J., Hildebrandt, G., & Lindholm, C. (2014). Profiling of low molecular weight proteins in plasma from locally irradiated individuals. *Journal of Radiation Research*, 55(4), 674–682.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(1), 2–12.
- Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F., & Serafi, M. (2012). Oxidative stress in atherosclerosis development: The central role of LDL and oxidative burst. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, 12(4), 351–360.
- Pinto, A. T., Pinto, M. L., Cardoso, A. P., Monteiro, C., Pinto, M. T., Maia, A. F., Castro, P., Figueira, R., Monteiro, A., Marques, M., Mareel, M., dos Santos, S. G., Seruca, R., Barbosa, M. A., Rocha, S., & Olivera, M. J. (2016). Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Scientific Reports*, 6, 18765.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dharma, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014, e761264.
- Reiche, E. M. V., Morimoto, H. K., & Nunes, S. M. V. (2005). Stress and depression-induced immune dysfunction: Implications for the development and progression of cancer. *International Review of Psychiatry*, 17(6), 515–527.
- Robbins, M. E. C., & Zhao, W. (2004). Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: A review. *International Journal of Radiation Biology*, 80(4), 251–259.
- Roberts, C. K., & Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, 84(21–22), 705–712.
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Vemeris, M., Walcheck, B., & Miller, J. (2013). NK cell CD₁₆ surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, 121(18), 3599–3608.
- Roy, R. M., Petrella, M., & Ross, W. M. (1991). Modification of mitogen-induced proliferation of murine splenic lymphocytes by *in vitro* tocopherol. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 13(4), 531–550.
- Saenko, E. L., Skorobogat'ko, O. V., Tarasenko, P., Romashko, V., Zhuravetz, L., Zadorozhnyaya, L., Senjuk, O. F., & Yaropolov, A. I. (1994). Modulatory Effects of ceruloplasmin on lymphocytes. Neutrophils and monocytes of patients with altered immune status. *Immunological Investigations*, 23(2), 99–114.
- Seegerstrom, S. C., & Miller, G. E. (2004). Psychological stress and the human immune system: A meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological Bulletin*, 130(4), 601.
- Sheikh Sajjadiesh, M. R., Kuznetsova, L. V., Bojenko, V. B., Gydz, N. B., Titkova, L. K., Vasileva, O. U., Uoshenko, I. I., & Drachyk, T. P. (2009). Effect of ionizing radiation on development process of T-cell population lymphocytes in Chernobyl children. *Iranian Journal of Radiation Research*, 7(3), 127–133.
- Sokolenko, V. L. (2016). Pokaznyky kholesterynu ta imunoiy systemy u osib z oznakamy veheto-sudynnoi dystoni, shcho prozhyvaly na terytoriyakh, zabrudnennykh radionuklidamy [Cholesterol rate and immune system indices in people with symptoms of vegetative-vascular dystonia, who lived in the territories contaminated with radionuclides]. *Svit Medytsyny ta Biolohiyi*, 2, 86–90 (in Ukrainian).
- Sokolenko, V. L., & Sokolenko, S. V. (2016). Vplyv pomimnykh fizychnykh navantazhen' na pokaznyky imunnoi systemy u meshkantsiv radiatsiino zabrudnennykh terytorij [Influence of moderate physical load on parameters of the immune system among residents of contaminated areas]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University, Biology, Medicine*, 7(1), 48–52 (in Ukrainian).
- Sokolenko, V. L., & Sokolenko, S. V. (2017a). Vzaïmozv'язok lipidnoho obminu ta tyreoidnoho statusu za prolonhovanoho vplyvu malykh doz radiatsii [The interaction between lipid exchange and thyroid status in the conditions of prolonged influence of small doses of radiation]. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), 231–238 (in Ukrainian).
- Sokolenko, V. L., & Sokolenko, S. V. (2017b). Vzaïmozv'язok pokaznykiv imunnoi systemy ta tyreoidnoho statusu v osib z radiatsiino-abrudnennykh terytorij za umov psykhoemotsiinoho navantazhennia [Interactions between immune system parameters and thyroid status in people from radioactive contaminated areas by the conditions of emotional stress]. *Fiziolohichnyi Zhurnal*, 63(3), 32–39 (in Ukrainian).
- Sokolenko, V., & Sokolenko, S. (2015). Aktyvnist radionuklidiv i realizatsiia funktsii imunnoi systemy u meshkantsiv radiatsiino zabrudnennykh terytorij [Radionuclide activity and the immune system functioning in residents of radiation contaminated areas]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University, Biology, Medicine*, 6(2), 93–96 (in Ukrainian).

- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4), R41.
- Staite, N. D., Messner, R. P., & Zoschke, D. C. (1987). Inhibition of human T lymphocyte E rosette formation by neutrophils and hydrogen peroxide. Differential sensitivity between helper and suppressor T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 139(7), 2424–2430.
- Stewart, S. F., Vidali, M., Day, C. P., Albano, E., & Jones, D. E. (2004). Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*, 39(1), 197–203.
- Stone, W. L., & Dratz, E. A. (1982). Selenium and non-selenium glutathione peroxidase activities in selected ocular and non-ocular rat tissues. *Experimental Eye Research*, 35(5), 405–412.
- Subleski, J. J., Jiang, Q., Weiss, J. M., & Wiltout, R. H. (2011). The split personality of NKT cells in malignancy, autoimmune and allergic disorders. *Immunotherapy*, 3(10), 1167–1184.
- Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 104–116.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R. A., & Bakan, E. (2002). Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 21(5), 200–204.
- Tinago, W., Coghlan, E., Macken, A., McAndrews, J., Doak, B., Prior-Fuller, C., Lambert, J. S., Sheehan, G. J., & Mallon, P. W. G. (2014). Clinical, immunological and treatment-related factors associated with normalised CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio: Effect of naive and memory T-cell subsets. *PloS One*, 9(5), e97011.
- Tumlund, J. R., Jacob, R. A., Keen, C. L., Strain, J. J., Kelley, D. S., Domek, J. M., Keyes, W. R., Ensunsa, J. L., Lykkesfeldt, J., & Coulter, J. (2004). Long-term high copper intake: Effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 1037–1044.
- Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(12), 1685–1696.
- Vider, J., Lehtmaa, J., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Zilmer, K., Kairane, Č., Lander, A., Karu, T., & Zilmer, M. (2001). Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology*, 7(4), 263–270.
- Viru, A., & Viru, M. (2004). Cortisol-essential adaptation hormone in exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 25(6), 461–464.
- Wang, F. P., Li, L., Li, J., Wang, J. Y., Wang, L. Y., & Jiang, W. (2013). High mobility group box-1 promotes the proliferation and migration of hepatic stellate cells via TLR4-dependent signal pathways of PI3K/Akt and JNK. *PloS One*, 8(5), e64373.
- Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., & Green, D. R. (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 35(6), 871–882.
- Wood, L. G., Gibson, P. G., & Garg, M. L. (2006). A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2057–2066.
- Wunderlich, R., Ernst, A., Rödel, F., Fietkau, R., Ott, O., Lauber, K., Frey, B., & Gaipl, U. S. (2015). Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. *Clinical and Experimental Immunology*, 179(1), 50–61.
- Yamane, H., & Paul, W. E. (2012). Cytokines of the γ c family control CD4⁺ T cell differentiation and function. *Nature Immunology*, 13(11), 1037–1044.
- Zheng, M., Xing, C., Xiao, H., Ma, N., Wang, X., Han, G., Chen, G., Hou, C., Shen, B., Li, Y., & Wang, R. (2014). Interaction of CD5 and CD72 is involved in regulatory T and B cell homeostasis. *Immunological Investigations*, 43(7), 705–716.
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28, 445–489.
- Zueva, N. A., Iukhimuk, L. N., Gerasimenko, T. I., Kovalenko, A. N., & Efimov, A. S. (2001). Ceruloplasmin, transferrin and insulin blood levels in those with diabetes mellitus type II and in nondiabetics who participated in the clean-up after the Chernobyl accident. *Likars'ka Sprava*, (3), 14–16.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 177–182
doi: 10.15421/021826

Genetic diversity of Ukrainian local pig breeds based on microsatellite markers

S. S. Kramarenko*, S. I. Lugovoy*, V. R. Kharzinova**, V. Y. Lykhach*, A. S. Kramarenko*, A. V. Lykhach*

*Mykolayiv National Agrarian University, Mykolayiv, Ukraine

**Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy, Russia

Article info

Received 24.03.2018

Received in revised form
26.04.2018

Accepted 29.04.2018

Mykolayiv National
Agrarian University,
Georgiy Gongadze st., 9,
Mykolayiv, 54020, Ukraine.

Federal Science Center
for Animal Husbandry
named after Academy Member
L. K. Ernst, Dubrovitsy, 60,
Podolsk District, Moscow
Region, 142132, Russia.
Tel.: +38-050-991-53-14.
E-mail: kssnail0108@gmail.com

Kramarenko, S. S., Lugovoy, S. I., Kharzinova, V. R., Lykhach, V. Y., Kramarenko, A. S., & Lykhach, A. V. (2018). Genetic diversity of Ukrainian local pig breeds based on microsatellite markers. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 177–182. doi:10.15421/021826

Preserving the current diversity of the living material on Earth is fundamental for the survival of future generations. A study was conducted to investigate the genetic diversity of Ukrainian local pig breeds. A total of 350 pigs representing five local pig breeds from Ukraine (Mirgorod – MIR, Poltava Meat – PM, Ukrainian Meat – UM, Ukrainian White Steppe – UWS and Ukrainian Spotted Steppe – USS) and one commercial breed (Duroc, DUR) were sampled. Twelve microsatellite loci (*SW24*, *S0155*, *SW72*, *SW951*, *S0386*, *S0355*, *SW240*, *SW857*, *S0101*, *SW936*, *SW911* and *S0228*) were selected and belong to the list of microsatellite markers recommended by ISAG. The results indicate that there exists, in general, a high degree of genetic variability within the five Ukrainian local pig breeds. However, the genetic variability in the MIR and PM breeds was significantly lower (mean $N_a = 2.92\text{--}3.92$; $H_o = 0.382\text{--}0.411$; $F_{IS} = 0.178\text{--}0.184$) than in the other three Ukrainian local pig breeds – UM, UWS and USS (mean $N_a = 5.00\text{--}8.42$; $H_o = 0.549\text{--}0.668$; $F_{IS} = 0.027\text{--}0.066$). Thirty-four private alleles were identified among the six analyzed genetic groups which were distributed between 11 of the 12 loci. A high number of alleles typical for the breed (private alleles) was observed in Duroc pigs – 9 alleles did not occur in Ukrainian local pig breeds. The HWE test showed that all of the polymorphic loci deviated from HWE ($P < 0.05$) in at least one population. Loci *S0355* (5), *S0386* (4) and *SW24* (4) presented a higher number of populations in imbalance. The mean F_{ST} showed that approximately 77.8% of the genetic variation was within-population and 12.2% was across the populations. The five Ukrainian local breeds were classified into two major groups, according to the phylogenetic tree, which was based on standard genetic distance. Overall, we found that 92.6% of the individual pigs were correctly assigned (324 out of 350) to the respective breed of origin, which is likely a consequence of the well-defined breed structure. Probabilities from the allocation test of individuals for the six pig genetic groups were estimated with Structure Harvester. In cluster 1 the highest grouping probabilities were found for the MIR (0.917) and PM (0.750) breeds. Local breeds UM (0.824) and USS (0.772) were grouped in cluster 2. Cluster 3 was related to the local pig breed USW (0.873). Cluster 4 presented high allocation probabilities for the commercial pig breed Duroc (0.924). The obtained results are important for the future conservation of Ukrainian local pig breeds.

Keywords: STR loci; genetic characterization; swine; Ukraine

Introduction

Preserving the current diversity of the living material on Earth is fundamental for the survival of future generations. In the case of animals, in the recent past, more and more effective breeding programmes have been implemented, and have led to an emphasis on a few specialised stocks. Consequently, breeds that are less suited to current needs tend to see their numbers decline and to be eventually lost. Conservation of variation, however, is necessary to meet future agricultural challenges and particularly food needs, as well as to preserve the rich agricultural heritage of the various regions of the world (SanCristobal et al., 2003).

Livestock populations have been subjected to a variety of evolutionary forces during their histories. The cumulative effect of foundation events, genetic drift and natural or artificial selection has led to the formation of distinct breeds. In the process of evaluating genetic diversity to develop conservation programmes, it is of interest to assess genetic variation between domestic stocks by using powerful tools such as genetic markers (Berthouly et al., 2008).

At present there are more than 730 breeds or lines of pigs throughout the world and more than two thirds are found in China and

Europe. Many of these (possibly more than 270 breeds) are now in danger of extinction and others are threatened by inefficient use or loss due to cross breeding. To evaluate genetic uniqueness and breed diversity of pigs and assist in rationalising breed conservation programmes, microsatellites have been and remain efficient markers (Nidup & Moran, 2011).

Europe contains a large proportion of the world population of pigs (circa 30%) as well as of the world genetic diversity of pigs (37% of the breeds included in the FAO inventory). However, the European pig industry relies predominantly on a limited number of breeds, since one single breed, the widely known Yorkshire (Large White in many countries), represents about one third of the slaughter pigs' gene pool of the European Union (Laval et al., 2000). Local breeds can be considered cultural properties in relation to their role as historical witnesses as they often play a central part in the agriculture tenures and in the social life of rural populations. Local breeds can also be likened to cultural properties because they contribute to the preservation of ancient local traditions. The analysis shows that consistent differences can be observed in the cultural values of local breeds, both as historical witness and as custodian, today, of local traditions (Gandini & Villa, 2003). It can be assumed that local breeds contain the genes and alleles per-

tinant to their adaptation to particular environments and local breeding goals. Such local breeds are needed to maintain genetic resources permitting adaptation to unforeseen breeding requirements in the future and can serve as a source of research material (Romanov & Weigend 2001).

Microsatellite markers (MS) also referred to as short tandem repeats (STR), short sequence repeats (SSR) or sequence tagged microsatellite sites (STMS) contain repetitive sequences composed of 2–6 nucleotides. The most common motif in the pig genome is (CA)_n and its number is estimated to range between 65,000 and 100,000 copies (Winterø et al., 1992). Microsatellites have been proposed as the best markers for evaluating the genetic diversities of domestic animals because of their abundant, even distribution in the genome, high polymorphism and ease of genotyping. The International Society of Animal Genetics (ISAG) and the Food and Agriculture Organization (FAO) have recommended a set of 27 microsatellite loci (www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel/html) for evaluating the genetic diversities of pigs as part of the global strategy for the management of farm animal genetic resources (Hammond & Leitch, 1998).

The analysis of the MS loci showed that the allelic diversity pattern among breeds was quasi-independent from the diversity pattern based on allele frequencies. Genetic distances showed no particular clustering of local with international breeds, confirming the genetic uniqueness of the European local breeds compared to mainstream international breeds (Ollivier, 2009). Within breeds of the same species (or within one species) it is possible to spot the ancient or the most estranged from the “protogene pool” groups of animals and, thus, to use these data in the breeding strategy aimed at the preservation of animal forms close to the ancestral form. Using various DNA markers, methods of genomic and genetic breeding in nature conservation and genetic selection of domesticated species provides an opportunity to obtain data on the genetic potential (value, originality) of the breed, which is important for scientific justification of its preservation (Stolpovskiy & Zakharov-Gezekhus, 2017).

Thus, the focus in this paper will be on the genetic diversity pigs of five Ukrainian local and one commercial (Duroc) breeds assessed by using genetic markers (microsatellite DNA loci).

Material and methods

This study was carried out to understand the molecular genetic diversity of six swine populations in Ukraine. A total of 350 pigs representing five local pig breeds from Ukraine (Mirgorod, MIR: *n* = 26; Poltava Meat, PM: *n* = 13; Ukrainian Meat, UM: *n* = 128; Ukrainian White Steppe, UWS: *n* = 67 and Ukrainian Spotted Steppe, USS: *n* = 25) and one commercial breed were sampled. The commercial breed pigs (Duroc, DUR: *n* = 91) were included in the investigation in order to complete the picture of the diversity existing in populations of pigs in different origins. The samples, for both sexes (sows and boars), were collected in five different region of Ukraine (Table 1).

Table 1
Sampling information
of five Ukrainian local and commercial pig breed

Breed	Code	Origin	Number of samples
Mirgorod	MIR	Poltava region	26
Poltava Meat	PM	Lugans'k region	13
Ukrainian Meat	UM	Kherson region	128
Ukrainian White Steppe	UWS	Kherson region	67
Ukrainian Spotted Steppe	USS	Kherson region	25
Duroc	DUR	Zaporizhzhya region, Mykolayiv region	91

PCR analysis was carried out on DNA extracted from 350 ethanol-fixed small tissue samples (pieces of ear). A DNA extraction using the Nexttec Clean Column kit (Nexttec, Leverkusen, Germany) was performed according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was extracted based on the Zinovieva and Gladys's (2011) protocol, with minimum adaptations.

Twelve microsatellite loci (*SW24*, *S0155*, *SW72*, *SW951*, *S0386*, *S0355*, *SW240*, *SW857*, *S0101*, *SW936*, *SW911* and *S0228*) recom-

mended by the International Society for Animal Genetics (ISAG) were used to analyze the genetic diversity of six Ukrainian swine breeds. Electrophoresis was conducted using an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The size of each allele was visualized and determined by GeneMapper version 4.0 software (Applied Biosystems, USA). The DNA of the samples were stored in the DNA Bank of the Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst where this experiment was developed.

In the analysis of the genetic variability within and between Ukrainian swine breeds, the GenAIEx version 6.5 software (Peakall & Smouse, 2012) was used to calculate population genetic parameters such as: allelic frequencies observed (*H_o*) and expected heterozygosity (*H_e*) for each locus. The effective allele number (*A_e*) for each swine breed or locus was calculated using the following formula:

$$A_e = 1 / (1 - H_e),$$

where *H_e* corresponds to the expected heterozygosity for each swine breed or locus, respectively.

We determined levels of genetic differentiation within and among six Ukrainian pig populations using the indices proposed by Weir & Cockerham (1984): *F_{IT}* (= *F*), *F_{ST}* (= *Θ*) and *F_{IS}* (= *φ*) in FSTAT version 2.9.3 software (Goudet, 2002). The bootstrap values were obtained to estimate the statistical significance for each of the indices by permutation test (999 permutations).

GENEPOP version 4.2 software (Rousset, 2008) was used to find a significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) per breed and locus using Markov chain algorithm (Guo, Thompson, 1992) with 10,000 dememorizations, 200 batches and 5,000 interactions per batch (the exact test).

The genetic relation between swine breeds was estimated based on Nei (1972) standard genetic distances using the GenAIEx version 6.5 software (Peakall & Smouse, 2012). A frequency-based population assignment-test (Paetkau et al., 1995) was carried out and the leave-one-out procedure was used the GenAIEx version 6.5 software (Peakall & Smouse, 2012).

A dendrogram (hierarchical tree diagram) was created using the UPGMA method (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal, 1973). Bootstrap analyses (with 999 permutations) were used to estimate the internal consistency of the suggested groupings in the PAST version 3.01 software (Hummer et al., 2001). A Principal Coordinate Analysis (PCoA) was done to visualize the geometric relationships among the Ukrainian swine breeds using GenAIEx version 6.5 software (Peakall & Smouse, 2012).

Population genetic structure of the swine breeds was investigated using Pritchard et al. (2000) algorithm implemented in Structure version 2.2 application based on the multilocus microsatellite genotypes. The Structure software is able to determine genetically distinct clusters (populations of origin, *K*) of the sampled pigs.

Based on the Markov chain Monte Carlo method (MCMC), the Structure Harvester algorithm (Earl, 2012) was used to estimate the natural algorithm of the probability that any particular individual belongs to the assumed *K* clusters (Evanno et al., 2005). The program provides a fast way to assess the range of possible clusters (*K*) from 2 to 11, and was run 10 times for each *K*.

Results

All microsatellite loci exhibit substantial levels of polymorphism across the study samples. A total of 132 alleles were detected at these 12 marker loci in the 350 evaluated samples of Ukrainian pigs. Only the alleles observed once were not included in the analyses. The number of observed alleles (*N_a*) detected per polymorphic microsatellite locus ranged from two (MIR, *S0355* and PM, *SW951*) to 14 (UM, *SW24*).

Shared alleles were detected in high frequencies among Ukrainian swine breeds in most of the studied loci (Table 2). Eight loci presented from 1 to 2 shared alleles in all Ukrainian local pig breeds: *S0155*, *SW72*, *SW951*, *S0386*, *S0355*, *SW240*, *SW857* and *S0101*. For the UM and UWS pig breeds higher total alleles (101 and 88, respectively) and rare alleles lower than 5% numbers (43 and 41, respectively) were detected across the 12 microsatellite loci analyzed. The Duroc popula-

tion had a lower allele number, with 80 alleles, from which 34 had frequency lower than 5%.

Table 2

List of the common alleles (with frequencies higher than 20%) observed among five Ukrainian local and one commercial pig breed (na – data not available)

Locus	Breed					
	MIR	PM	UM	UWS	USS	DUR
<i>SW24</i>	99	99, 107	107	107, 113	95, 107	101, 117
<i>S0155</i>	158	148, 158, 160	148, 160	158, 160	158, 160	154, 160
<i>SW72</i>	103, 111	103, 113	103	103	103, 113	103, 113
<i>SW951</i>	120, 122	120	120, 122	120, 128	120	120, 126
<i>S0386</i>	174, 176	174, 176	174, 176	166, 174, 176	174, 176	176, 184
<i>S0355</i>	245, 249	245, 249	245, 247	245, 247	247, 259	245, 247
<i>SW240</i>	95	95	95	95	95	93, 95
<i>SW857</i>	147, 149	147, 149	147, 149	147, 151	139, 147, 149	149, 153
<i>S0101</i>	207, 211	209, 211	209, 213	209, 211	209	209
<i>SW936</i>	na	na	99, 111	111	99	105, 111, 113
<i>SW911</i>	na	na	159, 169	159, 165	159	157
<i>S0228</i>	na	na	256, 260	258, 276	258, 260	260

There exist population-specific alleles found in a single swine breed ('private alleles'). Thirty-four 'private alleles' were identified among all tested pig breeds (Table 3) which were distributed between 11 of the 12 loci. A high number of 'private alleles' was detected in the Duroc population – nine alleles did not occur in other Ukrainian pig breeds. In animals of the UM breed, a total of 16 'private alleles' were detected. The number of 'private alleles' discovered for other Ukrainian local pig breeds was lowest (1–4 only).

Table 3

List of the 'private alleles' (in bp) found among five Ukrainian local and one commercial pig breed

Locus	Breed					
	MIR	PM	UM	UWS	USS	DUR
<i>SW24</i>	97	–	105, 125, 131	121	–	–
<i>S0155</i>	–	–	–	–	–	–
<i>SW72</i>	–	117	99, 107	–	–	131
<i>SW951</i>	–	–	118	116, 136	–	132
<i>S0386</i>	172, 178	–	–	–	–	186
<i>S0355</i>	–	–	–	–	263	243
<i>SW240</i>	–	–	–	–	–	123
<i>SW857</i>	–	–	–	159	–	145
<i>S0101</i>	–	–	193, 215	–	–	–
<i>SW936</i>	–	–	89, 93, 117	–	–	–
<i>SW911</i>	–	–	161, 167, 175, 177	–	–	–
<i>S0228</i>	–	–	274	–	–	254, 266, 270
Total	3	1	16	4	1	9

Table 5

Estimates of genetic diversity indices for 12 microsatellite loci detected on five Ukrainian local and one commercial pig breed

Breed	N_a	N_a (95%)	A_e	H_o	H_e	F_{IS}
MIR	3.92 ± 0.81	3.25 ± 0.64	2.30 ± 0.44	0.411 ± 0.098	0.486 ± 0.089	0.178 ± 0.102
PM	2.92 ± 0.57	2.58 ± 0.51	2.08 ± 0.42	0.382 ± 0.096	0.452 ± 0.087	0.184 ± 0.099
UM	8.42 ± 0.74	4.83 ± 0.34	3.83 ± 0.29	0.668 ± 0.030	0.718 ± 0.027	0.066 ± 0.030
UWS	7.33 ± 0.63	3.92 ± 0.22	3.13 ± 0.28	0.587 ± 0.039	0.649 ± 0.033	0.089 ± 0.047
USS	5.00 ± 0.47	3.33 ± 0.25	2.65 ± 0.25	0.549 ± 0.046	0.574 ± 0.048	0.027 ± 0.042
DUR	6.67 ± 0.64	3.83 ± 0.29	3.07 ± 0.39	0.551 ± 0.062	0.616 ± 0.047	0.111 ± 0.070

Note: N_a – number of different alleles; N_a (95%) – number of different alleles with a frequency $\geq 5\%$; A_e – number of effective alleles; H_o – observed heterozygosity; H_e – expected heterozygosity; F_{IS} – inbreeding coefficient.

The average values of observed heterozygosity (H_o) in the studied swine populations varied from 0.382 ± 0.096 (for PM) to 0.668 ± 0.030 (for UM). For the PM, the effective number of alleles ($A_e = 2.08 \pm 0.42$) and the expected heterozygosity ($H_e = 0.452 \pm 0.087$) were the lowest values amongst all analyzed pig breeds. On the other hand, UM was the breed that presented the highest estimated values of effective number of alleles ($A_e = 3.83 \pm 0.29$) and expected heterozygosity ($H_e = 0.718 \pm 0.027$). Comparing the estimates of expected heterozygosity and the effective number of alleles, Duroc possesses a high amount of genetic diversity compared to all other studied pig breeds, with the exception of UM and UWS.

The variability within pig breeds estimated using the inbreeding coefficient (F_{IS}) showed that the highest value was observed for the PM and MIR breeds (0.184 ± 0.099 and 0.178 ± 0.102 , respectively). In the

The effective number of alleles (A_e) varied from 1.28 to 5.89 and was proportional to the values of expected heterozygosity (H_e) found in loci *SW951* for the USS breed (0.218) and *SW24* for the UM breed (0.830), respectively.

The highest heterozygosity (over 80%) was detected for loci *S0101* (MIR and PM breeds), *SW857* (MIR and PM), *SW72* (UM) and *SW24* (UWS and DUR). The lowest value ($< 20\%$) was revealed for loci *S0355* and *SW24* in MIR and for locus *SW951* in PM.

The HWE test showed that all of the polymorphic microsatellite loci deviated from HWE ($P < 0.05$) in at least one population (Table 4). Loci *S0355* (5), *S0386* (4) and *SW24* (4) presented a higher number of populations in the HWE imbalance. As shown in Table 4, two (UM and UWS) of the five studied Ukrainian local swine breeds had deviated from the HWE for most loci. The Ukrainian local pig breeds presented from one (for USS) to seven (for UWS) loci that deviate from HWE, while the Duroc had eight loci that did not fit HWE (Table 4). This underlines a great difference in the number of loci in Hardy-Weinberg disequilibrium among the five Ukrainian local and one commercial pig breed (Table 4).

Table 4

Results of the HWE test for 12 microsatellite loci identified on five Ukrainian local and one commercial pig breed (D – deficit heterozygosity; E – excess heterozygosity;

* – $P < 0.05$; ** – $P < 0.01$; *** – $P < 0.001$; ns – $P > 0.05$)

Locus	Breed					
	MIR	PM	UM	UWS	USS	DUR
<i>SW24</i>	D***	D***	D***	D**	ns	ns
<i>S0155</i>	ns	ns	D*	D**	ns	D**
<i>SW72</i>	ns	ns	ns	D*	ns	E**
<i>SW951</i>	D*	ns	ns	D***	ns	ns
<i>S0386</i>	D***	ns	D***	D***	ns	D***
<i>S0355</i>	D***	ns	D***	D***	D*	D***
<i>SW240</i>	ns	D*	D***	D*	ns	ns
<i>SW857</i>	ns	ns	ns	ns	ns	D*
<i>S0101</i>	E*	E*	D*	ns	ns	ns
<i>SW936</i>	–	–	ns	ns	ns	E*
<i>SW911</i>	–	–	D*	ns	ns	D**
<i>S0228</i>	–	–	ns	ns	ns	D**

According to the genetic diversity indices (Table 5), the mean allele number (N_a) was lowest for PM (2.92 alleles/locus), while the UM and UWS populations presented highest estimates of 8.42 and 7.33, respectively. The total N_a was 6.23 alleles/locus (ranging between two to 14), whereas only two (UM and UWS) of the Ukrainian local pig breeds and the Duroc presented N_a above the total mean score.

local swine breeds it can be inferred that significant and positive F_{IS} values are a consequence of the inbreeding effect, arising from matings between related sows and boars. The Duroc presented a high significant inbreeding value also ($F_{IS} = 0.111 \pm 0.070$). The high positive values for F_{IS} in five pig breeds also showed a significant deviation from HWE (Table 4). The fixation coefficient of populations (F_{ST}) per locus varied from 0.057 (*SW72*) to 0.206 (*S0101*), with a mean value of 0.122 ± 0.010 . Thus, 12.2% of the total genetic variation was explained by differences between pig populations (Table 6). For the F_{ST} -index, six of the loci (50.0%) presented values outside the 95% confidence interval, with four loci indicating significant values to determine differences between studied pig breeds.

The mean F_{IT} and F_{IS} values for all microsatellite loci were 0.204 and 0.092 with 41.7% and 50.0% of the values outside the 95% confi-

dence interval, respectively. The mean fixation index within the populations (F_{IS}) in each locus represented positive values, except for loci *SW72* (-0.086), *SW857* (-0.039), *S0101* (-0.035) and *SW936* (-0.050), which presented negative F_{IS} , indicating an excess of heterozygous (primarily for Duroc, MIR and PM). The positive F_{IS} (0.092 ± 0.039) for all loci of pig breeds reflects the deviations from the HWE for most Ukrainian local pig breeds (Table 4).

Table 6

F statistical estimates for 12 microsatellite loci identified on five Ukrainian local and one commercial pig breed

Locus	$f(=F_{IS})$	$\Theta(=F_{ST})$	$F(=F_{IT})$
<i>SW24</i>	0.096	0.088	0.176
<i>S0155</i>	0.122	0.136#	0.242
<i>SW72</i>	-0.086	0.057#	-0.024
<i>SW951</i>	0.054	0.145#	0.191
<i>S0386</i>	0.282	0.108	0.359
<i>S0355</i>	0.377	0.115	0.449
<i>SW240</i>	0.138	0.085	0.211
<i>SW857</i>	-0.039	0.125	0.091
<i>S0101</i>	-0.035	0.206	0.178
<i>SW936</i>	-0.050	0.135	0.092
<i>SW911</i>	0.108	0.131#	0.225
<i>S0228</i>	0.095	0.152	0.233
$\bar{X} \pm S\bar{x}$	0.092 ± 0.039	0.122 ± 0.010	0.204 ± 0.035
95% CI	[0.021; 0.170]	[0.104; 0.143]	[0.139; 0.271]

Note: # – significant values for F_{ST} .

The genetic distances (D_A) between each pair of pig breeds are shown in Table 7. The highest Nei's D_A value (0.824) was found between the MIR and Duroc breeds, while the UM and the USS breeds were quite close to each other (0.159). Nei's D_A value indicated that the UM was the Ukraine local pig breed closest to the commercial Duroc breed (0.268), and that the MIR was the most genetically distant from Duroc (0.824). Overall, the Duroc breed revealed the longest distances in relation to all Ukrainian local pig breeds, probably due to the geographic isolation, drift and/or sampling effects. This finding supports the fact that the evolutionary path of Ukrainian local pig breeds is totally different from the evolutionary path of commercial pig breeds.

Table 7

Genetic distances (D_A) estimated among six pig populations

Breed	MIR	PM	UM	UWS	USS	DUR
MIR	–					
PM	0.169	–				
UM	0.506	0.306	–			
UWS	0.491	0.417	0.270	–		
USS	0.638	0.419	0.159	0.325	–	
DUR	0.824	0.584	0.268	0.566	0.374	–

The first axis of the PCoA plot of the six breeds (Fig. 1) clearly distinguishes the MIR and PM from the other breeds, which indicates that the Nei's D_A values among the MIR and PM, on the one hand, and the other Ukrainian local pig breeds, on the other hand, is high.

Figure 2 presents a dendrogram built with the UPGMA method from Nei's (1972) D_A matrix. Two different groups were observed: the first one (with 55% confidence) formed by Duroc and three local pig breeds (UM, USS and UWS); and the second group (with 67% confidence) formed by the MIR and PM breeds (Fig. 1 also).

An assignment-test was used to investigate relationships between six pig breeds (Table 8). The percentage of individuals assigned to the breed of origin varied from 69.2 (for PM) to 100% (for USS). Generally, we found that 92.6% of the individuals (324 out of 350) were correctly assigned to the respective breed of origin, which is probably a consequence of the clear intrabreed structure. The individuals of the Duroc breed were assigned to its true population of origin with a frequency of 92.6%. Only few individuals had a high probability of mixed ancestry (e.g., two MIR individuals clustered together with PM and three PM with MIR; five UM were assigned to UWS and four to USS). Thus, the assignment-test results yielded further evidence for genetic originality of the five Ukrainian local pig breeds.

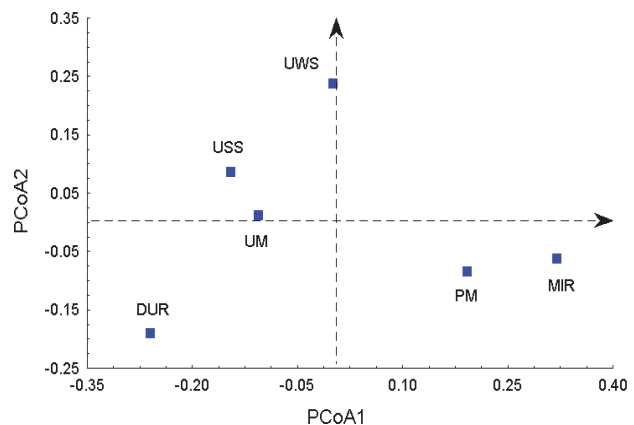


Fig. 1. Principal coordinate analysis (PCoA) plot for six pig populations based on Nei's genetic distances (D_A) using 12 microsatellite loci

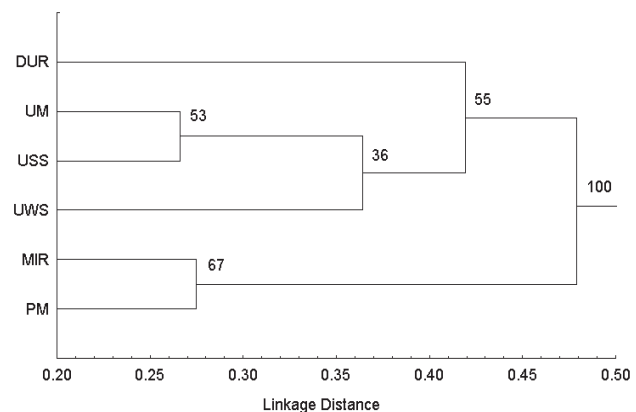


Fig. 2. UPGMA tree based on Nei's D_A genetic distance (Numbers indicate the proportion of bootstrap replicates sharing the labeled node)

The Bayesian approach implemented by Structure Harvester was used to evaluate the most likely number of ancestral populations underlying the observed interbreed genetic diversity. The likelihood of the observed data given the number of putative population of origin [$\ln \Pr(X|K)$] is shown in Figure 3, for numbers of inferred populations (K) ranging from 2 to 11. The mean value of $\ln \Pr(X|K)$ increased up to $K = 4$ and then descended, with a large increase in its variation. Thus, it was assumed that $K = 4$ is the optimal number of clusters (ancestral populations) for the pig populations studied (Fig. 4).

Probabilities from the allocation test of individuals for the six pig breeds estimated using Structure Harvester (for $K = 4$) are presented in Table 9. In cluster 1 the highest grouping probabilities were revealed for MIR (0.917) and PM (0.750) breeds. Local breeds UM (0.824) and USS (0.772) were grouped in cluster 2. Cluster 3 was related to the local breed UWS (0.873). Cluster 4 indicated high allocation probabilities for the commercial pig breed Duroc (0.924). It is noteworthy that, all pig populations studied, despite having presented higher proportions in certain of the clusters, had several individuals allocated in other clusters.

Table 8

Assignment analysis of the five Ukrainian local and one commercial pig breed (values are the number of individuals from each breed (rows) assigned to each population (columns); italic indicates correct assignment. Accurate – the proportions of individuals derived from their source population)

Breeds of origin	Breeds, based on n results of the assignment-test						Accurate, %
	MIR	PM	UM	UWS	USS	DUR	
MIR	23	2	1	–	–	–	88.5
PM	3	9	–	1	–	–	69.2
UM	–	1	117	5	4	1	91.4
UWS	–	–	3	62	1	1	92.5
USS	–	–	–	–	25	–	100.0
DUR	–	–	–	2	1	88	92.6

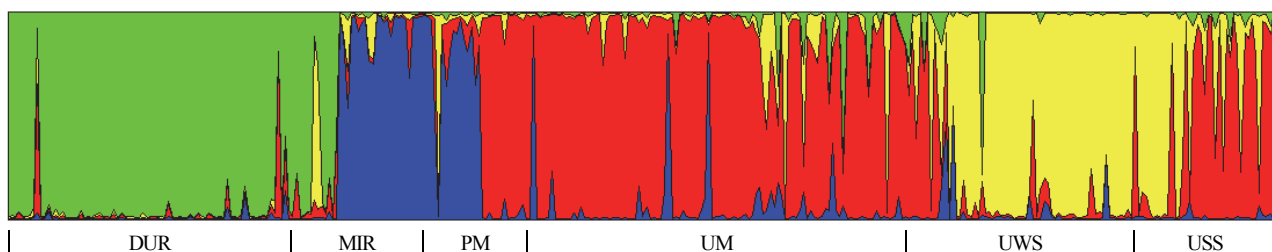


Fig. 4. Individual membership of the five Ukrainian local and one commercial pig breed of the K clusters ($K = 4$) inferred by Structure analysis: codes on the x-axis indicate the putative population of origin; see Table 1 for location abbreviations; each colour denotes a cluster from the structure analysis

Discussion

This is the first attempt to specifically quantify the population genetic diversity of the local Ukrainian pig breeds based on microsatellite markers. The six pig populations considered in our study showed substantial genetic diversity, with an overall mean of 6.23 alleles per locus (from two to 14) and an average expected heterozygosity of 0.572 for the 12 STR loci. At the breed level, the mean number of alleles per locus was 5.71 (2.92–8.42), with an allelic richness corrected for sample size of 2.84 (2.58–4.83) and an expected heterozygosity of about 0.525 (0.382–0.668). These results are in agreement with those observed for certain European pig breeds, but are somewhat lower than those reported for Asian breeds (Nidup & Moran, 2011).

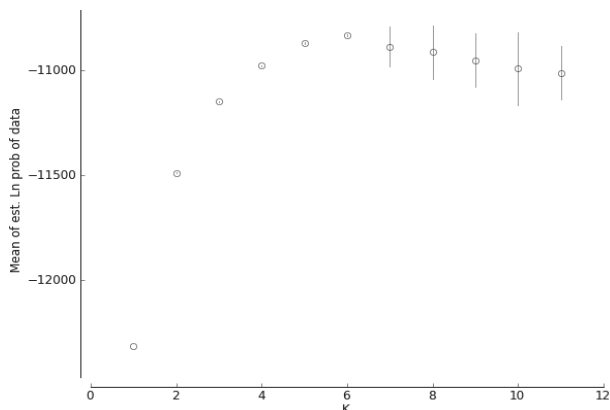


Fig. 3. Plot of mean likelihood $L(K)$ and standard deviation (SD) per K value from Structure Harvester on a dataset containing 350 individuals of the five Ukrainian local and one commercial pig breed genotyped for 12 polymorphic microsatellite loci

Table 9

Allocation probabilities of individuals in five Ukrainian local and one commercial pig breed based on probabilities estimated with the Structure software (for $K = 4$)

Breed	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
MIR	0.917	0.033	0.039	0.011
PM	0.750	0.137	0.098	0.015
UM	0.056	0.824	0.080	0.039
UWS	0.027	0.079	0.873	0.021
USS	0.013	0.772	0.184	0.031
DUR	0.010	0.038	0.029	0.924

The mean number of alleles per locus of 5.00–8.42 recorded in the present study for the UM, UWS and USS pig breeds is more than twice the mean number of alleles of 2.92–3.92 recorded for the MIR and PM pig breeds, indicating higher genetic diversity in some local pigs of Ukraine but approximately corresponds to the mean 7.00–7.70 reported by Behl et al. (2002) for two Indian pig breeds.

The relatively high number of alleles found in the UM and USS pig breeds is an indication that the effects of isolation and artificial selection of these populations has been moderate. The lower number of alleles in the Duroc population (6.67) reflects a relatively recently established Ukrainian population of limited size. The number of alleles in the

Ukrainian Duroc pigs is, however, still higher than values of 2.39–2.80 reported in Belgian and certain Asian swine populations (Van Zevenen et al., 1995; Fan et al., 2002; Chang et al., 2009).

Thus, the PM breed, based on estimates of effective number of alleles and observed heterozygosity, can be regarded as the Ukrainian local pig breed with lowest genetic diversity. As previously mentioned in Niang Megha pig (Indian local breed), the low effective number of alleles may be due to very low frequency of most of the alleles at each locus and a very few alleles might have contributed the major part of the allelic frequency at each locus (Zaman et al., 2013). Overall, the three Ukrainian local pig breeds presented higher mean values for the intra-population genetic diversity parameters (such as mean estimation of N_a , total allele and rare allele numbers), than the ones obtained for the commercial pig breed (Duroc). Additionally, the high amount of ‘private alleles’ found, mainly in the local swine breeds, shows their importance and the necessity of their preservation and conservation.

Such remark shows the high diversity of the local pig populations in comparison to the specialized (commercial) ones. This higher diversity may be explained by the fact that the locally adapted genetic groups are not subject to constant improvement programs for specific characteristics such as specialized breeds (Silva et al., 2011). Factors such as the level of inbreeding, population size, the history or origin of the breeding population, the level of artificial selection pressure and husbandry practices affect the genetic diversity of domestic animal populations (Ayizanga et al., 2016).

There was a significant level of inbreeding recorded at all loci studied. The lack of compliance with the HWE that was observed for at least one locus in most Ukrainian pig breeds is probably associated with the substantial deficit in heterozygosity. This shortage could be a consequence of inbreeding or intrabreed substructure, which are common properties in local breeds of low census population size (Ollivier et al., 2005; SanCristobal et al., 2006).

Moreover, in the analysed pig breeds, the high deviation from HWE loci number is probably due to the fact that the animals were raised by various pig breeding farms in Ukraine. These breeding farms often carry out matings between related individuals, especially due to the small size of the herd. On second hand, studying European commercial pig breeds, Laval et al. (2000) reported that the majority of them remained within HWE.

The mean overall fixation index (F_{IT}) of 20.4% recorded in the present study shows a great deal of genetic differentiation in individual animals relative to the total population. This index combines the genetic effects of non-random mating within populations together with the effects of genetic drift among populations (Ayizanga et al., 2016).

F_{ST} was the smallest at *SW240* and *SW24* loci (0.085–0.088) while at *SW951* locus it was the greatest (0.145). A mean F_{ST} of 0.122 indicates that 12.2% of total genetic variability occurs among the Ukrainian local pig populations and this is indicative of moderate genetic differentiation. This is comparable with results of Ayizanga et al. (2016) who reported a significant F_{ST} value of 12% among the local pigs of Ghana. AMOVA results of five Brazilian genetic groups (local and Landrace) obtained by Sollero et al. (2009) showed that 14% of all observed diversity came from the difference between the evaluated genetic groups. In another study carried out with Chinese pigs, an F_{ST} value of 7.7% was found (Yang et al., 2003). The highest genetic differentiation values for pig populations ever reported were $F_{ST} = 27\%$ (Laval et al., 2000)

between European pigs, followed by 26.1% for a differentiation study also carried out with European, Korean and Chinese pigs (Kim et al., 2005).

Results from the assignment test suggested a true genetic structure with significant differentiation among all populations, except the MIR and PM breeds. This result supports the trend from frequency-based D_A values, which showed significant differentiation among all population pairs but with the lowest D_A observed between the MIR and PM breeds (0.169) and between the UM and USS breeds (0.159). Five populations displayed a pattern of strong distinctiveness, with more than 88% of individuals assigned to a single cluster in each case. By contrast, significant numbers of pigs from the PM breed were distributed over several clusters, with the most prominent cluster containing only 69.2% (9 from 13) of individuals. Overall, the results from the assignment test support the hypothesis of high homogeneity within most Ukrainian local pig breeds sampled (Traspov et al., 2016).

Conclusions

This study was the first based on microsatellite markers for the genetic characterization of the local pig breeds from Ukraine. The results show that levels of genetic diversity in five local Ukrainian pig breeds are moderate to high. Results from an assignment-test confirmed results from F_{ST} which suggested an original genetic structure with significant differentiation between most breeds sampled, but with little differentiation among MIR and PM breeds.

Financial support was received from the Ministry of Education and Science of Ukraine (0117U000485) to A. V. Lykhach and A. S. Kramarenko.

References

- Behl, R., Kaul, R., Sheoran, N., Behl, J., Tanti, M. S., & Vijh, R. K. (2002). Genetic identity of two Indian pig types using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 33(2), 158–159.
- Berthouly, C., Bed'Hon, B., Tixier-Boichard, M., Chen, C. F., Lee, Y. P., Laloë, D., Legros, H., Verrier, E., & Rognon, X. (2008). Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. *Animal Genetics*, 39, 121–129.
- Chang, W. H., Chu, H. P., Jiang, Y. N., Li, S. H., Wang, Y., Chen, C. H., Chen, K. J., Lin, C. Y., & Ju, Y. T. (2009). Genetic variation and phylogenetics of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen microsatellite markers. *Journal of Animal Science*, 87(1), 1–8.
- Earl, D. A. (2012). Structure harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Fan, B., Wang, Z.-G., Li, Y.-J., Zhao, X.-L., Liu, B., Zhao, S.-H., Yu, M., Li, M.-H., Chen, S.-L., Xiong, T.-A., & Li, K. (2002). Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 33, 422–427.
- Gandini, G. C., & Villa, E. (2003). Analysis of the cultural value of local livestock breeds: A methodology. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1), 1–11.
- Guo, S. W., & Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 361–372.
- Hammer, H., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1–9.
- Hammond, K., & Leitch, H. (1998). Implementing the global strategy for the management of farm animal genetic resources. FAO, Rome, Italy.
- Kim, T. H., Kim, K. S., Choi, B. H., Yoon, D. H., Jang, G. W., Lee, K. T., Chung, H. Y., Lee, H. Y., Park, H. S., & Lee, J. W. (2005). Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. *Journal of Animal Science*, 83(10), 2255–2263.
- Laval, G., Iannuccelli, N., Legault, C., Milan, D., Groenen, M. A., Giuffra, E., Andersson, L., Nissen, P. H., Jørgensen, C. D., Beeckmann, P., Geldermann, H., Foulley, J.-L., Chevalet, C., & Geldermann, H. (2000). Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection Evolution*, 32(2), 187.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283–292.
- Nidup, K., & Moran, C. (2011). Genetic diversity of domestic pigs as revealed by microsatellites: A mini-review. *Genomics and Quantitative Genetics*, 2, 5–18.
- Ollivier, L. (2009). European pig genetic diversity: A mini-review. *Animal*, 3(7), 915–924.
- Ollivier, L., Alderson, L., Gandini, G. C., Foulley, J. L., Haley, C. S., Joosten, R., Rattink, A. P., Harlizius, B., Groenen, M. A. M., Amigues, Y., Boscher, M. Y., Russell, G., Law, A., Davoli, R., Russo, V., Matassino, D., Désautés, C., Firland, E., Bagga, M., Delgado, J. V., Vega-Pla, J. L., Martínez, A. M., Ramos, A. M., Glodek, P., Meyer, J. N., Plastow, G. S., Siggins, K. W., Archibald, A. L., Milan, D., San Cristobal, M., Laval, G., Hammond, K., Cardellino, R., & Chevalet, C. (2005). An assessment of European pig diversity using molecular markers: Partitioning of diversity among breeds. *Conservation Genetics*, 6(5), 729–741.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4(3), 347–354.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Romanov, M. N., & Weigend, S. (2001). Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*, 80(8), 1057–1063.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.
- SanCristobal, M., Chevalet, C., Foulley, J. L., & Ollivier, L. (2003). Some methods for analysing genetic marker data in a biodiversity setting – Example of the PigBioDiv data. *Archivos de Zootecnia*, 52(198), 173–183.
- SanCristobal, M., Chevalet, C., Haley, C. S., Joosten, R., Rattink, A. P., Harlizius, B., Groenen, M. A. M., Amigues, Y., Boscher, M.-Y., Russell, G., Law, A., Davoli, R., Russo, V., Désautés, C., Alderson, L., Firland, E., Bagga, M., Delgado, J. V., Vega-Pla, J. L., Martínez, A. M., Ramos, M., Glodek, P., Meyer, J. N., Gandini, G. C., Matassino, D., Plastow, G. S., Siggins, K. W., Laval, G., Archibald, A. L., Milan, D., Hammond, K., & Cardellino, R. (2006). Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 37, 189–198.
- Silva, E. C. D., Dutra Junior, W. M., Janella, P., Gomes Filho, M. A., Oliveira, C. J. P. D., Ferreira, D. N. D. M., Caetano, A. R., & Paiva, S. R. (2011). Patterns of genetic diversity of local pig populations in the State of Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(8), 1691–1699.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sollero, B. P., Paiva, S. R., Faria, D. A., Guimarães, S. E. F., Castro, S. T. R., Egito, A. A., Albuquerque, M. S. M., Piovezan, U., Bertani, G. R., & Marante, A. D. S. (2009). Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livestock Science*, 123(1), 8–15.
- Stolpovskiy, Y. A., & Zakharov-Gezekhus, I. A. (2017). The problem of conservation of gene pools of domesticated animals. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 21(4), 477–486.
- Traspov, A., Deng, W., Kostyunina, O., Ji, J., Shatkhin, K., Lugovoy, S., Zinivieva, B., Yang, B., & Huang, L. (2016). Population structure and genome characterization of local pig breeds in Russia, Belorussia, Kazakhstan and Ukraine. *Genetics Selection Evolution*, 48(1), 16.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370.
- Wintero, A. K., Fredholm, M., & Thomsen, P. D. (1992). Variable (dG-dT)n (dC-dA)n sequences in the porcine genome. *Genomics*, 12(2), 281–288.
- Yang, S. L., Wang, Z. G., Liu, B., Zhang, G. X., Zhao, S. H., Yu, M., Fan, B., Li, M. H., Xiong, T. A., & Li, K. (2003). Genetic variation and relationships of eighteen Chinese indigenous pig breeds. *Genetics Selection Evolution*, 35(7), 657.
- Zaman, G., Shekar, M. C., & Aziz, A. (2013). Molecular characterization of Meghalaya Local pigs (Niang Megha) using microsatellite markers. *Indian Journal of Science and Technology*, 6(10), 5302–5306.
- Zeveven, A. V., Peelman, L., Weghe, A. V. D., & Bouquet, Y. (1995). A genetic study of four Belgian pig populations by means of seven microsatellite loci. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 112, 191–204.
- Zinovieva, N. A., & Gladys, E. A. (2011). Geneticheskaya ekspertiza sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh: Primenenie test-sistem na osnove mikrosatelitov [Genetic evaluation of agricultural animals: The use of microsatellite test system]. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK*, 9, 19–20 (in Russian).



Cortex electrical activity during switching of motor programs among men and women

O. V. Korzhyk, O. S. Pavlovych, O. R. Dmytrotso, A. H. Morenko

Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine

Article info

Received 06.04.2018

Received in revised form
10.05.2018

Accepted 12.05.2018

*Lesya Ukrainka Eastern
European National
University, Voli ave., 13,
Lutsk, 43025, Ukraine.
Tel.: +38-066-826-27-23.
E-mail:
alevmore@gmail.com*

Korzhyk, O. V., Pavlovych, O. S., Dmytrotso, O. R., & Morenko, A. H. (2018). Cortex electrical activity during switching of motor programs among men and women. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 183–188. doi:10.15421/021827

The inhibition of motor response is considered as an important aspect of executive control, as a way of changing behaviour. Gender, as a biological characteristic, stipulates different peculiarities of brain processes and, as a consequence, different behaviour of men and women. In the context of the Stop-Change task, the aim of our study was to examine whether there were differences in the brain processes between men and women. The method of “event-related desynchronization / synchronization” – ERD / ERS EEG – was used to clarify that issue. 36 men and 38 women, healthy, between the ages of 18 and 22, right-handed, participated in the experiment of compliance with bioethical requirements. The application of Stop-Change task required from the participants under the condition of a low tone (600 Hz sound) to quickly press with the help of the index finger and release the left button of the remote control. If there was a high tone (1600 Hz sound) the participant had to rapidly press and release with the help of middle finger the right button of the console. The prevalence of event-related synchronization phenomena of the α - and β -EEG-activity in cortical areas was distinguished in groups of men and women. It was apparently related to some deactivation of the cortex during the switching of motor program that was launched. At the same time, cortical electrical activity acquired certain specific features of the frequency-spatial organization, which could indicate the existence of certain gender characteristics of the brain processes. The weaker ERG EEG among women (compared with men) at 10 Hz, 16 Hz in symmetrical frontal and left central and parietal areas was found. Instead, the relative increase of ERS EEG among women was set in the range of 10 Hz (right central areas), 13 Hz (frontal central areas) and 19 Hz (central parietal areas). Gender differences in the electrical activity of the cortex in the range above 25 Hz of the EEG were characterized by some instability of the ERS and ERD responses in the frequency and spatial aspects.

Keywords: event-related desynchronization; event-related synchronization; manual movements; Stop-Change task

Introduction

In all spheres of activity a person constantly tries to control their own manual motor skills and to change them according to their needs. Manipulator coordination requires the permanent cancellation and updating of motor programs and commands. The analysis of literature data showed that the modified version of the Go-No Go paradigm, the so-called Stop-Change task (Logan & Burkell, 1986; Verbruggen et al., 2008), is the most commonly used in study the processes that involve the motor responses inhibition. The Stop-Change task requires the involvement of the Go process, the braking process and the alternative action process. All three of them can be considered as independent (Verbruggen & Logan, 2009). According to the neurovisualization data obtained in the Stop-Change task situation, involvement of the prefrontal cortex and basal ganglia in the process of motor response inhibition has been established (Simmonds et al., 2008; Chambers et al., 2009). Isoda & Hikosaka (2007), Neubert et al. (2010) also defined that in the process of reprogramming preSMA participates. This fact, in their view, is relevant to the inhibition of irrelevant actions and facilitates the launch of an alternative answer. Neurophysiological studies of motor response inhibition conducted by Stop-Change task showed a peak negativity about 180 ms of parietal-occipital electrodes of both hemispheres and, later, about 220 ms of frontal and central (Rangel-Gomez et al., 2015). The research conducted by Rangel-Gomez et al. (Rangel-Gomez et al., 2015) indicates that there is no lateralization of negative cortical activity in parietal areas. Taking into consideration the

importance of the obtained results, it should be noted that there is some insufficiency in creating a complete concept of brain processes during the switching of motor programs of human movements.

Gender, as a biological characteristic, stipulates different peculiarities of brain processes and, as a consequence, different behaviour of men and women. Available literary sources give information about gender differences in the analysis of cognitive and emotional stimuli (Wager et al., 2003; Hamann & Canli, 2004; Wager & Ochsner, 2005). For example, among women, the activation of the left prefrontal cortex and mesolimbic pathways was fixed; it was manifested to a greater extent than that of men, reflecting a greater degree of processing (Azim et al., 2005) among women. Gender differences in the local brain activation were also observed in behavioural problems that required word formation (Bell et al., 2006), spatial attention (Bell et al., 2006), working memory (Gaab et al., 2003; Goldstein et al., 2005; Bell et al., 2006; Ragland et al., 2006; Mitchell, 2007), spatial navigation (Maguire et al., 1999), visceral stimulation (Kern et al., 2001; Naliboff et al., 2003) and odour identification (Bengtsson et al., 2001; Royet et al., 2003). According to the following authors (Meyers-Levy & Loken, 2015; Silva & Ravindran, 2015; Morenko et al., 2016) cognitive sexual differences may be due to the peculiarities in the organization of brain networks, due to evolutionary tendencies, hormonal influences or other developmental factors. On the other hand, numerous studies have revealed that males are more susceptible to impairment in inhibitory control and increased levels of impulsivity compared with females (Petry et al., 2002; Fillmore et al., 2004; Li et al., 2006; Cotto et al.,

2010). Schizophrenic patients show deficits in executive control tests such as stop-signal tasks, and cognitive impairments are much more exaggerated in male patients (Han et al., 2012). In a study by Mansouri et al. (2009) women have shown that they are more capable of resorting to previous influence and practice of using executive control in complex cognitive tasks than men. Despite their importance, the results underscore a certain lack of information about the gender specifics of cortex electrical activity precisely when switching motor programs of manual movements. In the context of the Stop-Change task, the aim of our study was to examine whether there were differences in the brain processes between men and women. The method of “event-related desynchronization / synchronization” – ERD / ERS EEG – was used to clarify that issue. According to data from literature sources (Pfurtscheller & Lopes da Silva, 1999; Pfurtscheller, 2001; Neuper et al., 2006), the application of ERD / ERS is the most appropriate method for analyzing the dynamic activity of brain oscillatory systems under motor responsive conditions and allows one to distinguish from the background rhythmic activity precisely the reaction associated with the event. The detection by the above-mentioned method of the EEG markers of the brain processes, related directly to the motor response to Stop-Change signals has not only fundamental scientific significance for understanding the mechanism of switching of motor programs of targeted MM. The use of such EEG markers in perspective can qualitatively improve early diagnosis of cortical dysfunctions of the neuromotor apparatus, as well as rehabilitation programs for controlling behaviour in neuropsychological disorders.

Materials and methods

The participants in our study were 36 male and 38 female volunteers from the ages of 19 to 21, each of whom has given written consent. Biomedical ethics rules in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association on the Ethical Principles of Scientific and Medical Research involving Human Subjects were

adhered to during the experiment. All the testees were healthy, had normal hearing according to the judgment and advisory conclusions of medical professionals, had the right profile of manual and auditory asymmetries, which were evaluated by the nature of responses during the survey and the performance of motor and psychoacoustic tests (Zhavoronkova, 2007). Time of sensorimotor responses in the choice of one of three objects as signals (triangles, circles, squares) was determined by computer diagnostic complex “Diagnost-1” (Certificate of measuring equipment type № UA-MI / 2p- 2613-2008 05.08.2008, Ukraine). All testees had to respond to the certain stimuli as quickly as possible by pressing and releasing the button panel by the right hand.

EEG experiment procedure envisioned the use of the Stop-Change task. Beforehand each examinee received an instruction according to which, on the appearance of low tone (sound of 600 Hz) s/he needed to press and release the left button of the console (Go-response) quickly with the help of the right index finger. If there was a high tone (1600 Hz sound) s/he had to rapidly press and release with the help of middle finger the right button of the console. Under experimental conditions, all stimuli sounds were served in pairs. In some stimuli pairs both sounds were low-pitched, in the others the first sound was of low tone, and the second – high tone. If the stimuli in the pair were unequal, then there was a braking of the running motor program (pressing the right index finger on the left button of the console), followed by switching to the alternative one (Stop-Change) (Fig. 1).

The duration of each beep was 50 ms, between stimuli interval representation of signals was 5000 ms (Pfurtscheller & Lopes da Silva, 1999). The correlation of stimuli pairs with both low sounds (600 Hz) and stimuli pairs with both low and high sounds (600 and 1600 Hz) in the sample was 70/30. Time delay after first sound was 140 ms. This period included tactile (hidden) and partially motor components of sensory-motor responses, which are related to the perception of signal analysis, the decision on the motion, the formation of motor programs (Lyzogub et al., 2015; Rangel-Gomez et al., 2015).

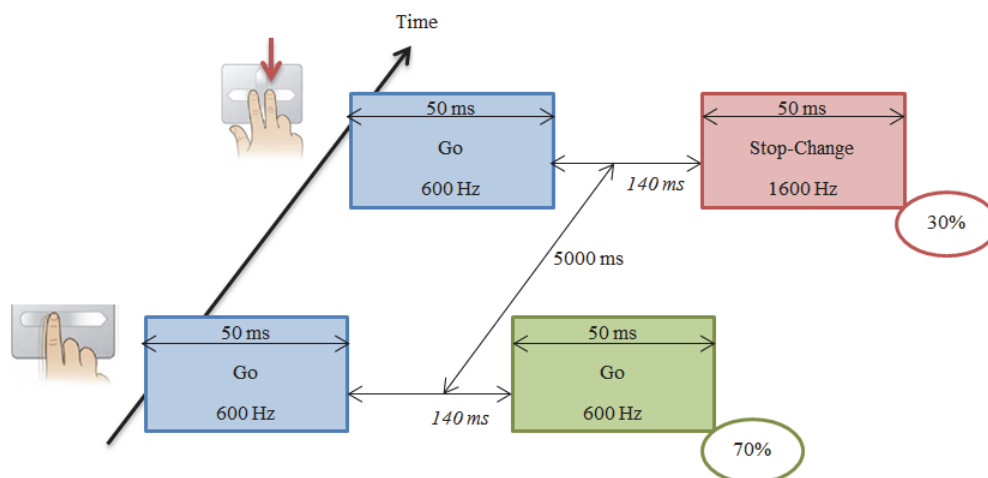


Fig. 1. Scheme of the conducted experimental Stop-Change task: Go – the first sound in stimuli pair, in response to which the testee had to start moving. Go, Stop-Change – the second sound in stimuli pair, confirm initiated movement; 70% and 30% – correlation between stimuli pairs in the sample

During the electroencephalographic stage participants were in a specially equipped sound and lightproof room, in a reclining position with eyes closed. EEG recording was performed using electroencephalographic hardware and software complex “Neurokom” (Certificate of compliance with technical regulations on medical devices N753 dated 25 January 2017). EEG registration was performed monopolar, 19 active electrodes were placed on the surface of the scalp on the international system 10/20. As reference electrodes, combined ear electrodes were used A1 and A2, which were attached to the left and right ear lobes respectively. Additionally, referential electrodes Ref were used (placed between frontal and lateral parts) and N (Nasion). Artefact activity rejection of native EEG was carried out by applying ICA-analysis (Independent Component Analysis). Changes of brain activity was measured in the frontal (F3, F4), central (C3, C4) and parietal (P3, P4) leads.

The choice of such assignments was associated with existing published data that demonstrate the greatest part of these cortical areas in the processing of motor data and motor programming (Haaland et al., 2000; Ioffe, 2003; Bai et al., 2005; Neubauer et al., 2006; Morenko & Korzhik, 2016).

Event-related desynchronization (ERD) and event-related synchronization (ERS) of EEG frequency (1–35 Hz) were estimated. Calculation of ERD/ERS maps was conducted in Matlab environment (MathWorks, 2015) in accordance with the procedure described by Pfurtscheller and Lopes da Silva (Pfurtscheller & Lopes da Silva, 1999). The content of the technique ERD/ERS was as follows: 1) collecting of EEG data for N stimulus presentation was conducted; 2) the signals were sequentially filtered for all stages N of analysis; 3) the filtered signals were summed in the square to calculate the signal strength for each reference in every stage; 4) the received power level for each period of time in the analysis

stage was summarized for all stages (point-to-point); 5) the calculation of ERD/ERS was repeated for several consecutive frequency ranges in increments of 1 Hz, and the received values were represented in a variety of colours of the spectrum, which gave ERD/ERS maps, as a result. Stage of analysis was 5 seconds, which included 2 seconds before the submission of the second sound in the stimuli pair (reference interval, RI) and 3 seconds after the filing (post stimuli interval, PI). Change of spectral power EEG was evaluated in regard to a referential time interval (RI).

Test samples for normality of distribution were carried out using criterion of Shapiro Wilk (W , at $P > 0.05$). The differences were evaluated by t -criterion of Student (for independent samples). Differences at $P < 0.05$ are considered reliable. Gender changes of ERD/ERS of EEG frequency components in each leads between motor responses to significant stimuli under the conditions of the Stop-Change task were analyzed. Statistical analysis was conducted in the Statistica 8.0 program (StatSoft Inc.) and Matlab (MathWorks, 2015).

Results

The time of the sensory-motor response among male participants was 368.72 ms, among female – 382.67 ms.

Analysis of the results indicates enhancement effects associated with the event-related synchronization in the range of α - and β -EEG rhythms in a situation of the motor running program inhibition, followed by switching to an alternative movement among women compared with men. Poststimuli time interval in the sensory-motor responses comparable noted the growing role of ERS EEG ($P < 0.05$) among women at frequencies of 8 and 10 Hz in the right central lead (PI: 170–478 ms) 13 Hz in both frontal and central areas (PI: 148–1014 ms). Along with that, among women over a period sensory-motor response was set lower ERS EEG ($P < 0.05$) in the frequency range of 10 Hz in the right and left frontal areas of the central (PI 0–520 ms) than among men (Fig. 2–4).

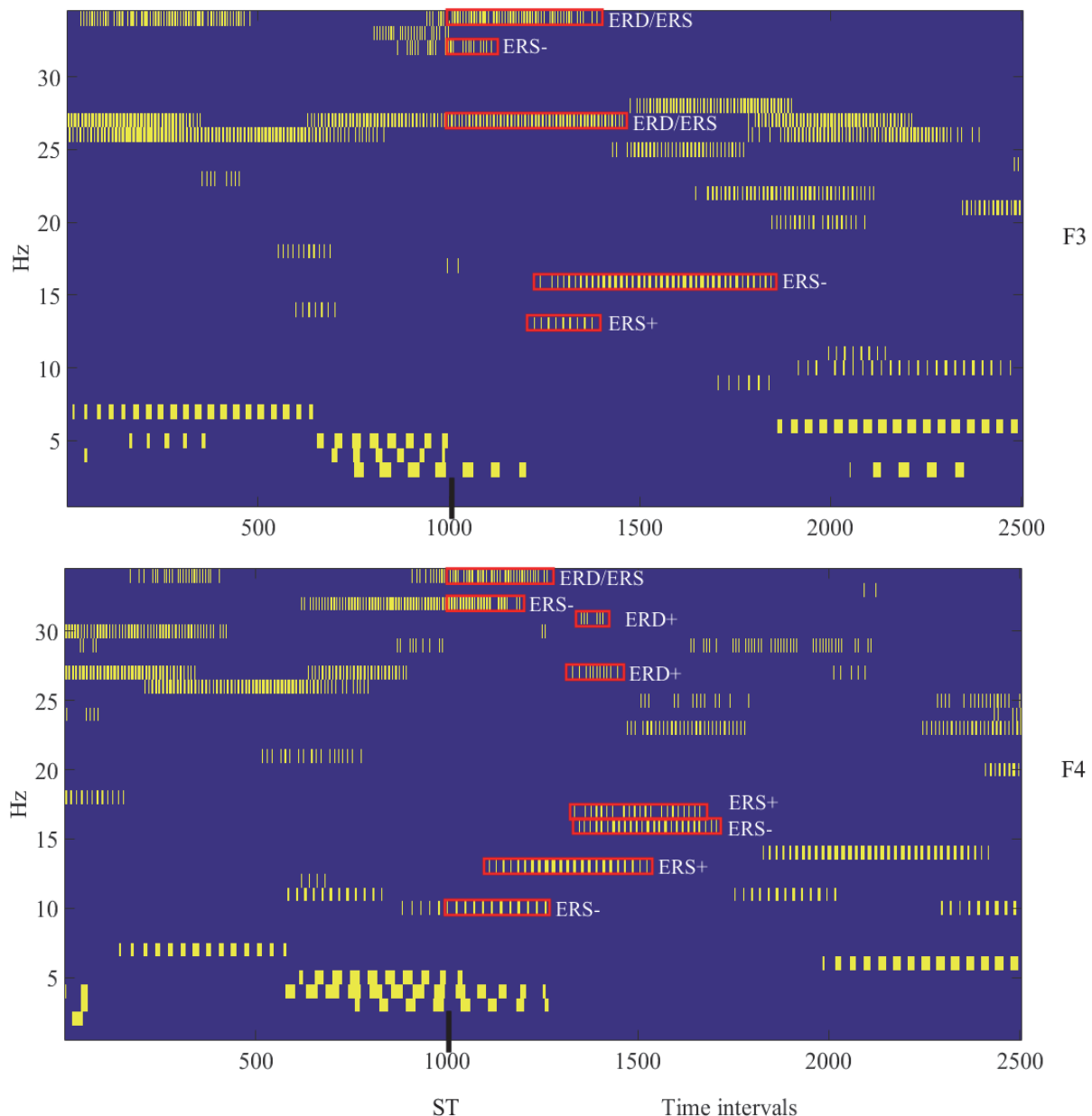


Fig. 2. ERD / ERS EEG in the frontal leads during responses to Stop-Change stimuli among women compared to men:

500 time durations correspond to 1 second. Within the limits of the mark of 1000 time durations, depending on the experimental set, a significant stimulus (ST) was given; yellow colour in a red frame on the figure indicates statistically significant differences ($P < 0.05$), and blue colour – its absence; ERS +/- or ERD +/- reflect the increase / decrease of reaction to Stop-Change stimuli response among women compared to men, $P < 0.05$. ERS / ERD (or ERD / ERS) in the schemes indicate the change in the type of reaction to the Stop- Change stimuli (second from the pair) among women in relation to those in men, (first in the pair), $P < 0.05$.

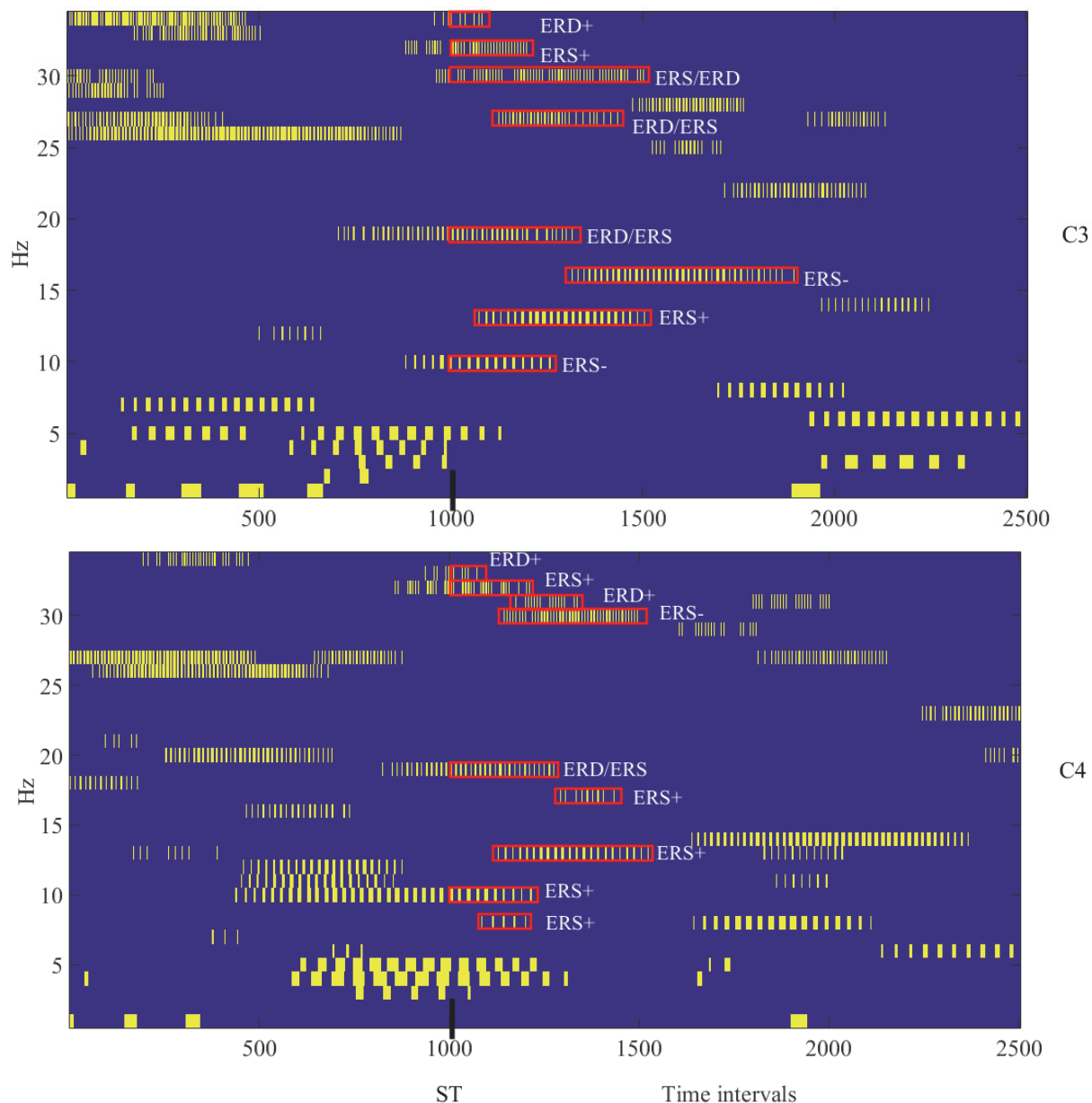


Fig. 3. ERD / ERS EEG in the central leads during responses to Stop-Change stimuli among women compared to men

In the 19 Hz range, women showed ERS EEG as opposed to ERD in men ($P < 0.05$). Such differences were found in the central and parietal cortex in the left (PI: 0–604 ms) and right (PI: 0–478 ms) hemisphere of the cortex ($P < 0.05$) (Fig. 2–4).

During the above mentioned testing, gender differences in cortical processes were noted that had a longer duration than the time sensory-motor response of the choice of the surveyed. At a frequency of 16 Hz, the lower level of ERS EEG among women was recorded in both frontal (PI: 510–1690 ms), left central and parietal cortex areas (PI: 662–1788) ($P < 0.05$) compared with men. At the same time, at the frequency of 17 Hz, the ERS of the EEG became higher in women in the right frontal (PI: 640–1326 ms) and central cortical areas (PI: 582–814 ms) ($P < 0.05$).

The gender differences in cortical electrical processes in the range of high-frequency β_2 activity (over 25 Hz) indicated some instability of ERS and ERD changes.

Discussion

Our paper was aimed at studying gender specifics of cortex electrical activity during switching motor programs of manual movements in the context of the Stop-Change task. We tried to examine whether

there were differences in the brain processes between men and women with use of the method of “event-related desynchronization / synchronization” – ERD/ERS EEG. We found an enhancement of the event-related synchronization in the range of α - and β -EEG rhythms in a situation of the motor running program inhibition, followed by switching to an alternative movement among women compared with men. According to some authors (Neuper & Pfurtscheller, 2001; Pfurtscheller, 2001; Bai et al., 2005; Li et al., 2006; Lopes da Silva, 2006; Morenko & Morenko, 2016), synchronization in this frequency EEG spectrum generally meets escalating decontamination processes in the respective populations of cortical neurons and can be traced in a position to reduce information processing, full or partial suspension of motor behaviour. In terms of our experiment, such patterns can indicate a greater role the downstream inhibitory cortical influences during the exercise among women.

At the same time, cortex electrical activity acquired certain specific features of the frequency-spatial organization, which could indicate the existence of certain gender characteristics of the brain processes. Weaker ERG EEG among women (compared with men) at 10, 16 Hz in symmetrical frontal and left central and parietal areas were found. Instead, the relative significance of ERG EEG among women was set in the range of 10 Hz (right central areas), 13 Hz (frontal central areas) and

19 Hz (central parietal areas). Relevant results probably meant that in such a frequency range associated with the event, a synchronous relationship between the main neural elements among women was lower (Pfurtscheller, 1999; Neubauer et al., 2006) than among men. From the point of view of a number of researchers, in the desynchronized system, readiness for activity and information capacity increases

(Thatcher et al., 1983), the level of activation of cortical neurons increases (Steriade et al., 1990; Neubert et al., 2010). In terms of our experiment desynchronization processes, that were established in the 19 Hz range among men and their cortical topography, could be associated with a greater degree of their differentiated attention, provided that the switching on an alternative motor task is required.

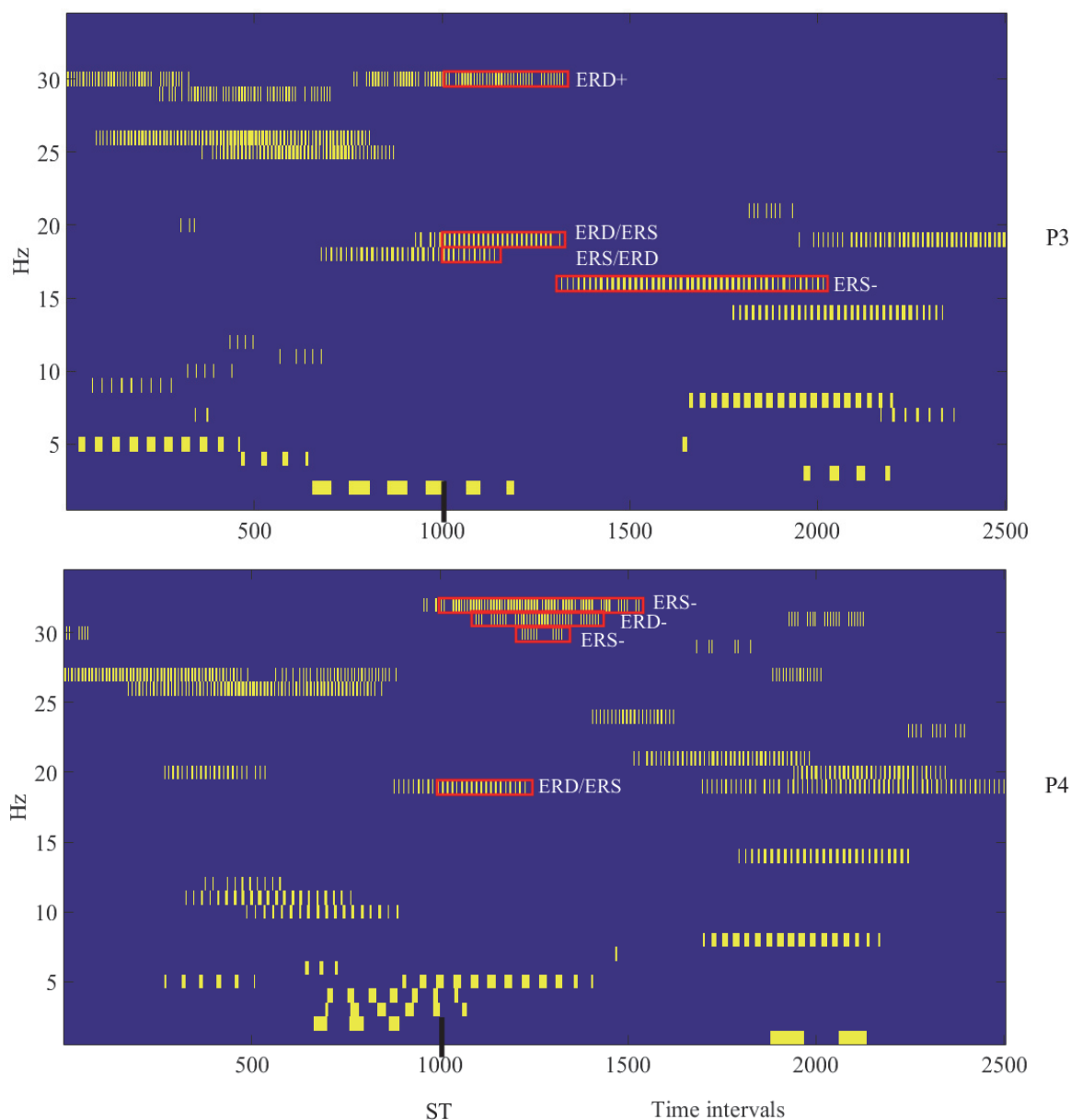


Fig. 4. ERD/ERS EEG in the parietal leads during responses to Stop-Change stimuli among women compared to men

During the above mentioned testing, gender differences in cortical processes were indicated that had a longer duration than the time of sensory-motor response of the choice of the surveyed. At a frequency of 16 Hz, the lower level of ERS EEG among women was recorded in both frontal, left central and parietal cortex areas compared with men. At the same time, at the frequency of 17 Hz, the ERS of the EEG became higher in women with right frontal and central cortical areas. Such gender differences may also be a reflection of the increased involvement of these cortical areas in preparation for the next manual response.

The gender differences in cortical electrical processes in the range of high-frequency β_2 activity (over 25 Hz) indicated some instability of reaction changes (ERS and ERD, respectively). We assume that according to the “horse-race model” (Verbruggen & Logan, 2009; Neuper et al., 2006), the processes of activation and inhibition of neuronal ensembles at such frequencies of EEG in our experiments occurred independently of each other, and their success or failure could be determined by the fact of which process was the first.

Conclusion

The prevalence of event-related synchronization phenomena of the α - and β -EEG-activity in cortical areas was distinguished in groups of men and women. It was apparently related to some deactivation of the cortex during the switching of motor program that was launched. At the same time, cortical electrical activity acquired certain specific features of frequency-spatial organization, which could indicate the existence of certain gender characteristics of the brain processes. Weaker ERG EEG among women (compared with men) at 10 and 16 Hz in symmetrical frontal and left central and parietal areas were found. Instead, the relative increase of ERS EEG among women was set in the range of 10 Hz (right central areas), 13 Hz (frontal central areas) and 19 Hz (central parietal areas). Gender differences in the electrical activity of the cortex in the range above 25 Hz of the EEG were characterized by some instability of the ERS and ERD responses in the frequency and spatial aspects.

This research has been performed within the framework of scientific topic of the Faculty of Biology of Lesya Ukrainka Eastern European National University "Neurophysiological mechanisms of human motor activity".

References

- Azim, E., Mobbs, D., Jo, B., Menon, V., & Reiss, A. L. (2005). Sex differences in brain activation elicited by humor. *Proceedings of the National Academy*, 102(45), 16496–16501.
- Bai, O., Mari, Z., Vorbach, S., & Hallet, M. (2005). Asymmetric spatiotemporal patterns of event-related desynchronization preceding voluntary sequential finger movements: A high-resolution EEG study. *Clinical Neurophysiology*, 116(5), 1213–1221.
- Bell, E. C., Willson, M. C., Wilman, A. H., Dave, S., & Silverstone, P. H. (2006). Males and females differ in brain activation during cognitive tasks. *Neuroimage*, 30(2), 529–538.
- Bengtsson, S., Berglund, H., Gulyas, B., Cohen, E., & Savic, I. (2001). Brain activation during odor perception in males and females. *Neuroreport*, 12(9), 2027–2033.
- Chambers, C. D., Garavan, H., & Bellgrove, M. A. (2009). Insights into the neural basis of response inhibition from cognitive and clinical neuroscience. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(5), 631–646.
- Cotto, J., Davis, E., Dowling, G. J., Elcano, J. C., Staton, A. B., & Weiss, S. R. (2010). Gender effects on drug use, abuse, and dependence: A special analysis of results from the national survey on drug use and health. *Gender Medicine*, 7(5), 402–413.
- da Silva, T. L., & Ravindran, A. V. (2015). Contribution of sex hormones to gender differences in schizophrenia: A review. *Asian Journal of Psychiatry*, 18, 2–14.
- Fillmore, M., & Weafer, J. (2004). Alcohol impairment of behavior in men and women. *Addiction*, 99(10), 1237–1246.
- Gaab, N., Keenan, J. P., & Schlaug, G. (2003). The effects of gender on the neural substrates of pitch memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 15(6), 810–820.
- Goldstein, J. M., Jerram, M., Poldrack, R., Anagnoson, R., Breiter, H. C., Makris, N., Goodman, J. M., Tsuang, M. T., & Seidman, L. J. (2005). Sex differences in prefrontal cortical brain activity during fMRI of auditory verbal working memory. *Neuropsychology*, 19(4), 509–519.
- Haaland, K. Y., Harrington, D. L., & Knight, R. T. (2000). Neural representations of skilled movement. *Brain*, 123(11), 2306–2313.
- Hamann, S., & Canli, T. (2004). Individual differences in emotion processing. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(2), 233–238.
- Han, M., Huang, X. F., Chen, D. C., Xiu, M. H., Hui, L., Liu, H., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2012). Gender differences in cognitive function of patients with chronic schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 358–363.
- Ioffe, M. (2003). *Mozgovye mehanizmy formirovaniya novykh dvizhenij pri obuchenii: Jevoljucija klassicheskikh predstavlenij* [Neural basis of learning new movements: Evolution of classical concepts]. *Zhurnal Vyshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni I. P. Pavlova*, 53(1), 5–21 (in Russian).
- Isoda, M., & Hikosaka, O. (2007). Switching from automatic to controlled action by monkey medial frontal cortex. *Nature Neuroscience*, 10(2), 240–248.
- Kem, M. K., Jaradeh, S., Arndorfer, R. C., Jesmanowicz, A., Hyde, J., & Shaker, R. (2001). Gender differences in cortical representation of rectal distension in healthy humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(6), 1512–1523.
- Li, C., Huang, C., Constable, R., & Sinha, R. (2006). Gender differences in the neural correlates of response inhibition during a stop-signal task. *Neuroimage*, 32(4), 1918–1929.
- Logan, G. D., & Burkell, J. (1986). Dependence and independence in responding to double stimulation – a comparison of stop, change, and dual-task paradigms. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 12(4), 549–563.
- Lopes da Silva, F. H. (2006). Event-related neural activities: What about phase? *Progress Brain Research*, 159, 3–17.
- Lyzogub, V. S., Kozhemyako, T. V., Yukhimenko, L. I., & Khomenko, S. M. (2015). *Elektrofiziologichni harakterystyky R₃₀₀ ta funktsionalna organizatsija skladnykh sluhomotornykh reakcij u pidlitkiv* [Electrophysiology characteristics of R₃₀₀ and the functional organization of complex audiomotory reactions of adolescents]. *Cherkasy University Bulletin: Biological Sciences Series*, 335(2), 72–78 (in Ukrainian).
- Maguire, E. A., Burgess, N., & O'Keefe, J. (1999). Human spatial navigation: Cognitive maps, sexual dimorphism, and neural substrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(2), 171–177.
- Mansouri, F., Tanaka, K., Buckley, M. (2009). Conflict-induced behavioral adjustment: A clue to the executive functions of the prefrontal cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(3), 141–152.
- Meyers-Levy, J., & Loken, B. (2015). Revisiting gender differences: What we know and what lies ahead. *Journal of Consumer Psychology*, 25(1), 129–149.
- Mitchell, R. L. (2007). fMRI delineation of working memory for emotional prosody in the brain: Commonalities with the lexicosemantic emotion network. *Neuroimage*, 36(3), 1015–1025.
- Morenko, A. G., & Korzhik, O. V. (2016). Brain processes in women with different modal alpha-frequency through the execution of manual movements with applying of force. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6(1), 326–341.
- Morenko, A., & Morenko, O. (2016). Electrical activity of the cerebral cortex during the low-frequency acoustic stimulation in women with different characteristics of alpha rhythm. *Annals of Neurosciences*, 23(4), 235–240.
- Naliboff, B. D., Berman, S., Chang, L., Derbyshire, S. W., Suyenobu, B., Vogt, B. A., Mandelkern, M., & Mayer, E. A. (2003). Sex-related differences in IBS patients: Central processing of visceral stimuli. *Gastroenterology*, 124(7), 1738–1747.
- Neubauer, A. C., Fink, A., & Grabner, R. H. (2006). Sensitivity of alpha band ERD to individual differences in cognition. *Progress in Brain Research*, 159, 167–178.
- Neubert, F. X., Mars, R. B., Buch, E. R., Olivier, E., & Rushworth, M. F. (2010). Cortical and subcortical interactions during action reprogramming and their related white matter pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), 13240–13245.
- Neuper, C., & Pfurtscheller, G. (2001). Event-related dynamics of cortical rhythms: Frequency specific features and functional correlates. *International Journal of Psychophysiology*, 43(1), 41–58.
- Neuper, C., Wörtz, M., & Pfurtscheller, G. (2006). ERD/ERS patterns reflecting sensorimotor activation and deactivation. *Progress in Brain Research*, 159, 211–222.
- Petry, M., Kirby, K., & Kranzler, H. (2002). Effects of gender and family history of alcohol dependence on a behavioral task of impulsivity in healthy participants. *Journal of Studies on Alcohol*, 63(1), 83–90.
- Pfurtscheller, G. (2001). Functional brain imaging based on ERD/ERS. *Vision Research*, 41, 1257–1260.
- Pfurtscheller, G., & Lopes da Silva, F. H. (1999). Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: Basic principles. *Clinical Neurophysiology*, 110(11), 1842–1857.
- Ragland, J. D., Coleman, A. R., Gur, R. C., Glahn, D. C., & Gur, R. E. (2000). Sex differences in brain-behavior relationships between verbal episodic memory and resting regional cerebral blood flow. *Neuropsychologia*, 38(4), 451–461.
- Rangel-Gomez, M., Knight, R. T., & Krämer, U. M. (2015). How to stop or change a motor response: Laplacian and independent component analysis approach. *International Journal of Psychophysiology*, 97(3), 233–244.
- Royet, J. P., Plailly, J., Delon-Martin, C., Kareken, D. A., & Segebarth, C. (2003). fMRI of emotional responses to odors: Influence of hedonic valence and judgment, handedness, and gender. *Neuroimage*, 20(2), 713–728.
- Simmonds, D. J., Pekar, J. J., & Mostofsky, S. H. (2008). Meta-analysis of go/no-go tasks demonstrating that fMRI activation associated with response inhibition is task-dependent. *Neuropsychologia*, 46(1), 224–232.
- Steriade, M., Gloor, P., Llinas, R. R., Lopes da Silva, F. H., & Mesulam, M. M. (1990). Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 76(6), 481–508.
- Thatcher, R. W., McAlaster, R., Lester, M. L., Horst, R. L., & Cantor, D. S. (1993). Hemispheric EEG asymmetries related to cognitive functioning in children. In: Poreman, A. (Ed.). *Cognitive processing in the right hemisphere*. Academic Press, New York.
- Verbruggen, F., & Logan, G. D. (2009). Models of response inhibition in the stop-signal and stop-change paradigms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(5), 647–661.
- Verbruggen, F., Schneider, D. W., & Logan, G. D. (2008). How to stop and change a response: The role of goal activation in multi-tasking. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 34(5), 1212–1228.
- Wager, T. D., & Ochsner, K. N. (2005). Sex differences in the emotional brain. *NeuroReport*, 16(2), 85–87.
- Wager, T. D., Phan, K. L., Liberzon, I., & Taylor, S. F. (2003). Valence, gender, and lateralization of functional brain anatomy in emotion: A meta-analysis of findings from neuroimaging. *NeuroImage*, 19(3), 513–531.
- Zhavoronkova, L. A. (2009). *Pravshi-levshi. Mezhpolutshamaja asimmetrija biopotencialov mozga cheloveka* [Right-handed people, the left-handers. Hemispheric asymmetry of the human brain biopotentials]. *Jekoinvest, Krasnodar* (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 189–197
doi: 10.15421/021828

Cytogenetic activity of radionuclide contamination of water reservoirs of the alienation zone of Chornobyl NPP

R. A. Yakymchuk

Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 04.03.2018

Received in revised form
11.04.2018

Accepted 12.04.2018

*Institute of Plant Physiology
and Genetics of NAS of Ukraine,
Vasylkivska st., 31/17,
Kyiv, 03022, Ukraine.
Tel.: +38-097-341-89-12.
E-mail:
peoplenature16@gmail.com*

Yakymchuk, R. A. (2018). Cytogenetic activity of radionuclide contamination of water reservoirs of the alienation zone of Chornobyl NPP. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 189–197. doi:10.15421/021828

Thirty years after the accident, the alienation zone of Chornobyl NPP continues to be an open source of radionuclide spread which is carried with superficial and soil waters into river systems and moves beyond the area. The study of mutagenic activity of radionuclide contamination of the water reservoirs in the near zone of Chornobyl NPP will make it possible to predict genetic consequences of their effect in the years after the accident. The purpose of this research is to study frequency and spectrum of chromosome aberrations in root meristem cells of *Triticum aestivum* L. under the prolonged effect of radionuclide contamination of water and bottom deposits of the water reservoirs in the near alienation zone of Chornobyl NPP. Seeds of winter wheat varieties Al'batros odes'kyi and Zymoziarka were sprouted in the conditions of the effect of water radionuclide contamination of the Prypiat River, Brahinka River, a reservoir-cooler of ChNPP, Semyhodskyi backwater, drainage-way 3 of ChNPP, Lakes Hlyboke and Azbuchyn (total specific activity of ^{137}Cs and ^{90}Sr – 0.17–52.99 Bq/m³) and bottom deposits of the left and right banks of Prypiat canal, a reservoir-cooler of ChNPP, drainage-ways 1–3 of ChNPP (total specific activity of ^{137}Cs and ^{90}Sr – 16.0–45.0 Bq/kg). Frequency and spectrum of cytogenetic disorders were identified in the cells of root meristem sprouts with help of the ana-telophase method. Under the influence of radiation on water and bottom deposits of the water reservoirs in the alienation zone of ChNPP, a 1.6–4.2 times increase in the frequency of chromosome aberrations and mitosis disorders was found. The highest levels of cytogenetic activity were shown by water radionuclide contamination in a reservoir-cooler of ChNPP, Semyhodskyi backwater and bottom deposits of drainage-way 2. The correlation between frequency of chromosome aberrations and specific value of radionuclide activity of water reservoirs has not been recorded, which can prove the induction of cytogenetic disorders resulting from the radiation in the low-rate range. The spectrum of cytogenetic disorder types is mostly represented by acentric fragments, bridges and lagging chromosomes. The induction of the cells with lagging chromosomes, which exhibit the highest levels (0.24–0.38%), under the effect of radionuclide contamination of water in Hlyboke Lake, the Brahinka River, the Prypiat River, a reservoir-cooler of ChNPP and bottom deposits of drainage-way 3, allows one to assume the availability of aneugenic factors in the water reservoirs in the alienation zone of ChNPP. The water entities of the alienation zone of ChNPP, the level of radionuclide contamination of which is characterized by a high cytogenetic activity, induce cells with complex chromosome rearrangements of high frequency. Despite the decrease in chromosome aberration frequency effected by the water of the Prypiat River near Chornobyl city, the Brahinka River and bottom deposits of the right bank of Prypiat canal, the increased level of aneugenic cells and the induction of multiple chromosome rearrangements confirm the persistence of mutagenic activity in the abovementioned contaminated water entities.

Keywords: *Triticum estivum* L.; chromosome aberrations; mitosis disorders; mutagenic activity; genetic consequences

Цитогенетична активність радіонуклідних забруднень водойм зони відчуження Чорнобильської АЕС

Р. А. Якимчук

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна

Зона відчуження Чорнобильської АЕС через 30 років після аварії продовжує залишатись відкритим джерелом поширення радіонуклідів, що надходять із поверхневими та ґрунтовими водами в річкові системи та виносяться за її межі. Вивчення мутагенної активності радіонуклідних забруднень водойм ближньої зони ЧАЕС дасть змогу встановити потенційну мутагенну небезпеку водних об'єктів і спрогнозувати генетичні наслідки їх впливу у віддалені строки після аварії. Мета досліджень – вивчити частоту та спектр хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми *Triticum aestivum* L. за пролонгованої дії радіонуклідних забруднень води та донних відкладів водойм ближньої зони відчуження Чорнобильської АЕС. Насіння озимої пшениці сортів Альбатрос одеський і Зимоярка пророщували в умовах впливу радіонуклідних забруднень води р. Прип'ять, р. Брагинка, водойми-охолодника ЧАЕС, Семиходського затону, відвідного каналу 3 ЧАЕС, оз. Глибоке, оз. Азбучин (сумарна питома активність ^{137}Cs і ^{90}Sr – 0,17–52,99 кБк/м³), донних відкладів лівого та правого

берегів Прип'ятського каналу, водойми-охолодника ЧАЕС, відвідних каналів 1–3 ЧАЕС (сумарна питома активність ^{137}Cs і ^{90}Sr – 16,0–45,0 кБк/кг). У клітинах кореневої меристеми проростків за допомогою ана-телозафазного методу визначали частоту та спектр цитогенетичних порушень. За радіаційного впливу води та донних відкладів водойм зони відчуження ЧАЕС виявлено зростання частоти хромосомних аберацій і порушень мітозу в 1,6–4,2 рази. Найвищі рівні цитогенетичної активності виявили радіонуклідні забруднення води водойми-охолодника ЧАЕС, Семиходського затону та донних відкладів відвідного каналу 2. Залежності між частотою хромосомних аберацій та величиною питомої активності радіонуклідів водойм не виявлено, що можна пояснити індукуванням цитогенетичних порушень унаслідок опромінення в діапазоні низьких доз. Спектр їх типів переважно представлений ацентричними фрагментами, мостами та відстаючими хромосомами. Індукування клітин із відстаючими хромосомами, що виявляють найвищі рівні (0,24–0,38%) за дії радіонуклідних забруднень води оз. Глибоке, р. Брагінка, р. Прип'ять, водойми-охолодника ЧАЕС і донних відкладів відвідного каналу 3 дозволяє припустити наявність у водоймах зони відчуження ЧАЕС анеугенних чинників. Водні об'єкти зони відчуження ЧАЕС, рівень радіонуклідних забруднень яких характеризується високою цитогенетичною активністю, індукують із високою частотою клітини з комплексними хромосомними перебудовами. Незважаючи на зниження частоти хромосомних аберацій за впливу води р. Прип'ять поблизу м. Чонобилів, р. Брагінка та донних відкладів правого берега Прип'ятського каналу, підвищений рівень анеугенних клітин та індукування множинних хромосомних перебудов свідчить про збереження мутагенної активності забруднень зазначених водних об'єктів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L.; хромосомні аберації; порушення мітозу; мутагенна активність; генетичні наслідки

Вступ

Через 30 років після Чорнобильської катастрофи зона відчуження продовжує залишатись відкритим джерелом поширення радіонуклідів, що надходять із поверхневими та ґрунтовими водами в річкові системи та виносяться за її межі (Beresford et al., 2016; Evangeliou et al., 2016; Konoplev et al., 2016). Водойми басейнів Дніпра та Прип'яті – одні з найбільших водних систем у Європі – зосередили близько 2,3 пБк ^{90}Sr і 19,6 пБк ^{137}Cs (Romanenko et al., 2014; Evangeliou et al., 2015). Більшість радіонуклідів, що потрапили до водойм, досить швидко акумулювалась донними відкладами. Зважаючи на те, що переважно у верхньому шарі донних відкладів депоновано ^{90}Sr – 89–95%, ^{137}Cs – 99%, ^{238}Pu , $^{239+240}\text{Pu}$, ^{241}Am – майже 100% загальної кількості радіонуклідів екосистеми (Gudkov et al., 2010; Ashraf et al., 2014; Bondar et al., 2015), питому радіоактивність водойм і водотоків нині визначає інтенсивність їх обміну з водними масами (Bondarkov et al., 2011; Gudkov et al., 2016a, 2016b). Серед найнебезпечніших наслідків радіонуклідного забруднення навколишнього середовища, викликаних аварією на Чорнобильській АЕС, стали генетичні зміни організмів, які виявляються різними формами патогенезу, затриманням розвитку, росту, зниженням інтелекту, скороченням тривалості життя та загибеллю особин (Garnier-Laplace et al., 2015; Busby, 2017; Nakamura, 2018). Тому проведення досліджень мутагенної активності радіонуклідних забруднень води та донних відкладів водойм зони відчуження ЧАЕС дасть змогу встановити потенційну мутагенну небезпеку водних об'єктів, спрогнозувати масштабність генетичних наслідків неконтрольованого зниження рівня води у водоймах зони відчуження ЧАЕС, спричиненого природними кліматичними змінами та передбаченими інженерними контрзаходами з дезактивації (Talerko et al., 2013).

Із часу аварії донині серед широкого кола науковців тривають дискусії навколо питання мутагенної активності низьких доз пролонгованого та хронічного опромінення та генетичних наслідків їх впливу в комплексі з хімічними антропогенними чинниками навколишнього середовища. У його вирішення значний внесок здійснили численні дослідження, проведені у природних умовах суходолу радіонуклідно забрудненої зони відчуження ЧАЕС, або ж у лабораторних умовах із використанням відібраних ґрунтових проб (Medvedeva et al., 2014; Mousseau & Möller, 2014; Boubriak et al., 2016; Itoh et al., 2018). Проте вивченню генетичних наслідків радіонуклідних забруднень поверхневих вод, радіоекологічна ситуація в яких визначається кількістю осілих на водну поверхню радіоактивних речовин і складним комплексом тривалих взаємодій дотичних природних середовищ (Gudkov et al., 2010; Pohrebenyuk et al., 2016), приділяється неналежна увага. У результаті низки гідробіологічних досліджень зони відчуження ЧАЕС (Sazykina & Kryshev, 2003; Bondarkov et al., 2011; Gudkov et al., 2011; Fuller et al., 2015; Beresford et al., 2016; Gudkov et al., 2016; Shuryak, 2017) виявлено високий рівень аберацій хромосом в ембріональних тканинах риб, молосків і кореневих меристемах вищих водних рослин, нехарактерне патологічне ґалування пагонів очерету, аномальні новоутворення в місцях сущів, флуктуючу асиметрію стулок черепашки молосків, аномалії в системі репродукції та ор-

ганів риб, канцерогенез тварин, зниження стійкості до шкідників і хвороб, підвищення смертності. Переважно мутації в гідробіонтів індуковані хронічною дією інкорпорованих α - та β -випромінюючих радіонуклідів, які, локалізуючись у клітинному ядрі та в комплексах ДНК-білок, зумовлюють високу відносну біологічну ефективність внутрішнього опромінення. Роль частки зовнішнього γ -опромінення у формуванні сумарної мутагенності водойм у віддалені строки після аварії на ЧАЕС залишається не достатньо дослідженою.

Найбільш інформативні та чутливі маркери мутагенного забруднення (зокрема, хронічного радіаційного впливу в низьких дозах) – цитогенетичні показники, а саме хромосомні аберації в клітинах рослин (Al-Dulaimi et al., 2017; Qureshi et al., 2017). Розрахунки, виконані на основі вивчення наслідків опромінення, показали, що ймовірність виявлення аберацій хромосом у 10^3 – 10^4 разів вища, ніж ймовірність виявлення мутації окремого локусу, а оцінка мутаційного процесу за допомогою цитогенетичного аналізу дає результати, зіставні з результатами, отриманими методом електрофоретичного аналізу ізоферментів (Ramzaev et al., 2008). У зв'язку зі значним радіонуклідним забрудненням земель після аварії на Чорнобильській АЕС особливої актуальності набуло вивчення впливу іонізуючого випромінювання на сільськогосподарські культури, зокрема, на озиму пшеницю (Kosakovskaja & Gudkova, 2005), що зумовило її широке використання як рослинного тест-об'єкта. Мета цієї статті – оцінити частоту та спектр хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми *Triticum aestivum* L. за пролонгованої дії радіонуклідних забруднень води та донних відкладів водойм ближньої зони відчуження Чорнобильської АЕС.

Матеріал і методи досліджень

Насіння двох сортів пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.) Альбатрос одеський і Зимоярка витримували впродовж 18 годин у пробах води р. Прип'ять (м. Чорнобиль), р. Брагінка (дамба 39), водойми-охолодника ЧАЕС (берегова насосна станція (БНС)), Семиходського затону, відвідного каналу 3 ЧАЕС, оз. Глибоке та оз. Азбучин (рис. 1), сумарна питома активність ^{137}Cs і ^{90}Sr в яких становила, відповідно, 0,17, 2,53, 2,11, 7,76, 91,99, 70,08 та 52,99 кБк/м³. Подальше пророщування насіння проводили за температури 24–26 °С у чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері. Для визначення цитогенетичної активності радіонуклідних забруднень донних відкладів водойм насіння пророщували протягом 40 годин у піщаних субстратах, відібраних на лівому та правому берегах Прип'ятського каналу (МК-6 поблизу мосту), у водоймі-охолоджувачі ЧАЕС (БНС), відвідних каналах 1–3 ЧАЕС, сумарна питома активність ^{137}Cs і ^{90}Sr в яких становила, відповідно, 23,2, 16,0, 26,7, 42,0, 45,0 та 17,0 кБк/кг. За контроль взято проби води та донних відкладів з умовно чистого оз. Голосіївське м. Київ, питома активність ^{137}Cs і ^{90}Sr в якому становила 0,021 кБк/м³. Проби води та донних відкладів відбирали в 2015 році за стандартними методиками (Parshad & Sanford, 2001). Вимірювання питомої активності ^{137}Cs і ^{90}Sr проведено ДСП «Чорнобильський спецкомбінат» за допомогою γ -спектрометричного комплексу та низькофонового β -радіометра.

Корінці проростків довжиною 0,8–1,0 см протягом 4 годин фіксували у фіксаторі Кларка, що складається з 96% розчину ети-

лового спирту та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3 : 1. Хімічну мацерацію корінців проводили в 1 н розчині соляної кислоти протягом 1 хв. Після закінчення мацерації з метою подальшого проведення аналізу хромосомних аберацій і порушень мітозу клітин корінці поміщали у розчин ацетоорсеїну на 24 години за температури 25 °С.

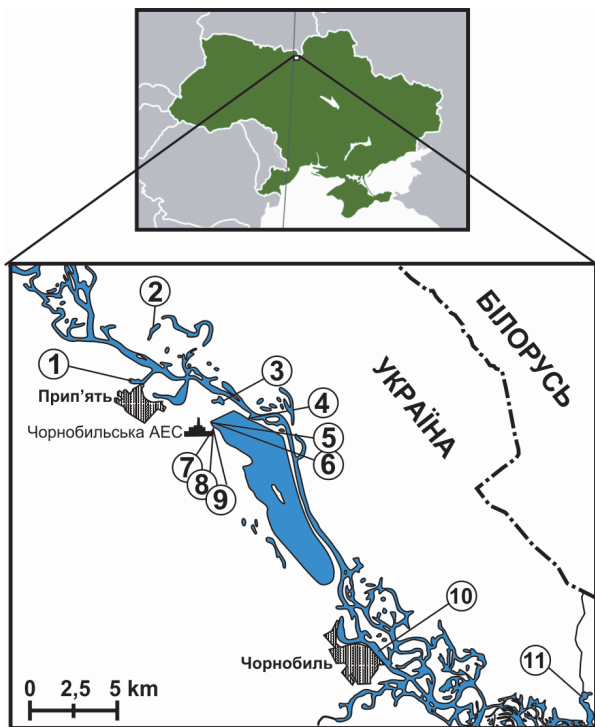


Рис. 1. Місця відбирання проб води та донних відкладів у зоні відчуження Чорнобильської АЕС: 1 – Семиходський затон, 2 – оз. Глибоке, 3 – оз. Азбучин, 4 – водойма-охолодник ЧАЕС (БНС), 5, 6 – лівий і правий берег Прип'ятського каналу (МК-6 біля мосту), 7, 8, 9 – відвідні канали 1–3 ЧАЕС, 10 – р. Прип'ять (м. Чорнобиль), 11 – р. Брагінка (дамба 39)

Для мікроскопічного аналізу готували тимчасові давлені цитологічні препарати за загальноприйнятими методиками (Pausheva, 1988). Мікроскопічне вивчення меристематичної зони корінців проводили із застосуванням мікроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Jena) за збільшення $\times 900$. Під час визначення частоти хромосомних аберацій і порушень мітозу до уваги брали клітини, які перебували в анафазі та ранній телофазі. Вибірка для кожного варіанта становила не менше як 1 000 клітин, які аналізували в 20 і більше первинних корінцях. Ураховували частоту абераційних клітин як відсоток клітин в анафазі та ранній телофазі, що містили порушення хромосом. Для обчислення середньої кількості аберацій на абераційну клітину враховували клітини з 0, 1, 2 та множинними хромосомними абераціями (>2 аберацій). Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали загальноприйнятими методами, достовірність різниці оцінювали за критерієм Стюдента після перевірки нормальності розподілу вибірки. У таблицях наведено відсоткові частки хромосомних аберацій та середні похибки вибірко-вих середніх арифметичних.

Результати

У меристематичних клітинах первинних корінців проростків пшениці, які зазнали радіаційного впливу водойм і водотоків зони відчуження ЧАЕС, виявлено зростання частоти хромосомних аберацій і порушень мітозу в 1,6–4,2 раза. Найвищий рівень цитогенетичної активності характерний для зразків води, відібраних із водойми-охолодника ЧАЕС та Семиходського затону. Частота хромосомних аберацій у 2,8–4,2 раза перевищувала показники контрольного рівня та складала 1,77% і 1,90% в меристематичних

клітинах корінців сорту Альбатрос одеський і 2,21% і 2,28% у сорту Зимоярка (табл. 1). Вплив забруднень із найвищою питомою активністю ^{137}Cs і ^{90}Sr у воді відвідного каналу 3, оз. Глибоке та оз. Азбучин на кореневу меристему проростків насіння пшениці не спричинив стрімкого зростання частоти абераційних клітин. За впливу радіонуклідних забруднень води відвідного каналу 3 та оз. Глибоке частота клітин із хромосомними абераціями сорту Зимоярка становила 1,96% та 1,53%, що істотно перевищує спонтанний рівень відповідно у 2,8 та 3,6 раза. Статистично вірогідного зростання частоти клітин із хромосомними абераціями в сорту Альбатрос одеський за впливу радіонуклідних забруднень зазначених водойм не виявлено, проте їх рівень в 1,9 та 2,0 раза перевищував показники контролю. Зростання в 1,6 та 2,2 раза частоти абераційних клітин у сортів Альбатрос одеський та Зимоярка за відсутності статистично достовірної різниці зі спонтанними показниками також виявлено за впливу радіонуклідних забруднень води оз. Азбучин.

Рівень цитогенетичних порушень за впливу радіонуклідів у воді р. Прип'ять (м. Чорнобиль) становив для меристематичних клітин сорту Альбатрос одеський 1,06%, для сорту Зимоярка – 1,18%, перевищуючи показники спонтанних хромосомних порушень відповідно в 1,7 та 2,2 раза. Зростання частоти абераційних клітин в 1,9 та 2,1 раза (1,22% у сорту Альбатрос одеський та 1,14% у сорту Зимоярка) виявлено також у меристемі первинних корінців, які зазнали впливу радіонуклідних забруднень води р. Брагінка. Відсутність статистично достовірної різниці між частотою абераційних клітин кореневої меристеми пшениці, яка зазнала пролонгованої дії іонізуючих випромінювань радіонуклідних забруднень водойм зони відчуження ЧАЕС (оз. Азбучин, р. Прип'ять і р. Брагінка), та контролем, вказує на наближення показників цитогенетичної активності окремих водотоків і водойм зони відчуження ЧАЕС до спонтанного рівня. Однак перевищення частоти хромосомних аберацій удвічі порівняно з рівнем спонтанних цитогенетичних порушень свідчить про наслідки ефекту подвоювальної дози опромінення меристематичних клітин і мутагенну небезпеку існуючих низьких потужностей радіонуклідних забруднень зазначених водних об'єктів ближньої зони відчуження ЧАЕС.

За впливу радіонуклідних забруднень донних відкладів водойм частота хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми пшениці перевищувала спонтанні показники в 1,6–3,3 раза (табл. 2). Найвищу цитогенетичну активність іонізуючого випромінювання виявлено за пророщування насіння в субстраті донних відкладів відвідного каналу 2 ЧАЕС. Частота абераційних клітин становила 2,50% у сорту Альбатрос одеський і 2,94% у сорту Зимоярка, що істотно перевищувало показники контролю відповідно у 3,3 і 3,1 раза. Зростання рівня хромосомних аберацій у 2,1–2,4 раза, що статистично вірогідно перевищувало спонтанні показники, виявлено за впливу радіонуклідних забруднень донних відкладів лівого берега Прип'ятського каналу та водойми-охолоджувача ЧАЕС. Унаслідок радіаційного ураження меристематичних клітин первинних корінців пшениці сорту Зимоярка, насіння якої пророщували на субстратах донних відкладів відвідних каналів 1 і 3, частота абераційних клітин перевищувала показники контролю в 2,2–2,3 раза, на відміну від сорту Альбатрос одеський, де зростання рівня клітин із хромосомними абераціями в 1,6–1,9 раза перебувало за межами статистичної достовірності.

Вивчивши радіоекологічні проблеми водних екосистем зони відчуження ЧАЕС, деякі дослідники дійшли висновку, що найнижчою питомою активністю радіонуклідів характеризуються компоненти річкових екосистем, донні відклади яких зазнали природного самоочищення та за роки, що минули з часу аварії, перестали відігравати істотну роль вторинного джерела забруднення водойм (Gudkov et al., 2010). У результаті аналізу цитогенетичних порушень у клітинах різних за генотипами зразків пшениці, індукованих радіонуклідами донних відкладів правого берега Прип'ятського каналу, не встановлено статистично вірогідного зростання частоти хромосомних аберацій, однак її рівень перевищував контрольні показники удвічі. Це можна розглядати як наслідок ефекту подвоювальної дози опромінення, що свідчить про можливу генетичну небезпеку радіаційних забруднень.

Таблиця 1

Частота хромосомних аберацій в озимій пшениці за дії радіонуклідного забруднення водойм зони відчуження ЧАЕС

Місце відбору зразків	Вивчено ана-телофаз мітозів, шт.	Мітози з порушеннями та хромосомними абераціями шт. %	Вивчено ана-телофаз мітозів, шт.	Мітози з порушеннями та хромосомними абераціями шт. %
	Альбатрос одеський			Зимоярка
оз. Голосіївське (контроль)	1 277	8 0,63 ± 0,22	1 088	6 0,55 ± 0,22
р. Прип'ять, м. Чорнобиль	1 230	13 1,06 ± 0,29	1 103	13 1,18 ± 0,33
р. Брагінка	1 067	13 1,22 ± 0,34	1 317	15 1,14 ± 0,29
Водойма-охолодник ЧАЕС	1 693	30 1,77 ± 0,32*	1 358	30 2,21 ± 0,40*
Семиходський затон	1 473	28 1,90 ± 0,36*	1 187	27 2,28 ± 0,43*
Відвідний канал 3 ЧАЕС	1 490	19 1,28 ± 0,29	1 173	23 1,96 ± 0,41*
оз. Глибоке	1 424	17 1,19 ± 0,29	1 049	16 1,53 ± 0,38*
оз. Азбучин	1 599	16 1,00 ± 0,25	1 070	13 1,22 ± 0,34

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

Таблиця 2

Частота хромосомних аберацій в озимій пшениці за дії радіонуклідного забруднення донних відкладів водойм зони відчуження ЧАЕС

Місце відбору зразків	Вивчено ана-телофаз мітозів, шт.	Мітози з порушеннями та хромосомними абераціями шт. %	Вивчено ана-телофаз мітозів, шт.	Мітози з порушеннями та хромосомними абераціями шт. %
	Альбатрос одеський			Зимоярка
оз. Голосіївське (контроль)	1 073	8 0,75 ± 0,26	1 053	13 0,95 ± 0,30
Відвідний канал 1 ЧАЕС	1 187	17 1,43 ± 0,35	1 112	23 2,07 ± 0,43*
Відвідний канал 2 ЧАЕС	1 242	31 2,50 ± 0,28*	1 327	39 2,94 ± 0,46*
Відвідний канал 3 ЧАЕС	1 063	13 1,22 ± 0,33	1 235	27 2,19 ± 0,42*
Прип'ятський канал (правий берег)	1 453	22 1,51 ± 0,32	1 051	20 1,90 ± 0,42
Прип'ятський канал (лівий берег)	1 461	26 1,78 ± 0,35*	1 458	32 2,20 ± 0,38*
Водойма-охолодник ЧАЕС	1 683	26 1,54 ± 0,30*	1 448	33 2,28 ± 0,39*

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

Контроль співвідношення хромосомних порушень різного типу важливий під час проведення радіоекологічних досліджень. Адже за відносно низького стресового впливу спочатку відбувається зміна спектра порушень мітозу, а лише потім – зростання кількості патологій (Artjuhov & Kalaev, 2005). Спектр типів хромосомних аберацій і порушень мітозу за радіонуклідного забруднення води та донних відкладів водойм зони відчуження ЧАЕС переважно представлений ацентричними фрагментами, мостами та відстаючими хромосомами (рис. 2а–г). Рівень ацентричних фрагментів і мостів у меристематичних клітинах сорту Альбатрос одеський, викликаний радіонуклідним забрудненням водойм зони відчуження ЧАЕС, перевищував рівень контролю відповідно у 1,4–

4,4 та 1,2–2,5 раза (табл. 3). Найбільшу кількість ацентричних фрагментів, що перевищувала в 2,9 та 4,4 раза їх спонтанне індукування, виявлено за впливу радіаційних забруднень водойми-охолодника ЧАЕС і Семиходського затону (рис. 3). Кількість ацентричних фрагментів і мостів у меристематичних клітинах сорту Зимоярка, індукованих випромінюванням радіонуклідних забруднень водойм зони відчуження ЧАЕС, зростала відповідно в 1,4–2,1 та 1,7–16,9 раза. За рівнем індукування мостів (зокрема, її подвійних) у клітинах сорту Зимоярка встановлено, що найвищою мутагенною активністю характеризується радіаційне забруднення водойми-охолоджувача ЧАЕС, відвідного каналу 3 ЧАЕС, оз. Азбучин, Семиходського затону.

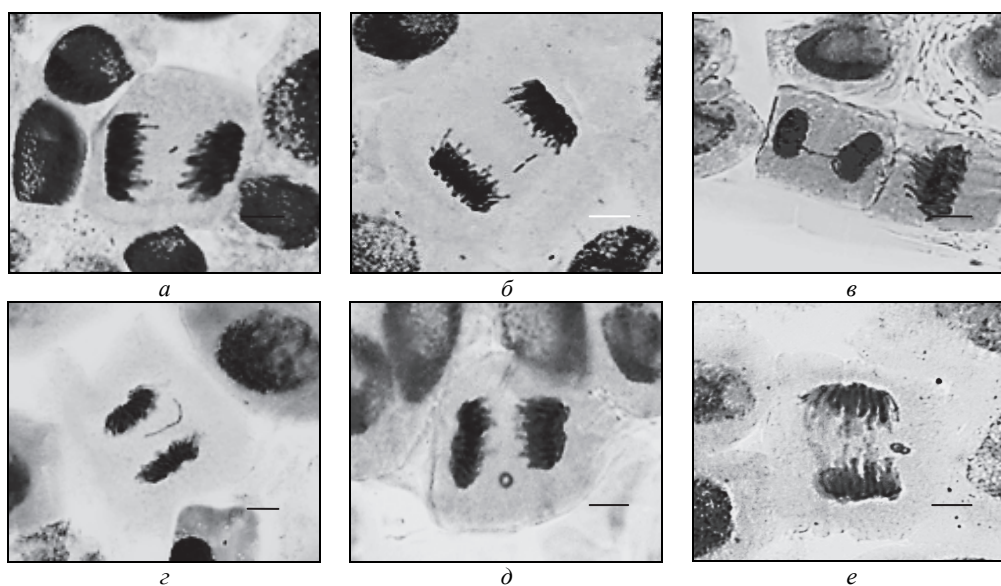


Рис. 2. Типи хромосомних аберацій і порушень мітозу, індуковані радіонуклідним забрудненням водойм зони відчуження ЧАЕС: а – одиничний ацентричний фрагмент, б – парні ацентричні фрагменти, в – міст, г – відстаюча хромосома, д – хромосомне кільце, е – парні хромосомні кільця; бар – 5 мкм

Таблиця 3

Спектр типів хромосомних аберацій в озимій пшениці за дії радіонуклідного забруднення водойм зони відчуження ЧАЕС

Місце відбору зразків	Частота типів порушень мітозу та хромосомних аберацій, %						Кількість аберацій на аберантну клітину
	фрагменти	мости	фрагменти та мости	мікроядра	відстаючі хромосоми	хромосомні кільця	
Альбатрос одеський							
оз. Голосіївське (контроль)	0,31 ± 0,15	0,24 ± 0,14	0	0	0,08 ± 0,08	0	1,00
р. Прип'ять, м. Чорнобиль	0,57 ± 0,21	0,24 ± 0,14	0	0	0,24 ± 0,14	0	1,23
р. Брагінка	0,66 ± 0,25	0,28 ± 0,16	0,09 ± 0,09	0	0,19 ± 0,13	0	1,15
Водойма-охолодник ЧАЕС	0,89 ± 0,23	0,53 ± 0,18	0	0,06 ± 0,06	0,24 ± 0,12	0,06 ± 0,06	1,20*
Семиходський затон	1,36 ± 0,30*	0,27 ± 0,13	0,07 ± 0,07	0,07 ± 0,07	0,14 ± 0,10	0	1,32*
Відвідний канал 3 ЧАЕС	0,54 ± 0,19	0,60 ± 0,20	0,07 ± 0,07	0,07 ± 0,07	0	0	1,21*
оз. Глибоке	0,42 ± 0,17	0,28 ± 0,14	0	0,14 ± 0,10	0,35 ± 0,15	0	1,12
оз. Азбучин	0,50 ± 0,17	0,31 ± 0,14	0	0	0,19 ± 0,11	0	1,19
Зимоярка							
оз. Голосіївське (контроль)	0,46 ± 0,20	0,09 ± 0,09	0	0	0	0	1,17
р. Прип'ять, м. Чорнобиль	0,64 ± 0,24	0,54 ± 0,22	0	0	0,09 ± 0,09	0	1,31
р. Брагінка	0,68 ± 0,22	0,15 ± 0,10	0	0	0,30 ± 0,15*	0	1,13
Водойма-охолодник ЧАЕС	0,96 ± 0,26	1,03 ± 0,27*	0	0,07 ± 0,07	0,15 ± 0,10	0	1,13
Семиходський затон	0,76 ± 0,25	1,52 ± 0,35*	0	0	0	0	1,11
Відвідний канал 3 ЧАЕС	0,85 ± 0,27	0,68 ± 0,24*	0,09 ± 0,09	0	0,26 ± 0,15	0,09 ± 0,09	1,09
оз. Глибоке	0,95 ± 0,30	0,19 ± 0,13	0	0	0,38 ± 0,18*	0	1,31
оз. Азбучин	0,47 ± 0,21	0,65 ± 0,24*	0	0	0,09 ± 0,09	0	1,15

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

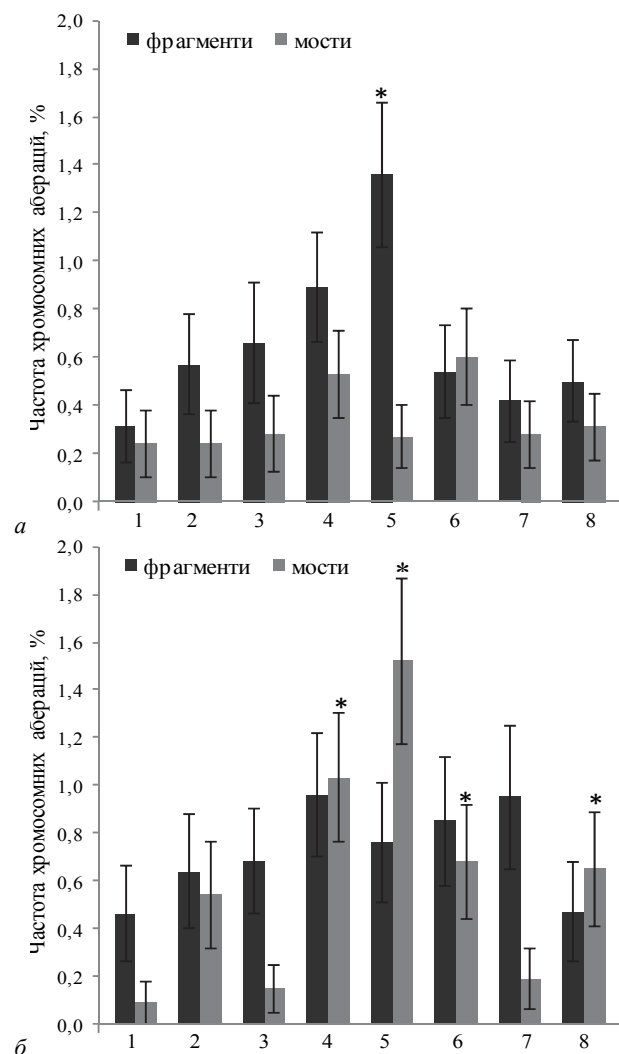


Рис. 3. Індукування в озимій пшениці сортів Альбатрос одеський (а) та Зимоярка (б) ацентричних фрагментів і мостів радіонуклідними забрудненнями водойм зони відчуження ЧАЕС: 1 – оз. Голосіївське (контроль), 2 – р. Прип'ять, 3 – р. Брагінка, 4 – водойма-охолодник ЧАЕС, 5 – Семиходський затон, 6 – відвідний канал 3 ЧАЕС, 7 – оз. Глибоке, 8 – оз. Азбучин; * – P < 0,05 порівняно з контролем, n = 1 000, x ± SE

Радіонуклідне забруднення донних відкладів відвідних каналів 1, 2 та лівого берега Прип'ятського каналу спричинило зростання частоти клітин з ацентричними фрагментами в 2,5–3,9 раза, що становила 0,93% і 1,45% у сорту Альбатрос одеський та 0,75% у сорту Зимоярка, за контрольних показників 0,37% і 0,19% (табл. 4). Істотне зростання частки мостів хромосомного та хроматидного типів відносно загального рівня цитогенетичних порушень виявлено за впливу на клітини кореневої меристеми радіонуклідних забруднень донних відкладів відвідного каналу 3 ЧАЕС і лівого берега Прип'ятського каналу у сорту Альбатрос одеський та відвідного каналу 2, правого берега Прип'ятського каналу та водойми-охолодника ЧАЕС у сорту Зимоярка (рис. 4). Їх рівень перевищував спонтанні показники у 2,2–3,1 раза і становив відповідно 0,94 і 1,16, 1,88 і 1,66% за їх показників у контролі 0,37 і 0,76%.

Спектр типів хромосомних аберацій у кореневій меристемі пшениці за дії радіонуклідних забруднень води та донних відкладів водойми-охолодника ЧАЕС, відвідних каналів 1–3 ЧАЕС розширювався за рахунок індукування хромосомних кілець (рис. 1d, e). Індукування в меристематичних клітинах проростків сорту Зимоярка парних хромосомних кілець радіонуклідними забрудненнями донних відкладів відвідного каналу 3 ЧАЕС вказує на розрив хромосоми у той момент, коли вона представлена функціонально одиничною ниткою – G0- чи G1-періоди інтерфази (Durante et al., 1998; Marković et al., 2017).

У спектрі цитогенетичних порушень, викликаних радіаційним забрудненням водойми-охолодника ЧАЕС, відвідного каналу 3 ЧАЕС і Семиходського затону, виявляються поодинокі мікроядра, які формуються переважно з ацентричних фрагментів та чутливі до мутагенності навколишнього середовища (Osman, 2014).

Зважаючи на те, що дія іонізуючого випромінювання для природних екосистем практично ніколи не проявляється в «чистому» вигляді, орієнтація тестів із визначення цитогенетичної активності генотоксичних забруднювачів лише на облік структурних хромосомних аберацій чи пошкоджень ДНК істотно звужує уявлення про мутагенні властивості досліджуваних чинників, багато з яких здатні викликати геномні мутації без прояву вираженого кластогенного ефекту (Duesberg et al., 2000). Особливу цікавість у генетичній токсикології викликає облік нерозходження хромосом, оскільки в основі цієї події лежать первинні пошкодження не ДНК, а білків веретена поділу клітини. Найвищу частку анеуплоїдних клітин – 0,35% у сорту Альбатрос одеський виявлено за впливу радіонуклідних забруднень води оз. Глибоке та 0,38% і 0,30% у сорту Зимоярка – за впливу забруднень оз. Глибоке та р. Брагінка, відповідно. Значну частку цитогенетичних порушень (0,24%) становлять відстаючі хромосоми в меристематичних клітинах сорту Альбатрос одеський, які зазнали впливу мутагенів води р. При-

п'ять і водойми-охолодника ЧАЕС. Забруднювальні чинники донних відкладів водойм Чорнобильської зони індукують порушення мітогичного апарату з невисокою частотою 0,08–0,24%, що дає під-

ставу припустити наявність незначного вмісту анеугенів – речовин, що впливають на апарат поділу клітини, та підвищеного вмісту кластогенів – чинників, які безпосередньо діють на хромосоми.

Таблиця 4

Спектр типів хромосомних аберацій в озимій пшениці за дії радіонуклідного забруднення донних відкладів водойм зони відчуження ЧАЕС

Місце відбору зразків	Частота типів порушень мітозу та хромосомних аберацій, %					Кількість аберацій на аберантну клітину
	фрагменти	мости	фрагменти і мости	відстаючі хромосоми	хромосомні кільця	
Альбатрос одеський						
оз. Голосіївське (контроль)	0,37 ± 0,18	0,37 ± 0,18	0	0	0	1,00
Відвідний канал 1 ЧАЕС	0,93 ± 0,28	0,42 ± 0,19	0	0	0,08 ± 0,08	1,35*
Відвідний канал 2 ЧАЕС	1,45 ± 0,34*	0,89 ± 0,26	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08	0	1,39*
Відвідний канал 3 ЧАЕС	0,28 ± 0,16	0,94 ± 0,29	0	0	0	1,08
Прип'ятський канал (правий берег)	0,69 ± 0,22	0,55 ± 0,19	0,07 ± 0,07	0,20 ± 0,12	0	1,36*
Прип'ятський канал (лівий берег)	0,48 ± 0,18	1,16 ± 0,28*	0	0,14 ± 0,10	0	1,19*
Водойма-охолодник ЧАЕС	0,71 ± 0,20	0,65 ± 0,19	0,06 ± 0,06	0,12 ± 0,08	0	1,12
Зимоярка						
оз. Голосіївське (контроль)	0,19 ± 0,13	0,76 ± 0,27	0	0	0	1,00
Відвідний канал 1 ЧАЕС	0,45 ± 0,20	1,53 ± 0,37	0,09 ± 0,09	0	0	1,26*
Відвідний канал 2 ЧАЕС	0,68 ± 0,22	1,88 ± 0,37*	0	0,15 ± 0,11	0,15 ± 0,11	1,28*
Відвідний канал 3 ЧАЕС	0,49 ± 0,20	1,38 ± 0,33	0	0,24 ± 0,14	0,24 ± 0,14	1,19*
Прип'ятський канал (правий берег)	0,28 ± 0,16	1,62 ± 0,39	0	0	0	1,20*
Прип'ятський канал (лівий берег)	0,75 ± 0,22*	1,24 ± 0,29	0,07 ± 0,07	0,14 ± 0,10	0,14 ± 0,1	1,25*
Водойма-охолодник ЧАЕС	0,48 ± 0,18	1,66 ± 0,33*	0	0,07 ± 0,07	0,07 ± 0,07	1,12*

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

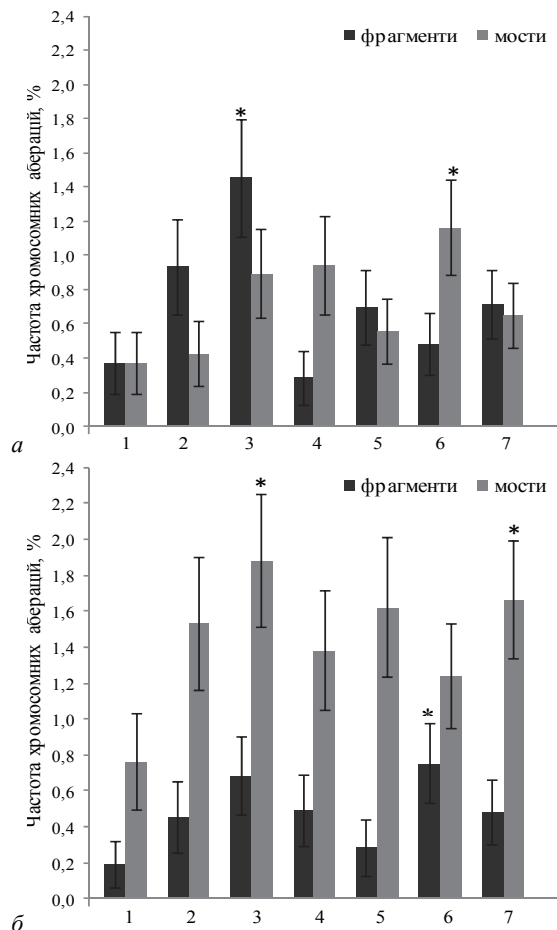


Рис. 4. Індукування в озимій пшениці сортів Альбатрос одеський (а) та Зимоярка (б) ацентричних фрагментів і мостів радіонуклідними забрудненнями донних відкладів водойм зони відчуження ЧАЕС: 1 – оз. Голосіївське (контроль), 2 – відвідний канал 1 ЧАЕС, 3 – відвідний канал 2 ЧАЕС, 4 – відвідний канал 3 ЧАЕС, 5 – Прип'ятський канал (правий берег), 6 – Прип'ятський канал (лівий берег), 7 – водойма-охолодник ЧАЕС; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем; $n = 1\ 000$, $\bar{x} \pm SE$

Тяжкість генетичних порушень, спричинених радіаційним опроміненням, відображають клітини з множинними абераціями. Показник кількості аберацій на абераційну клітину не перебуває у прямій залежності від частоти абераційних клітин і являє собою якісно відмінну кількісну характеристику цитогенетичної активності радіаційного забруднення середовища (Tawn et al., 2017). Установлено, що кількість аберацій на абераційну клітину для сорту Альбатрос одеський найвищий за впливу забруднень води Семихоського затоки (1,32), р. Прип'ять (1,23), водойми-охолоджувача ЧАЕС (1,20) та відвідного каналу 3 ЧАЕС (1,21), а для сорту Зимоярка – за впливу забруднень води р. Прип'ять та оз. Глибоке (1,31). Незважаючи на невисоку частоту клітин із хромосомними абераціями, питома активність радіонуклідів у воді р. Прип'ять індукує в меристемі проростків пшениці зростання частки клітин із множинними абераціями. В меристемі проростків за дії радіонуклідних забруднень донних відкладів відвідних каналів 1 і 2 ЧАЕС та лівого та правого берегів Прип'ятського каналу показник кількості аберацій на абераційну клітину становить 1,08–1,39 у сорту Альбатрос одеський та 1,12–1,26 – у сорту Зимоярка. Радіонуклідне забруднення донних відкладів правого берега Прип'ятського каналу, яке індукує низьку частоту клітин із хромосомними абераціями, викликає в меристемі проростків пшениці істотне зростання частки клітин із множинними абераціями. Отже, природні водні об'єкти зони відчуження ЧАЕС, рівень радіонуклідних забруднень яких характеризується високою цитогенетичною активністю, індукують із високою частотою клітини з комплексними хромосомними перебудовами, що вважається специфічним проявом біологічного впливу іонізуючого випромінювання.

Обговорення

За останні роки у ґрунтах Чорнобильської зони відчуження встановлено тенденцію до збільшення виходу мобільних біологічно доступних форм радіонуклідів, які з поверхневими та ґрунтовими водами потрапляють у гідрологічну мережу, де швидко включаються у біотичний кругообіг (Gudkov et al., 2010; Gudkov et al., 2016). Донні не втрачає своєї актуальності оцінювання мутагенної активності головного джерела надходження радіонуклідів до каскаду дніпровських водойм – р. Прип'ять із численними озерами та старицями її заплави, які у післяваріантний період зазнали найінтенсивнішого радіонуклідного забруднення (Gudkov et al., 2010; Bird & Little, 2013; Suga et al., 2014; Fuller et al., 2018). Збіль-

шення кількості аберацій хромосом у клітинах меристематичних тканин – неспецифічна реакція клітин живих організмів на вплив мутагенів навколишнього середовища, яка виявляється за дії чинників різної природи, зокрема іонізуючої радіації (Pojoga et al., 2013; Tawn et al., 2015; Nurmansyah et al., 2018). На відміну від природного радіаційного фону, додаткове опромінення від штучних радіонуклідів у замкнених і проточних водоймах зони відчуження, що характеризується значною неоднорідністю розподілу у просторі та часі, спричиняють непрогнозоване багаторазове зростання частоти хромосомних аберацій у рослин мікроядер у клітинах крові гідробіонтів тваринного походження, появу флуктуаційної асиметрії моллюсків, потворностей і канцерогенезу риб (Gudkov et al., 2011; Rudenko et al., 2013; Gudkov et al., 2016a, 2016b).

Радіонуклідне забруднення водойм ближньої зони відчуження ЧАЕС через 30 років після аварії продовжує зберігати високу цитогенетичну активність та індукуює в клітинах кореневої меристеми озимої пшениці істотне зростання цитогенетичних порушень. Рівень тваринного походження, появу флуктуаційної асиметрії моллюсків, потворностей і канцерогенезу риб (Gudkov et al., 2011; Rudenko et al., 2013; Gudkov et al., 2016a, 2016b).

Радіонуклідне забруднення водойм ближньої зони відчуження ЧАЕС через 30 років після аварії продовжує зберігати високу цитогенетичну активність та індукуює в клітинах кореневої меристеми озимої пшениці істотне зростання цитогенетичних порушень. Рівень тваринного походження, появу флуктуаційної асиметрії моллюсків, потворностей і канцерогенезу риб (Gudkov et al., 2011; Rudenko et al., 2013; Gudkov et al., 2016a, 2016b).

В інших дослідженнях виявлено залежність частоти хромосомних порушень від величини питомої активності забруднення ^{137}Cs води та ґрунту у *Phragmites australis* L., *Lymnaea stagnalis* L., *Pinus sylvestris* L., *Oenothera biennis* L., які зазнавали хронічного впливу високих потужностей як зовнішнього, так і внутрішнього іонізуючого опромінення (Ramzaev et al., 2008; Geras'kin & Volkova, 2014; Gudkov et al., 2016). Відповідно реальне дозове навантаження на клітини меристеми може на порядок перевищувати оцінки доз, розрахованих із припущення рівномірного опромінення тканин рослин (Gudkov et al., 2011; Geras'kin & Volkova, 2014).

Біологічні маркери радіаційного ураження організмів – парні ацентричні фрагменти та дицентричні хромосоми, які виявились переважними типами хромосомних аберацій за обробки насіння пробами води та донних відкладів водойм ближньої зони ЧАЕС. Існує точка зору, що підвищений рівень ацентричних фрагментів – ознака пролонгованого опромінення низької потужності. Радіаційно-індуковані в G_2 -періоді розриви хроматид утворюються в момент конденсації хроматину та формування хроматинового волокна (Parshad & Sanford, 2001; Magin et al., 2015; Guogye et al., 2017). Мости з'являються як у результаті розриву та об'єднання розірваних кінців хромосом, так і внаслідок аглютинації (злипання хромосом) (Muratova et al., 2014; Albertson, 2015; Zolina et al., 2015; Pampalona et al., 2016). У працях інших дослідників також зазначається причетність районів із радіоактивним забрудненням до утворення подвійних і множинних дицентриків (Geras'kin et al., 2011; Firbas & Amon, 2014). Не менш важливі маркери радіаційного впливу – хромосомні кільця (Geras'kin et al., 2011; Hristova et al., 2013; Firbas & Amon, 2014; Medvedeva et al., 2014), які виявлено за дії радіонуклідних забруднень води та донних відкладів водойми-охолоджувача і відвідних каналів 1–3 ЧАЕС. Вважається, що їх утворення пов'язане з обміном ділянками двох плечей тієї самої хромосоми зі злиттям її проксимальних кінців (Medvedeva et al., 2014). Розрив хромосом і утворення мостів супроводжуються появою ацентричних фрагментів, які найчастіше заплізаються в мітозі. За радіаційного впливу формування мікроядер на 90% пов'язане з включенням таких фрагментів (Lisowska et al., 2014; Qian et al., 2016). Тому їх поява з частотою 0,07–0,14%

за впливу радіонуклідних забруднень водойми-охолоджувача ЧАЕС відвідного каналу 3 ЧАЕС, Семиходського затону і оз. Глибоке свідчить про радіаційне ураження меристематичних клітин.

Спектр цитогенетичних порушень розширювався також за рахунок індукування клітин із відстаючими хромосомами. Це може бути пов'язано з наявністю у водоймах хімічних ксенобіотиків і важких металів, які у великих кількостях використовували для дезактивації найзабрудненіших радіонуклідами територій зони відчуження ЧАЕС. Ефект їх впливу частіше проявляється через взаємодію з багатьма мішенями, що прямо чи опосередковано контролюють сегрегацію хромосом. Наслідок таких подій – нелінійна залежність частоти кількісних хромосомних порушень від концентрації мутагену (Elhajouji et al., 2011). Поява клітин із відстаючими хромосомами може бути пов'язана з порушенням організації клітинних центрів поділу, дефектами веретена поділу, пошкодженнями кінетохору чи його функцій, змінами відносин між веретеном поділу та кінетохорами, дефектами центромерного району, змінами взаємодії між центромерними районами сестринських хроматид у процесі мітозу (Compton, 2011; Passerini et al., 2016). Виявлений тип порушень хромосомного апарату, за даними деяких авторів (Kovaleva & Bagatskaia, 2013), дуже рідко зустрічається в популяціях, не обтяжених дією мутагенних факторів, що свідчить про порушення процесів клітинного поділу в результаті нерозходження хромосом у разі блокади веретена поділу.

Природні водні об'єкти зони відчуження ЧАЕС, рівень радіонуклідних забруднень яких характеризується високою цитогенетичною активністю, індукують клітини з комплексними хромосомними перебудовами, що вважається специфічним проявом біологічного впливу іонізуючого випромінювання. Індуковані радіаційним опроміненням первинні пошкодження молекул ДНК розподілені по клітинах відповідно до закону Пуассона (Obe et al., 2002), а їх кінцевий розподіл може істотно від цього відрізнятися. Більше того, чим значніша роль систем відновлення, тим більше розподіл пошкоджень має відрізнятися від пуассонівського. Відомо, що кількість клітин із множинними абераціями дозозалежно збільшується лише в умовах значного мутагенного навантаження (Shkarupa et al., 2011), тому зростання показника кількості аберацій на аберантну клітину за впливу забруднень водойм штучними радіонуклідами свідчить про їх високу мутагенну активність, яка частково визначається особливістю реакції-відповіді системи відновлення ДНК радіаційно ураженої клітини в діапазоні малих доз (Borego-Soto et al., 2015; McMahon et al., 2016). Таке припущення знаходить своє підтвердження під час аналізу експериментальних даних щодо розподілу структурних мутацій по клітинах за опромінення насіння та проростків багатьох інших сільськогосподарських рослин (Geras'kin et al., 2007).

Висновки

Радіонуклідне забруднення водойм ближньої зони відчуження ЧАЕС через 30 років після аварії продовжує зберігати високу цитогенетичну активність та індукуює у клітинах кореневої меристеми озимої пшениці істотне зростання цитогенетичних порушень, що в 1,6–4,2 рази перевищує спонтанний рівень. За показниками частоти аберантних клітин, спектра типів хромосомних аберацій та кількості аберацій на аберантну клітину вона найвища для радіонуклідних забруднень води Семиходського затону, відвідного каналу 3 ЧАЕС, оз. Глибоке, донних відкладів відвідного каналу 2 ЧАЕС, лівого берега Прип'ятського каналу, води та донних відкладів водойми-охолоджувача ЧАЕС. Залежності між рівнем хромосомних аберацій і величиною питомої активності радіонуклідів водойм не виявлено, що може свідчити про індукування цитогенетичних порушень у клітинах кореневої меристеми пшениці внаслідок опромінення в діапазоні низьких доз.

Незважаючи на відсутність істотної різниці між спонтанною частотою аберантних клітин та індукованою радіонуклідним забрудненням води р. Прип'ять поблизу м. Чорнобиль, р. Брагінка та донних відкладів правого берега Прип'ятського каналу, підвищений рівень анеугенних клітин та виявлення клітин із множин-

ними хромосомними абераціями свідчить про генетичну небезпеку для організмів зазначених водних об'єктів. З огляду на те, що питома радіоактивність водойм і водотоків нині визначається інтенсивністю переходу депонованих донними відкладами радіонуклідів у водні маси, під час виведення з експлуатації водойми-охолоджувача ЧАЕС та зміни рівня води у водоймах ближньої зони відчуження необхідно передбачити серед критичних подій можливість зростання мутагенної активності забруднень водних екосистем і важких генетичних наслідків у гідробіонтів.

References

- Albertson, D. G. (2015). Molecular genetics methods in discovery of chromosome structure. Chromosomal Translocations and Genome Rearrangements in Cancer, New York University College of Dentistry, New York, pp. 15–25.
- Al-Dulaimi, D. W., Faisal, S. F., Baharetha, H. M., & Majid, A. M. S. A. (2017). Cytogenetic an experimental monitoring test for plant extracts. Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 12(3), 100–105.
- Artjuhov, V. G., & Kalaev, V. N. (2005). Citogeneticheskie pokazateli semenno-go potomstva derev'ev duba chereschatogo (*Quercus robur* L.), podverg-shijsja vozdejstviyu radioaktivnosti v rezul'tate avarii na Chernobyl'skoj AES i proizrastajushhih na territorijah s raznym urovnem antropogennogo zagrijaz-nenija [Cytogenetic indicators of seed progeny of *Quercus robur* L. trees exposed to radioactivity as a result of the Chernobyl accident and growing in areas with different levels of anthropogenic pollution]. Radiation Biology. Radioecology, 45(5), 619–628 (in Russian).
- Ashraf, M. A., Akib, S., Maah, M. J., Yusoff, I., & Balkhair, K. S. (2014). Cesium-137: Radio-chemistry, fate, and transport, remediation, and future concerns. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44, 1740–1793.
- Beresford, N. A., Fesenko, S., Konoplev, A., Skuterud, L., Smith, J. T., & Voigt, G. (2016). Thirty years after the Chernobyl accident: What lessons have we learnt? Journal of Environmental Radioactivity, 157, 77–89.
- Bird, W. A., & Little, J. B. (2013). A tale of two forests: Addressing postnuclear radiation at Chernobyl and Fukushima. Environmental Health Perspectives, 121(3), 78–85.
- Bondar, Y. I., Nenashev, R. A., Kalinichenko, S. A., Marchenko, Y. D., Dowdall, M., Standing, W., Brown, J. E., Pettersen, M., Skipperud, L., & Zabrotsky, V. N. (2015). The distribution of ¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr, and ²⁴¹Am in waterbodies of different origins in the Belarusian part of Chernobyl exclusion zone. Water, Air, and Soil Pollution, 226(3), 1–13.
- Bondarkov, M. D., Oskolkov, B. Y., Gaschak, S. P., Kireev, S. I., Maksimenko, A. M., Proskura, N. I., Jannik, G. T., & Farfan, E. B. (2011). Environmental radiation monitoring in the Chernobyl exclusion zone – history and results 25 years after. Health Physics, 101(4), 442–485.
- Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiate-on-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. Genetics and Molecular Biology, 38(4), 420–432.
- Boubriak, I., Akimkina, T., Polischuk, V., Dmitriev, A., McCready, S., & Grodzinsky, D. (2016). Long term effects of Chernobyl contamination on DNA repair function and plant resistance to different biotic and abiotic stress factors. Cytology and Genetics, 50(6), 381–399.
- Busby, C. (2017). Radiochemical genotoxicity risk and absorbed dose. Research and Reports on Toxicology, 1(1), 1–13.
- Compton, D. A. (2011). Mechanisms of Aneuploidy. Current Opinion in Cell Biology, 23(1), 109–113.
- Duesberg P., Li, R., & Rasnick, D. (2000). Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. Cancer Genetics and Cytogenetics, 119, 83–93.
- Durante, M., Furusawa, Y., & George, K. (1998). Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. Radiation Research, 149, 446–454.
- Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Cammerer, Z., & Kirsch-Volders, M. (2011). Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. Mutagenesis, 26(1), 199–204.
- Evangelidou, N., Balkanski, Y., Cozic, A., Hao, W. M., Mouillot, F., Thonicke, K., Paugam, R., Zibtsev, S., Mousseau, T. A., Wang, R., Poulter, B., Petkov, A., Yue, C., Cadule, P., Koffi, B., Kaiser, J. W., & Möller, A. P. (2015). Fire evolution in the radioactive forests of Ukraine and Belarus: Future risks for the population and the environment. Ecological Monographs, 85(1), 49–72.
- Evangelidou, N., Hamburger, T., Talerko, N., Zibtsev, S., Bondar, Y., Stohl, A., Balkanski, Y., Mousseau, T. A., & Möller, A. P. (2016). Reconstructing the Chernobyl Nuclear Power Plant (CNPP) accident 30 years after. A unique database of air concentration and de position measurements over Europe. Environmental Pollution, 216, 408–418.
- Firbas, P., & Amon, T. (2014). Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 67(1), 25–35.
- Fuller, N., Ford, A. T., Nagorskaya, L. L., Gudkov, D. I., & Smith, J. T. (2018). Reproduction in the freshwater crustacean *Asellusa quaticus* along a gradient of radionuclide contamination at Chernobyl. Science of the Total Environment, 628–629, 11–17.
- Fuller, N., Lerebours, A., Smith, J. T., & Ford, A. T. (2015). The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review. Aquatic Toxicology, 167, 55–67.
- Garnier-Laplace, J., Beaugelin-Seiller, K., Della-Vedova, C., Métiévier, J.-M., Ritz, C., Mousseau, T. A., & Möller, A. P. (2015). Radiological dose reconstruction for birds reconciles outcomes of Fukushima with knowledge of dose-effect relationships. Scientific Reports, 5, 1–13.
- Geras'kin, S. A., & Volkova, P. Y. (2014). Genetic diversity in Scots pine populations along a radiation exposure gradient. Science of the Total Environment, 496, 317–327.
- Geras'kin, S. A., Oudalova, A. A., Kim, J. K., Dikarev, V. G., & Dikareva, N. S. (2007). Cytogenetic effect of low dose gamma-radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: Non-linear dose-effect relationship. Radiation and Environmental Biophysics, 46(1), 31–41.
- Geras'kin, S., Oudalova, A. A., Docareva, N. S., Spiridonov, S., Hinton, T., Chernonog, E., & Garnier-Laplace, J. (2011). Effects of radioactive contamination on Scots pines in the remote period after the Chernobyl accident. Ecotoxicology, 20, 1195–1208.
- Gudkov, D. I., Kuzmenko, M. I., Kireev, S. I., Nazarov, A. B., Shevtsova, N. L., Dziubenko, E. V., & Kaglian, A. E. (2010). Radioecological problems of aquatic ecosystems of the Chernobyl exclusion zone. Biophysics, 55(2), 332–339.
- Gudkov, D. I., Shevtsova, N. L., Pomortseva, N. A., Dzyubenko, E. V., Kaglyan, A. E., & Nazarov, A. B. (2016a). Radiation-induced cytogenetic and hematologic effects on aquatic biota within the Chernobyl exclusion zone. Journal of Environmental Radioactivity, 151(2), 438–448.
- Gudkov, D., Dzyubenko, E., Shevtsova, N. M., & Nazarov, A. (2011). Aquatic biota within the Chernobyl accident exclusion zone: Consequences of the long-term radiation exposure. Radiobiology and Environmental Security, 116, 233–244.
- Gudkov, D., Dzyubenko, Y. V., Nazarov, A. B., & Klenus, V. G. (2016). Fresh-water mollusks in the exclusion zone of the Chernobyl NPS: Dynamics of radionuclide content, dose loads, and cytogenetic and hematological investigations. Hydrobiological Journal, 46(5), 74–90.
- Guogytė, K., Plieskienė, A., Ladygienė, R., Vaisiūnas, Ž., Ševriukova, O., Janušonis, V., & Žiliukas, J. (2017). Assessment of correlation between chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes after *in vitro* irradiation and normal tissue side effects for cancer patients undergoing radiotherapy. Genome Integrity, 8(1).
- Hristova, R., Hadjidekova, V., Grigorova, M., Nikolova, T., Bulanova, M., Popova, L., Staynova, A., & Benova, D. (2013). Chromosome analysis of nuclear power plant workers using fluorescence in situ hybridization and Giemsa assay. Journal of Radiation Research, 54(5), 832–839.
- Itoh, M., Kajihara, R., Kato, Y., Takano-Shimizu, T., & Inoue, Y. (2018). Frequencies of chromosomal inversions in *Drosophila melanogaster* in Fukushima after the nuclear power plant accident. PLoS One, 13(2), 0192096.
- Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. International Journal of Biological Sciences, 4(6), 338–344.
- Konoplev, A., Golosov, V., Laptsev, G., Nanba, K., Onda, Y., Takase, T., Wakiyama, Y., & Yoshimura, K. (2016). Behavior of accidentally released radionuclide in soil-water environment: Looking at Fukushima from a Chernobyl perspective. Journal of Environmental Radioactivity, 151, 568–578.
- Kosakovskaja, I. V., & Gudkova, N. V. (2005). Vlijanie gamma-radiacii i vysokoj temperatury na sostav kislotorastvorimyh jadernih belkov prorostkov ozimoj pshenicy [Effect of gamma radiation and high temperature on the composition of acid-soluble nuclear proteins of winter wheat seedlings]. Physiology and Biochemistry of Cultivated plants, 37(1), 24–29 (in Russian).
- Kovaleva, V. I., & Bagatskaia, N. V. (2013). Cytogenetic effects in peripheral blood lymphocytes in the offspring of Chernobyl nuclear power plant accident liquidators under the influence of mitomycin C *in vitro* and folic acid *in vivo*. Cytology and Genetics, 47(1), 68–73.
- Lisowska, H., Brehwens, K., Zölzer, F., Wegierek-Ciuk, A., Czub, J., & Lankoff, A. (2014). Effect of hypothermia on radiation-induced micronuclei and delay of cell cycle progression in TK6 cells. International Journal of Radiation Biology, 90(4), 318–324.
- Magin, S., Papaioannou, M., Saha, J., Staudt, C., & Iliakis, G. (2015). Inhibition of homologous recombination and promotion of mutagenic repair of DNA double-strand breaks underpins arabinoside-nucleoside analogue radiosensitization. Cancer Biology and Signal Transduction, (3), 1424–1433.
- Marković, S. Z., Nikolić, L. I., Hamidović, J. L., Grubor, M. G., Grubor, M. M., & Kastratović, D. A. (2017). Chromosomes aberrations and environmental factors. Hospital Pharmacology, 4(1), 486–490.
- McMahon, S. J., Schuermann, J., Paganetti, H., & Prise, K. M. (2016). Mechanistic modelling of DNA repair and cellular survival following radiation-induced DNA damage. Scientific Reports, 7, 1–14.

- Medvedeva, M. Y., Bolsunovsky, A. Y., & Zotina, T. A. (2014). Cytogenetic abnormalities in aquatic plant *Elodea canadensis* in anthropogenic contamination zone of Yenisei River. *Contemporary Problems of Ecology*, 7(4), 422–432.
- Mousseau, T. A., & Møller, A. P. (2014). Genetic and ecological studies of animals in Chernobyl and Fukushima. *Journal of Heredity*, 105(5), 704–709.
- Muratova, E. N., Goryachkina, O. V., Komilova, M. G., Pimenov, A. V., Sedelnikova, T. S., & Bolsunovsky, A. Y. (2014). Cytogenetic studies on submerged plants from the Yenisei river area in the zone of radioactive contamination. *Biology Bulletin*, 41(5), 461–467.
- Nakamura, N. (2018). Why genetic effects of radiation are observed in mice but not in humans. *Radiation Research*, 189, 117–127.
- Nurmansyah, Y., Alghamdi, S. S., Migdadi, H. M., & Farooq, M. (2018). Morphological and chromosomal abnormalities in gamma radiation-induced mutagenized faba bean genotypes. *International Journal of Radiation Biology*, 94(2), 174–185.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A. T., Martinez-López, W., Folle, G. A., & Drets, M. E. (2002). Chromosomal aberrations: Formation, identification and distribution. *Mutation Research*, 504, 17–36.
- Osman, A. G. M. (2014). Genotoxicity tests and their contributions in aquatic environmental research. *Journal of Environmental Protection*, 5, 1391–1399.
- Pampalona, J., Roscioli, E., Silkworth, W. T., Bowden, B., Genescà, A., Tusell, L., & Cimini, D. (2016). Chromosome bridges maintain kinetochore-microtubule attachment throughout mitosis and rarely break during anaphase. *PLoS One*, 11(1), 0147420.
- Parshad, R., & Sanford, K. K. (2001). Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. *Hematology*, 37, 87–96.
- Passerini, V., Ozeri-Galai, E., de Pagter, M. S., Donnelly, N., Schmalbrock, S., Kloosterman, W. P., Kerem, B., & Storchova, Z. (2016). The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. *Nature Communications*, 7, 10754.
- Pausheva, Z. P. (1988). *Praktikum po citologii rastenij* [Workshop on plant cytology]. Agropromizdat, Moscow (in Russian).
- Pohrebennyk, V., Politylo, R., Yakovleva, V., & Salamon, I. (2016). Radioecological monitoring of groundwater resources in the Chernobyl exclusion zone. *Journal of Acta Facultatis Studiorum Humanitatis et Naturae Universitatis Prešovensis*, 43, 136–142.
- Pojoga (Usurelu), M. D., Manaila, E., Nicoleta, C., Duta, C. G., Cimponeriu, D., & Simon-Gruita A. (2013). Chromosome aberrations, telomere and telomerase dysfunction after beta irradiation in human lymphocytes. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(5), 8603–8612.
- Qian, Q. Z., Cao, X. K., Shen, F. H., & Wang, Q. (2016). Effects of ionising radiation on micronucleus formation and chromosomal aberrations in Chinese radiation workers. *Radiation Protection Dosimetry*, 168(2), 197–203.
- Qureshi, S. T., Memon, S. A., Abassi, A. R., Sial, M. A., & Bughio, F. A. (2017). Radiofrequency radiations induced genotoxic and carcinogenic effects on chickpea (*Cicer arietinum* L.) root tip cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4), 883–891.
- Ramzaev, V., Bøtter-Jensen, L., & Thomsen, K. J. (2008). An assessment of cumulative external doses from Chernobyl fallout for a forested area in Russia using the optically stimulated luminescence from quartz inclusions in bricks. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99(7), 1154–1164.
- Romanenko, V., Gudkov, D., & Kuz'menko, M. (2014). Hidrobionty vodojm Chomobyl's'koi' zony [Hydrobionts of reservoirs of the Chernobyl zone]. *Svitogljad*, 46(2), 37–46 (in Ukrainian).
- Rudenko, L. I., Han, V. E., Odincov, A. A., & Dzhuzha, O. V. (2013). Fazovoe raspredelenie, formy nahozhdeniya i dolja mikrochastits v gruntovoy vode po ¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr, uranu i transuranovym jelementam [The phase distribution, the forms of occurrence and the fraction of microparticles in groundwater over ¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr, uranium and transuranium elements]. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 7, 165–171 (in Russian).
- Sazykina, T. G., & Kryshev, A. I. (2003). EPIC database on the effects of chronic radiation in fish. *Journal of Environmental Radioactivity*, 68, 65–87.
- Shevchenko, V. V., Grinih, L. I., & Abramov, V. I. (1998). Citogeneticheskie efekty v prirodnyh populjacijah *Crepis tectorum* L., proizrastajushhih v rajone Vostochno-Ural'skogo radioaktivnogo sleda [Cytogenetic effects in natural populations of *Crepis tectorum* L., growing in the area of the East Urals radioactive trace]. *Radiation Biology. Radioecology*, 38(3), 330–336 (in Russian).
- Shkarupa, V. M., Neumerzhicka, L. V., Klimenko, S. V., & Simiglazova, T. V. (2011). Dynamika zmin spektra aberacij hromosom, indukovanyh mitomicynom C u *Allium cepa* L. [Dynamics of changes in spectrum of aberrations of chromosomes induced by mitomycin C in *Allium cepa* L.]. *Bulletin of the Ukrainian Society of Genetics and Breeders*, 9(1), 112–117.
- Shmakova, N. L., Fadeeva, T. A., & Nasonova, E. A. (2002). Citogeneticheskie jeffekty malyh doz oblucheniya v kletkah mlekopitajushhih: Analiz fenomena giperchuvstvitel'nosti i inducirovannoj rezistentnosti [Cytogenetic effects of small doses of irradiation in mammalian cells: An analysis of the phenomenon of hypersensitivity and induced resistance]. *Radiation Biology, Radioecology*, 42(3), 245–250 (in Russian).
- Shuryak, I. (2017). Quantitative modeling of responses to chronic ionizing radiation exposure using targeted and non-targeted effects. *PLoS One*, 12(4), 0176476.
- Suga, H., Fan, Q., Takeichi, Y., Tanaka, K., Kondo, H., Kanivets, V. V., Sakaguchi, A., Kato, K., Inami, N., Mase, K., Ono, K., & Takahashi, Y. (2014). Characterization of particulate matters in the Pripyat River in Chernobyl related to their adsorption of radiocesium with inhibition effect by natural organic matter. *Chemistry Letters*, 43(7), 1128–1130.
- Talerko, N. N., Garger, E. K., & Kuz'menko, A. G. (2013). Prognoznaja oценка transgranichnogo perenosa radionuklidov vsledstvie prohozhdeniya smercha nad vodoemom-ohladiatelyem ChAJeS [Predictive assessment of cross-border transport of radionuclides due to the passage of the tornado cooling pond Chernobyl]. *Problems of Safety of Nuclear Power Plants and Chernobyl*, 20, 85–93 (in Ukrainian).
- Tawn, E. J., Curwen, G. B., Jonas, P., Gillies, M., Hodgson, L., & Cadwell, K. K. (2015). Chromosome aberrations determined by FISH in radiation workers from the Sellafield nuclear facility. *Radiation Research*, 184(3), 296–303.
- Tawn, E. J., Curwen, G. B., Riddell, A. E., Lloyd, D. C., & Ainsbury, E. A. (2017). Chromosome analysis in a case of a plutonium contaminated wound. *Journal of Radiological Protection*, 37(2), 13–18.
- Topashka-Ancheva, M., & Gerasimova, T. (2012). Genomic sensitivity of small Mammals – a suitable test system in the genetic monitoring. In: Begum, G. (ed.). *Ecotoxicology*. InTech, Rijeka. Pp. 125–146.
- Zotina, T. A., Trofimova, E. A., Medvedeva, M. Y., Dement'ev, D. V., & Bolsunovsky, A. Y. (2015). Use of the aquatic plant *Elodea canadensis* to assess toxicity and genotoxicity of Yenisei river sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(10), 2310–2321.



Fitting competing models and evaluation of model parameters of the abundance distribution of the land snail *Vallonia pulchella* (Pulmonata, Valloniidae)

O. N. Kunakh*, S. S. Kramarenko**, A. V. Zhukov*, A. S. Kramarenko**, N. V. Yorkina***

*Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

**Mykolayiv National Agrarian University, Mykolayiv, Ukraine

***Bohdan Khmelnytsky Melitopol State Pedagogical University, Melitopol, Ukraine

Article info

Received 15.03.2018

Received in revised form

21.04.2018

Accepted 25.04.2018

Oles Honchar Dnipro
National University,
Gagarin av., 72,
Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-098-507-96-82.
E-mail: olga-kunakh@rambler.ru

Mykolayiv National
Agrarian University,
Georgiy Gongadze st., 9,
Mykolayiv, 54020, Ukraine.
E-mail: kssnail0108@gmail.com

Bohdan Khmelnytsky
Melitopol State Pedagogical
University, Hetmanska st., 20,
Melitopol, 72312, Ukraine.
E-mail:
nadyayork777@gmail.com

Kunakh, O. N., Kramarenko, S. S., Zhukov, A. V., Kramarenko, A. S., & Yorkina, N. V. (2018). Fitting competing models and evaluation of model parameters of the abundance distribution of the land snail *Vallonia pulchella* (Pulmonata, Valloniidae). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 198–202. doi:10.15421/021829

This paper summarizes the mechanisms behind the patterning of the intra-population abundance distribution of the land snail *Vallonia pulchella* (Müller, 1774). The molluscs were collected in recultivated soil formed on red-brown clays (Pokrov, Ukraine). Data obtained in this study reveal that *V. pulchella* population abundance ranges from 1 to 13 individuals per 100 g of soil sample. To obtain estimates of the mean, three models were used: the model of the arithmetic mean, the Poisson model and a log-normal model. The arithmetic mean of the occurrence of this species during the study period was 1.84 individuals/sample. Estimation of the average number of molluscs in one sample calculated using the Poisson model is lower and equals 1.40 individuals/sample. The distribution of the number of individuals in a population was described by the graphics "rank – abundance". The individual sample plot sites with molluscs may be regarded as equivalents of individual species in the community. For the analysis, the following models were used: broken sticks model, niche preemption model, log-normal model, Zipf model, and Zipf-Mandelbrot model. Applying the log-normal distribution gives a lower estimate of the mean density at 1.28 individuals/sample. Median value and mode is estimated at 1.00 individuals/sample. The Zipf-Mandelbrot model was shown as the most adequate to describe distribution of the *V. pulchella* population within the study area. The Zipf-Mandelbrot model belongs to the family of so-called non-Gaussian distributions. This means that the sample statistics do not possess asymptotic properties and by increasing the sample size, they tend to infinity, and are not close to the values of the general population. Therefore, the average value of the random variable that describes the non-Gaussian distribution has no statistical meaning. From an environmental point of view, this means that within the study area the capacity of the habitat is large, and for some combination of environmental conditions the rapid growth of the abundance of a given species is possible.

Keywords: abundance; intra-population structure; land snails

Introduction

There are plenty of publications devoted to habitat selection by land snails based on the investigation of mollusc communities from spatially different biotopes which differ in vegetation cover, soil type, moisture level (Millar & Waite, 1999; Martin & Sommer, 2004; Müller et al., 2005; Weaver et al., 2006). The number of invertebrates on a particular plot changes randomly. It is impossible to predict in advance for any moment of time at a given plot which of the factors will operate within the optimum range and which at an extreme range for any given species of invertebrate (Brygadyrenko, 2015a). The calcium content in the soil, pH, the soil texture (Ondina et al., 2004), and the content of exchangeable cations and aluminum (Ondina et al., 1998) are the most important among the edaphic factors which affect the molluscs. The soil moisture plays a significant role in forming ecological niches of molluscs (Nekola, 2003). However, P. Ondina et al. (2004) noted the restrictions of the importance of soil moisture data at any given moment because of the considerable changeability of this parameter. To help address this situation phytoindication data application is an appropriate method for assessment of land snails' ecological characteristics and community properties (Horsák et al., 2007; Dvořáková & Horsák, 2012). Ellenberg phytoindication scales have been effectively used to

explain the habitat preferences of the land snail *Vertigo geyeri* in Poland and Slovakia (Schenkova et al., 2012). Interaction of litter macrofauna with herbaceous plants has been investigated in natural forests of Ukraine's steppe zone (Brygadyrenko, 2015b) and in poplar plantations within city parks (Faly & Brygadyrenko, 2014). The importance of soil factors in the spatial distribution, abundance and diversity of mollusc communities has been revealed on a large-scale level of research (Nekola & Smith, 1999; Juřicková et al., 2008; Szybiak et al., 2009). The issue of the spatial scale and the hierarchy of factors acting on molluscs are of special interest (Nekola & Smith, 1999; Bohan et al., 2000; McClain & Nekola, 2008; Myšák et al., 2013).

Habitat is attributed by the presence of a certain range of resources and ecological conditions which make it possible for a given species to occupy, survive and reproduce in a given area (Hall et al., 1997). For identification of the environmental characteristics which make a territory appropriate for the existence of a species, it is important to investigate the selection of habitat types (Calenge & Basille, 2008).

The mollusc *Vallonia pulchella* (Müller, 1774) is Holarctic species distributed around the world at high latitudes. In Europe it prefers wetter habitats such as wet grasslands and swamps, as well as dry dunes and meadows (Kerney & Cameron, 1979). In Ukraine it is found in moderately dry and wet grasslands habitats (Gural-Sverlova & Gural, 2012).

There have been few publications on the results of aut- and demecological research on the land snail *V. pulchella*. In the 1930s, research was carried out on the reproduction of this mollusc (Whitney, 1937, 1941), which was continued in this century (Kuznik-Kowalska & Proćkow, 2016). It was revealed that the density of *V. pulchella* is affected by many soil physico-chemical properties, especially calcium and magnesium concentration and pH of water extract (Hermida et al., 1993, 2000). Furthermore, interrelation was found between the abundance of *V. pulchella* and pH and electrical conductivity of the water in marshy lowland central Scandinavia (Schenkova et al., 2015). Local trends, as well as the mosaic nature of the organization of the soil body determine the structure of the vegetation cover. This explains the role of indicators in the organization of ecological niche of mollusc *V. pulchella*, the dimension of which exceeds the size of the ecological space of an individual of this species. Soil mechanical impedance, as well as phytoindication indicators of vegetation, determines the peculiarities of marginality and specialization of the ecological niche of *V. pulchella*. It is the measurement of these indicators that makes it possible to draw a map of habitat preferences for *V. pulchella*. Thus, ecological niche optima may be presented by integral variables such as marginality and specialization axes and may be plotted in geographic space by means of habitat suitability index reproduction (Yorkina et al., 2018).

Thus, the main aim of our work is to select the optimal model and to evaluate model parameters of the abundance distribution of the land snail *V. pulchella* (Müller, 1774) (Gastropoda, Pulmonata, Valloniidae).

Material and methods

The studies were conducted at the research station of Dnipro Agrarian and Economic University in Pokrov in June 2012. Sampling was carried out on a type of technogenic soil formed on red-brown clays (geographic coordinates of the southwest corner of the polygon are 47°38'55" N, 34°08'33" E) (Zhukov et al., 2013; Zverkovskiy et al., 2017; Kharytonov et al., 2018; Yorkina et al., 2018). According to WRB 2007 (IUSS Working group WRB, 2007), the examined soil belongs to the RSG Technosols. A perennial legume-grass agrophytocenosis was cultivated at this research station between 1995 and 2003, following which the process of naturalization of vegetation began (Zhukov et al., 2017).

The area within which the samples were taken consisted of seven transects of 15 samples each. The sampling points formed a regular grid of a mesh size of 3 m. From the center of each sampling site a soil sample weighing 100 g was collected. Each sample was examined in the laboratory with a $\times 10$ binocular microscope MBS-9 and the number of live specimens of *V. pulchella* was noted.

To obtain estimates of the mean, three models were used: the model of the arithmetic mean, the Poisson model and a log-normal model. Estimation of the mean from assumptions about the distribution of the random variable according to Poisson was obtained by the formula (Shebanin et al., 2008):

$$D = -\ln \frac{n_0}{n}, \quad (1)$$

where D is the mean estimation; n_0 is number of samples without the presence of the species; n is total number of samples.

Statistical calculations were performed using Statistica 7.0 program (Khalafyan, 2007) and a 95% confidence interval for the mean estimation obtained using different models has been calculated on the basis of the bootstrap approach using bootES package (Kirby & Gerlanc, 2013). The distribution of the number of individuals in a population may also be described by the graphics "rank – abundance", which are often used in community ecology (Whittaker, 1965). In this case, the individual sample plot sites with molluscs may be regarded as equivalents of individual species in the community. For the analysis in this case, the following model can be used:

– broken sticks model (MacArthur, 1957):

$$\hat{a}_r = \frac{N}{S} \sum_{k=r}^S \frac{1}{k}; \quad (2)$$

– Motomura model (the Whittaker niche preemption model) (Motomura, 1932):

$$\hat{a}_r = N\alpha(1-\alpha)^{r-1}; \quad (3)$$

– log-normal model (Preston, 1948, 1962):

$$\hat{a}_r = \exp[\log(\eta) + \log(\sigma)\Phi]; \quad (4)$$

– Zipf model (Zipf, 1949):

$$\hat{a}_r = N\hat{p}_1 r^{-\gamma}; \quad (5)$$

– Zipf-Mandelbrot model (Mandelbrot, 1983):

$$\hat{a}_r = Nc(r+\beta)^{-\gamma}; \quad (6)$$

where $\hat{a}_r$ is the expected abundance of species of rank r ; S is the number of species; N is the number of individuals; Φ is a standard normal distribution function; $\hat{p}_1$ is the estimated proportion of the most abundant species; $\alpha, \mu, \sigma, \gamma, \beta$ and c are the parameters in each model.

The degree of adequacy of the model was evaluated using Akaike's information criterion (AIC) and the Bayesian information criterion (BIC). The best model has the lowest AIC and BIC.

Plant and soil data used for distance matrix calculation were discussed previously in our publication (Yorkina et al., 2018). Statistical calculations were performed with the help of the Statistica 7.0 program and the project for statistical computations R (www.r-project.org) using vegan (Oksanen et al., 2017).

Results

In examining 105 samples, 193 *V. pulchella* were detected. Thus, the arithmetic mean of the occurrence of this species in sod lithogenic soils on red-brown clays during the study period was 1.84 individuals per of 100 g soil sample (Table 1). Thus, the observed distribution of *V. pulchella* abundance in one sample is adequately described by the Poisson law (Kolmogorov-Smirnov test: $d_{KS} = 0.089$, $P > 0.05$) (Fig. 1). This type of discrete distribution is described by a random flow (Puzachenko, 2004; Shebanin et al., 2008). Estimation of the average number of molluscs in one sample calculated using the Poisson model is lower and equals 1.40 individuals/example (Table 1).

Table 1

Estimates of *V. pulchella* population density based on different models, individuals per of 100 g soil sample

Model	D	D _{boot} ± SD	95% CI
Arithmetic mean	1.84	1.79 ± 0.23	1.35 – 2.27
Poisson distribution	1.40	1.43 ± 0.20	1.08 – 1.85
Log-normal distribution	1.28	1.26 ± 0.14	1.03 – 1.52

Notes: D – density estimates of the population; D_{boot} – bootstrap-based density estimates of the population; SD – standard deviation; CI – confidence interval.

The pronounced asymmetric character of the distribution makes the arithmetic mean an insignificant value of the general population mean. It is quite logical that applying the log-normal distribution gives a lower estimate of the mean density at 1.28 individuals/sample (Table 1). This value is closest to the median value and mode, which is estimated at 1.00 individuals/sample.

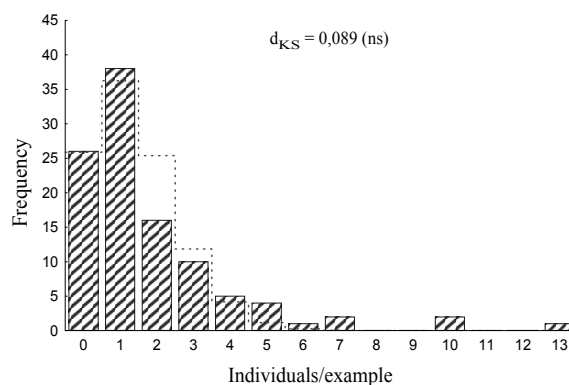


Fig. 1. Histogram of the empirical distribution of *V. pulchella* per 100 g of soil sample (dashed line marks the theoretical Poisson distribution for $\lambda = 1.40$)

The use of curves "ranked-abundance" shows that the Zipf-Mandelbrot model is the most adequate to describe the abundance of the

population of *V. pulchella* within the study area, as the Akaike information criterion for this model is the smallest among all least studied (Table 2).

Table 2

Statistics for the various models of distribution “rank-abundance” experimental data

Model	Deviation	Information criterion	
		Akaike (AIC)	Bayesian (BIC)
Broken sticks	30.30	232.29	232.29
Niche preemption	16.83	220.82	223.19
Log-normal	8.78	214.77	219.51
Zipf	7.23	213.23	217.96
Zipf-Mandelbrot	3.37	211.36	218.47

It should be noted that the Zipf-Mandelbrot model belongs to the family of so-called non-Gaussian distributions (Khaytun, 2005). This means that the sample statistics do not possess asymptotic properties

Table 3

Correlations of distance matrices (Mantel test)

Factor	All environmental indicators	Edaphic indicators	Phytoindication scales			Spatial coordinates
			all	climate	edaphic	
<i>Mantel Test</i>	$r=0,15$, $p=0,014$	$r=0,15$, $p=0,016$	$r=-0,11$, $p=0,99$	$r=-0,05$, $p=0,79$	$r=-0,08$, $p=0,93$	$r=0,04$, $p=0,120$
A partial Mantel test with control variables						
Edaphic indicators	$r=-0,12$, $p=0,997$	–	$r=-0,13$, $p=0,994$	$r=-0,06$, $p=0,859$	$r=-0,09$, $p=0,96$	$r=0,02$, $p=0,329$
Phytoindication scales	$r=0,16$, $p=0,009$	$r=0,16$, $p=0,009$	–	–	–	$r=0,07$, $p=0,077$
Climate	$r=0,15$, $p=0,016$	$r=0,15$, $p=0,015$	$r=-0,10$, $p=0,978$	–	$r=-0,08$, $p=0,937$	$r=0,04$, $p=0,153$
Edaphic	$r=0,15$, $p=0,015$	$r=0,15$, $p=0,009$	$r=-0,08$, $p=0,954$	$r=-0,05$, $p=0,784$	–	$r=0,05$, $p=0,123$
Spatial coordinates	$r=0,14$, $p=0,023$	$r=0,14$, $p=0,028$	$r=-0,12$, $p=0,987$	$r=-0,05$, $p=0,806$	$r=-0,09$, $p=0,961$	–

It should be noted that the information value for describing the variation in the number of molluscs has a complex of phytoindication indicators, and does not separate the matrices of climatic and edaphic indicator values. The use of edaphic indicators as a control variable in the partial Mantel test leads to a change in the correlation coefficient of the distance matrices in terms of the number of molluscs and the matrix of ecological indicators ($r_m = -0.12$, $P = 0.997$). This confirms the result that edaphic factors and phytoindication indicators mark opposite tendencies of influence of environmental factors on the mollusc population, while the Mantel test between the matrices of edaphic and phytoindicating distances is positive ($r_m = 0.11$, $P = 0.013$).

Phytoindication scales as drivers in the partial Mantel test do not affect the correlation of molluscs and both environmental indicators in general and edaphic indicators.

Thus, the analysis of the results of Mantel tests indicates a specific character of the influence of edaphic factors and vegetation on the population of the molluscs *V. pulchella* and the absence of influence of spatial factors on the chosen scale. It is likely that the selected set of indicators can fully describe the spatial variation of the population of *V. pulchella* within the studied test site.

Discussion

Distribution of the species in the loci can be described by a number of models. Abundance curves are widely used to describe dominance structures in communities of living organisms. This tool can also be used to describe the statistical distribution of the individuals in a population. The difference consists in the fact that the x-axis will not be delayed in the rank of species abundance and species abundance levels in the locus of a given population. Ideally, the extent to which the actual distribution of a particular model makes it possible to make a choice in favour of one of the theories that explain the structuring of the population (or community) (Pielou, 1975). Geometric series (Motomura, 1932) was proposed to describe the benthic communities of a lake. The parameter k of the distribution is a measure of the complexity of the species composition of the community. According to

and by increasing the sample size, they tend to infinity, and are not close to the values of the general population. Therefore, the average value of the random variable that describes the non-Gaussian distribution has no statistical meaning. From an environmental point of view, this means that within the study area the capacity of the habitat is large, and for some combination of environmental conditions the rapid growth of the abundance of a given species is possible.

The Mantel test allows us to compare the correlation matrices among themselves (Table 3). The Mantel test for matrices of distance measures based on the number of molluscs (Euclidean distance) and measured ecological characteristics (Euclidean distance) indicates a reliable correlation of these matrices ($r_m = 0.15$, $P = 0.02$). Mantel tests indicate that in a complex of environmental indicators that affect molluscs, a key role is played by edaphic factors (positive correlation) and phytoindication indicators (negative correlation). The space (the matrix of geographical distances) does not play an important role in the variability of the molluscs' density.

Tokeshi (1993), Motomura applied a geometric series as the simplest mathematical form for the description of an ecological community, although later this model was interpreted as a reflection of the distribution of resources among species (Ferreira & Petrere-Jr., 2008). From this viewpoint, the distribution should be described by a situation in which the dominant species uses a proportion k of the whole initially available resource, leaving accessible proportion $1-k$. The next dominant species uses the same fraction k of the remaining available resource. This goes for all species of the community. May (1975) believes that the geometric series is a situation in which all species of a community are energy equivalent and value of ecological interactions is proportional to the abundance of species – more abundant species require more energy from the system. Geometric series take into account only the number of species and neglect the influence of the size of the animals on the energy needs of a species (Ferreira, Petrere-Jr., 2008).

Logarithmic series distribution proposed by Fischer et al. (1943) slightly resembles a hyperbola decreasing with increasing number of species and can be predicted from the expression:

$$\alpha x, \alpha x^2/2, \alpha x^3/3, \dots, \alpha x^n/n,$$

where $\alpha x^n/n$ represents the number of species with n number of individuals. The number x can be obtained from the equation

$$S/N = [(1-x)/x] * [-\ln(1-x)]$$

and in practice is in the range 0.9–1.0 (Magurran, 2004). The constant α is independent of the sample size and may be viewed as an index of diversity, while remaining a robust assessment even in the case where the data is not very well matched logarithmic series (Ferreira & Petrere-Jr., 2008).

Truncated lognormal distribution was proposed by Preston (1948). With the species abundances in the histogram in logarithmic scale, the author obtained a curve that is a good description of a large number of community data. The R classes resulting logarithms are called octaves, wherein each class represented twice the number of species of the previous class (1, 2, 4, 8, 16 ...). The lognormal model has two parameters: μ – mean value of the logarithmic score abundance and σ – standard rating average logarithmic abundance deviation (Ferreira & Petrere-Jr., 2008). For real samples distribution is truncated on the left.

The area behind this point represents species that is not included in the sample, and it decreases with increasing sample size. MacArthur (1957) suggested that the ecological niches in a community can be compared with a stick of unit length, at which $n-1$ are randomly generated points form n segments of length proportional to the abundance of each species in the community. MacArthur's broken stick model does not contain parameters for evaluation.

Model Zipf (Zipf, 1949) has two parameters – abundance estimation dominant form γ and the parameter β , which indicates the probability of occurrence of the species in the community. The Model Zipf-Mandelbrot (Mandelbrot, 1983) has a third parameter α , which may be regarded as ecological variety of potential environmental or ecological niche diversity.

The geometrical model of the distribution of species abundance is consistent with the hypothesis interception niches Whittaker (1972). It assumes that every species of community sites in decreasing order of abundance (increase in rank) uses a constant (K -th) of the remaining resources of the community. For example, if the strongest competitor (dominant) occupies 70% of the niche space using the appropriate community resources share, the second most important species of able to take a similar share of the remainder of the first niche space, the third type – the same piece of space left over from the first and the second kind, etc. According to this model, the proportion of community resources used by the most abundant species (dominant) is not a special case (the result of the biological and ecological characteristics or accidental circumstances), and reflects the general character of the distribution of niche space between species in different conditions. Hence the community with a higher dominance of the most competitive species must be characterized as having not only fewer resources available for related species, but also a more "rigid" means of distribution of resources among them (i.e. higher K values) that *ceteris paribus* conditions may affect their species richness.

There are other types (models) of species abundance patterns, a review of which is available in many publications (Whittaker, 1972; Megarran, 2004; Ferreira & Petreire-Jr., 2008). They assume a more or less uniform, compared to the geometric model, allocation of resources and thus more or less marked predominance of one species. The former include, for example, log-normal model and the "broken stick" MacArthur; to the second – hyperbolic model.

According to the log-normal model (for the analysis of biological communities, this was first used by Preston), K values in the species of the first rank higher than the species next few ranks, and in accordance with the hypothesis of random boundaries between niches MacArthur vice versa. At the same time as the lognormal model and MacArthur model typical for communities with a relatively low level of dominance. Therefore, the allocation of resources between the associated views in the three models (hyperbolic lognormal and MacArthur) is related to the level less than the first domination rank species than in geometric.

Particular attention is paid to the types of distribution in the community ecology and population ecology due to the need to open or create a picture of the mechanisms of the relationship of the community or population with the resources offered by the habitat. It is expected that the community or the population is subject to the theoretical concepts, on the basis of which are derived the corresponding types of distributions. The fact that the population size distribution of *V. pulchella* is not subject to a fully stochastic processes (Poisson distribution model of the broken sticks) indicates that the selected site is not entirely uniform for the species under study. It should be noted that an alternative statistical broken stick model is a little more realistic, which can only be the basis for the assumption of the presence of any processes that may underlie the alternative models.

The best of the studied models to describe the number of molluscs is the model of the Zipf-Mandelbrot. This type of distribution is often found in the description of complex organized systems (Khaytun, 2005). The non-Gaussian nature of this distribution makes it difficult to use traditional statistics to describe the corresponding processes. With respect to the type of population, Mandelbrot-Zipf distribution systems can arise as the result of significant increase in population numbers in the formation of optimal environmental conditions. In other words, the

number is not in this situation, a marker of environmental conditions in the sense that the relationship is not proportional. Then a great informational value is simply the fact of the presence (or absence) of the form.

Studies of terrestrial micromolluscs has always been accompanied by significant methodological difficulties related to their small size. For example, the diameter of the shell of many species of *Vallonia* Risso, 1926 does not exceed 2–3 mm (Gerber, 1996). However, the procedure for assessing the abundance of species, using a widespread approach based on test plots, characterized by significant errors and obtained on the basis of such an assessment approach, cannot always be trusted unconditionally. In addition, these estimates may differ even by two-four orders of magnitude and cannot always be clear, these differences are fundamental and are the consequences of violations of population estimation procedure. For example, the population density of *V. pulchella* in alder and oak forests of Belarus was 4–8 individuals/m² (Zemoglyadchuk, 2005), on artificial *Robinia* stands in a recultivated area near the town of Zhovti Vodi it was 5.6 individuals/m² (Kul'bachko & Unkov'ska, 2008), whereas in ash-elm forests in Poland it did not exceed the average of 0.13 individuals/m² (Koralewska-Batura & Błoszyk, 2007), and in floodplain forests of Slovakia it was 0.07 individuals/m² (Čejka & Hamerlik, 2009). On the other hand, Hermida et al. (1993) estimated the average density for three studied populations of *V. pulchella* in Spain (meadow and forest habitats, as well as near the river bank) to be 5.9–10.1 individuals/m², reaching on separate test plots values of the order of 200 individuals/m². In bush willow depressions in Kazakhstan Uvalieva (1990) a density of 224 individuals/m² was estimated.

Therefore, in principle other methods have been proposed for abundance estimates for litter micromolluscs, for example, collecting a significant amount of topsoil, moss, lichen, leaf litter (volume 10–12 liters), followed by hand sorting of these samples in a laboratory. In addition, for complete extraction of the shells (if possible), a set of sieves with decreasing mesh sizes may be used (Horsák, 2003).

For typical soil species it has been proposed to conduct sampling of soil (specific weight), followed by its analysis under a microscope in the laboratory. This method originated in paleozoology (Evans, 1972). Using this approach, Davies et al. (1996) found the abundance of *V. pulchella* to be 0.4–40.4 individuals per 100 g sample of soil on chalky soils in UK, and for the Jurassic limestone in the center of Krakow (Poland), its abundance was 1–22 individuals per 100 g of soil sample (Gołas-Siarzewska, 2013). The results thus obtained are entirely consistent with the data obtained in this study – 1–13 individuals per 100 g of soil sample, which may indicate the higher accuracy of this method.

References

- Bohan, D. A., Glen, D. M., Wiltshire, C. W., & Hughes, L. (2000). Parametric intensity and the spatial arrangement of the terrestrial mollusc herbivores *Deroceras reticulatum* and *Arion intermedius*. *Journal of Animal Ecology*, 69(6), 1031–1046.
- Brygadyrenko, V. V. (2015a). Influence of moisture conditions and mineralization of soil solution on structure of litter macrofauna of deciduous forests of Ukraine's steppe zone. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 23(1), 50–65 (in Ukrainian).
- Brygadyrenko, V. V. (2015b). Influence of tree crown density and density of the herbaceous layer on the structure of litter macrofauna of deciduous forests of Ukraine's steppe zone. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology* 23(2), 134–148 (in Ukrainian).
- Calenge, C., & Basille, M. (2008). A general framework for the statistical exploration of the ecological niche. *Journal of Theoretical Biology*, 252(4), 674–685.
- Čejka, T., & Hamerlik, L. (2009). Land snails as indicators of soil humidity in Danubian woodland (SW Slovakia). *Polish Journal of Ecology*, 57(4), 741–747.
- Davies, P., & Grimes, C. J. (1999). Small-scale spatial variation of pasture mollusc faunas within a relic watermeadow system at Wyllye, Wiltshire, UK. *Journal of Biogeography*, 26(5), 1057–1063.
- Dvořáková, J., & Horsák, M. (2012). Variation of snail assemblages in hay meadows: Disentangling the predictive power of abiotic environment and vegetation. *Malacologia*, 55(1), 151–162.
- Evans, J. G. (1972). *Land snails in archaeology*. Seminar Press, London and New York.
- Faly, L. I., & Brygadyrenko, V. V. (2014). Patterns in the horizontal structure of litter invertebrate communities in windbreak plantations in the steppe zone of the Ukraine. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 414–420.

- Ferreira, F. C., & Petrere Jr., M. (2008). Comments about some species abundance patterns: Classic, neutral, and niche partitioning models. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 1003–1012.
- Fisher, R. A., Corbet, A. S., & Williams, C. B. (1943). The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of animal population. *The Journal of Animal Ecology*, 12, 42–58.
- Gerber, J. (1996). Revision der Gattung *Vallonia* Risso 1826 (Mollusca: Gastropoda: Valloniidae). Hemmen, Wiesbaden (Schriften zur Malakozoologie aus dem Haus der Natur-Cismar, Haus der Natur Cismar. Issue 8).
- Gólas-Siarzewska, M. (2013). Malacofauna of the Wawel Hill in Cracow (Poland) – a quarter of a century after its first description. *Folia Malacologica*, 21(1), 19–23.
- Gural-Sverlova, N. V., & Gural, R. I. (2012). *Vyznachnyk nazemnykh moljuskiv Ukraïny* [Guide to the terrestrial mollusks of Ukraine]. Lviv (in Ukrainian).
- Hall, L. S., Krausman, P. R., & Morrison, M. L. (1997). The habitat concept and a plea for standard terminology. *Wildlife Society Bulletin*, 25(1), 173–182.
- Hermida, J., Ondina, M. P., & Rodríguez, T. (2000). The relative importance of edaphic factors on the distribution of some terrestrial gastropod species: Autecological and synecological approaches. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 46, 265–274.
- Hermida, J., Outeiro, A., & Rodríguez, T. (1993). Aspectos ecológicos de *Vallonia pulchella* (Müller, 1774) (Gastropoda, Pulmonata). *Nova Acta Cientifica Compostelana (Biologia)*, 4, 129–135.
- Horsák, M. (2003). How to sample mollusc communities in mires easily. *Malacologica Bohemoslovaca*, 2, 11–14.
- Horsák, M., Hájek, M., Tichý, L., & Juříčková, L. (2007). Plant indicator values as a tool for land mollusc autecology assessment. *Acta Oecologica*, 32(2), 161–171.
- IUSS Working Group WRB (2007). World reference base for soil resources 2006, first update 2007. *World Soil Resources Reports No 103*. FAO, Rome.
- Juříčková, L., Horsák, M., Cameron, R., Hylander, K., Mikovcová, A., Hlaváč, J. Č., & Rohovec, J. (2008). Land snail distribution patterns within a site: The role of different calcium sources. *European Journal of Soil Biology*, 44(2), 172–179.
- Keamey, M. P., & Cameron, R. A. D. (1979). *A field guide to the land snails of Britain and North West Europe*. William Collins Sons and Company, Ltd., London.
- Khalafayn, A. A. (2007). *Statistica 6: Statisticheskij analiz dannykh* [Statistica 6: Statistical Analysis of the Data]. Bean-Pres, Moscow (in Russian).
- Kharytonov, M., Babenko, M., Velychko, O., & Pardini, G. (2018). Prospects of medicinal herbs management in reclaimed minelands of Ukraine. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 527–532.
- Khaytun, S. D. (2005). *Kolichestvennyy analiz sotsial'nykh yavleniy. Problemy i perspektivy* [Quantitative analysis of social phenomena. Problems and prospect]. KomKniga Publisher, Moscow (in Russian).
- Kirby, K. N., & Gerlanc, D. (2013). BootES: An R package for bootstrap confidence intervals on effect sizes. *Behavior Research Methods*, 45(4), 905–927.
- Koralewska-Batura, E., & Błoszyk, J. (2007). Stability of malacocoenoses in an ash-elm forest based on two-year observations. *Folia Malacologica*, 15(4), 175–180.
- Kul'bachko, Y. L., & Unkov's'ka, S. I. (2008). *Kharakteristika fauny nazemnykh bryukhonogikh moljuskov iskusstvennykh drevesnykh nasazhdeniy i rekultivirovannykh territoriy v g. Zheltye Vody* [Characteristic of terrestrial snails fauna of artificial stands and rehabilitated territories in the town of Zhovti Vody]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 16(1), 128–132 (in Russian).
- Kuźnik-Kowalska, E., & Proćkow, M. (2016). Reproductive biology and growth of two *Vallonia* species in laboratory conditions (Gastropoda: Eupulmonata: Valloniidae). *Folia Malacologica*, 24(4), 265–273.
- MacArthur, R. H. (1957). On the relative abundance of bird species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(3), 293–295.
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Mandelbrot, B. B. (1983). *The fractal geometry of nature*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Martin, K., & Sommer, M. (2004). Relationships between land snail assemblage patterns and soil properties in temperate-humid forest ecosystems. *Journal of Biogeography*, 31(4), 531–545.
- May, R. M. (1975). Patterns of species abundance and diversity. In: Cody, M. L., & Diamond, J. M. (Eds.). *Ecology and evolution of communities*. Harvard University Press, Cambridge.
- McClain, C. R., & Nekola, J. C. (2008). The role of local-scale processes on terrestrial and deep-sea gastropod body size distributions across multiple scales. *Evolutionary Ecology Research*, 10(1), 129–146.
- Millar, A. J., & Waite, S. (1999). Mollusks in coppice woodland. *Journal of Conchology*, 36, 25–48.
- Motomura, I. (1932). On the statistical treatment of communities. *Zoological Magazine*, 44, 379–383.
- Müller, J., Strätz, C., & Hothorn, T. (2005). Habitat factors for land snails in European beech forests with a special focus on coarse woody debris. *European Journal of Forest Research*, 124(3), 233–242.
- Myšák, J., Horsák, M., Svobodová, E., & Cemohorsky, N. (2013). Small-scale distribution of terrestrial snails: Patterns of species richness and abundance related to area. *Journal of Molluscan Studies*, 79(2), 118–127.
- Nekola, J. C. (2003). Large-scale terrestrial gastropod community composition patterns in the Great Lakes region of North America. *Diversity and Distributions*, 9(1), 55–71.
- Nekola, J. C., & Smith, T. M. (1999). Terrestrial gastropod richness patterns in Wisconsin carbonate cliff communities. *Malacologia*, 41(1), 253–270.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Wagner, H. (2017). *Community Ecology Package*. R package version 2.4-5.
- Ondina, P., Hermida, J., Outeiro, A., & Mato, S. (2004). Relationships between terrestrial gastropod distribution and soil properties in Galicia (NW Spain). *Applied Soil Ecology*, 26(1), 1–9.
- Ondina, P., Mato, S., Hermida, J., & Outeiro, A. (1998). Importance of soil exchangeable cations and aluminium content on land snail distribution. *Applied Soil Ecology*, 9(1), 229–232.
- Pielou, E. C. (1975). *Ecological diversity*. Wiley, New York.
- Preston, F. W. (1948). The commonness, and rarity, of species. *Ecology*, 29(3), 254–283.
- Preston, F. W. (1962). The canonical distribution of commonness and rarity. *Ecology*, 43, 185–215.
- Puzachenko, Y. G. (2004). *Matematicheskie metody v ekologicheskikh i geograficheskikh issledovaniyakh* [Mathematical Methods in Ecological and Geographical Studies]. Academy, Moscow (in Russian).
- Schenková, V., Horsák, M., Hájek, M., Hájková, P., & Dítě, D. (2015). Mollusc assemblages of Scandinavian fens: Species composition in relation to environmental gradients and vegetation. *Annales Zoologici Fennici*, 52, 1–16.
- Schenková, V., Horsák, M., Plesková, Z., & Pawlikowski, P. (2012). Habitat preferences and conservation of *Vertigo geyeri* (Gastropoda: Pulmonata) in Slovakia and Poland. *Journal of Molluscan Studies*, 78(1), 105–111.
- Shebanin, V. S., Melnik, S. I., Kramarenko, S. S., & Ganganov, V. M. (2008). *Analiz strukturi populyatsiy* [Analysis of population structure]. MSAU Publishing House, Mykolayiv (in Ukrainian).
- Szybiak, K., Błoszyk, J., Koralewska-Batura, E., & Goldyn, B. (2009). Small-scale distribution of wintering terrestrial snails in forest site: relation to habitat conditions. *Polish Journal of Ecology*, 57(3), 525–535.
- Tokeshi, M. (1993). Species abundance patterns and community structure. *Advances in Ecological Research*, 24, 111–186.
- Uvalieva, K. K. (1990). *Nazemnye moljuskiki Kazakhstana i sopredel'nykh territoriy* [Terrestrial mollusks of Kazakhstan and adjacent territories]. Science, Alma-Ata (in Russian).
- Weaver, K. F., Anderson, T., & Guralnick, R. (2006). Combining phylogenetic and ecological niche modeling approaches to determine distribution and historical biogeography of Black Hills mountain snails (Oreohelidae). *Diversity and Distributions*, 12(6), 756–766.
- Whitney, M. E. (1937). Some observations on the reproductive cycle of a common land snail, *Vallonia pulchella* Mull.; influence of environmental factors. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 47, 299–307.
- Whitney, M. E. (1941). The hermaphrodite gland and germ cells of *Vallonia pulchella*. *Michigan Academy of Science, Arts and Letters*, 26, 311–338.
- Whittaker, R. H. (1965). Dominance and diversity in land plant communities. *Science*, 147, 250–260.
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2/3), 213–251.
- Yorkina, N., Maslikova, K., Kunah, O., & Zhukov, O. (2018). Analysis of the spatial organization of *Vallonia pulchella* (Müller, 1774) ecological niche in Technosols (Nikopol manganese ore basin, Ukraine). *Ecologica Montenegrina*, 17, 29–45.
- Zemoglyadchuk, K. V. (2005). *Vidovoy sostav nazemnykh moljuskov Berezinskogo gosudarstvennogo biosfernogo zapovednika* [Species composition of terrestrial mollusks of the Berezinsky state biosphere reserve]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*, 5(1), 87–90 (in Russian).
- Zhukov, A. V., Zadorozhnaya, G. O., Bets, T. U., & Lyadskaya, I. V. (2013). *Dynamika usadky demovo-litogennykh g'runtyv na chervono-buryh glynah za sharamy* [Dynamics of the shrinkage of the sod-lithogenic soils on the red-brown clays over the layers]. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, 5(3), 425–430 (in Ukrainian).
- Zhukov, O. V., Zadorozhnaya, G. O., Maslikova, K. P., Andrushevich, K. V., & Lyadskaya, I. V. (2017). *Ekologiya tehnosolov* [Ecology of Technosols]. Zhurfond, Dnipro (in Ukrainian).
- Zipf, G. K. (1949). *Human behavior and the principle of least effort*. Addison-Wesley, Cambridge.
- Zverkovskiy, V. M., Sytnyk, S. A., Lovynska, V. M., Kharytonov, M. M., & Mykolenko, S. Y. (2017). Remediation potential of forest-forming species in the reclamation planting. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(3), 64–72.



Determination of antimicrobial activity of some 1,2,4-triazole derivatives

M. S. M. Alrawashdeh

Mu'tah University, Karak, Jordan

Article info

Received 24.03.2018

Received in revised form
29.04.2018

Accepted 30.04.2018

Mu'tah University, Karak, 61710,
P. O. Box 7, Jordan.
E-mail: drmsmr77@yahoo.com

Alrawashdeh, M. S. M. (2018). Determination of antimicrobial activity of some 1,2,4-triazole derivatives. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 9(2), 203–208. doi:10.15421/021830

We carried out MIC of the derivatives of 1,2,4-triazole II (4-((5-nitrofur-2-yl)methyleneamino)-1-propyl-4H-1,2,4-triazolium bromide) and I (N-((5-nitrofur-2-yl)methylene)-4H-4-amino-1,2,4-triazolidium chloride) against *Escherichia coli* ATCC 3912/4 and *E. coli* k88ad, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* k99, *Klebsiella pneumonia* k56 and *Salmonella typhimurium* 144, *S. enteritidis*. All test cultures were sensitive to compound II at concentrations of 1,25–0,039 µg/ml. Similar MIC (0,039 µg/ml) of compounds II and I were set for *E. coli* k88a and *S. aureus* k99 test cultures – 0,156 µg/ml. Only *S. aureus* ATCC 25923 and *K. pneumonia* k56 had sensitivity to ceftriaxone (MIC = 0,097 µg/ml). Antiviral activity of Trifuzol (piperidine 2-[5-(furan-2-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazol-3-ylthio]acetate) and avistim (morpholines 3-(4-pyridyl)-1,2,4-triazol-5-thioacetate) against the chicken infectious bronchitis virus (VIB) strain 4/91 was characterized by a decrease in mortality and pathological changes of chicken embryos (CE) which were induced by the virus. Death of infected CE provoked by the strain 4/91 of VIB in dilution 10^{-3} occurred at 57.1%. The reduction in the percentage of deaths of CE infected by the virus in dilution 10^{-3} in the presence of Avistim was 28.6%, and with Trifuzol 14.3%. The use of avistim and Trifuzol compounds reduced VIB infectious activity when it was cultivated in CE, reducing the titre of the virus (strain 4/91) by 3 lg EID 50 cm⁻³.

Keywords: derivatives of 1,2,4-triazole; Trifuzol; Avistim; antibacterial activity; antiviral activity

Introduction

The compounds of 1,2,4-triazol-5 and 3-nitro-1,2,4-triazole-5 were obtained at the beginning of the 20th century, and considered as effective compounds in decreasing of the influence of many diseases (Gehlen et al., 1964). The typical species in a range of compounds of 1,2,4-triazole are 5-amino-1,2,4-triazole-3-carboxylic and 5-amino-1,2,4-triazole-3-ylacetic acid. The first of these was known at the end of the 19th century. Dyes, plant protection products and antivirals (ribavirin) were synthesized in industry on its basis (Abo-Bakr, 2014).

Derivatives of 1,2,4-triazoles are used in industry, agriculture, veterinary and humane medicine. Among a large number of various agents that have antibacterial, antifungal and antiviral effects, these compounds deserve special attention in veterinary practice (Parchenko, 2011; Pattan et al., 2012; Zoumpoulakis et al., 2012).

The analysis of scientific and technical studies in recent years has shown that the nucleus of 1,2,4-triazole is a structural fragment of antifungal drugs (Fluconazole, Itraconazole), antidepressant (Trazodone, Alprazolam), hepatoprotective, wound healing and antiviral (Thiotriazolin) effects (Plech Tomaz et al., 2013).

Currently 1,2,4-triazoles attract interest in antimicrobial chemotherapy due to their high spectrum of biological activity. The emergence of new pathogens and the difficult problem of resistance give rise to the need for new antimicrobial agents with greater selectivity and low accidental effects (Jyoti Sinha et al., 2017).

Among the compounds that have antibacterial activity, special attention should be paid to 2-pyrazolines, 1,3,4-oxadiazoles, glycosides, salicylates, quinolines, amino acids (glycopeptides), isatins, oxoindoles and triazoles. The spectrum of use of morpholines 2-[5-(pyridine-4-yl)-1,2,4-triazole-3-ylthio]acetate for the treatment and prevention of poultry diseases is very wide. The main indicators for the successful use of any drug in the poultry sector are activation of the general resistance, increa-

se of preservation, growth and development of poultry post-hatching, reduction of the influence of various stress factors, fortification of the immune response to vaccines, prevention of the sickness rate of the poultry in the context of threat of an infectious outbreak (Alrawashdeh, 2008). Some compounds of the triazolin group have a high level of biological activity (Mavrova et al., 2009). So, the cytotoxicity of 21 compounds against thymocytes was proved (Truchlinski et al., 2006), when the turkeys were given 1,2,4-triazole derivatives in comparison with garlic extract and echinovite, there was an increase of leukocytes number, cellular immunity the percentage of phagocytic activity of neutrophils by 2 times. Ognik (2009) has determined the positive effect of 5-oxo-1,2,4-triazole on 11-week-old turkey organisms at the dose of 30 µg/kg of body weight per day and established the antioxidant activity of this compound.

Some strains of microorganisms, in the presence of Lozeval, received resistance to it longer than to other drugs (Ampicillin, Levomycetin). Studying the stability of *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella*, it was established that even after the 20th passage, high sensitivity to Lozeval remains, however this has emerged to a much lesser extent to other antibiotics (Onischiuk, 2004).

The minimum inhibitory concentration of compound 3f(4-[(E)-(3-Phenyl-1H-pyridazol-4-yl)methylidene]-amino)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol) against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* is 3 times lower than the concentration of Ceftriaxon of 1.6125 mg/mL (Malladi et al., 2017).

New synthesized compounds – derivatives of 1,2,4-triazole have had a variable inhibitory effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The minimum inhibitory concentration of (MIC) compounds: 3-(4-chlorophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydro-2H-pyrazolo [30,40:4,5] thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole(4b); 3-(3-nitrophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydro-2H-pyrazolo [30,40:4,5] thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole(4c); 3-(4-nitrophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydro-2H-pyrazolo [30,40:4,5] thiazolo [3,2-b][1,2,4]triazole(4d); 3-(4-bromophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydro-

2H-pyrazolo [30,40:4,5] thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole(4h); 3-(3-nitrophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydroisoxazolo [30,40:4,5] thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazolo(5c)-3-(4-nitrophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydroisoxazolo [30,40:4,5] thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole(5d); 3-(4-bromophenyl)-6-(p-tolyl)-3,3a-dihydroisoxazolo [30,40:4,5] thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole(5h) was 50% lower than the concentration of Chloramphenicol and Streptomycin of 3,125 mg/ml against *B. thuringiensis*. Compounds 4b and 4d provoked the inhibition of growth of *P. aeruginosa* culture at the concentration that was 50% lower than the compared species (Seelam et al., 2016).

Bactericidal activity at a concentration of 10 mg/cm³ was established in 8% of the studied compound. The most promising compound was 1.3.6.8-tetraazatricyclo[4.4.1.1.3.8]dodecan (AI-20, tiotropin), from which were synthesized two derivatives AI-21 (Zn-containing derivative of tetraazadigomoadamantane) and AI-22 (NH₃ retaining derivative tetraazadihydroadamantane). After 24 h of exposure, inactivation of the cultures of *S. aureus* 209P, *E. coli* K12, *E. coli* 195β, *S. enteritidis* occurred at concentrations of tetraazadigomoadamantane not lower than 0,032%, 0,017%, 0,012% and 0,019%, respectively. The antimicrobial activity of the synthesized ilidenhydrazide compounds against *S. aureus* 209P, *E. coli* 675, *S. disenteriae* 1675 E, *Proteus vulgaris* 5, *B. anthracis* 1319, *P. aeruginosa* 165 detects antimicrobial activity, but does not exceed the activity of standard comparison (Danilchenko et al., 2017).

The dynamics of sensitivity of *S. aureus* and *E. coli* strains have been studied. These strains showed a high level of resistance to the preparations of the groups of aminoacid, oxindole, triazole and glycoside despite the presence in molecules of the latest – OH-radicals and phenols, stipulating the antiseptic properties of medicinal substances of this group. Triazole M100 had a bacteriostatic effect only against *S. aureus*, whereas Triazole M129 showed antimicrobial activity only against *E. coli* strains (Thomas et al., 2012).

New alkyl derivatives of 5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol and esters of 2-((5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazol-3-yl)thio)-acetate acid have been investigated in relation to antimicrobial activity. All ten compounds showed moderate activity. The most sensitive was *S. aureus* ATCC 25923 to 3-pentylthio-5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazole, isopropyl 2-((5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and isobutyl 2-((5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate (Pruglo et al., 2016).

The group of antiviral drugs, based on the nucleus of 1,2,4-triazole, is quite wide. It is established that the well-known drug tiotriazolin, which is an S-derivate of 1,2,4-triazole, forwards the improvement of the clinical picture of patients with hepatitis B and C. First of all the antiviral activity of this drug is linked with its immune modulation properties. The widely-known medicinal product ribavirin is a synthetic analogue of nucleoside. *In vitro* it is active against some RNA and DNA viruses.

New derivatives of 1,2,4-triazole were created. They are different from the morpholine 5-methyl-1,2,4-triazole-3-ylthioacetate-tiotriazolin, which realized antiviral activity in inadequate degree. These derivatives reduce the infectious activity of the VIB virus, strain H – 120 for 1,8 lg, and strain Calnek 1143 of Poultry Infectious Encephalomyelitis virus at 1,0 lg when cultivating in 9-day chicken embryos (CE). In this case, the compound actions affected the intensity of displaying the pathological features induced by the virus. New compounds that are derivatives from 1,2,4-triazole provide antiviral activity with low toxicity and could be used in pharmacology to create new drugs for this type of action (Bushueva et al., 2017).

Research on effectiveness of Trifuzole vaccination against viral diseases of broilers has been performed on the experimental group. This group did not receive Trifuzol. The control group received 1% Trifuzol solution at 7–9 day of bird breeding at the rate of 0,5 ml per 10 kg of live weight for 3 consecutive days. The level of protective antibodies against VIB responded to the base norm, but the vaccination index (IV) in the control group was 1.5 times higher. The average antibodies titre to the Newcastle disease virus with use of the Trifuzol was 5 log₂, and the group immunity – 87.5%, which corresponds to the standard (Varynskyi et al., 2015). When piperidine 2-[5-(furan-2-yl)-2H-1,2,4-triazol-3-ylthio]acetate was added to the culture medium 2 h after the

virus adsorption, the largest antiviral activity for the whole long period of its reproduction was observed 120 h after the start of infection. The infectious activity decreased by more than 4.75 lg TCD₅₀/cm³, and the compound of comparison Thiotriazolin decreased the virus to more than 2,0 lg TCD₅₀/cm³ (the difference between them exceeded 2.5 lg). This indicates the greater antiviral action of piperidine 2-[5-(furan-2-yl)-2H-1,2,4-triazole-3-ylthio] acetate compared to Thiotriazolin (Sinha, 2017).

The studied compounds reduce the intensity of pathological changes in infected chicken embryos, which have been induced by vaccine virus strains. Starting with 0.01% concentration, the compounds suppress the occurrence of pathological changes induced by viruses. Thus, the percentage of changes such as hyperemia, thickening of the chorionallantoic membrane (CAM), embryonic head hemorrhage, lag in growth and development, the clay of the liver decrease during the simultaneous injection of the piperidine 2-[5-(furan-2-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazole-3-ylthio] acetate and (morpholine 2-[5-(pyridine-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetate in 0.01%, 0.02% concentration. Thus, the morpholine 2-[5-(pyridine-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetate and piperidine 2-[5-(furan-2-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetate cause the decrease the biological activity of the viruses that affected the intensity of the manifestation of patho-anatomical fetures, induced by the virus and reduced is titre (Alrawashdeh, 2008).

The analysis of scientific sources against the synthesis and screening of biological activity of derivatives of 1,2,4-triazole determines the relevance of this direction of scientific research all over the world. Spreading of the spectrum of antimicrobial agents is associated with the emergence of resistant strains of microorganisms and the viruses' variability, especially in the poultry industry. In this regard, the aim of our research was to determine the sensitivity of bacteria, isolated from chickens, to new triazolin compounds and their antiviral activity.

Materials and methods

For bacteriological studies, blood and red bone marrow from 1-day, 10-day and 21-day Hubbard cross chickens were collected. Sensitivity of microorganisms to antibiotics was carried out relative to NCCLS "Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents" (1999) and EUCAST Definitive document CLSI "Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems" (2015).

List of compounds, studied in the research:

I – N-((5-Nitrofuran-2-yl)methylene)-4H-4-amino-1,2,4-triazolium chloride (formula 1);

II – 4-((5-Nitrofuran-2-yl)methyleneamino)-1-propyl-4H-1,2,4-triazolium bromide (formula 2);

Avistim – morpholines 3-(4-pyridyl)-1,2,4-triazolil-5-thioacetate (formula 3);

Trifuzol – piperidine 2-[5-(furan-2-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetate (formula 4);

The compounds were synthesized in Zaporizhzhya State Medical University, Ukraine.

Dimethylformamide (DMF) – N,N-Dimethylformamide (formula 5);

Ceftriaxone – [6R-[6α,7β(z)]]-7-[[[(2-Amino-4-thiazolil)methoxyminoacetyl]amino]-8-oxo-3-[[[(1,2,5,6-tetrahydro-2-metil-5,6,1b)rcj-1,2,4-triasin-3-yl]tio]metil]-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]octa-2-ene-2-carboxylic acid (formula 6);

Preparation of solutions and serial dilutions of the studied substances. The compounds are synthesized in Zaporizhzhya State Medical University, Ukraine.

The dilution of compounds I and II were prepared from 1:20 to 1:0.039 based on a matrix solution (dilution of compounds 1:40 in DMF) on the sterile physiological solution for 24 units of McFarland.

Ceftriaxone is a dry powder for injection of 1,000 active units (1 g), was diluted in 2 ml of meat infusion broth (MIB), and a working solution of 500 units/ml was obtained. Then dilutions were repeated, by adding 1 ml of the working solution of antibiotic with 500 units/ml to 4 ml of MIB. Thus, the working solution was obtained at a concentration of 100 units/ml. Subsequently 1 ml of MIB was added to the same solution

and received 50 units/ml (McFarland 0.5). Thus, the tested concentrations of Ceftriaxone were from 25 to 0.0488 units.

Preparation of inoculum of test cultures. Typical representatives of Gram-positive and Gram-negative bacteria were selected as test objects: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and k99; *Escherichia coli* ATCC 3912/41 i k88 ad.; *Klebsiella pneumoniae* k56 and *Salmonella typhimurium* 144. For the production of inoculums of microorganism cultures, daily cultures were grown on Mueller-Hinton Agar (HiMedia Laboratories Ltd., India).

Inoculum was prepared from the daily culture of microorganisms, on MIB. The inoculum concentration was 0.5 units by MacFarland, which is 1.5×10^8 CFU/ml. The working concentration of the inoculum was 5 CFU/ml (10^6 CFU/ml).

Serial dilutions in the broth were accompanied by control of crop growth in MIB without the use of compounds I or II, Ceftriaxone and DMF.

The purity of the suspension of microorganisms was confirmed by sowing on agar, followed by Gram-staining and microscopy. The assessment of sensitivity of microorganisms to the studied compounds was carried out on the basis of a minimum inhibitory concentration (MIC). The results of the experiment were taken into account after the assessment control of the inoculums, which was at temperature 40 °C and in the thermostat (37 °C).

Disc-diffusion method. Disks of sterile filter paper, 5 mm diameter, were soaked in appropriate concentrations of the studied compounds I and II. The content of the studied compounds on the disk was 25 and 50 µg. Petri dishes with the Muller-Hinton agar were sown by test culture in the concentration equal to the turbid standard McFarland 0.5. After that the disks, which contained the test substances and antibiotics, were replaced on the agar surface, in accordance to the stencil. Petri dishes were maintained at room temperature for 30 minutes and placed in the thermostat at the temperature of 8 °C in an inverted position. Antibiotics: Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Levomycetin, Erythromycin, Azithromycin, Josamycin, Cefuroxime, Ceftriaxone, Cefepime, Gentamicin, Amoxicillin were control. In 24 h, the sensitivity of test-cultures to compounds I and II was determined by the diameter of retardation zone (Patel, 2013).

Studying of antiviral activity of triazolin range compounds against the virus of the infection of chicken bronchitis. Chicken embryos (CE) were incubated in a laboratory. Biological evaluation of eggs was carried out according to the recommendations of Dyadichkin (2010) and Besarabov (2010). Vaccine strain that was used in this research: the lyophilized live vaccine against chicken bronchitis infectious (Nobilis IB 4-91, virus titer 10^6 EID₅₀/cm³). The preparation of the virus from 10^{-1} to 10^{-4} was prepared in a sterile physiological solution. The determination of the antiviral activity of the compounds of Trifuzol and Avistim in concentration 1% was carried out by simultaneous infection by the strain of 4/91 VIB of chicken embryos 9-day incubation on the CAM in a dose of 0.2 cm³. The incubation of infected and control CE were carried out in a laboratory incubator at the temperature of 37 °C and a humidity of 65% for 4 days. Evaluation of pathological changes induced by VIB strain 4/91 and the effects of triazolin range compounds, selection of the restrictive virus material were carried out at 4 days incubation of CE and pre-cooling at the temperature of 40 °C for 12 h. The criterion for assessing the reproduction of the virus was pathological changes in the embryo, special to the action of the virus and the titre of the virus, which was calculated by Reed and Mench and expressed in EID₅₀/cm³ (Stefanov, 2001).

Statistical processing of the results. Statistical data were processed by a program Statistica 7.0 (StatSoft, USA) (Rebrova, 2006).

Results

Strains of *E. coli* and *S. aureus* were isolated from 1, 10 and 21-day chickens. As a result of serological typing, there were 78 enterotropic bacteria cultures, 87% of them were classified into serological variants of k88 ad; k88 ad, ab; k99. *E. coli* and *S. aureus* were detected from the blood of 1-day chickens, *E. coli* of serovar k 88 ad were detected from the red bone marrow, whereas in the blood of 10-day old chickens – *E. coli* serovar k 88 ad, ab and *S. aureus* k99 were detected. *E. coli*

serovariants k99 were isolated from red bone marrow of 21-day old chickens. The frequency of detection of *S. aureus* – 16.2% and *E. coli* – 13.2% (Fig. 1).

Isolated strains of *E. coli* and *S. aureus* had the highest sensitivity to erythromycin (diameter of the growth inhibition zones 32 ± 3.5 mm and 25 ± 2.8 mm respectively).

Both *S. aureus* and *E. coli* were sensitive to gentamicin (diameter of the growth inhibition zones 19 ± 2.1 mm and 21 ± 2.3 mm respectively). In this case, the *S. aureus* culture had an average sensitivity to Doxycycline. Thus, microorganism cultures isolated from chickens at different incubation periods have the high sensitivity to antibiotics of the Macrolide and Aminoglycoside classes.

The evaluation of isolated *E. coli* 88 showed the resistance to Doxycycline (diameter of the growth inhibition zone 2.5 ± 0.27 mm), Josamycin (4.3 ± 0.47 mm), and Azithromycin (5.1 ± 0.56 mm). The resistance of *S. aureus* k99 was also detected to Azithromycin, Josamycin, Ceftriaxone and Ciprofloxacin. In the subsequent study we expanded the antibiotics spectrum of different groups and tested the potential antimicrobial action of new derivatives of 1,2, 4-triazole.



Fig. 1. Clinically sick chicken Hubbard cross (a) and pathological changes in chicken with coli bacillosis (b)

Antimicrobial activity of triazolin compounds. The sensitivity to Cefuroxim was shown by *E. coli* ATCC 3912/41 and *S. aureus* ATCC 25923. The diameter of the growth inhibition zone exceeded the norm for this antibiotic. Cultures, which were isolated from the chickens, stayed insensitive to Cefuroxim.

E. coli ATCC 3912/41 detected high sensitivity to Ceftriaxone that also exceeded the normative index. All studied cultures were highly susceptible to Gentamicin and only test-cultures were susceptible to Ciprofloxacin and Norfloxacin. The sensitivity of *S. aureus* culture, isolated both from the chickens and among the museum strains, should be noted.

Antibacterial activity of the new triazolin range compounds can be compared with the normative indices, in the case of their sensitivity to the action of Cefuroxim, Cefepim, Norfloxacin, Levomycetin, and Doxycycline in the growth delay zone, as tested and as isolated cultures (Table 1).

Table 1

Antibacterial activity of the investigated compounds compare to antibiotics (M ± m)

Drug class or subclass / antibiotic	The content of the antibiotic on the disk, µg	The diameter of the growth inhibition zone, mm			
		<i>E. coli</i> , 5×10 ⁵ CFU/cm ³		<i>S. aureus</i> , 5×10 ⁵ CFU/cm ³	
		K88 ad	ATCC O55 K59 912/41	ATCC 25923	K99
Erythromycin	15	32 ± 3.5	15.3 ± 0.5	16.2 ± 0.1	25 ± 2.77
Azithromycin	15	5.1 ± 0.56	—	—	3.6 ± 0.4
Josamycin	15	4.3 ± 0.47	—	—	2.3 ± 0.25
Cefuroksim	30	6.2 ± 0.68	19.4 ± 0.4	24.3 ± 0.2	8.5 ± 0.94
Ceftriaxone	30	7.8 ± 0.86	23.3 ± 0.5	—	4.6 ± 0.51
Cefepim	30	6.5 ± 0.72	—	—	8.9 ± 0.98
Amoxicilin	20	10.1 ± 1.12	—	—	8.6 ± 0.95
Ofloxacin	5	—	24.0 ± 0.82	—	27.6 ± 0.24
Ciprofloxacin	5	9.3 ± 1.03	34.0 ± 0.1	30.1 ± 0.7	4.9 ± 0.54
Norfloxacin	10	10 ± 1.11	22.6 ± 0.24	18.5 ± 0.3	9.6 ± 1.06
Doxycycline	30	2.5 ± 0.27	—	—	12.3 ± 1.36
Gentamicin	120	21 ± 2.33	22.0 ± 0.7	20.5 ± 0.5	19.0 ± 2.1
Levomycetin	30	—	17.8 ± 0.48	21.4 ± 0.1	27.3 ± 0.48
N-((5-Nitrofur-2-yl)methylene)-4H-4-amino-1,2,4-triazolium chloride (I)	50	15.8 ± 1.55	13.5 ± 2.14	—	0
4-((5-Nitrofur-2-yl)methylene-amino)-1-propyl-4H-1,2,4-triazolium bromide (II)	50	17.8 ± 1.44	17.8 ± 0.25	—	18.8 ± 1.65
	25	14.8 ± 1.7	13.5 ± 1.20	—	14.0 ± 1.47
	50	12.0 ± 2.16	14.8 ± 2.05	—	17.3 ± 0.47

Note: “—” — not sensitive.

The detection of sensitivity of test cultures and isolated strains of *E. coli* and *S. aureus* to new derivatives of 1,2,4-triazolo N-((5-nitrofur-2-yl)methylene)-4H-4-amino-1,2,4-triazolium chloride (I) and 4-((5-nitrofur-2-yl)methylenemino)-1-propyl-4H-1,2,4-triazolium bromide (II), in comparison with the antibiotics of different groups, indicates their antimicrobial action. The most effective antimicrobial

activity was shown by the compound I at a concentration of 50 µg against the *S. aureus* (diameter of inhibition of growth zone 18.8 ± 1.65 mm). The compound I had lower activity with respect to *E. coli* (17.8 mm), respectively, serovariant k88 ad and ATCC 3912/41. Compound II inhibited the growth of *S. aureus* k99 (diameter of inhibition of growth zone 17.3 mm).

The detection of antimicrobial activity of triazolinium group compounds by the method of serial dilutions. The experimental data on effect of compounds I and II indicates the high bactericidal and bacteriostatic effects of the compound on the epizootic strains of bacteria, isolated from chicken. The minimum bactericidal concentration of compound II for *E. coli* k88 ad cultures was 0.039 µg/ml. The minimum inhibitory concentration of compound II to *S. aureus* k99 culture was 0.16 µg/ml (Table 2).

Table 2

Antibacterial activity of Triazoline compounds

Strains of microorganisms	Inhibitory concentration (MIC) interpretive criteria, µg/ml			
	I	II	Ceftriaxone	DMF
<i>E. coli</i> K88 ad	0.039	0.039	—	—
<i>E. coli</i> ATCC O55K59 3912/41	—	0.625	—	—
<i>S. aureus</i> K99	0.156	0.156	—	—
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	—	0.039	0.097	—
<i>K. pneumoniae</i> K56 3534/51	—	1.250	0.097	—
<i>S. typhimurium</i> 144	—	0.313	—	—

Note: “—” — not sensitive.

The detection of antiviral activity of 1,2,4-triazole derivatives in relation to strain 4/91 of the infectious bronchitis chicken virus. The compounds of Trifuzol and Avistim in concentration 1% used simultaneously with infection by the VIB strain 4/91 in dilutions 10⁻¹ to 10⁻⁴ in 9-day CE on CAM reduced infectious activity of the virus, depending on its concentration. We detected the reduction at 14.3% of the pathological symptom “the incorrect embryo position” in CE, which were infected by VIB strain 4/91 in dilution of 10⁻¹ with Avistim against CE, which were infected by only the virus at the same concentration. There was a decrease in the percentage of this feature in CE, infected with the VIB strain 4/91 in dilution 10⁻² with Avistim 12.5%.

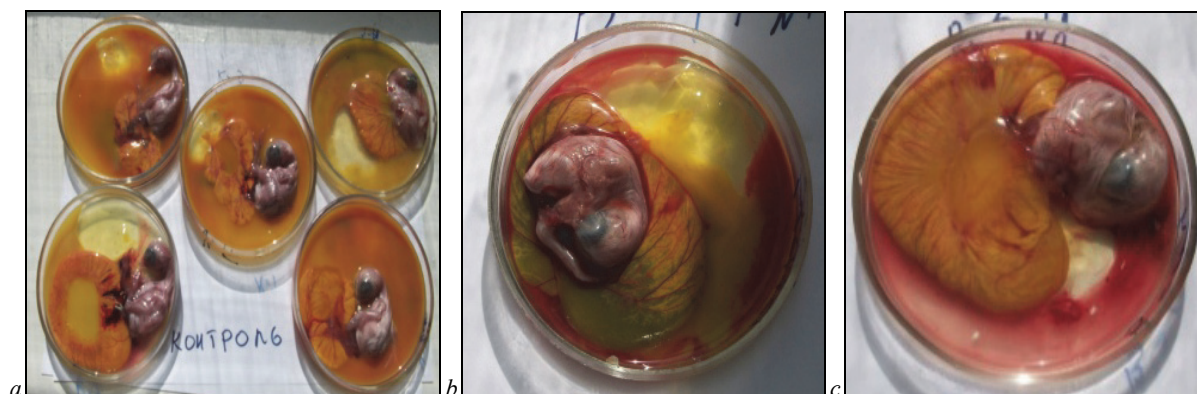


Fig. 2. CE infected with VIB strain 4/91: a – control; b – infected by VIB in dilution 10⁻²; c – infected VIB in dilution 10⁻¹ simultaneously with Avistim; d – infected with VIB in dilution 10⁻³ simultaneously with Avistim

The increase of this feature occurred after the injection of the virus at a concentration of 10⁻³ simultaneously with Avistim, that was 28.5%. The decrease in the percentage of CE with an increased amount of extraembryonic liquid was registered after the injection of the virus in studied concentrations, with Avistim at the same time.

Thus, the reduction of this index (by 73.2%) occurred in CE which had been infected by 10⁻³ dilution of the virus with Avistim, when compared with CE which were infected with the virus at the same concentration without Avistim.

In the control CE group and the groups that have been injected only by Avistim or Trifuzol, in contrast to the experimental CE, the amount of allantoic fluid decreased. The presence of uremic salts in CE of these

groups was observed at the level of 85.7% in the control group, and 28.5% after the injection of Avistim, and 14.3% in the group receiving Trifuzol. When compared with the CE control group, the percentage of this index in CE infected by the virus in dilution 10⁻¹ decreased by 56.9%, whereas in the CE group after the injection of Avistim, the difference was 57.5%. The percentage of uremic salts in allantoic fluid infected by the virus at a concentration of 10⁻³ and infected by the virus at a concentration of 10⁻³ with Avistim was 14.3%, which is believed to be lower than control by 71.4% (Fig. 3).

In the CE group, infected by the virus from dilution of 10⁻³ simultaneously with Trifuzol, the presence of uremic salts was detected at a large value, and was 42.9%.

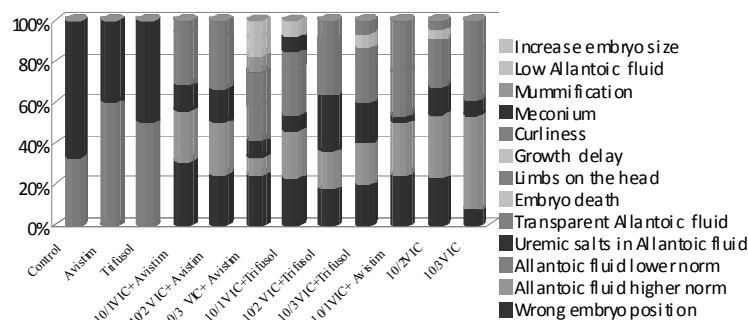


Fig. 3. Pathological changes in CE, induced by VIB with the studied compounds

Transparent allantoic fluid in CE was present in the group which had been injected by the virus in the studied concentrations, in contrast to the control group and CE groups which had been injected by Avistim and Trifuzol. The highest percentage of transparent allantoic fluid was observed in CE infected by the virus in dilution of 10^{-1} (71.4%), the lowest rate index in CE, infected by the virus in dilution 10^{-2} (25.0%). This index remained stable in CE infected by all investigated concentrations with the simultaneous injection of Trifuzol compounds and amounted to 42.9%. In the CE group infected with the virus in combination with Avistim, this feature decreased simultaneously with the decrease of virus concentration.

The highest death rate of the embryo was in the CE group infected by the virus in dilution 10^{-3} (57.1%). The death of the embryos rose to 28.5%, while in the CE infected by the virus at the same concentration simultaneously with Avistim and in the group infected by Trifuzol the death rate was 42.9%. The position of the embryos during the autopsy in many cases was accompanied by the sticking of the limbs to the head, which is one of the specific reproduction features of the bronchitis infectious virus in CE. At the same time, the highest percentage was noted in CE infected with the virus in dilution 10^{-3} , was 85.7%. The decrease of this indicator occurred both with a decrease in the concentrations of the virus, and with the simultaneous injection of the virus and the studied compounds. The lowest percentage of CE with the limbs on the head was in the group CE which were infected with different dilutions with the simultaneous Trifuzol injection, which was 14.3%.

The percentage of CE with limbs on the head in the CE group, which was infected with the virus, simultaneously with infection of Avistim was lower than in CE which had been infected with only the virus, however it was higher than in the CE group with Trifuzol.

Growth delay was marked in CE infected by the virus at the concentrations of 10^{-2} , 10^{-3} (12.5% and 14.3% respectively) and in the group infected by the virus in dilution 10^{-3} simultaneously with Trifuzol (14.3%). The Avistim and Trifuzol compounds reduce the VIB infectious activity during its cultivation in CE, reducing the titre of the virus (strain 4/91) by 3 lg EID₅₀/cm³.

Discussion

Use of the preparations, containing the nucleus of 1,2,4-triazole into the veterinary practice is increasing very rapidly (Dal Pozzo & Thiry, 2014; Krajczyk et al., 2014; Jefferey et al., 2015; Wenda et al., 2017).

Search for new antiviral and antibacterial means is being undertaken all over the world. This is connected with the emergence of new variants of viruses and antibiotic-resistant bacteria (Wang & Zhou, 2011; de Oliveira et al., 2012; Asif, 2015). Testing a number of triazole derivative compounds that were obtained as the result of directed synthesis has proven their ability to suppress the reproduction of test-cultures of microorganisms (Zhuo Chen et al., 2010; Ferreira et al., 2013).

Derivatives of 1,2,4-triazole are distinguished among other drugs by the capacity for a wide range of biological activity and low toxicity. The priority of their use in antimicrobial therapy is confirmed by the prolonged effect of the formation of resistance bacteria (Siddiquia et al., 2011; Gross & Bryson, 2015). Reduction of the infectious activity of the infectious bronchitis virus (strain 4/91) in the EC biosystem, caused by Trifuzol and Avistim, makes it possible to register them as antiviral and immunomodulatory agents for use in veterinary medicine.

Investigation of the compound 2-[5-(furan-2-yl-4-phenyl-1,2,4-triazolo-3-ylthio)] acetate on 9-day chicken embryos against the action of the infectious encephalomyelitis virus (Calnek 1143 strain) and the infectious bronchitis virus H-120 revealed the decrease of titre of strain H-120 at 1.8 log and strain Calnek 1143 at 1.0 log (Parchenko et al., 2009; Fotina, 2015).

A comparative assessment of the sensitivity *E. coli* and *S. aureus* cultures, isolated from chickens and test-cultures, against new triazolin compounds with the results of antibacterial drug sensitivity proves that they are worth studying further. The growth inhibition zones of test-cultures, caused by compounds I and II, were indexed in the range from 12.0 to 18.8 mm. Norfloxacin, Levomycitin, Doxycycline and Eritromycin induced similar inhibition of growth zones of test-cultures, simultaneously. Sahu (2014) defined the MIC of new compounds that are derivatives of 1,2,4-triazole compare to Gentamycin. By the method of dilutions, it was determined that MIC ranges for compounds against *E. coli* and *S. aureus* were from 1.6 to 25.0 mg/ml, and for Gentamycin for these test-cultures – 1.6 mg/ml. The diameter of inhibition of growth zone of test-cultures of *E. coli* and *S. aureus*, induced by the compounds, changed from 0.6 to 5.0 mm, while for Gentamycin – 16.0 mm.

According to Malladi (2013), MIC of Ceftriaxon for *E. coli* was 1.61 mg/ml and for *S. aureus* – 3.13 mg/ml. Seelam (2016) showed the ability of triazolin compounds to suppress the growth of *E. coli* test-culture (MTCC 433) at MIC from 50 to 3.13 mg/ml. In this case, Streptomycin and Chloramphenicol had a MIC of 6.25 mg/ml.

Wahi et al. (2011) proved the antimicrobial activity of new derivatives of 1,2,4-triazole by the method of serial dilutions. Only 2 compounds out of the 8 compounds were indexed against Gram-negative and Gram-positive bacteria in low MIC (3.12 mg/ml). MIC of the compounds against *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium sporogenes*, *Salmonella typhimurium* ranged from 3.12 to 50 mg/ml. The standard example had a lower MIC (1.56–6.25 mg/ml).

In research by Popiolek et al. (2013), MIC of novel 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives against Gram-negative and Gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 10876, *M. luteus* ATCC 10240) ranged from 15.6 to 500 mg/ml. The inhibitory concentration of Ceftriaxone on *S. epidermidis* ATCC 12228 was 0.24 mg/ml, and for *B. cereus* ATCC 10876 – 62.5 mg/ml.

Screening of 15 new derivatives of 1,2,4-triazole with antibacterial activity made by Bektaş et al. (2010) detected for 4 compounds: MIC for *E. coli* ATCC 25923 $\geq$ 500 mg/ml to 1.95 mg/ml. *S. aureus* ATCC 25923 was susceptible to these compounds in the range of 1.95 to 500 mg/ml. Ampicillin had a higher MIC compared to *E. coli* (10 mg/ml) and 35 mg/ml – to *S. aureus*. The ability of new derivatives of 1,2,4-triazole to have an effect against the bacterial and viral pathogens of poultry infections, has been carried out in the process of the research, and is the basis for their use in schemes for prevention of infectious diseases. The agents of Trifuzol and Avistim have antiviral action against the chicken infectious virus bronchitis strain 4/91 (reduction of the virus titre by 3.0 logs). In this case, defined antiviral activity was higher than the data obtained by Fotina et al. (2015), against the VIB strain N-120 and the virus of encephalomyelitis of bird strain Calnek 1143.

The biological activity of the new derivatives of 1,2,4-triazole, determined by us against the different groups of microorganisms, proves the prospect of their further use in veterinary medicine.

Conclusion

Antibacterial activity of compounds I and II against collection strains, isolated from broiler chickens is established. Against *S. aureus*, compound I in 50 µg concentration on a disk, induced the growth inhibition zone at 18.8 ± 1.65 mm and for *E. coli* – 17.8 ± 1.44 – 17.8 ± 0.25 mm respectively to serovariants k88 ad and ATCC 3912/41. Compound II in a concentration of 50 µg on a disk induced the growth inhibition zone of *S. aureus* 99, isolated from chicken broilers, at a level of 17.3 mm. Trifuzol and Avistim cause antiviral activity against the VIB strain 4/91 during cultivation in EC. The percentage of deaths of EC infected with the virus in dilution 10^{-3} in the presence of Avistim was lower by 28.6%, and with Trifuzol lower by 14.3%. The Avistim and Trifuzol compounds reduced the VIB infectious activity when it was cultivated in CE, reducing the titre of the virus (strain 4/91) by $3.0 \log \text{EID}_{50}/\text{cm}^3$.

References

- Abo-Bakr, A. M. (2014). Synthesis and antibacterial activity of some new functionalized derivatives of 4-amino-5-benzyl-4H-[1,2,4]-triazole-3-thione. *International Journal of Science and Research*, 3(11), 15–23.
- Alrawashdeh, M. S. (2008). Vplyv preparatu VPK-108 na cilyarnu aktivnist' epiteliyu kuryachoyi traxeji, infikovanoji virusom infekciynoho bronxitu kurej [Influence of the preparation VPK-108 on the ciliary activity of the epithelium of the chicken trachea, infected by the virus of infectious chicken bronchitis]. *Collection of Scientific Works of the Lugansk National Agrarian University*, 92, 4–8 (in Ukrainian).
- Asif, M. (2015). Antiviral and antiparasitic activities of various substituted triazole derivatives: A mini review. *Chemistry International*, 1(2), 71–80.
- Bektaş, H., Karaali, N., Şahin, D., Demirbaş, A., Karaoglu, Ş. A., & Demirbaş, N. (2010). Synthesis and antimicrobial activities of some new 1,2,4-triazole derivatives. *Molecules*, 15(4), 2427–2438.
- Bessarabov, B. F. (2010). Otsenka kachestva yaits selskochozyaystvennoi ptitsy [Evaluation of the egg quality in poultry]. *Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K. I. Scriabin, Moscow* (in Russian).
- Cao, X., Wang, W., Wang, S., & Bao, L. (2017). Asymmetric synthesis of novel triazole derivatives and their *in vitro* antiviral activity and mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 718–725.
- Chen, Z., Xu, W., Liu, K., Yang, S., Fan, H., Bhadury, P. S., Hu, D.-Y., & Zhang, Y. (2010). Synthesis and antiviral activity of 5-(4-chlorophenyl)-1,3,4-thiadiazole sulfonamides. *Molecules*, 15(12), 9046–9056.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard, 7th ed. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). *Verification of commercial microbial identification and antimicrobial susceptibility testing systems*. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Dal Pozzo, F., & Thiry, E. (2014). Antiviral chemotherapy in veterinary medicine: Current applications and perspectives. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)*, 33(3), 791–801.
- Danilchenko, D. M., & Parchenko, V. V. (2017). Antimicrobial activity of new 5-(furan-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives. *Zaporozhye Medical Journal*, 19(1), 105–107 (in Ukrainian).
- de Oliveira, C. S., Lira, B. F., Barbosa-Filho, J. M., Lorenzo, J. G. F., & de Athayde-Filho, P. F. (2012). Synthetic approaches and pharmacological activity of 1,3,4-oxadiazoles: A review of the literature from 2000–2012. *Molecules*, 17(9), 10192–10231.
- Diadichkina, L. F., Pozdniakova, N. S., & Holovatskikh, O. V. (2010). Rukovodstvo po biologicheskomu kontroliu pri inkubatsii yaits selskochoziaistvennoi ptitsy [Guidelines for biological control during egg incubation in agricultural poultry]. *RSRUTU of Poultry, Sergiev Posad* (in Russian).
- Fotina, G. A., & Fotina, T. I. (2015). Application of the immunomodulator "Avestim TM" in the conditions of the farm for the cultivation of geese. *Visnyk of Zhytomyr National Agroecological University*, 44, 78–83 (in Ukrainian).
- Gehlen, H., & Schade, W. (1964). 1,2,4-Triazolin-5-ones. IV. Formation of 1,2,4-triazolin-5-ones from substituted acylsemicarbazides. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 675(1), 180–188.
- Gross, A. E., & Bryson, M. L. (2015). Oral ribavirin for the treatment of noninfluenza respiratory viral infections. *Annals of Pharmacotherapy*, 49(10), 1125–1135.
- Krajczyk, A., Kulinska, K., Kulinski, T., Hurst, B. L., Craig, W. D., Smeets, D. F., Ostrowski, T., Januszczyk, P. (2014). Antivirally active ribavirin analogues – 4,5-disubstituted 1,2,3-triazole nucleosides: Biological evaluation against certain respiratory viruses and computational modeling. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23, 161–171.
- Malladi, S., Isloor, A. M., Isloor, S., Akhila, D. S., & Fun, H.-K. (2013). Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new pyrazole based Schiff bases. *Arabian Journal of Chemistry*, 6(3), 335–340.
- Malladi, S., Venkata Nadh, R., Suresh Babu, K., & Suri Babu, P. (2017). Synthesis and antibacterial activity studies of 2,4-di substituted furan derivatives. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(4), 345–354.
- Mavrova, A. T., Wesselinova, D., Tsenov, Y. A., & Denkova, P. (2009). Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 63–69.
- Musser, J. M. B., Heatley, J. J., Koinis, A. V., Suchodolski, P. F., Guo, J., Eskandon, P., Tisard, I. R. (2015). Ribavirin inhibits parrot bornavirus 4 replication in cell culture. *PLoS One*, 10(7), e0134080.
- Ognik, K., & Sembratovith, I. (2009). Influence of synthesized 5-oxo-1,2,4-triazine derivative on some immunological and hematological indices of turkey. *Journal of Applied Animal Research*, 36(2), 235–237.
- Parchenko, V. V. (2011). Antivirushnaya aktivnost' proizvodnykh 1,2,4-triazola [Antiviral activity of 1,2,4-triazole derivatives]. *Pharmaceutical Journal*, 2011, 49–53 (in Ukrainian).
- Patel, J. B., Sharp, S., & Novak-Weekley, S. (2013). Verification of antimicrobial susceptibility testing methods: A practical approach. *Clinical Microbiology Newsletter*, 35(13), 103–109.
- Pattan, S. R., Gadhave, P., Tambe, V., Dengale, S., & Thakur, D. (2012). Synthesis and evaluation of some novel 1,2,4-triazole derivatives for antimicrobial, anti-tubercular, anti-inflammatory activities. *Indian Journal of Chemistry*, 51B, 297–301.
- Plech, T., Wujec, M., Kosikowska, U., Malm, A., Rajtar, B., Palz-Dacewicz, M. (2013). Synthesis and *in vitro* activity of 1,2,4-triazole ciprofloxacin hybrids against drug-susceptible and drug-resistant bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 128–134.
- Popielek, L., Kosikowska, U., Mazur, L., Dobosz, M., & Malm, A. (2013). Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 22(7), 3134–3147.
- Sahu, J. K., Ganguly, S., & Kaushik, A. (2014). Synthesis of some novel heterocyclic 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as possible antimicrobial agents. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(2), 81–86.
- Seelam, N., Shrivastava, S. P., & Prasanthi, S. (2016). Supriya gupta synthesis and *in vitro* study of some fused 1,2,4-triazole derivatives as antimycobacterial agents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20, 411–418.
- Siddiqui, N., Ahsan, W., Alam, M. S., Ali, R., Jain, S., Azad, B., Akhtar, J. (2011). Triazoles: As potential bioactive agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 8(1), e029.
- Sinha, J., & Kadawla, M. (2017). Triazoles as antimicrobial: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 5(2), 1–7.
- Thomas, E., Ghany, M. G., & Liang, T. J. (2012). The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23, 1–12.
- Varynskyi, B. O., Knysh, Y. G., Parchenko, V. V., & Panasenko, O. I. (2015). Quantitative analysis of piperidin-1-ium((5-(2-furyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, substance of veterinary drug "Tryfuzol", in poultry meat by LC-DAD-MS. *Aktualni Pytannia Farmatsevtichnoji i Medychnoji Nauky ta Praktyky*, 18, 25–31.
- Wahi, A. K., Singh, A., & Singh, A. K. (2011). Determination of minimum inhibitory concentration (mic) of some novel triazole derivative. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1(4), 1108–1114.
- Wang, Y., & Zhou, C. H. (2011). Recent advances in the researches of triazole compounds as medicinal drugs. *Scientia Sinica Chemica*, 41, 1429–1456.
- Zoumpoulakis, P., Camoutsis, C., Pairs, G., Pitsas, A. (2012). Synthesis of novel sulfonamide-1,2,4-triazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,3,4-oxadiazoles, as potential antibacterial and antifungal agents. *Biological evaluation and conformational analysis studies*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(4), 1569–1583.



The effect of third-generation aromatase inhibitors on aromatase activity in visceral adipose tissue

D. V. Lytkin, A. L. Zagayko, T. O. Briukhanova

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 06.03.2018

Received in revised form
29.03.2018

Accepted 04.04.2018

National University of
Pharmacy, Pushkinska st.,
53, Kharkiv, 61002,
Ukraine.
Tel.: +38-050-287-69-71.
E-mail:
d.v.lytkin@gmail.com

Lytkin, D. V., Zagayko, A. L., & Briukhanova, T. O. (2018). The effect of third-generation aromatase inhibitors on aromatase activity in visceral adipose tissue. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 209–215. doi:10.15421/021831

Pathogenesis and clinical manifestations of metabolic syndrome (and other conditions characterized by the growth of fat mass and decreased adiponectin content) is associated with an imbalance of sex hormones, which develops under the influence of increased aromatase activity in adipose tissue. Drugs of the aromatase inhibitors therapeutic group are able to suppress the course of the aromatase reaction in the central and peripheral organs and tissues. The aim of our study was to establish the relationship between levels of serum adiponectin and adipose tissue aromatase activity in Syrian hamsters of different ages and gender with experimental metabolic syndrome and study the effect of aromatase inhibitors on these indicators. Experimental metabolic syndrome in animals was induced by a high-fat and fructose diet. The drugs were administered during the 21-st day in doses of 3.086 (exemestane), 0.309 (letrozole) and 0.126 mg/kg (anastrozole). The aromatase activity of the visceral adipose tissue was determined by the modified kinetic method based on the amount of the reaction product estradiol converted from testosterone. The content of estradiol in adipose tissue homogenate and serum adiponectin levels were measured by the immune enzyme method. The results showed a high inverse correlation between serum adiponectin and adipose tissue aromatase activity in hamsters. Aromatase inhibitors caused a decrease in the adipose tissue aromatase activity and increase in serum adiponectin levels. Letrozol demonstrated the greatest effect, it reduced aromatase activity in adipose tissue by 72–84% and increased serum adiponectin content by 1.6–1.8 times. At the same time, intra-group correlation of the studied parameters was significant. The results show the relationship between adiponectin level and adipose tissue aromatase activity and ability to change these rates by the way of aromatase inhibitors, which may be useful in clinical practice. Third-generation aromatase inhibitors are promising drugs for metabolic syndrome treatment and require further study in clinical trials.

Keywords: exemestane; letrozole; anastrozole; adiponectin; metabolic syndrome

Вплив інгібіторів ароматази третього покоління на ароматазну активність вісцеральної жирової тканини

Д. В. Литкін, А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Патогенез та клінічні прояви метаболічного синдрому (та інших станів, що характеризуються зростанням жирової маси та зниженням вмісту адипонектину) асоційовані з дисбалансом статевих гормонів, який розвивається за впливу зростання активності ароматази в жировій тканині. Препарати групи інгібіторів ароматази здатні пригнічувати перебіг ароматазної реакції в центральних і периферичних органах і тканинах. Мета цього дослідження – встановити взаємозв'язок між рівнем сироваткового адипонектину й ароматазною активністю жирової тканини на тлі експериментального метаболічного синдрому у сирійських хом'яків різного віку та статі та вивчення впливу інгібіторів ароматази на ці показники. Експериментальний метаболічний синдром у тварин індукували дієтою з високим вмістом жирів та фруктози. Препарати застосовували впродовж 21 доби в дозах 3,086 (екземестан), 0,309 (летрозол) та 0,126 мг/кг (анастрозол). Ароматазну активність вісцеральної жирової тканини визначали модифікованим кінетичним методом за кількістю продукту реакції – естрадіолу, що утворився з тестостерону. Вміст естрадіолу в гомогенаті жирової тканини та рівень сироваткового адипонектину визначали імуноферментним методом. Результати дослідження показали високу зворотну кореляцію між рівнем сироваткового адипонектину та ароматазною активністю жирової тканини у хом'яків. Застосування інгібіторів ароматази сприяло зменшенню ароматазної активності жирової тканини та зростанню рівня адипонектину в сироватці. Найбільший ефект продемонстрував препарат летрозол, що знижував активність ароматази в жировій тканині на 72–84% та збільшував вміст адипонектину в сироватці в 1,6–1,8 раза. При цьому внутрішньогрупова кореляція досліджуваних показників була значущою. Результати дослідження показують наявність взаємозв'язку між рівнем адипонектину й ароматазною активністю жирової тканини та можливість впливати на ці показники шляхом фармакокорекції, що може бути використано в клінічній практиці. Інгібітори ароматази третього покоління можуть стати перспективними препаратами для лікування метаболічного синдрому та потребують подальшого вивчення в клінічних дослідженнях.

Ключові слова: екземестан; летрозол; анастрозол; адипонектин; метаболічний синдром

Ароматазний ферментний комплекс – останній елемент ланки біосинтезу стероїдів, завдяки якому каталізуються реакції конверсії андрогенів в естрогени. В ході ароматизації стероїди андрогенового ряду C_{19} реагують із NADPH і киснем у декілька етапів окисного гідроксилування, після чого відбувається ароматизація кільця А та втрата одного атома карбону у формі форміатної кислоти, таким чином утворюються продукти C_{18} . Цей тип реакції потребує двох ензимів, що входять до комплексу: цитохрому $P_{450arom}$ та NADPH-цитохром P_{450} редуктази. Головні ендogenousні субстрати ароматазної реакції в організмі людини – тестостерон і андростендіон, а продукти – естрадіол і естрон, відповідно (Blakemore & Naftolin, 2016; Chan et al., 2016; Ghosh et al., 2016).

Цей ферментний комплекс міститься в ендоплазматичному ретикулумі різних клітин, присутніх в яєчниках, плаценті, молочних залозах, матці, яєчках, мозку, жировій тканині тощо. Таким чином, у цих органах може відбуватися утворення естрогенів *de novo* або із транспортованих до них з інших тканин і депонованих там андрогенів (Biegon, 2016; Chan et al., 2016). Особливий інтерес у медицині викликає інтраутеринна ароматаза, зокрема, молочної залози. В атипових естрогензалежних клітинах пухлини молочної залози надмірно посилюється локальна ароматазна активність, при цьому експресується велика кількість естрогенових рецепторів. Локально утворені та циркулюючі естрогени через відповідні рецептори та сигнальні шляхи стимулюють експресію генів та синтез внутрішньоклітинних білків, що стимулюють проліферацію клітин та сприяють росту пухлини, секрецію сигнальних білків, які індукують механізми метастазування (Ozkaya et al., 2016; Zhao et al., 2016).

Для зменшення цього негативного стимулювального ефекту в сучасній клінічній практиці використовують інгібітори ароматази, які суттєво зменшують активність цього ферментного комплексу в центральних і периферичних органах і, як наслідок – зменшують кількість потенційних лігандів до естрогенових рецепторів у пухлині. Молекули препаратів цієї групи мають стероїдну та триазольну структуру та здатні в ролі псевдосубстрату зворотню або незворотно блокувати активний центр ароматази, тим самим робити фермент неактивним і недоступним для субстрату. Крім того, препарати триазольного походження ще здатні інактивувати реакційну здатність атома феруму у складі гему цитохрому P_{450} . Незважаючи на досить інваріативний механізм дії, інгібітори ароматази третього покоління відзначаються значущою клінічною ефективністю та успішно застосовуються в ад'ювантній терапії естроген-рецептор позитивного раку молочної залози (здебільшого у пацієнток постменопаузного віку), навіть у випадках відсутності відповіді на лікування антиестрогенними препаратами першої лінії терапії. Антиароматазні препарати третього покоління характеризуються високою селективністю до відповідного ензиму та володіють задовільним профілем безпеки (Mantas et al., 2016; Viciano & Martí, 2016; Mojaddami et al., 2017).

Низка клінічних досліджень із використання інгібіторів ароматази третього покоління вказує на часткове помірне зниження ефективності застосування препаратів саме у пацієнток із зайвою вагою та надмірним індексом маси тіла. При цьому в усіх пацієнток незалежно від конституції істотно зменшувався рівень естрогенів, що циркулюють у крові. На нашу думку, цей факт може вказувати на те, що більша кількість препарату розподілилася у висцеральну жирову тканину, місцево зв'язалася з ароматазним комплексом із пригнічуванням його активності та не досягла органа-мішені молочної залози та тканин навколо, через що менше інгібувалася місцева продукція естрогенів в області пухлини. У більшості випадків висновком результатів досліджень виступала необхідність корекції доз у таких пацієнток (Pfeiler et al., 2013; Ioannides et al., 2014; Lønning et al., 2014). Проте ми вважаємо, що така особливість цих препаратів може бути застосована в терапії захворювань, у патогенезі яких має місце гіпер-

продукція естрогенів, викликана збільшенням ароматазної активності саме висцеральної жирової тканини.

Слід зазначити, що висцеральна жирова тканина продукує значну кількість естрогенів в організмі людини, частина з яких депонується у тканині, а частина – переходить до кровообігу. Близько третини циркулюючих естрогенів утворюється шляхом ароматизації андрогенів у жирових депо організму. У жінок після настання менопаузи жирова тканина практично переймає функцію продукування естрогенів. Хоча більш типовий продукт для жирової тканини – естрон, що володіє помірно естрогенною активністю, також за рахунок тестостерону вона може продукувати значну кількість більш функціонально активного естрадіолу. Обидва продукти зв'язуються з естрогеновими рецепторами всіх типів (проте з різною афінністю) та запускають у клітинах відповідний сигнал, у тому числі в ракових (Blakemore & Naftolin, 2016; Chan et al., 2016).

Серед усіх клітин жирової тканини значною мірою ароматазу експресують лише преадипоцити, що з диференціацією втрачають таку властивість. Таким чином, загальна ароматизація та продукція естрогенів у жировій тканині залежить від загальної кількості преадипоцитів, а значить від загального розміру жирових депо. Збільшення вмісту жирової тканини в організмі сприяє зростанню кількості продукованих нею естрогенів. У свою чергу естрогени викликають зростання жирової тканини через індукцію проліферації преадипоцитів (нетиповий механізм), які починають виробляти ще більше естрогенів, що лише посилює цей процес (Dos Santos et al., 2010; Bulun et al., 2012; Chan et al., 2016).

Одне з найпоширеніших захворювань, що характеризується патологічною зміною ароматазної активності жирової тканини, – метаболічний синдром. Дисбаланс статевих гормонів за метаболічного синдрому, асоційований зі зміною активності зазначеного ензиму, посідає одне з центральних місць у патогенезі вказаної патології та відповідно впливає на механізми розвитку всіх його патогенетичних компонентів і маніфестації клінічних проявів (ожиріння, дисліпідемія, підвищена глюкоза натщесерце, інсулінорезистентність) (Guamer-Lans et al., 2011; Kim & Halter, 2014).

Визначають високу кореляцію між вмістом естрогенів (особливо естрону – головного продукту периферійної ароматизації) в сироватці крові зі ступенем ожиріння та індексом маси тіла у пацієнтів як чоловічої, так і жіночої статі (Newbold et al., 2009; Cao et al., 2012; Jones et al., 2013; Boonchaya-anant et al., 2016). Посилення росту жирової тканини та збільшення ароматазної активності викликає ще більшу продукцію естрогенів, частина з яких мобілізується в системний кровообіг. Таким чином, у більшості хворих на метаболічний синдром реєструють збільшення вмісту естрогенів (здебільшого естрону) у плазмі крові (Kim & Halter, 2014). Дисбаланс статевих гормонів зі збільшенням плазматичного рівня естрогенів, асоційований із гіперглікемією та діабетом, негативно впливає на вуглеводний обмін, зменшує чутливість клітин до інсуліну через зниження експресії інсулінзалежного транспортера глюкози GLUT4, у зв'язку з чим у таких пацієнтів реєструють істотно збільшений індекс HOMA-IR (Xu et al., 2008). Надмірний рівень естрогенів провокує розвиток дисліпідемії не тільки опосередковано через збільшення обсягу жирової тканини, а і прямими механізмами дії на естрогенові рецептори печінки та підвищенням активності гормонзалежної ліпопротеїноліпази жирової тканини (Gao et al., 2008; Comitato et al., 2015).

Все зазначене вище дає змогу висловити гіпотезу, що за метаболічного синдрому істотно зростає ароматазна активність висцеральної жирової тканини, а інгібітори ароматази, імовірно, можуть корегувати активність цього ензиму у преадипоцитах, що може впливати на перебіг метаболічного синдрому взагалі або на його окремі складові.

Нині одним із найінформативніших прогностичних маркерів перебігу метаболічного синдрому та низки інших станів, в основі яких має місце порушення обміну вуглеводів (інсулінорезистентність, підвищення глюкози натщесерце) та ліпідів (гіперліпідемія, ожиріння), є рівень адипонектину в крові. За цих захворювань рівень адипонектину знижується, на відміну від інших

адипокінів, і має чітку кореляцію з рівнем ліпідів, ліпопротеїдів та HOMA-IR (Von Frankenberg et al., 2014; Ding et al., 2015). Слід зазначити, що адипонектин має здатність впливати на проліферацію та диференціювання преадипоцитів, а також є дані, що його вміст зворотно корелює із щільністю кісткової тканини та масою вісцерального жиру (Kömer et al., 2005; Richards et al., 2007; Matsushita et al., 2013). Ці факти можуть вказувати на імовірний взаємозв'язок між обміном естрогенів, ароматазною активністю жирової тканини та рівнем адипонектину в сироватці крові.

Мета цього дослідження – визначити ароматазну активність жирової тканини та її кореляції з умістом сироваткового адипонектину на тлі експериментального метаболічного синдрому у тварин, а також визначення впливу застосування інгібіторів ароматази на досліджувані показники.

Матеріал і методи досліджень

Досліджено 200 аутобредних сирійських хом'ячків (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839) обох статей віком 1,0 і 2,5 місяця (на момент початку експерименту). Піддослідні тварини утримувалися у виварії ЦНДІ Національного фармацевтичного університету згідно зі стандартними санітарними нормами у рекомендованих для цього виду тварин умовах. Кожен етап дослідження проводили відповідно до біотичних норм, установлених директивою Ради ЄС 86/609 ЄЕС від 24 листопада 1986 р. про дотримання законів, постанов і адміністративних положень держав ЄС із питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети.

Перед початком експерименту тварин зважували та розподіляли на чотири рандомізовані за віком і статтю кластери по 50 тварин у кожному, що, у свою чергу, поділялися на 5 аналогічних груп по 10 тварин. Експозиція експериментальних груп сформована згідно зі встановленою метою дослідження:

- група 1 – інтактні тварини без модельної патології;
- група 2 – тварини з експериментальною контрольною патологією;
- група 3 – тварини з експериментальною патологією, які отримали препарат екземестан;
- група 4 – тварини з експериментальною патологією, які отримали препарат летрозол;
- група 5 – тварини з експериментальною патологією, які отримали препарат анастрозол.

Модельну патологію аліментарного метаболічного синдрому у тварин індукували модифікованою висококалорійною дієтою з високим умістом жирів та вуглеводів (із високою часткою фруктози), наближеною до «дієти кафетерію», що викликало додаткове поглинання калорій шляхом добровільної гіперфагії (Dalbøge et al., 2015; Wong et al., 2016). У межах цієї моделі тварин утримували на такому раціоні протягом 6 тижнів. Тварин із групи інтактного контролю утримували на стандартному збалансованому раціоні для хом'ячків упродовж усього експерименту.

Як фармакокоректори ароматазної активності жирової тканини тварин застосовували інгібітори ароматази третього покоління, зареєстровані на території України: препарат із класу стероїдних інгібіторів ароматази екземестан (Екземестан-Віста[®], табл. 25 мг, No 30, № UA/14554/01/01) та препарати з класу триазольних інгібіторів ароматази летрозол (Летромара[®], табл. 2,5 мг, No 30, № UA/4698/01/01) та анастрозол (Анастрозол Сандоз[®], табл. 1 мг, No 28, № UA/13575/01/01).

Добові дози препаратів, еквівалентні для тварин (AED), розраховані згідно з останніми рекомендаціями щодо проведення доклінічних досліджень з урахуванням середньотерапевтичних добових доз для людини та міжвидової різниці маси та площі поверхні тіла (Naig & Jacob, 2016). Таким чином, добові дози препаратів для хом'ячків склали: екземестану – 3,086 мг/кг, летрозолу – 0,309, анастрозолу – 0,126 мг/кг.

Після відтворення стійкого метаболічного синдрому у тварини починали застосовувати відповідні інгібітори ароматази. Необхідну індивідуальну для кожної тварини кількість препара-

ту зважували та диспергували в одному мілілітрі очищеної води та вводили внутрішньошлунково за допомогою спеціального зонда один раз на добу упродовж 21 доби. Для відтворення рівних умов експерименту тваринам із групи негативного та позитивного контролю вводили 1 мл очищеної води упродовж цього періоду. Уведення тваринам лікарських засобів і плацебо здійснювали щодоби о 9.00–9.30 натщесерце перед контрольним зважуванням. Необхідну для тварини кількість препарату корегували, враховуючи масу тіла на поточну добу. Протягом зазначеного періоду раціон тварин усіх груп залишався незмінним, що дозволяє оцінити вплив саме препаратів, а не зміни способу життя, на оцінювання показників і перебіг метаболічного синдрому.

Після курсового застосування препаратів упродовж 21 доби (або еквівалентного часу очікування в разі позитивного та негативного контролю) всіх тварин виводили з експерименту під хлорало-уретановим наркозом шляхом декапітації та відбирали біологічний матеріал. Заздалегідь перед евтаназією тварини були позбавлені вільного доступу до їжі. У декапітованих тварин збирали кров для отримання сироватки (де визначали вміст адипонектину) та хірургічно вилучали мезентеральну вісцеральну жирову тканину (для оцінювання ароматазної активності).

Слід зазначити, що наразі не існує однієї уніфікованої, ефектної та економічно доцільної методики визначення активності ароматази в жировій тканині, тому ми використовували модифіковану методику визначення цього показника на основі декількох праць і особисто отриманих емпіричних даних – кінетичне визначення активності ароматази за кількістю продукту реакції імуноферментним методом (Sun et al., 2007; Tinwell et al., 2011).

Гомогенат отримували з 1 г жирової тканини в 3 мл 0,1 М калій фосфатного буфера (pH = 7,4) за низької температури, для кращої солюбілізації жирових клітин додавали 0,015 г лаурил сульфату, після чого отриманий гомогенат проходив два цикли заморожування/розморожування задля руйнування клітинних мембран. Вміст білка в гомогенаті визначали після осадження центрифугуванням із трихлороцтовою кислотою та перерозчиненням в 0,1 Н розчині натрію гідроксиду методом Лоурі в модифікації Хартрі (метод Міллера в модифікації Хартрі). Після реакції утворення біуретового мідного комплексу та взаємодії реактиву Фоліна з тирозином і цистеїном у пептидних ланцюгах інтенсивність забарвлення виміряли проти бланка за 650 нм (Redmile-Gordon et al., 2013).

Активність ароматази визначали за отриманням продукту естрадіолу з доданого до реакційної суміші надлишку тестостерону та NADPH. Оскільки тестостерон – не переважаючий субстрат для ароматази жирової тканини, а естрадіол – не переважаючий продукт цієї реакції, їх вміст у жировій тканині досить помірний, що дає змогу визначити зміну концентрації.

Для проведення реакції в пробірку додавали 1 мл отриманого гомогенату, 29 мкмоль тестостерону та 200 мкмоль NADPH. Додавання NADPH ініціювало ароматазну реакцію. Після чого пробу інкубували на термостатувальному шейкері Immuno Chem-2200 (HTI, США) упродовж 30 хвилин за температури 37 °C. Із відповідного зразка гомогенату також готували нульову пробу, без додавання компонентів реакції та інкубування, де вимірювали вихідну кількість естрадіолу. Після інкубування реакцію призупиняли еквімолярним додаванням HCl до відмітки pH = 7,0. Проби центрифугували практично за 5 000 g і відбирали супернатант для імуноферментного аналізу.

Кількісне визначення естрадіолу в супернатанті та адипонектину в сироватці крові проводили імуноферментним методом ELISA за допомогою відповідних стандартних наборів реактивів Естрадіол ІФА (ТОВ «ХЕМА», Україна) та Hamster Adiponectin ELISA Kit (LifeSpan BioSciences Inc., США) згідно з інструкцією до застосування на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 303 plus (Awareness Technology, США).

Отримані результати розраховані статистико-логістичним методом 4PI за допомогою інтернет-сервісу для вільного використання MyAssays[®] і додатково статистично оброблені із застосуванням непараметричних методів аналізу (Mann-Whitney U-Test)

за допомогою стандартного пакета комп'ютерної програми Statistica 7.0. Взаємозв'язки між ознаками визначали за показником коефіцієнта лінійної кореляції Пірсона та оцінювали їх силу за шкалою Чеддока. Для кращого інтерпретування результатів і уникнення низки помилок під час тестування статистичних гіпотез застосовано інтервали вірогідності $P < 0,05$ та $0,01$.

Результати

За впливу тривалої висококалорійної дієти з високим вмістом жирів і фруктози в усіх тварин незалежно від статі та віку спостерігали збільшення ароматазної активності жирової тканини та зменшення вмісту адипонектину в сироватці крові, що узгоджується із загальними уявленнями щодо перебігу експериментального метаболічного синдрому. Також у піддослідних тварин визначали значну зворотну кореляцію між цими двома показниками, що може свідчити про високу ймовірність наявності взаємних регуляторних механізмів (табл. 1).

Таблиця 1

Кореляційний зв'язок між ароматазною активністю жирової тканини та рівнем адипонектину в сироватці крові

Експериментальні тварини	Тварини віком 2,5 місяця (на початок експерименту)		Тварини віком 1 місяць (на початок експерименту)	
	самці	самиці	самці	самиці
Тварини, які не отримували інгібітори ароматази	-0,898	-0,859	-0,839	-0,701
Тварини, які отримували екземестан (внутрішньогрупової кореляції)	-0,764	-0,721	-0,613	-0,637
Тварини, які отримували летрозол (внутрішньогрупової кореляції)	-0,821	-0,865	-0,860	-0,674
Тварини, які отримували анастрозол (внутрішньогрупової кореляції)	-0,791	-0,798	-0,706	-0,670

У самців хом'ячків віком 2,5 місяця на початок експерименту, на тлі модельної дієти вірогідно зростав рівень ароматазної активності втричі та зменшувався вміст адипонектину в сироватці у 2,7 раза (табл. 2). Наявність досить високої, за шкалою Чеддока, зворотної кореляції цих показників та практично пропорційна їх зміна у зрілих самців свідчить про високу прогностичну значущість визначення показника ароматазної реакції в жировій тканині за експериментальних патологій, що характеризуються зменшенням рівня адипонектину та порушенням метаболізму в жировій тканині (метаболічний синдром, ожиріння тощо).

За впливу екземестану, що вводився дозою 3,086 мг/кг у самців даної групи з високою вірогідністю зменшувався ступінь ароматизації у вісцеральній жировій тканині на 75,5% порівняно з аналогічним показником тварин із групи контрольної патології ($P < 0,01$). У свою чергу, рівень адипонектину в сироватці крові цих тварин вірогідно зростав практично удвічі. Внутрішньогруповий коефіцієнт кореляції між показниками в цій групі був зворотним високим ($R = -0,764$).

Застосування у зрілих самців антиароматазних препаратів триазольної будови викликало вірогідне зменшення активності ароматази в жировій тканині на 84,2% у групі летрозолу та на 78,3% у групі анастрозолу ($P < 0,01$). Слід зазначити, що цей показник ароматизації за дії препаратів із високим ступенем вірогідності був навіть меншим за інтактне значення. Летрозол і анастрозол сприяли зростанню рівня адипонектину у тварин із метаболічним синдромом майже в 2,4 та 2,3 раза відповідно, була зафіксована тенденція до нормалізації цього показника, але все ж таки були наявні статистичні відмінності від значень інтактної групи ($P < 0,05$). Сила зворотного взаємозв'язку між показниками у цих групах за шкалою Чеддока була високою.

Ароматазна активність вісцеральної жирової тканини у самиць віком 2,5 місяця на початок експерименту на тлі аліментарного метаболічного синдрому вірогідно зростала в 2,8 раза, а рі-

вень сироваткового адипонектину, навпаки, зменшувався майже удвічі. Крім того, простежувалася чітка зворотна залежність між двома досліджуваними показниками (табл. 3). Також висока кореляція між показниками в цій групі зберігалася всередині груп, де застосовували інгібітори ароматази.

Таблиця 2

Вплив інгібіторів ароматази на специфічні показники перебігу метаболічного синдрому в самців хом'ячків зрілого віку ($x \pm SD$, $n = 10$)

Експериментальна група	Ароматазна активність жирової тканини за естрадіолом, пмоль/мг білка×год.	Адипонектин у сироватці крові, нг/мл
Інтактний контроль	$0,251 \pm 0,024$	$221,19 \pm 10,34$
Контрольна патологія	$0,751 \pm 0,064^{**}$	$81,59 \pm 4,32^{**}$
Екземестан	$0,184 \pm 0,017^{***\#}$	$164,78 \pm 7,85^{***\#}$
Летрозол	$0,119 \pm 0,013^{***\#}$	$192,33 \pm 5,41^{***\#}$
Анастрозол	$0,163 \pm 0,022^{***\#}$	$186,94 \pm 6,27^{***\#}$

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно тварин групи інтактного контролю за рівня значущості $P < 0,05$, ** – за рівня значущості $P < 0,01$; # – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології за рівня значущості $P < 0,05$, *** – за рівня значущості $P < 0,01$.

За впливу внутрішньошлункового введення екземестану впродовж 21 доби ароматазна активність жирової тканини зменшувалася та майже не відрізнялася від аналогічного показника в інтактній групі, а вміст адипонектину в сироватці крові зростав практично в 1,6 раза порівняно з контрольною патологією. Застосування летрозолу в дозі 0,309 мг/кг та анастрозолу в дозі 0,126 мг/кг зменшувало інтенсивність ароматизації в жировій тканині на 75,3% і 72,9% відповідно, що було вірогідно менше за показник інтактного контролю. Рівень адипонектину в сироватці тварин групи летрозолу достовірно зростав майже в 1,8 раза, а в групі анастрозолу – в 1,7 раза порівняно з контрольною патологією.

Таблиця 3

Вплив інгібіторів ароматази на специфічні показники перебігу метаболічного синдрому у самиць хом'ячків зрілого віку ($x \pm SD$, $n = 10$)

Експериментальна група	Ароматазна активність жирової тканини за естрадіолом, пмоль/мг білка×год.	Адипонектин у сироватці крові, нг/мл
Інтактний контроль	$0,360 \pm 0,026$	$151,78 \pm 7,39$
Контрольна патологія	$1,016 \pm 0,080^{**}$	$75,90 \pm 3,65^{**}$
Екземестан	$0,307 \pm 0,025^{***\#}$	$119,65 \pm 4,32^{***\#}$
Летрозол	$0,251 \pm 0,024^{***\#}$	$134,66 \pm 3,90^{***\#}$
Анастрозол	$0,275 \pm 0,018^{***\#}$	$126,09 \pm 5,61^{***\#}$

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно тварин групи інтактного контролю за рівня значущості $P < 0,05$, ** – за рівня значущості $P < 0,01$; # – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології за рівня значущості $P < 0,05$, *** – за рівня значущості $P < 0,01$.

Імуноферментний аналіз супернатанта з гомогенату вісцеральної жирової тканини та сироватки крові самиць хом'ячків віком один місяць на початку експерименту показав збільшення активності ароматази практично в 4,9 раза та зменшення вмісту адипонектину удвічі за модельної висококалорійної дієти (табл. 4). Сила зворотного кореляційного зв'язку між цими показниками у тварин, що не отримували інгібітори ароматази, була високою.

Високи за шкалою Чеддока зворотні коефіцієнти кореляції також в інших групах, де застосовували препарати, крім групи екземестан, де сила зворотного зв'язку показників досить чітко простежувалась.

Усі досліджувані препарати зменшували ароматазну активність жирової тканини до рівнів, що статистично не відрізнялись від інтактних значень. Проте відновлення нормального рівня адипонектину відбувалося лише у тварин, що отримували летрозол. У групах екземестану та анастрозолу сироватковий вміст адипонектину зростав практично в 1,7 та 1,8 раза відповідно, проте зберігалася вірогідна відмінність від інтактних значень.

Слід зазначити, що в групі анастрозолу показник вмісту адипонектину у тварин мав тенденцію до нормалізації ($P < 0,05$).

Таблиця 4

Вплив інгібіторів ароматази на специфічні показники перебігу метаболічного синдрому в самиць хом'яків молодого віку ($x \pm SD$, $n = 10$)

Експериментальна група	Ароматизаційна активність жирової тканини за естрадіолом, пмоль/мг білка×год.	Адипонектин у сироватці крові, нг/мл
Інтактний контроль	$0,126 \pm 0,016$	$201,33 \pm 6,46$
Контрольна патологія	$0,615 \pm 0,058^{**}$	$102,45 \pm 4,21^{**}$
Екземестан	$0,174 \pm 0,023^{###}$	$175,03 \pm 5,16^{**###}$
Летрозол	$0,168 \pm 0,017^{###}$	$188,10 \pm 4,27^{###}$
Анастрозол	$0,159 \pm 0,020^{###}$	$180,82 \pm 3,66^{###}$

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно тварин групи інтактного контролю за рівня значущості $P < 0,05$, ** – за рівня значущості $P < 0,01$; # – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології за рівня значущості $P < 0,05$, ### – за рівня значущості $P < 0,01$.

У молодих самиць хом'яків на тлі експериментального метаболічного синдрому рівень ароматизаційної активності жирової тканини збільшувався в 2,1 раза, а рівень адипонектину зменшувався в 1,8 раза. Кореляція в цій групі найменша з усіх аналогічних груп за віком та статтю, займала проміжний рівень між високою та помітною кореляцією за шкалою Чеддока. В середині експериментальних груп тварин, які отримували препарат, кореляція також найнижча – помітна, серед усіх аналогічних груп. Проте така сила зв'язків теж свідчить про ймовірну наявність взаємозв'язку між показниками (табл. 5). У самиць хом'яків віком один місяць на початок експерименту всі досліджувані препарати приводили до нормалізації показника ароматизаційної активності жирової тканини та значуще збільшували показники вмісту адипонектину в сироватці, що з невеликим ступенем вірогідності відрізнялися від інтактного значення ($P < 0,05$).

Таблиця 5

Вплив інгібіторів ароматази на специфічні показники перебігу метаболічного синдрому самиць хом'яків молодого віку ($x \pm SD$, $n = 10$)

Експериментальна група	Ароматизаційна активність жирової тканини за естрадіолом, пмоль/мг білку×год.	Адипонектин у сироватці крові, нг/мл
Інтактний контроль	$0,274 \pm 0,025$	$159,09 \pm 7,19$
Контрольна патологія	$0,589 \pm 0,060^{**}$	$88,78 \pm 4,10^{**}$
Екземестан	$0,304 \pm 0,034^{###}$	$137,88 \pm 6,12^{*###}$
Летрозол	$0,270 \pm 0,031^{###}$	$141,49 \pm 4,62^{*###}$
Анастрозол	$0,320 \pm 0,020^{###}$	$134,09 \pm 5,54^{*###}$

Примітки: * – відмінності вірогідні відносно тварин групи інтактного контролю за рівня значущості $P < 0,05$, ** – за рівня значущості $P < 0,01$; # – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології за рівня значущості $P < 0,05$, ### – за рівня значущості $P < 0,01$.

Обговорення

У цьому фрагменті нашого дослідження встановлено чітку зворотну кореляцію між ароматизаційною активністю висцеральної мезентеральної жирової тканини (за вмістом продукту) та вмістом сироваткового адипонектину у сирійських хом'яків різної статі та віку. Отримані дані теоретично обґрунтовуються загальновідомими положеннями щодо метаболізму статевих гормонів та їх зв'язком із перебігом різних метаболічних захворювань, а також не суперечать даним інших дослідників, висвітленим у науковій літературі.

Низка досліджень опосередковано вказує на логічність сформуваної нами гіпотези про взаємозв'язок ароматизаційної активності жирової тканини з рівнем адипонектину. У дослідженні Tworoger et al. (2007) показано, що рівень вільного естрадіолу в жінок із верхнім квартильним показником вмісту плазматичного адипонектину на 27,0% вищий відносно нижньоквартильних показників, до того ж ці дані асоційовані з масою жирової тканини

у пацієнток. Застосування замісної гормональної терапії пероральними препаратами естрадіолу у жінок постменопаузного віку вірогідно зменшувало плазматичний рівень адипонектину практично на 2 мг/л (Kunnapati et al., 2008).

Низка публікацій демонструє імовірний механізм взаємозв'язку зниження рівня адипонектину зі збільшенням ризику розвитку естроген-рецепторпозитивного раку молочної залози у жінок із зайвою вагою та опосередковано торкається можливого впливу адипонектину на загальну ароматизацію в організмі цих пацієнток. У цих дослідженнях високий рівень адипонектину пов'язаний із погіршенням перебігу естрогензалежних форм раку молочної залози, що також може вказувати на залежність рівня естрогенів від вмісту адипонектину в крові. Також було продемонстровано можливий вплив лептину на ароматизацію та перебіг онкологічних захворювань у жінок (Nalabolu et al., 2014; Mauro et al., 2015).

Існують і протилежні дані, що вказують на позитивний вплив естрадіолу на експресію адипонектину, але ці дані показані лише на прикладі тканин скелетних м'язів у щурів та не пов'язані з цими процесами в жировій тканині (Capllonch-Amer et al., 2014). Слід зазначити, що у людей цей гормон, переважно, продукується та секритується в жировій тканині.

Нині вже проведені клінічні дослідження частково продемонстрували значущий вплив застосування інгібіторів ароматази на збільшення рівня адипонектину у жінок постменопаузного віку з раком молочної залози (Akyol et al., 2016), але існують також дані щодо відсутності вірогідного впливу (Pfeiler et al., 2013). У дослідженні, де ефект був відсутнім, проводили короткострокове лікування, а у пацієнтів, які проходили повний курс терапії тривалістю понад 6 місяців, спостерігали збільшення рівня адипонектину. Крім того, вплив препаратів на рівень адипонектину в умовах метаболічного синдрому ще не досліджували.

Застосування інгібіторів ароматази може позитивно впливати на низку окремих станів – компонентів метаболічного синдрому. Короткострокове (28 днів) дослідження застосування летрозолу на здорових чоловіках показало вірогідне зменшення глюкози натщесерце та інсуліну в плазмі крові на 7% і 37% відповідно порівняно з плацебо (Lapauw et al., 2009).

Довгострокове клінічне дослідження щодо наявності взаємозв'язку між стратегією лікування раку молочної залози та конституцією тіла показало, що інгібітори ароматази викликають значне зменшення загальної маси жирової тканини порівняно з селективними модуляторами рецепторів естрогену. У цьому дослідженні значення ліпідів крові не вимірювали, але логічно припустити, що дисліпідемія (спровокована збільшенням жирової маси) теж істотно зменшувалася (Van Londen et al., 2011). Крім того низка клінічних і доклінічних досліджень вказує на певний позитивний вплив інгібіторів ароматази на рівень ліпідів у крові, зокрема на тригліцероли, вільні жирні кислоти, загальний холестерол і його різні фракції (Markopoulos et al., 2005; Nabholz, 2008; Zidan et al., 2010; Lytkin & Zagayko, 2017).

І хоча існують протилежні дані, варто враховувати той факт, що інгібітори ароматази нині показані до застосування лише в онкології та переважна кількість клінічних досліджень проводили на пацієнтах постменопаузного віку з естрогензалежним раком молочної залози, у яких метаболічні процеси можуть певним чином змінюватися та відрізнятися від фізіологічних через вплив онкопатології. Враховуючи експериментальні результати та дані літературних джерел зазначимо, що інгібітори ароматази потребують детальних клінічних досліджень як фармакокоректори інших патологічних станів, зокрема тих, що характеризуються зменшенням адипонектину та дисбалансом статевих гормонів. Подальші детальні дослідження цієї групи препаратів можуть допомогти розширити перелік їх показань до застосування та вирішити низку клінічних проблем, у тому числі і в ендокринології.

Висновки

За експериментального метаболічного синдрому відбувається посилення активності ароматази жирової тканини та спостеріга-

ється наявність високої зворотної кореляції між показниками ароматазної активності вісцеральної мезентеральної жирової тканини та рівнем сироваткового адипонектину в хом'яків різної статі та віку. Отримані результати зумовлюють перспективність подальших поглиблених досліджень на предмет пошуку та встановлення специфічних механізмів взаєморегуляції досліджуваних показників.

Препарати з групи інгібіторів ароматази здатні впливати на перебіг експериментального метаболічного синдрому шляхом вірогідного зменшення ароматазної активності в жировій тканині та відповідного збільшення вмісту сироваткового адипонектину у сирійських хом'яків різної статі та віку. Встановлення значної внутрішньогрупової кореляції між досліджуваними показниками у групах, де тварини отримували препарати, також підтверджує наявність специфічного зв'язку між ароматазною активністю вісцерального жиру та рівнем адипонектину, а теж показує, що на співвідношення цих показників можна впливати, змінюючи один із них (в даному випадку ароматазну активність), у тому числі за допомогою фармакокоректорів, що може бути застосовано у клінічній практиці для терапії метаболічних порушень. Слід зазначити, що найбільшою активністю відносно зменшення ароматазації у жировій тканині та збільшення сироваткового адипонектину в усіх експериментальних групах володів препарат летрозол, внутрішньогрупова сила кореляційних зв'язків між показниками теж була найбільшою.

Отримані дані показують, що інгібітори ароматази можуть стати перспективними засобами для використання у схемах терапії метаболічного синдрому, а подальші клінічні дослідження можуть розширити перелік показань до застосування цих препаратів.

References

- Akyol, M., Demir, L., Alacacioglu, A., Ellidokuz, H., Kucukzeybek, Y., Yildiz, Y., Gumus, Z., Bayoglu, V., Yildiz, I., Salman, T., Varol, U., Kucukzeybek, B., Demir, L., Dirican, A., Sutcu, R., & Tarhan, M. O. (2016). The effects of adjuvant endocrine treatment on serum leptin, serum adiponectin and body composition in patients with breast cancer: The Izmir Oncology Group (IZOG) study. *Chemotherapy*, 61(2), 57–64.
- Biegon, A. (2016). *In vivo* visualization of aromatase in animals and humans. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 40, 42–51.
- Blakemore, J., & Naftolin, F. (2016). Aromatase: Contributions to physiology and disease in women and men. *Physiology*, 31(4), 258–269.
- Boonchaya-anant, P., Laichuthai, N., Suwannasrisuk, P., Hounngam, N., Udomsawaengsup, S., & Snaboon, T. (2016). Changes in testosterone levels and sex hormone-binding globulin levels in extremely obese men after bariatric surgery. *International Journal of Endocrinology*, 2016, 1416503.
- Bulun, S. E., Chen, D., Moy, I., Brooks, D. C., & Zhao, H. (2012). Aromatase, breast cancer and obesity: A complex interaction. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23(2), 83–89.
- Cao, J., Chen, T. M., Hao, W. J., Li, J., Liu, L., Zhu, B. P., & Li, X. Y. (2012). Correlation between sex hormone levels and obesity in the elderly male. *The Aging Male*, 15(2), 85–89.
- Capllonch-Amer, G., Sbert-Roig, M., Galmés-Pascual, B. M., Proenza, A. M., Lladó, I., Gianotti, M., & García-Palmer, F. J. (2014). Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *The Journal of Endocrinology*, 221(3), 391–403.
- Chan, H. J., Petrossian, K., & Chen, S. (2016). Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and – resistant breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 161, 73–83.
- Comitato, R., Saba, A., Turrini, A., Arganini, C., & Virgili, F. (2015). Sex hormones and macronutrient metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 227–241.
- Dalbøge, L. S., Pedersen, P. J., Hansen, G., Fabricius, K., Hansen, H. B., Jelsing, J., & Vrang, N. (2015). A hamster model of diet-induced obesity for preclinical evaluation of anti-obesity, anti-diabetic and lipid modulating agents. *Public Library of Science One*, 10(8), e0135634.
- Ding, Y. S., Guo, S. X., Ma, R. L., Li, S. G., Guo, H., Zhang, J. Y., Zhang, M., Liu, J. M., He, J., Yan, Y. Z., Zhang, W. J., & Liu, L. G. (2015). Association of metabolic syndrome with the adiponectin to homeostasis model assessment of insulin resistance ratio. *Mediators of Inflammation*, 2015, 607364.
- Dos Santos, E., Dieudonné, M. N., Leneveu, M. C., Sérazin, V., Rincheval, V., Mignotte, B., Chouillard, E., De Mazancourt, P., Giudicelli, Y., & Pecque-ry, R. (2010). Effects of ¹⁷beta-estradiol on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: Involvement of IGF1-R signaling. *Hormone and Metabolic Research*, 42(7), 514–520.
- Gao, H., Fält, S., Sandelin, A., Gustafsson, J.-Å., & Dahlman-Wright, K. (2008). Genome-wide identification of estrogen receptor α -binding sites in mouse liver. *Molecular Endocrinology*, 22(1), 10–22.
- Ghosh, D., Lo, J., & Egbuta, C. (2016). Recent progress in the discovery of next generation inhibitors of aromatase from the structure-function perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(11), 5131–5148.
- Guamer-Lans, V., Rubio-Ruiz, M. E., Pérez-Torres, I., & Baños de MacCarthy, G. (2011). Relation of aging and sex hormones to metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Experimental Gerontology*, 46(7), 517–523.
- Ioannides, S. J., Barlow, P. L., Elwood, J. M., & Porter, D. (2014). Effect of obesity on aromatase inhibitor efficacy in postmenopausal, hormone receptor-positive breast cancer: A systematic review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(2), 237–248.
- Jones, M. E., Schoemaker, M., Rae, M., Folkerd, E. J., Dowsett, M., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2013). Changes in estradiol and testosterone levels in postmenopausal women after changes in body mass index. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(7), 2967–2974.
- Kim, C., & Halter, J. B. (2014). Endogenous sex hormones, metabolic syndrome, and diabetes in men and women. *Current Cardiology Reports*, 16(4), 467.
- Kömer, A., Wabitsch, M., Seidel, B., Fischer-Posovszky, P., Berthold, A., Stumvoll, M., Blüher, M., Kratzsch, J., & Kiess, W. (2005). Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2), 540–550.
- Kunnari, A., Santaniemi, M., Jokela, M., Karjalainen, A. H., Heikkinen, J., Ukkola, O., & Kesäniemi, Y. A. (2008). Estrogen replacement therapy decreases plasma adiponectin but not resistin in postmenopausal women. *Metabolism*, 57(11), 1509–1515.
- Lapauw, B., T'Sjoen, G., Mahmoud, A., Kaufman, J. M., & Ruige, J. B. (2009). Short-term aromatase inhibition: Effects on glucose metabolism and serum leptin levels in young and elderly men. *European Journal of Endocrinology*, 160(3), 397–402.
- Lønning, P. E., Haynes, B. P., & Dowsett, M. (2014). Relationship of body mass index with aromatization and plasma and tissue oestrogen levels in postmenopausal breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. *European Journal of Cancer*, 50(6), 1055–1064.
- Lytkin, D. V., & Zagayko, A. L. (2017). The effect of third-generation aromatase inhibitors on lipid metabolism in hamsters under experimental diet-induced metabolic syndrome. *World Science*, 29(2), 23–27.
- Mantas, D., Kostakis, J. D., & Markopoulos, C. (2016). Aromatase inhibitors: A comprehensive review in mechanisms of action, side effects and treatment in postmenopausal early breast cancer patients. *Hellenic Journal of Surgery*, 88, 245.
- Markopoulos, C., Polychronis, A., Zobolas, V., Xepapadakis, G., Papadiamantis, J., Koukouras, D., Lappas, H., & Gogas, H. (2005). The effect of exemestane on the lipidemic profile of postmenopausal early breast cancer patients: Preliminary results of the TEAM Greek sub-study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 93(1), 61–66.
- Matsushita, Y., Nakagawa, T., Yamamoto, S., Kato, T., Ouchi, T., Kikuchi, N., Takahashi, Y., Yokoyama, T., Mizoue, T., & Noda, M. (2013). Adiponectin and visceral fat associate with cardiovascular risk factors. *Obesity (Silver Spring)*, 22(1), 287–291.
- Mauro, L., Pellegrino, M., Giordano, F., Ricchio, E., Rizza, P., De Amicis, F., Catalano, S., Bonofiglio, D., Panno, M. L., & Andò, S. (2015). Estrogen receptor- α drives adiponectin effects on cyclin D1 expression in breast cancer cells. *The FASEB Journal*, 29(5), 2150–2160.
- Mojaddami, A., Sakhteman, A., Fereidoonzehad, M., Faghih, Z., Najdian, A., Khabnadideh, S., & Rezaei, Z. (2017). Binding mode of triazole derivatives as aromatase inhibitors based on docking, protein ligand interaction fingerprinting, and molecular dynamics simulation studies. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 21–30.
- Nabholtz, J.-M. A. (2008). Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(1), 189–204.
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27–31.
- Nalabolu, M. R., Palasamudram, K., & Jamil, K. (2014). Adiponectin and leptin molecular actions and clinical significance in breast cancer. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 8(1), 31–40.
- Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., & Jefferson, W. N. (2009). Environmental estrogens and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1–2), 84–89.
- Ozkaya, H. M., Comunoglu, N., Keskin, F. E., Oz, B., Haliloglu, O. A., Tanriover, N., Gazioglu, N., & Kadioglu, P. (2016). Locally produced estrogen through aromatization might enhance tissue expression of pituitary tumor

- transforming gene and fibroblast growth factor 2 in growth hormone-secreting adenomas. *Endocrine*, 52(3), 632–640.
- Pfeiler, G., Königsberg, R., Hadji, P., Fitzal, F., Maroske, M., Dressel-Ban, G., Zellinger, J., Exner, R., Seifert, M., Singer, C., Gnant, M., & Dubsky, P. (2013). Impact of body mass index on estradiol depletion by aromatase inhibitors in postmenopausal women with early breast cancer. *British Journal of Cancer*, 109(6), 1522–1527.
- Pfeiler, G., Königsberg, R., Hadji, P., Fitzal, F., Tea, M.-K. M., Vogl, S., Berger, A., Exner, R., Seifert, M., Singer, F. C., Gnant, M., & Dubsky, P. C. (2013). The impact of estrogen depletion by aromatase inhibitors on adiponectin serum levels in postmenopausal patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(15), in print.
- Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R., & Goulding, K. W. T. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 67(100), 166–173.
- Richards, J. B., Valdes, A. M., Burling K., Perks, U. C., & Spector, T. D. (2007). Serum adiponectin and bone mineral density in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(4), 1517–1523.
- Sun, H., Ehlhardt, W. J., Kulanthaivel, P., Lanza, D. L., Reilly, C. A., & Yost, G. S. (2007). Dehydrogenation of indoline by cytochrome P₄₅₀ enzymes: A novel “Aromatase” process. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(2), 843–851.
- Tinwell, H., Rasclé, J. B., Colombel, S., Al Khansa, I., Freyberger, A., & Bars, R. (2011). A novel method for measuring aromatase activity in tissue samples by determining estradiol concentrations. *Journal of Applied Toxicology*, 31, 446–454.
- Tworoger, S. S., Mantzoros, C., & Hankinson, S. E. (2007). Relationship of plasma adiponectin with sex hormone and Insulin-like Growth Factor levels. *Obesity*, 15, 2217–2224.
- Van Londen, G. J., Perera, S., Vujevich, K., Rastogi, P., Lembersky, B., Brufsky, A., Vogel, V., & Greenspan, S. L. (2011). The impact of an aromatase inhibitor on body composition and gonadal hormone levels in women with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 125(2), 441–446.
- Viciano, I., & Martí, S. (2016). Theoretical study of the mechanism of exemestane hydroxylation catalyzed by human aromatase enzyme. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(13), 3331–3343.
- Von Frankenberg, A. D., do Nascimento, F. V., Gatelli, L. E., Nedel, B. L., Garcia, S. P., de Oliveira, C. S., Saddi-Rosa, P., Reis, A. F., Canani, L. H., & Gerchman, F. (2014). Major components of metabolic syndrome and adiponectin levels: A cross-sectional study. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 6, 26.
- Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: A review. *Nutrition and Metabolism*, 13, 65.
- Xu, Q., Wells, C. C., Garman, J. H., Asico, L., Escano, C. S., & Maric, C. (2008). Imbalance in sex hormone levels Exacerbates Diabetic Renal Disease. *Hypertension*, 51(4), 1218–1224.
- Zhao, H., Zhou, L., Shangguan, A. J., & Bulun, S. E. (2016). Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. *Journal of Molecular Endocrinology*, 57(1), 19–33.
- Zidan, J., Chetver, L., Hussein, O., & Zucker, M. (2010). Effect of letrozole on plasma lipids, triglycerides, and estradiol in postmenopausal women with metastatic breast cancer. *The Oncologist*, 15(11), 1159–1163.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 216–222
doi: 10.15421/021832

Analysis of the transmembrane potential of embryos exposed to action of nickel, cobalt, tin and zinc

G. V. Galyk*, Z. Y. Fedorovych*, E. I. Lychkovsky*, D. I. Sanagursky**

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

**Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

Article info

Received 02.03.2018

Received in revised form
07.04.2018

Accepted 10.04.2018

Danylo Halytsky Lviv
National Medical University,
Pekarska st., 69,
Lviv, 79010, Ukraine.
Tel.: +38-096-217-52-08.
E-mail:
Zoryana.Ivanytska@gmail.com

Galyk, G. V., Fedorovych, Z. Y., Lychkovsky, E. I., & Sanagursky, D. I. (2018). Analysis of the transmembrane potential of embryos exposed to action of nickel, cobalt, tin and zinc. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 9(2), 216–222. doi:10.15421/021832

Germ cells of aquatic organisms are complex systems whose growth and development depends on many factors, one of which is the composition of the aquatic environment. We used parameters in our analysis from aggregate data available from published literature. They are data of the transmembrane potential of the germinal cells of *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) at the development stage from 180th to 360th minutes. Embryos were incubated in an environment with nickel, cobalt, tin, and zinc ions and without them. Plotted lines of the transmembrane potential were digitized and calibrated at intervals of 10 minutes. Rows of numerical values of the transmembrane potentials were obtained. These rows were used for calculation of autocorrelation and cross-correlation functions. It was established that the transmembrane potential describes nonperiodic and quasi-periodic oscillations. The higher statistically significant values of the autocorrelation coefficients were observed in the first lags. Autocorrelation analysis indicates that the periods of oscillations of the transmembrane potential increase with the action of nickel, cobalt, tin and zinc on the germ. The phenomena and processes that occur in the germ cell are well reflected at the initial stages of the auto-correction and are lost when the magnitude of the lag increases. The degree of similarity of transmembrane potentials with the help of cross-correlation analysis is quantitatively characterized. The distribution of fluctuations of cross-correlation functions with complex dynamics, which arise with time shifts both in the forward and reverse directions, were established. It is established that for large values of time shifts, the cross-correlation coefficient is a low-informative indicator, since information about the influence of the factor on the living system is lost. A graph for a given time shift was constructed. The connection between the nodes is the magnitude of the cross-correlation coefficients between the vapor of the transmembrane potentials, which indicate the degree of similarity of the bioelectric processes. Graphs will be used for qualitative and quantitative study of system dynamics. The obtained results confirm the existence of a close relationship between environmental nickel, cobalt, tin, and zinc and the oscillation of transmembrane potential during early embryogenesis.

Keywords: autocorrelation; cross-correlation; lag; time series; heavy metals

Аналіз трансмембранного потенціалу зародків в'юна за дії нікелю, кобальту, олова та цинку

Г. В. Галик*, З. Я. Федорович*, Е. І. Личковський*, Д. І. Санагурський**

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

**Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

Зародкові клітини водних організмів – складні системи, ріст і розвиток яких залежить від багатьох чинників, одним з яких є склад водного середовища. Вхідні параметри – літературні дані трансмембранного потенціалу зародкових клітин *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) на стадії 180–360-ї хвилини розвитку, які інкубували в середовищі з іонами нікелю, кобальту, олова, цинку та без них. Графіки трансмембранних потенціалів переведено у цифровий формат і проквантовано з інтервалом 10 хв. Отримано ряди числових значень трансмембранних потенціалів, які у подальшому використано для обчислення автокореляційних і крос-кроскореляційних функцій. Трансмембранний потенціал описує неперіодичні та квазіперіодичні коливання. Високі статистично значущі значення коефіцієнтів автокореляції спостерігаємо у перших лагах. Автокореляційний аналіз вказує на те, що періоди коливань трансмембранного потенціалу збільшуються за дії нікелю, кобальту, олова та цинку на зародок. Процеси, які відбуваються у зародковій клітині, добре відображаються на початкових етапах автокорелограми та втрачаються у разі збільшення величини лага. Кількісно охарактеризовано ступінь подібності трансмембранних потенціалів за допомогою кроскореляційного аналізу. Встановлено поширення флуктуацій кроскореляційних функцій зі складною динамікою, які виникають за часових зсувів як у прямому, так і зворотному напрямках. За великих значень часових зсувів

коефіцієнт кроскореляції – малоінформативний показник, оскільки втрачається інформація про вплив фактора на живу систему. Побудовано кореляційні плеяди для заданих часових зсувів. Зв'язок між компонентами плеяд – величина коефіцієнтів кроскореляції між парами трансмембранних потенціалів, які вказують на ступінь подібності біоелектричних процесів. Кореляційні плеяди у подальшому будуть застосовуватись для якісного та кількісного дослідження динаміки системи. Отримані результати підтверджують існування тісного взаємозв'язку між наявністю в середовищі інкубації зародкових клітин у ранньому ембріогенезі іонів нікелю, кобальту, олова та цинку на величину періоду коливань трансмембранного потенціалу.

Ключові слова: автокореляція; кроскореляція; зсуви; часовий ряд; важкі метали.

Вступ

Процес саморегуляції будь-якої біологічної системи полягає у функціонуванні взаємозалежних сигнальних шляхів, які можна зобразити як позитивними, так і негативними зворотними зв'язками (Reversade & De Robertis, 2005; Abdelalim, 2013; Huang & Zheng, 2018). Зародкові клітини, як приклад складних систем, самореалізуються шляхом координованої динамічної експресії сотень генів та білків, у точній реакції на дію зовнішніх сигналів (температурний режим, склад середовища тощо).

Один із головних параметрів, який описує фізіологічний стан клітини, – це мембранний потенціал. Результати фізіологічних досліджень вказують на зміни в регуляції трансмембранного потенціалу, що, у свою чергу, контролюється проходженням клітини через клітинний цикл (Blackiston et al., 2009; Barghouth et al., 2015). Трансмембранний потенціал розглядають як ключовий регулятор проліферації клітин різного типу, а також припускають, що він контролює фазові переходи G1/S та G2/M (Blackiston et al., 2009). Для зародкових об'єктів у період синхронних поділів бластомерів характерні коливання біоелектричних (Goyda, 1993) та метаболічних (Abdelalim, 2013) параметрів, таких, як швидкість поглинання кисню, швидкість гліколізу, активність Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} -АТФази, казеїнази II. У зв'язку з цим для повного уявлення про особливості клітинних ритмів у ранньому ембріогенезі тварин проаналізовано динаміку трансмембранного потенціалу не лише за нормальних умов розвитку, а і за дії гормонів (Sanagursky & Goyda, 1980).

Найпоширеніші забруднювачі не лише водних екосистем – іони важких металів та їх сполук, серед яких найчастіше зустрічають кобальт, нікель, залізо, цинк, мідь, кадмій (Gevorgyan et al., 2016; Blewett & Leonard, 2017). Ці речовини токсичні, біоакмулюються (Jitar et al., 2015) та залишаються у довкіллі упродовж тривалого часу (Marzan et al., 2017). Їх походження як природне (Neta et al., 2018), так і зумовлене діяльністю людини (Gevorgyan et al., 2016).

У водних тварин гамети виділяються у воду, де відбувається запліднення. З літературних даних відомо, що, залежно від концентрації, іони важких металів акумулюються у клітинах (Boiko & Sanagursky, 2000) і впливають на гамети та ембріони, змінюючи фізіологічні властивості клітин і генерацію потенціалу дії (Boiko & Sanagursky, 2000; Gallo, 2018).

Іони важких металів, нагромаджуючись у клітині, зумовлюють низку ефектів, як метаболічні розлади, токсичні ефекти, що спричиняють структурні зміни клітин, розвиток значних аномалій або смерть організму (Boiko & Sanagursky, 2000; Jezierska et al., 2008; Galyk, 2017). Важкі метали впливають на амплітуду коливань трансмембранного потенціалу зародкових клітин (Boiko & Sanagursky, 2000) – індикатор життєздатності клітини та організму в цілому.

Крива, зареєстрованого трансмембранного потенціалу на мембранах бластомерів характеризується коливальною динамікою, де період кожного коливання збігається в часі з поділом клітини у період синхронних поділів (Sanagursky & Goyda, 1980). Тому для дослідження зареєстрованого сигналу трансмембранного потенціалу застосовують аналітичні підходи (Sanagursky & Goyda, 1980). Розрахунок коефіцієнтів автокореляції та кроскореляції виконано у працях Sanagursky & Goyda (1980), Ivashkiv et al. (2001) із метою встановлення тісноти зв'язку між часовими співвідношеннями метаболічних показників (швидкість поглинання кисню, швидкість гліколізу, рівень рН, активність казеїнази-2 та Na^+ / K^+ -АТФази) та біоелектричних показників (коефіцієнт електричного зв'язку та трансмембранний потенціал зародкової клітини). Як наслідок запропоновано критерії оцінювання динаміки показників бластомерів у період синхронних поділів за нормальних умов середовища та за дії екстремальних чинників (Sanagursky & Goyda,

1980; Ivashkiv et al., 2001).

Вплив катіонів важких металів на зародки водних організмів – актуальна проблема сучасної біології не лише з екологічної, а й із біофізичної точки зору. Порушення механізму генерування і, як наслідок, величини трансмембранного потенціалу у період синхронних поділів бластомерів – один із симптомів аномального розвитку, який може викликати зменшення чисельності водних організмів. У зв'язку з цим, мета статті – оцінити динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна за дії іонів нікелю, кобальту, олова, цинку та за нормальних умов.

Матеріал і методи досліджень

Вхідні параметри – літературні дані авторів (Boiko & Sanagursky, 2000) про зміни трансмембранного потенціалу зародкових клітин *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) на 180–360-й хвилині розвитку за відсутності та наявності у середовищі інкубації іонів нікелю, кобальту, олова та цинку.

Методика обчислення кореляційної функції трансмембранного потенціалу у спрощеному вигляді полягає у такій послідовності. По-перше, зареєстровану в експерименті криву трансмембранного потенціалу необхідно подати у формі послідовності чисел, які відображають величину сигналу потенціалу для часового відрізка 180–360-та хв. Для переведення графіків у цифровий формат використали програму GetData Graph Digitizer 2.26 (Ivashkiv et al., 2001).

Наступний крок вимагав проквантувати отримані результати. Частоту вимірів обрано 10 хв. Отримано ряди числових значень трансмембранних потенціалів, які у подальшому використано для обчислення автокореляційних і крос-кореляційних функцій. Автокореляційний аналіз полягає у порівнянні часового ряду величин сигналу трансмембранного потенціалу із самим собою, зсунутим на деякий проміжок часу, який називається лагом. Його порівняння проводили на часовому проміжку з іншим часовим проміжком, який випереджує або запізнюється у часі відносно даного. З метою отримання «чистішої» картини періодичних залежностей (усунення впливу інших змінних) обчислюється часткова автокореляція часового ряду. Під час кроскореляційного аналізу виконують порівняння двох сигналів трансмембранного потенціалу, реєстрованих для двох клітин, у часі із запізненням і випередженням сигналу (Box et al., 2013; Huang & Zheng, 2018).

Розрахунок автокореляційних, часткових автокореляційних і кроскореляційних функцій проводили за допомогою пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Дослідження полягали у комплексному вивченні трансмембранного потенціалу, який являв собою випадковий процес, що має властивості стаціонарного. Статистичні об'єкти – часові ряди, значення в яких послідовно впорядковані в часі. Автокореляція високих порядків оцінюється за допомогою Q-тесту Льюнга – Бокса зі значенням ймовірності, з якою приймається гіпотеза про те, що автокореляція відсутня на кожному лазі за тестом Льюнга – Бокса. Достовірність кроскореляції оцінена за таблицю граничних значень коефіцієнтів кореляції за рівня значимості $P = 0,05$.

Результати

Дослідження автокореляційних функцій п'яти часових рядів трансмембранних потенціалів для зародків в'юна у період раннього ембріонального розвитку, які інкубували в середовищі з іонами нікелю, кобальту, олова та цинку та без них, виявило лаги, на яких значення коефіцієнтів автокореляції виходили за межі довірчого інтервалу. Для часового ряду трансмембранного потенціалу за-

родків, інкубованих у середовищі без іонів важких металів на першому лазі (190-та хв) коефіцієнт автокореляції набув максимального значення $r = 0,74$ на рівні значущості $P = 0,002$. Автокореляційний зв'язок позитивний, сильний і послідовний у лагах від першого по четвертий (період 30 хв: із 190-ї по 220-ту хв) (рис. 1а), та негативний, слабкий у лагах із 10-го по 15-й (період із 280-ї по 330-ту хв) і відсутній у лагах із 5-го по 8-й (період 30 хв: із 230-ї по 260-ту хв), оскільки значення кореляції осцилюють близько нуля. Величини автокореляційних функцій виходять за межі довірчого інтервалу в лагах з першого по третій (період 20 хв: із 190-ї по 210-ту хв) і з 10-го по 15-й лаг (період 50 хв: із 280-ї по 330-ту хв). Коефіцієнти автокореляції плавно змінюють знак із позитивного на негативний у шостому лазі (240 хв). Коефіцієнт часткової автокореляції виходить за межі довірчого інтервалу на першому лазі (190 хв) і набуває максимального значення 0,736 на рівні значущості $P = 0,0002$ (рис. 1б). Такий результат вказує на кореляцію даних, віддалених на 10 хв. Коливання пікових значень часткової автокореляційної функції відбуваються періодично з третього по одинадцятий лаги (період 80 хв: із 210-ї по 290-ту хв), за інших значень часових зсувів коливання часткової автокореляційної функції – аперіодичні.

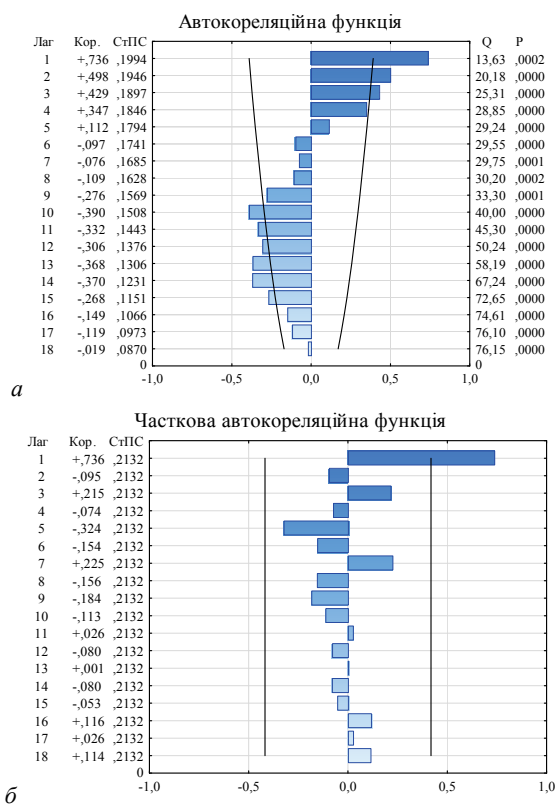


Рис. 1. Графіки автокореляційної (а) та часткової кореляційної функції (б) для часового ряду трансмембранного потенціалу: довірчий інтервал показано чорною лінією

Для часового ряду трансмембранного потенціалу, реєстрованого на зародках в'юна, інкубованих у середовищі з нікелем, максимальне значення коефіцієнта автокореляції значуще та відповідає першому лагу (190-та хв) і становить $r = 0,85$ на рівні значущості $P < 0,001$, що вказує на сильний кореляційний зв'язок і наявність лінійного тренду (рис. 2а). Автокореляційна функція позитивна достовірна в лагах із першого по третій (період 20 хв: із 190-ї по 210-ту хв) та негативна достовірна у лагах 13–18 (період 50 хв: із 310-ї по 360-ту хв). Автокореляційна функція повільно зменшується зі збільшенням лага. У зміщенні, що відповідає шостому лагу (240 хв), корелограма змінює знак на негативний, автокореляція практично відсутня $r = -0,024$ за $P < 0,001$. Дослідження часткової автокореляційної функції виявило, що лише для першого лага значення коефіцієнта кореляції виходить

за довірчий інтервал і становить 0,853 ($P < 0,001$). З першого по тринадцятий лаг (період 100 хв: із 190-ї по 310-ту хв) спостерігаються періодичні коливання часткової автокореляційної функції з періодом коливань 60 хв (рис. 2б), чого не спостерігали на графіку автокореляційної функції (рис. 2а).

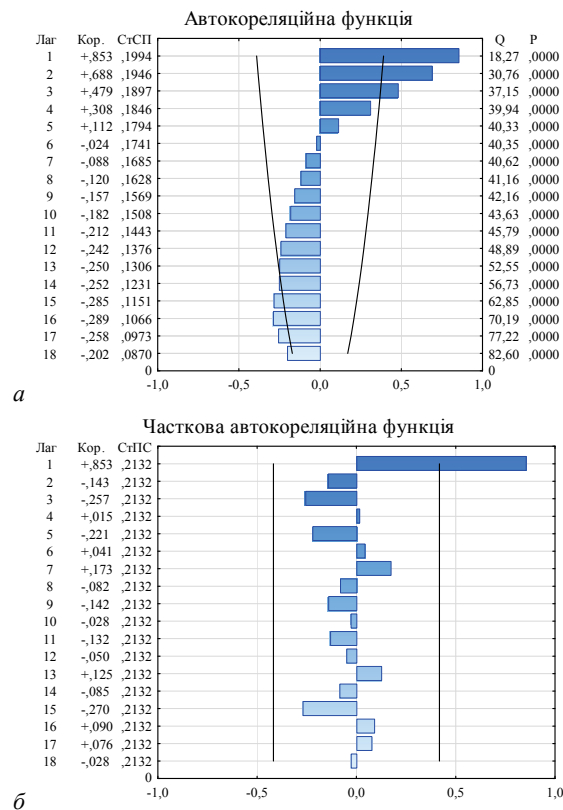


Рис. 2. Графіки автокореляційної (а) та часткової кореляційної функції (б) для часового ряду трансмембранного потенціалу (середовище інкубації зародків в'юна містить нікель): довірчий інтервал показано чорною лінією

Максимального значення автокореляційна функція, розрахована для часового ряду трансмембранного потенціалу, реєстрованого для зародків в'юна у середовищі інкубації з іонами кобальту, набуває у першому лазі (190 хв) і становить $r = 0,863$ ($P < 0,001$, рис. 3а). Такий результат вказує на сильний кореляційний зв'язок. Автокореляційна функція для даного часового ряду характеризується повільним затуханням зі зростанням величини лага та змінює знак на від'ємний у разі зсуву, що відповідає сьомому лагу (250 хв). Автокореляція практично відсутня та коливається поблизу нуля з 7-го по 10-й лаг (період 30 хв: із 250-ї по 280-ту хв). Значення автокореляційної функції виходять за межі довірчого інтервалу з першого по четвертий (період 30 хв: із 190-ї по 220-ту хв) і з 12-го по 18-й лаг (період 60 хв: з 300-ї по 360-ту хв). Часткова автокореляція у першому лазі (190 хв) досягає максимального значення, становить 0,863 ($P < 0,001$) та виходить за межі довірчого інтервалу (рис. 3б). Дослідження часткової автокореляційної функції виявили періодичні коливання з 3-го по 13-й лаг (період 100 хв: із 210-ї по 310-ту хв) із періодом коливань 50 хв.

Для часового ряду величин трансмембранного потенціалу зародків в'юна, інкубованих у середовищі з оловом, автокореляційна функція характеризується затухаючими коливаннями у разі збільшення кількості лагів (рис. 4а). Автокореляційна функція змінює знак на протилежний на 7-му лазі (250 хв), величина коефіцієнта автокореляції $r = 0$. Максимальні значення коефіцієнтів автокореляції на першому лазі $r_1 = 0,885$ ($P < 0,001$) та у другому лазі $r_2 = 0,738$ ($P < 0,001$) підтверджують наявність тренду. Значення коефіцієнтів автокореляційної функції виходять за межі довірчого інтервалу з першого по четвертий лаг (період 30 хв: 190–220-та хв) та з 11-го по 18-й лаг (період 70 хв: 290–360-та хв). Наявність лі-

нійного тренду підтверджує також часткова автокореляційна функція, максимальне значення якої для першого лага становить 0,885 ($P < 0,001$) та виходить за межі довірчого інтервалу (рис. 3б).

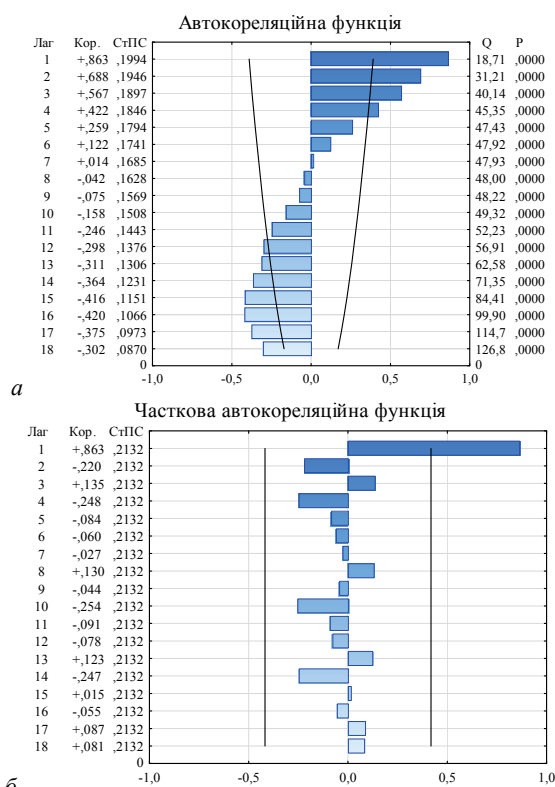


Рис. 3. Графіки автокореляційної (а) та часткової кореляційної функції (б) для часового ряду трансмембранного потенціалу (середовище інкубації зародків в'юна містить кобальт): довірчий інтервал показано чорною лінією

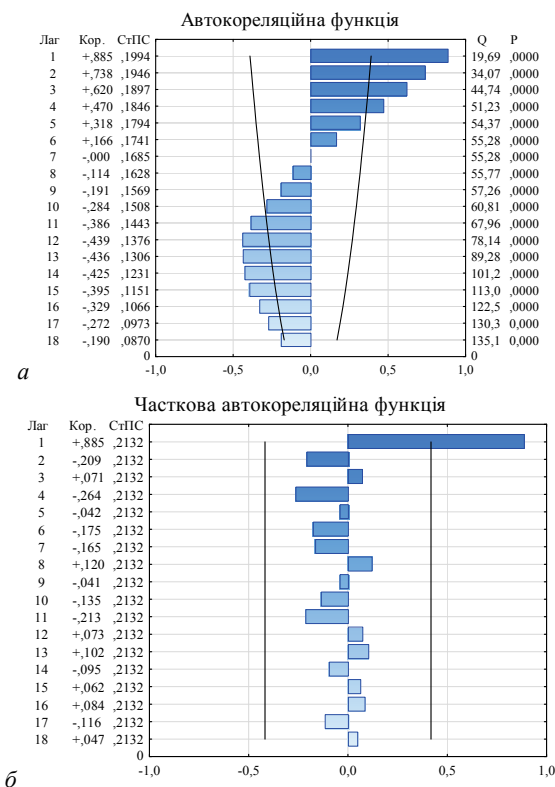


Рис. 4. Графіки автокореляційної (а) та часткової кореляційної функції (б) для часового ряду трансмембранного потенціалу (середовище інкубації зародків в'юна містить олово): довірчий інтервал показано чорною лінією

Автокореляційна функція, обчислена для трансмембранного потенціалу зародків, інкубованих у середовищі із цинком, різко знижується зі зростанням кількості лагів, коливається близько нуля та не виходить за межі довірчого інтервалу (рис. 5а) з 2-го по 18-й лаг (період 180 хв: з 200-ї по 360-ї хв). Максимальне значення коефіцієнта автокореляції відповідає першому лагу, значує та становить $r = 0,611$ ($P = 0,002$), що відповідає помітній сильній щільності зв'язку. Під час зростання кількості лагів значення коефіцієнтів автокореляції зменшуються. Коефіцієнти часткової автокореляції значущі для першого та четвертого лагів. Такі результати вказують на кореляцію даних, зміщених на 10 та 40 хв.

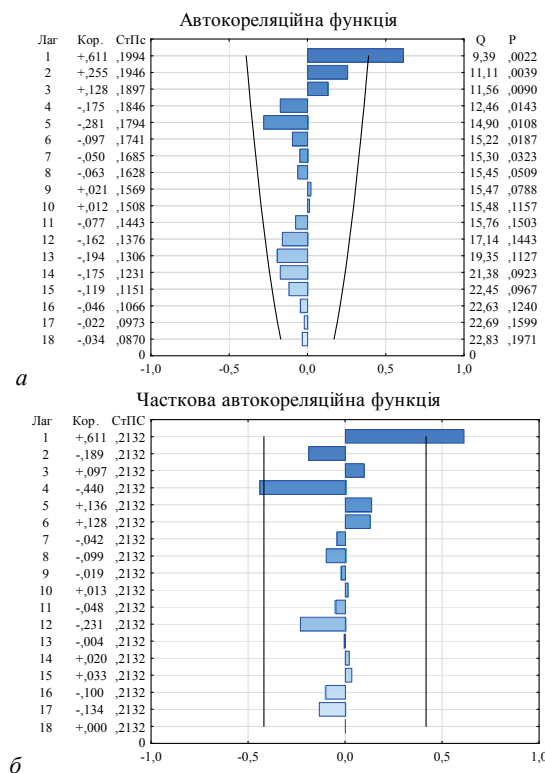


Рис. 5. Графіки автокореляційної (а) та часткової кореляційної функції (б) для часового ряду трансмембранного потенціалу (середовище інкубації зародків в'юна містить цинк): довірчий інтервал показано чорною лінією

P -значення на всіх лагах автокореляційних функцій, крім такої для часового ряду трансмембранного потенціалу зародків, інкубованих у середовищі із цинком, менше за рівень значимості 0,1%, тому за тестом Льюнга – Бокса відхиляється гіпотеза про відсутність серійної кореляції на всіх лагах. Отже, дані досліджуваних часових рядів – не випадкові стохастичні коливання. Для всіх п'яти випадків має місце автокореляція першого порядку. Оскільки порядки автокореляції між значеннями трансмембранного потенціалу однакові, кожне наступне значення мембранного потенціалу залежить від попереднього, генерованого на 10 хв раніше. Для випадку з умістом іонів цинку у середовищі інкубації для зародкових об'єктів значення трансмембранного потенціалу залежить від попередніх, генерованих на 10 та 40 хв раніше.

Кроскореляційний аналіз десяти часових рядів сигналів, що відповідають трансмембранним потенціалам ембріональних клітин, які інкубували у різних середовищах, виявив аперіодичні коливання кроскореляційних функцій зі зміщеними відносно нульового лага (180-та хв) максимальними значеннями кроскореляції як у прямому, так і у зворотному напрямках (рис. 6). Виходячи з візуального графічного аналізу, всі тимчасові ряди явно нестационарні. Із графіків кроскореляційних функцій видно незначні коливання коефіцієнтів кореляції, характер періодичних коливань не виражений. У цьому випадку два сигнали трансмембранного потенціалу мають велику схожість за рахунок неритмічних коливань. Наприклад, різниця в силі кореляції між трансмембранними

потенціалами, вимірними для зародків, інкубованих у середовищі без іонів нікелю, кобальту, олова, цинку та за їх наявності, вказує на вплив іонів важких металів на загальну кореляцію сигналів. Це число може бути як позитивним, так і негативним (рис. 6а) в обох напрямках.

Взаємовплив двох сигналів – трансмембранних потенціалів, вимірних для зародкових клітин, інкубованих у середовищах без та за дії нікелю (рис. 6а), характеризується позитивною кроскореляцією, яка поширюється зі зміщеннями від –1 до 12-го лага. Максимальне достовірне значення кроскореляційної функції відповідає зсуву 40 хв ($r = 0,65$, $P = 0,05$). Достовірні значення коефіцієнтів кроскореляції реєструються за зсувів 2–7.

Крива кореляційних функцій трансмембранних потенціалів, вимірних для зародкових клітин, інкубованих у середовищах без і за дії кобальту (рис. 6а) характеризується позитивною кроскореляцією, яка виходить за межі довірчого інтервалу зі зміщеннями лага 0–6 (період 60 хв: від 180-ї до 240-ї хв). Максимальне значення коефіцієнта кроскореляції становить $r = 0,68$ ($P = 0,05$ на першому лазі). Кроскореляція трансмембранних потенціалів, вимірних для зародкових клітин, інкубованих у середовищах без і за дії олова (рис. 6а), характеризується позитивними значеннями, які відповідають зсувам від –4 до 9. Максимального значення кроскореляція набуває за зсувів на 10 хв ($r = 0,77$, $P = 0,05$). Значення коефіцієнтів кроскореляції виходять за межі довірчого інтервалу за зміщень у межах від –1-го до 5-го лага.

Взаємовплив трансмембранного потенціалу, виміряного на ембріональній клітині, за нормальних умов інкубації та за наявності в інкубаційному середовищі іонів цинку (рис. 6а), характеризується коливальною динамікою з позитивними значеннями кроскореляційних функцій, що відповідають зміщенням у лагах –17–15 та –1–12. Максимальне достовірне значення коефіцієнта кроскореляції становить $r = 0,42$ на рині значущості $P = 0,05$ за зсуву на 30 хв (лаг 3). Значення кроскореляційної функції не виходять за межі довірчого інтервалу.

Під час дослідження взаємовпливу сигналів трансмембранних потенціалів, зареєстрованих за інкубації ембріонів у середовищах із нікелем і кобальтом, кроскореляційні функції характеризуються позитивними значеннями в межах часових зсувів, що відповідають лагам від –9-го до 5-го (рис. 6б). Максимальне позитивне значення коефіцієнта кроскореляції відповідає нульовому лагу та становить $r = 0,88$ ($P = 0,05$). Значення кроскореляційних функцій виходять за межі довірчого інтервалу при зсувах від –4-го до 2-го.

Кроскореляційна функція взаємовпливу сигналів трансмембранних потенціалів, зареєстрованих за інкубації ембріонів у середовищах із нікелем і оловом, характеризується коливною динамікою. Значення коефіцієнтів кроскореляції виходять за межі довірчого інтервалу, що відповідають лагам від –9-го до 4-го (рис. 6б). Максимального позитивного значення кроскореляція набуває у разі зміщення у 30 хв назад (лаг –3) та становить $r = 0,84$, $P = 0,05$. Достовірні значення кроскореляційних функцій перебувають у межах зміщень від –6-го по 1-й лаг.

Аналіз взаємовпливу сигналів трансмембранних потенціалів, зареєстрованих за інкубації ембріонів у середовищах із нікелем і цинком, характеризується коливальною динамікою з позитивними значеннями в межах часових зсувів, що відповідають лагам із –4 до 5-го (рис. 6б). Максимального позитивного значення коефіцієнт кроскореляції набуває за зсуву 10 хв назад (лаг –1) і дорівнює 0,73 ($P = 0,05$). Кроскореляційна функція не виходить за межі довірчого інтервалу за зсувів від –2 до 1-го.

Співставлення сигналів, зареєстрованих для ембріональних клітин, інкубованих у середовищах із кобальтом і оловом показало, що кроскореляційна функція набуває позитивних значень у межах від –8 до 6-го лага (рис. 6в). Графік кроскореляційної функції характеризується коливаннями з максимальною амплітудою в нульовому лазі, яка становить 0,87 ($P = 0,05$). Достовірні значення кроскореляційної функції не виходять за межі довірчого інтервалу в межах від –5 до 2-го лага.

Кроскореляційні функції, отримані для трансмембранного потенціалу зародків, інкубованих у середовищах із кобальтом і

цинком, характеризуються коливаннями, з максимальною амплітудою коефіцієнта кроскореляції 0,60 ($P = 0,05$) у нульовому лазі (рис. 6в). Позитивні значення кроскореляційної функції перебувають у межах зміщень, що відповідають зсувам від –3 до 11-го. Достовірні значення кроскореляційної функції розміщені симетрично від максимального значення коефіцієнта кроскореляції у лагах від –2 до 2-го.

Для трансмембранного потенціалу, виміряного на зародках в'юна за інкубації в середовищах олова та цинку, розрахована кроскореляційна функція, достовірні значення якої перебувають у межах від 1 до 5-го лага (рис. 6в). Візуально крива характеризується коливанням, яке припадає на від'ємне значення зсуву. Максимальна амплітуда коливання кроскореляційної функції припадає на зсув у 30 хв (лаг 3) і становить 0,66 ($P = 0,05$).

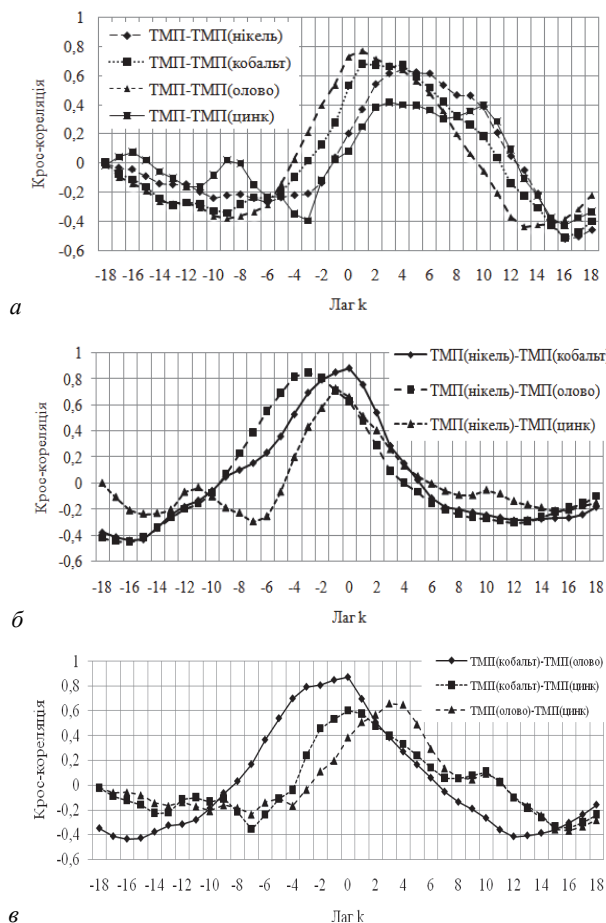


Рис. 6. Крос-корелограми часових рядів трансмембранного потенціалу зародкових клітин, інкубованих за різного складу середовища: ТМП – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині Гольфрета, ТМП (нікель) – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-5} М нікелю, ТМП (кобальт) – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-4} М кобальту, ТМП (олово) – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-4} М олова, ТМП (цинк) – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-5} М цинку

Із метою візуального зображення сили взаємодії між двома сигналами трансмембранного потенціалу зародкової клітини побудовано чотири кореляційні плеяди для часових зсувів, рівні 180, 240, 300 та 360 хв. Загальний вигляд кореляційних плеяд показано як центри, об'єднані стрілками, які вказують на силу та напрям кореляційного зв'язку (рис. 7). Для цього попарно розглядали всі можливі шляхи взаємодії між параметрами, що описують генерацію трансмембранного потенціалу та регуляторних чинників на досліджуваному часовому проміжку, та позначали числами 1–5.

Відстані між цими символами пропорційні значенням коефіцієнтів кроскореляцій для певного моменту часового зсуву, де сила та напрямок кроскореляційної функції мають конкретне значення.

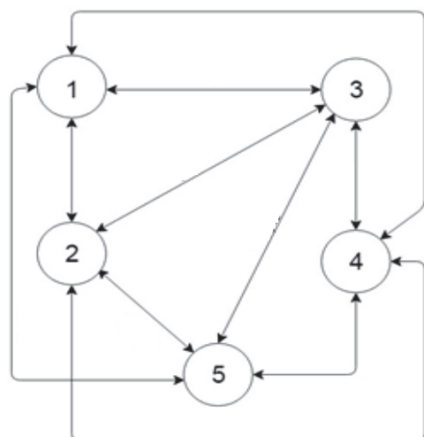


Рис. 7. Кореляційна плеяда: 1 – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині Гольфрета, 2 – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-5} М нікелю, 3 – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-4} М кобальту, 4 – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-4} М олова, 5 – трансмембранний потенціал зародків в'юна, інкубованих у розчині, що містив 10^{-5} М цинку, стрілками позначено зв'язок між параметрами

Обговорення

Численні літературні дані вказують, що іони важких металів здатні викликати порушення ембріонального розвитку у різних видах організмів, наприклад, безхребетних (Sisman, 2011; Gallo et al., 2016; Gallo, 2018), риб (Blewett et al., 2016; Blewett & Leonard, 2017), чи моллюсків (Ringwood et al., 2010). Наслідками негативно впливу на метаболічні процеси в ембріогенезі, зумовлені іонами нікелю, кобальту, олова та цинку, стали сповільнення розвитку (Behra, 1993; Blewett & Leonard, 2017), виникнення морфологічних та функціональних аномалій (Dineley et al., 2003; Hwang et al., 2012; Tualla & Bitacura, 2016), або смерті зародка (Cavas, 2008; Cai et al., 2012; Kucukoglu et al., 2013).

Автокореляційний та кроскореляційний аналізи продемонстрували зміну періодів коливань трансмембранних потенціалів зародків, інкубованих у середовищах з іонами важких металів, які можна вважати регуляторними чинниками іон-транспортувальних систем плазматичної мембрани клітини.

Автокорелограма – симетрична функція, значення якої залежить від часових зсувів. Таким чином, у разі збільшення кількості лагів крива автокореляції прямує до нуля. Суттєвих великих значень автокореляційна функція набуває до певного критичного лага. Для зародкових клітин в'юна, інкубованих у середовищі Гольфрета, він рівний 30 хв. Збільшення величини критичного лага для автокорелограм трансмембранних потенціалів зародків, інкубованих у середовищі з іонами важких металів, вказує на зростання періоду коливань. Показники збільшення періодів коливань, які проаналізовано з автокореляційних функцій трансмембранних потенціалів зародків, інкубованих із нікелем, кобальтом і оловом, збігаються з даними Boyko & Sanagursky (2000) про вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу у ранньому ембріональному розвитку.

Отримані результати кроскореляційного аналізу свідчать, що поширення флуктуацій кроскореляцій зі складною динамікою виникає за часових зсувів як у прямому, так і зворотному напрямі. Коливний ефект чітко видно лише за дії іонів цинку на зародкові об'єкти, хоча значення коефіцієнтів не виходять за межі довірчого

інтервалу. Наявність тісного кроскореляційного зв'язку за малих значень часових зсувів вказує на те, що іони важких металів впливають на динамічні зміни трансмембранного потенціалу.

За наявності іонів нікелю та кобальту в середовищах інкубації бластомери в'юна, максимального достовірного значення кроскореляція набирає за нульового лага. Пояснення цього факту полягає в тому, що нікель порушує іонний обмін (Blewett & Leonard, 2017). За дії нікелю на ембріони морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* виявлено зниження концентрації калію та підвищення рівня натрію, що вказує на інгібування Na^+, K^+ -АТпази (Tellis et al., 2014). Іони кобальту блокують K^+ -канали, Na^+ -канали та змінюють фізичний стан ліпідної фази плазматичної мембрани (Cai et al., 2012). Крім того, кобальт у концентрації 10^{-6} М інгібує Na^+, K^+ -АТпазну активність (Kaplja, 2016), що, тим самим, зумовлює деполяризацію мембрани.

Отримані результати кроскореляційного аналізу свідчать, що за наявності іонів олова в середовищі інкубації зародків, максимальних достовірних значень коефіцієнти кореляції набирають за незначних часових зсувів. Очевидно, такий ефект зумовлений впливом олова на потенціал-керовані іонні канали (Tomaszewski & Busselberg, 2008), хоча це питання потребує подальшого вивчення.

У разі наявності іонів цинку в середовищі інкубації зародків максимальних достовірних значень коефіцієнти кроскореляцій набували за незначних часових зсувів. Такий результат, можливо, є наслідком впливу цинку на системи мембранної сигналізації (MacDonald, 2000), а також підтверджує той факт, що цинк та інші двовалентні катіони алостерично регулюють ліганд-керовані іонні канали або інгібують іонні канали (Zimmermann et al., 2012).

Коефіцієнти кроскореляції – малоінформативні показники за великих часових зсувів, оскільки їх значення не виходять за межі довірчих інтервалів, тобто губляться значення того чи іншого чинника на живу систему.

Оскільки розраховані кроскореляції належать до однієї системи, яка являє собою зародковий об'єкт, і відображають стан відповідних їй елементів у часі, вони можуть бути використані для побудови структурно-функціональних схем – кореляційних плеяд. У запропонованих схемах наявні зворотні зв'язки. Побудовані кореляційні плеяди використовуються у подальшому для моделювання структурними рівняннями. Отже, їх можна застосовувати для якісного опису параметрів системи, а також їх будують для створення математичних моделей для кількісного дослідження.

Висновки

Наведено результати аналізу часових рядів трансмембранних потенціалів зародкових клітин, інкубованих за різного складу середовища. Отримані в межах дослідження результати підтверджують існування тісного взаємозв'язку між наявністю у середовищі інкубації зародкових клітини у ранньому ембріогенезі іонів нікелю, кобальту, олова та цинку на величину зареєстрованого трансмембранного потенціалу. Період коливань трансмембранного потенціалу відмінний від норми за дії регуляторних чинників. Значення цих величин більші порівняно з такими для норми, що, ймовірно, викликано однаковими механізмами регулювання трансмембранного потенціалу. Отримані результати мають прикладне значення для подальших досліджень взаємодій різних параметрів метаболізму у складних системах і дозволяють застосовувати математичні підходи для прогнозування послідовності їх взаємодій.

References

- Abdelalim, E. M. (2013). Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(6), 764–773.
- Barghouth, P. G., Thiruvalluvan, M., & Oviedo, N. J. (2015). Bioelectrical regulation of cell cycle and the planarian model system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(10), 2629–2637.
- Behra, R. (1993). *In vitro* effects of cadmium, zinc and lead on calmodulin-dependent actions in *Oncorhynchus mykiss*, *Mytilus* sp., and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24(1), 21–27.

- Blackiston, D. J., McLaughlin, K. A., & Levin, M. (2009). Bioelectric controls of cell proliferation: Ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle*, 8(21), 3519–3528.
- Blewett, T. A., & Leonard, E. M. (2017). Mechanisms of nickel toxicity to fish and invertebrates in marine and estuarine waters. *Environmental Pollution*, 223, 311–322.
- Blewett, T. A., Smith, D. S., Wood, C. M., & Glover, C. N. (2016). Mechanisms of nickel toxicity in the highly sensitive embryos of the sea urchin *Evechinus chloroticus*, and the modifying effects of natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, 50(3), 1595–1603.
- Boiko, N., & Sanagursky, D. (2000). Dynamika transmembrannoho potentsialu zarodkiv v'yuna v umovakh vplyvu ioniv vazhkykh metaliv [Dynamics of transmembrane potential of germ breeding in conditions of influence of heavy metal ions]. *Visnyk of Lviv University. Series Biological*, 25, 3–7 (in Ukrainian).
- Box, G. E. P., Jenkins, G. M., & Reinsel, G. C. (2013). Time series analysis: Forecasting and control. John Wiley and Sons, Inc.
- Cai, G., Zhu, J., Shen, C., Cui, Y., Du, J., & Chen, X. (2012). The effects of cobalt on the development, oxidative stress, and apoptosis in zebrafish embryos. *Biological Trace Element Research*, 150(1), 200–207.
- Cavas, T. (2008). *In vivo* genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 352–358.
- Dineley, K. E., Votyakova, T. V., & Reynolds, I. J. (2003). Zinc inhibition of cellular energy production: Implications for mitochondria and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 85, 563–570.
- Fabricio Neta, A. B., do Nascimento, C. W. A., Biondi, C. M., van Straaten, P., & Bittar, S. M. B. (2018). Natural concentrations and reference values for trace elements in soils of a tropical volcanic archipelago. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(1), 163–173.
- Gallo, A. (2018). Toxicity of marine pollutants on the ascidian oocyte physiology: An electrophysiological approach. *Zygote*, 26(1), 14–23.
- Gallo, A., Boni, R., Buttino, I., & Tosti, E. (2016). Spermiotoxicity of nickel nanoparticles in the marine invertebrate *Ciona intestinalis* (ascidians). *Nanotoxicology*, 10(8), 1096–1104.
- Galyk, G. V. (2017). Vplyv ioniv vazhkykh metaliv na metabolizm zarodkovykh klityn [The impact of heavy metals on the metabolism of germ cells]. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*, 1, 58–65 (in Ukrainian).
- Gevorgyan, G. A., Mamyan, A. S., Hambaryan, L. R., Khudaverdyan, S. K., & Vaseashta, A. (2016). Environmental risk assessment of heavy metal pollution in Armenian river ecosystems: Case study of Lake Sevan and Debed River catchment basins. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(6), 2387–2399.
- Goyda, O. A. (1993). Biofizicheskiye aspekty rannego ontogeneza zhyvotnykh [Biophysical aspects of early ontogenesis of animals]. *Naukova Dumka, Kyiv* (in Russian).
- Hwang, U. K., Park, J. S., Kwon, J. N., Heo, S., Oshima, Y., & Kang, H. S. (2012). Effect of nickel on embryo development and expression of metallothionein gene in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Journal Faculty of Agriculture Kyushu University*, 57(1), 145–149.
- Ivashkiv, L., Hraduk, M., & Sanagursky, D. (2001). Analiz kros-korelyatsiy u chasovykh zminakh fizyko-khimichnykh pokaznykiv rozvytku zarodkiv v'yuna [Analysis of cross-correlations in temporary changes of physical and chemical parameters of loach germs' development]. *Visnyk of Lviv University. Series Biological*, 27, 3–11.
- Jezierska, B., Lugowska, K., & Witeska, M. (2008). The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 625–640.
- Jitar, O., Teodosiu, C., Oros, A., Plavan, G., & Nicoara, M. (2015). Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms from the Romanian sector of the Black Sea. *New Biotechnology*, 32(3), 369–378.
- Kaplia, A. A. (2016). The influence of heavy metal ions, spermine and sodium nitroprusside on ATP-hydrolases of cell membranes of rat colon smooth muscle. *Ukrainian Biochemical Journal*, 88(4), 20–28.
- Kucukoglu, M., Binokay, U. S., & Boga Pekmezeker, A. (2013). The effects of zinc chloride during early development in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Turkish Journal of Biology*, 37, 158–164.
- MacDonald, R. S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1500S–1508S.
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., & Masudul Azad Chowdhury, A. M. (2017). Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65–74.
- Reversade, B., & De Robertis, E. M. (2005). Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. *Cell*, 123, 1147–1160.
- Ringwood, A. H., McCarthy, M., Bates, T. C., & Carroll, D. L. (2010). The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Marine Environmental Research*, 69, 49–51.
- Sanagursky, D. I., & Goyda, E. A. (1980). Opisaniye biologicheskikh struktur s pozitsiy ikh organizatsii [Description of biological structures from the perspective of their organization]. *Bionics Issues*, 24, 100–105 (in Russian).
- Sisman, T. (2011). Early life stage and genetic toxicity of stannous chloride on zebrafish embryos and adults: toxic effects of tin on zebrafish. *Environmental Toxicology*, 26(3), 240–249.
- Tellis, M. S., Lauer, M. M., Nadella, S., Bianchini, A., & Wood, C. M. (2014). The effects of copper and nickel on the embryonic life stages of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(3), 453–464.
- Tomaszewski, A., & Busselberg, D. (2008). SnCl₂ reduces voltage-activated calcium channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *NeuroToxicology*, 29, 958–963.
- Tualla, I. P. B., & Bitacura, G. (2016). Effects of cadmium and zinc on the gamete viability, fertilization, and embryonic development of *Tripneustes gratilla* (Linnaeus). *Scientifica (Cairo)*, 8175213.
- Zimmermann, I., Marabelli, A., Bertozzi, C., Sivilotti, L. G., & Dutzler, R. (2012). Inhibition of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC by divalent cations. *PLoS Biology*, 10(11), e1001429.



Cellular metabolic activity as a marker of cytotoxicity and immunotropicity of probiotics' derivatives

O. V. Knysh*, O. Y. Isayenko*, O. V. Falko**, Y. M. Babych*,
V. Y. Prokopyuk**, O. S. Prokopyuk**, M. S. Pogorila*

*SI "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine",
Kharkiv, Ukraine

**Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 29.03.2018

Received in revised form
03.05.2018

Accepted 11.05.2018

SI "I. I. Mechnikov Institute
of Microbiology and Immunology
of National Academy of Medical
Sciences of Ukraine",
Pushkins'ka st., 14/16,
Kharkiv, 61057, Ukraine.
Tel.: +38-068-210-47-10.
E-mail: knysh_oksana@ukr.net

Institute for Problems of
Cryobiology and Cryomedicine,
National Academy of Sciences
of Ukraine, Pereyaslavs'ka st.,
23, Kharkiv, 61015, Ukraine.

Knysh, O. V., Isayenko, O. Y., Falko, O. V., Babych, Y. M., Prokopyuk, V. Y., Prokopyuk, O. S., & Pogorila, M. S. (2018). Cellular metabolic activity as a marker of cytotoxicity and immunotropicity of probiotics' derivatives. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 223–228. doi:10.15421/021833

Structural components of cells and metabolites of probiotics with biologically active potential, along with the study of effectiveness, require a series of tests to ensure their safety. The study aims to test the cytotoxicity and potential of structural and metabolic derivatives of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to affect the immunocompetent cells using in vitro tests that characterize the metabolic activity of test-cells. Structural components of probiotic bacteria were obtained by the physical method of disintegration – cyclic freezing-thawing. Metabolic derivatives were obtained by cultivation of producers – bifidobacteria and lactobacilli in their own disintegrates. Cultures of mouse embryonic fibroblasts and splenocytes were used as the test cells. MTT and Alamar Blue® were used as redox indicators. According to the MTT test, filtrates that contain structural and metabolic derivatives at a concentration of 5% and 10% in the incubation medium did not cause significant changes in the metabolic activity of the embryonic mouse fibroblasts. An increase of up to 20% of content in the incubation medium of filtrates of lactobacilli disintegrates led to a reduction of metabolic activity of test cells by $52.7 \pm 6.2\%$, of filtrates of bifidobacteria disintegrates – by $26.5 \pm 6.5\%$, of filtrates of lactobacterium culture – by $15.7 \pm 6.9\%$, of filtrates of bifidobacterium cultures – by $40.4 \pm 6.8\%$. According to the Alamar Blue® test, filtrates that contained only structural derivatives of lactobacilli and bifidobacteria at concentrations of 5% and 10%, as well as filtrates that contained a complex of structural and metabolic derivatives at a concentration of 5%, did not cause significant changes in the reducing ability of mouse splenocytes. At concentrations of 10%, filtrate containing a complex of structural and metabolic derivatives of lactobacilli, caused the inhibition of metabolic activity of splenocytes by $14.6 \pm 3.5\%$, and bifidobacteria – by $10.0 \pm 2.8\%$. With the contents of the incubation medium at 20% concentration, the filtrate of the disintegrates of lactobacilli decreased the metabolic activity of splenocytes by $12.2 \pm 3.0\%$, and the filtrate of lactobacillus cultures that were grown on their own disintegrates – by $43.2 \pm 3.3\%$. Increasing the content of the disintegrate filtrate and the bifidobacteria culture that were grown on their own disintegrates in the culture medium by up to 20% led to a decrease the metabolic activity of splenocytes by $38.0 \pm 2.0\%$. Thus, the research has shown: the orientation of changes in cellular metabolism under the influence of the studied biologically active derivatives is similar in all model systems, and their intensity depends on the type of test cells, regenerative substrates and concentration of the agent of influence in model systems. The obtained results stimulate further exploration of the immunotropicity of the investigated derivatives of probiotic bacteria and can be used for development of new immunobiological preparations.

Keywords: metabolic activity; proliferation of lymphocytes; MTT; mouse embryonic fibroblasts; mouse splenocytes

Метаболічна активність клітин як маркер цитотоксичності та імуотропності дериватів пробіотиків

О. В. Книш*, О. Ю. Ісаєнко*, О. В. Фалько**, Є. М. Бабич*,
В. Ю. Прокопюк**, О. С. Прокопюк**, М. С. Погоріла*

*Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

**Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

Структурні компоненти клітин і метаболіти пробіотиків, що володіють біологічно активним потенціалом, поряд із дослідженням ефективності вимагають проведення низки випробувань безпечності їх застосування. Вивчали цитотоксичність та потентність до впливу

на імунокомпетентні клітини структурних і метаболітичних дериватів *Bifidobacterium bifidum* і *Lactobacillus reuteri* за допомогою тестів *in vitro*, що характеризують метаболічну активність клітин. Структурні компоненти пробіотичних бактерій отримані методом фізичної дезінтеграції – циклічного заморожування та відігрівання. Метаболіти похідні одержані шляхом культивування продуцентів (біфідобактерій та лактобактерій) у власних дезінтегратах. Культури ембріональних фібробластів і спленоцитів мишей використані як тест-клітини, а МТТ та Alamar Blue® – редокс-індикатори. За даними МТТ-тесту, фільтрати, що містять структурні та метаболітичні деривати, за умови вмісту в середовищі інкубації в концентрації 5% та 10%, не викликають суттєвих змін метаболічної активності ембріональних фібробластів миші. Збільшення вмісту в інкубаційному середовищі фільтратів дезінтегратів лактобактерій до 20% знижує метаболічну активність тест-клітин на $52,7 \pm 6,2\%$, фільтратів дезінтегратів біфідобактерій – на $26,5 \pm 6,5\%$, фільтратів культур лактобактерій – на $15,7 \pm 6,9\%$, фільтратів культур біфідобактерій – на $40,4 \pm 6,8\%$. За даними Alamar Blue®-тесту, фільтрати, що містять лише структурні деривати лакто- та біфідобактерій, у концентрації 5% та 10%, а також фільтрати, що містять комплекс структурних і метаболітичних дериватів у концентрації 5%, не спричиняють значних змін відновлювальної здатності спленоцитів миші. За концентрації 10% фільтрати, що містять структурні та метаболітичні деривати лактобактерій, викликають пригнічення метаболічної активності спленоцитів на $14,6 \pm 3,5\%$, а деривати біфідобактерій – на $10,0 \pm 2,8\%$. За вмісту в середовищі інкубації 20% фільтрати дезінтегратів лактобактерій викликають пригнічення метаболічної активності спленоцитів на $12,2 \pm 3,0\%$, а фільтрати культур лактобактерій, вирощених у власних дезінтегратах, – на $43,2 \pm 3,3\%$. Підвищення вмісту в інкубаційному середовищі фільтратів дезінтегратів та культур біфідобактерій, що виростили у власних дезінтегратах, майже на 20% знижує метаболічну активність спленоцитів на $38,0 \pm 2,0\%$. Таким чином, спрямованість змін клітинного метаболізму за впливу досліджуваних біологічно активних дериватів подібна в усіх модельних системах, а їх інтенсивність залежить від виду тест-клітин, відновлюваних субстратів і концентрації агентів впливу в модельних системах. Отримані результати спонукають до подальшого вивчення імуноотропності досліджуваних дериватів пробіотичних бактерій і можуть бути використані для розроблення нових імунобіологічних препаратів.

Ключові слова: метаболічна активність; проліферація лімфоцитів; МТТ; ембріональні фібробласти миші; спленоцити миші

Вступ

Нові речовини та сполуки штучного та природного походження, а також створені на їх основі лікувально-профілактичні засоби потребують як експериментального доклінічного випробування щодо певних біологічних властивостей, так і проведення токсикологічних досліджень (Stefanov, 2001; Habriev, 2005). Розроблення препаратів нового покоління на основі бактеріальних похідних – структурних компонентів і продуктів життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів – метабіотиків, які мають низку переваг порівняно з клітинними препаратами, наразі перспективне й актуальне (Shenderov, 2013; Shaikh & Sreeja, 2017; Shenderov & Gabrichevsky, 2017). Метаболіти пробіотичних мікроорганізмів мають стимулювальний вплив на нормальну мікрофлору (Rivière et al., 2016), виявляють протимікробну (Lew & Liong, 2013; Presti et al., 2015; Sharma et al., 2017), імуномодуляторну (Jensen et al., 2010; Bauer et al., 2013; Kang & Connolly, 2016), протизапальну (Griet et al., 2014; Richards et al., 2016; Castiblanco et al., 2017), протівірусну (Kim et al., 2014; Ang et al., 2016; Al Kassaa, 2017), протипухлинну (Sharma & Shukla, 2016) та інші види активності. Структурні компоненти бактеріальних клітин – фрагменти клітинних стінок, рибосоми, нуклеїнові кислоти відносять до біологічно активних речовин імуноотропної дії завдяки здатності викликати рецептор-опосередковані каскадні реакції, результат яких – активація механізмів імунного захисту організму (Ashraf & Shah, 2013; Kozlov & Andronova, 2013; Fong et al., 2015). Одержують клітинні структури за допомогою різних способів дезінтеграції: хімічних, фізичних, механічних і комбінованих (Bauer et al., 2010; Kim et al., 2014; Kang & Connolly, 2016). Метаболіти отримують шляхом культивування у поживному середовищі продуцента та наступного його видалення (Griet et al., 2014; Castiblanco et al., 2017). При цьому повністю очистити кінцевий метаболітмісний продукт від поживного середовища практично не можливо. Ми розробили спосіб одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штампів, який дозволяє уникнути застосування поживних середовищ і об'єднати розрізнені процедури отримання структурних компонентів бактеріальних клітин та їх метаболітів в один двоетапний процес (Клуш et al., 2018). Необхідність проведення токсикологічних досліджень дериватних продуктів, що містять структурні та метаболітичні похідні пробіотиків, зумовлена перспективністю їх використання під час розроблення нових імунобіологічних препаратів.

Прийнятими в Україні та світі етико-правовими та законодавчими нормами – Директивою 2010/63/ЄС, Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV 2006 року та «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин», до якої 2 травня 2017 року приєдналася Україна, затверджено обмеження щодо застосування тварин для дослідних та інших наукових цілей і необхідність заміни класичних досліджень *in vivo* адек-

ватними альтернативними методами: тестуванням на тканинних та клітинних культурах, математичним моделюванням, комп'ютерними технологіями та іншими тестами. Серед таких методів оцінювання токсичності різних сполук і нових препаратів найпоширенішими стали методи із застосуванням біологічних систем, отриманих від тварин, метаболічні ланцюги яких наближені до таких у людини. Вони дають можливість знизити вартість, скоротити терміни та підвищити надійність доклінічних досліджень (Davila et al., 1998; Arora et al., 2011; Adan et al., 2016). Використання клітинних культур дозволяє виявити прямий цитотоксичний ефект досліджуваних речовин за змінами морфологічних показників, проліферації або метаболічної активності клітин. Відображення деяких аспектів загального метаболізму та маркером життєздатності клітин може служити їх здатність до відновлення редокс-індикаторів – резазурину та солей тетразолію. Такі індикатори після інкубації з популяцією клітин перетворюються на забарвлені або флуоресцентні кінцеві продукти, вміст яких визначається кількісно та пропорційно кількості життєздатних клітин (Rampersad, 2012; Riss et al., 2013; Präbst et al., 2017).

Колориметричний МТТ-тест – стандартний метод перевірки цитотоксичності різних сполук на етапі фармакологічного скринінгу. Він технічно простий, чутливий та відтворюваний і за певних умов відображає кількість життєздатних клітин (Riss et al., 2016; Präbst et al., 2017). У його основі – здатність безбарвної солі тетразолію ((3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію) бромід (МТТ) відновлюватися до забарвленого формазану за дії мітохондріальних ферментів живих клітин, частіше – адгезованих до стінок планшета. Формазан накопичується у вигляді нерозчинних преципітатів усередині, на поверхні клітин і в культуральному середовищі. Загибель клітин супроводжується втратою здатності перетворювати МТТ на забарвлений кінцевий продукт, що реєструють спектрофотометрично. Як тестові застосовують клітини різного походження, серед яких фібробласти визнані стандартним об'єктом під час доклінічних випробувань.

Також для вивчення цитотоксичності потенційних фармацевтичних препаратів і сполук застосовують резазурин-тест (Alamar Blue®-тест), що відображає відновлювальний потенціал проліферувальних клітин (O'Brien et al., 2000; Rampersad, 2012; Präbst et al., 2017). На відміну від МТТ, резазурин відновлюється більш широким спектром ферментів: мітохондріальними та цитоплазматичними дегідрогеназами, цитохромами. Життєздатні клітини з активним метаболізмом відновлюють резазурин у рожевий флуоресцентний продукт – резорурфін, кількість якого пропорційна кількості життєздатних клітин. Мета цієї статті – оцінити цитотоксичність структурних і метаболітичних дериватів *Bifidobacterium bifidum* і *Lactobacillus reuteri* за допомогою *in vitro* тестів шляхом визначення метаболічної активності тест-клітин – ембріональних фібробластів і спленоцитів миші.

Матеріал і методи досліджень

Дослідженню на цитотоксичність підлягали: фільтрати дезінтегратів біфідобактерій і лактобактерій (містять структурні компоненти бактеріальних клітин); фільтрати культур біфідобактерій і лактобактерій, вирощених на власних дезінтегратах (містять структурні компоненти та метаболіти бактеріальних клітин).

Структурні компоненти біфідо- та лактобактерій отримували шляхом застосування фізичного методу дезінтеграції бактеріальних клітин – циклічного заморожування-відтавання. Для цього ліофілізовані виробничі штами *B. bifidum* 1 (з препарату «Біфідум-бактерин»), ПрАТ «Біофарма», Україна) та *L. reuteri* Protectis DSM 17938 (з препарату «BioGaia»), «BioGaia AB», Sweden) після періодатації культивували протягом 20–24 годин за температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ у рідкому або напіврідкому поживному середовищі (MRS-бульйон, тіогліколеве середовище). Після триразового відмивання від середовища готували суспензії клітин з оптичною густиною 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда за допомогою приладу Densi-La-Meter (Lachema, Чехія). Цикли заморожування-відтавання проводили десятиразово в такому режимі: заморожування – пасивним охолодженням у морозильній камері холодильника Samsung RB29FSRNSA до температури $-23 \pm 1^\circ\text{C}$, відігрівання – на водяній бані за температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ до повного відтавання.

Продукти метаболізму біфідо- та лактобактерій одержували під час вирощування пробіотиків у власних дезінтегратах. Для цього мікробну суспензію бактерій з оптичною густиною 10 одиниць за шкалою МакФарланда вносили в дезінтеграт у співвідношенні 1 : 9 і культивували за температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ упродовж 72 годин (Knysh et al., 2018).

Отримані дезінтеграти та культури, які виростили в дезінтегратах, для видалення цілих клітин та клітинного дебрису, спочатку піддавали центрифугуванню за 1 100 g упродовж 15 хвилин, після чого супернатант фільтрували через стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0,2 мкм (Владіпор, Росія).

Експерименти з використанням лабораторних тварин проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Культуру ембріональних фібробластів миші отримували за стандартною методикою з ембріонів мишей BALB/c, вилучених на 13–14-ту добу гестації шляхом механічної та ензиматичної гомогенізації (за допомогою 0,05% Trypsin-EDTA) тулубів ембріонів без навколоплідних оболонок, голови та внутрішніх органів (Jozefczuk et al., 2012). Фібробласти ресуспендували у культуральному середовищі DMEM/F12 (Sigma, Німеччина) з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (FCS), пеніциліну (50 од./мл) і стрептоміцину (50 мг/мл).

Визначення цитотоксичності дериват-вмісних фільтратів за МТТ-тестом. Суспензію фібробластів у концентрації 100 000 клітин/мл вносили у лунки 96-лункового планшета (Tecan Genios, Tecan Inc., Австралія) по 100 мкл, культивували в CO_2 інкубаторі (Automatic Flo-Thru CO_2 Incubators) за 95% вологості, 5% вмісту CO_2 та температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 24 години неприкріплені до пластику клітини видалляли, а прикріплену фракцію клітин культивували до отримання конфлюентного шару. Після формування моношару клітини двічі промивали середовищем DMEM/F12 без сироватки. У дослідні лунки вносили середовище DMEM/F12 з досліджуваними фільтратами у кінцевій концентрації 5, 10 та 20% об., у контрольні – середовище без досліджуваного фільтрату (негативний контроль, К). Планшети інкубували за вищезазначених умов протягом 24 годин. МТТ-реагент (безбарвну сіль тетразолію [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], Sigma Chemical Co., USA) додавали в лунки по 15 мкл. Інкубували з ним клітини упродовж 4 годин в CO_2 інкубаторі в умовах, сприятливих для відновлення клітинами розчинного МТТ-реагенту до нерозчинного формазану. Після закінчення зазначеного часу з лунк видалляли середовище та вносили по 100 мкл диметилсуль-

фоксиду (ДМСО) з метою сольобілізації формазану. Акуратно струшували планшет протягом 5–10 хвилин до розчинення кристалів формазану.

За допомогою планшетного ридера (Elise microplate reader with PC software UTRAO SM 600, China) визначали оптичну густину кожної лунки за 530 нм, віднімали виміряне фонове поглинання за 620 нм. Результати розраховували за формулою ($\text{RAU} = \text{оптична густина зразка з клітинами} - \text{оптична густина зразка без клітин}$) і наводили у відсотках від значень, отриманих для контрольного зразка.

Отримання спленоцитів миші. Селезінку мишей BALB/c (3 самця, віком 6–8 тижнів, вагою 18–20 г) отримували в асептичних умовах. Виділену селезінку одноразово промивали 70% етиловим спиртом і тричі середовищем RPMI-1640 (Biowest), після чого подрібнювали пінцетами до стану однорідної маси, перенесли у пластикову пробірку ємністю 15 мл, вносили 4 мл середовища RPMI-1640 з додаванням 10% ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (37°C), центрифугували за 500 g (1500 об./хв) протягом 5 хвилин. Супернатант видалляли, осад ресуспендували в 1 мл культурального середовища RPMI з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (FCS), пеніциліну (50 од./мл) і стрептоміцину (50 мг/мл). Концентрацію клітин визначали за допомогою гемоцитометра Marienfeld.

Визначення цитотоксичності дериват-вмісних фільтратів за Alamar Blue®-тестом. Суспензію спленоцитів вносили в лунки пластикового планшета Tecan Genios (Tecan Inc., Австралія) по 80 мкл (70 000 клітин на лунку). У дослідні лунки додавали по 20 мкл досліджуваних фільтратів (нерозведених і розведених 1 : 2; 1 : 4 культуральним середовищем). Кінцеві концентрації фільтратів у лунках склали відповідно 20%, 10% та 5% об. Контрольні лунки містили спленоцити у середовищі культивування (негативний контроль, К). Клітинні суспензії культивували в інкубаторі за 5% концентрації CO_2 , 95% вологості та температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ упродовж 24 годин. Alamar Blue® (Serotec Ltd, США) вносили у лунки в концентрації 0,15 мг/мл, після чого планшети витримували упродовж двох годин в інкубаторі у зазначених умовах. Кількість відновленого флуоресцентного барвника у зразках визначали за інтенсивністю флуоресценції за довжини хвилі збудження 550 та емісії 590 нм. Вимірювання проводили за допомогою ридера (Elise microplate reader with PC software UTRAO SM 600, China). Результати вимірювань розраховані за формулою ($\text{RFU} = \text{інтенсивність флуоресценції зразка з клітинами} - \text{інтенсивність флуоресценції зразка без клітин}$) і наведені у відсотках відносно контрольного зразка, що не містить досліджуваних речовин.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Для кожної концентрації досліджуваних речовин експерименти виконано тричі у шести повторях. Для виявлення розбіжностей між вибілками застосовано непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Отримані дані наведені у вигляді середнього арифметичного ($\bar{x}$) зі стандартним відхиленням (SD). Значення $P < 0,05$ прийняті як статистично значущі.

Результати

За результатами МТТ-тесту, присутність у середовищі інкубації ембріональних фібробластів миші фільтратів, що містять структурні та метаболіти деривати лактобактерій, у концентрації 5% та 10% не викликає статистично достовірних змін метаболічної активності тест-клітин (рис. 1). Введення до складу середовища фільтрату дезінтеграту лактобактерій у концентрації 20% спричиняє значне пригнічення відновлювальної здатності фібробластів: її показник знижується на $52,7 \pm 6,2\%$ порівняно з контролем. Метаболічна активність фібробластів за 20% вмісту в середовищі інкубації фільтрату культури лактобактерій, вирощеної у власному кріодезінтеграті, знижується на $15,7 \pm 6,9\%$. Таким чином, відновлювальна здатність фібробластів під час застосування як редокс-індикатора МТТ виявилася чутливішою до впливу структурних, ніж комплексу структурних і метаболітичних дериватів лактобактерій.

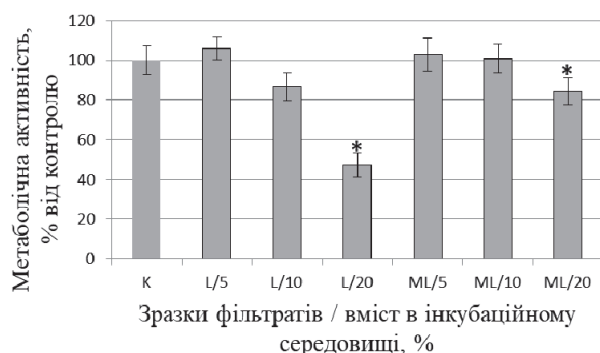


Рис. 1. Вплив дериватів лактобактерій на метаболічну активність ембріональних фібробластів миші, визначену за МТТ-тестом ($x \pm SD$, $n = 3$): L – фільтрати дезінтеграції лактобактерій; ML – фільтрати культур лактобактерій, вирощених на власних дезінтегратах; * – відмінності статистично достовірні за $P < 0,05$ порівняно з контролем

Фільтрати, що містять структурні та метаболічні деривати біфідобактерій, у концентрації 5% та 10% не викликають статистично достовірних змін метаболічної активності ембріональних фібробластів миші за МТТ-тестом (рис. 2). За концентрації в середовищі культивування фільтратів 5% спостерігається тенденція до підвищення відновної здатності фібробластів. Збільшення вмісту фільтратів дезінтеграції біфідобактерій у середовищі культивування до 20% супроводжується суттєвим пригніченням метаболічної активності тест-клітин: її рівень знижується на $26,5 \pm 6,5\%$. Фільтрати культур біфідобактерій, вирощених у власних дезінтегратах, за вмісту в середовищі культивування 20% спричиняють значне зниження відновної здатності ембріональних фібробластів миші: порівняно з контрольними показниками відновний потенціал тест-клітин зменшується на $40,4 \pm 6,8\%$. Отримані результати МТТ-тесту показують, що за однакового вмісту в інкубаційному середовищі (20%) структурні деривати біфідобактерій спричиняють менш суттєве пригнічення метаболічної активності фібробластів, ніж комплекс структурних і метаболічних дериватів.

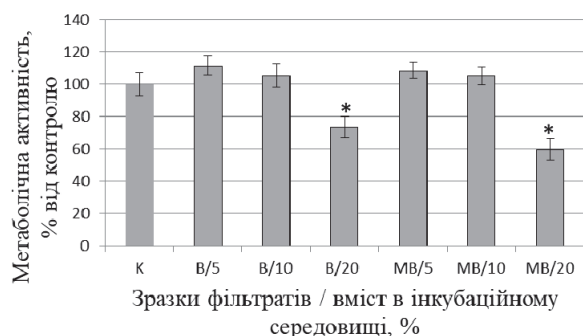


Рис. 2. Вплив дериватів біфідобактерій на метаболічну активність ембріональних фібробластів миші, визначену за МТТ-тестом ($x \pm SD$, $n = 3$): B – фільтрати дезінтеграції біфідобактерій; MB – фільтрати культур біфідобактерій, вирощених на власних дезінтегратах; * – відмінності статистично достовірні за $P < 0,05$ порівняно з контролем

Як видно з наведених на рисунку 3 даних, вміст у середовищі інкубації фільтратів дезінтеграції у концентрації 5% і 10% та фільтратів культур лактобактерій, вирощених у власних дезінтегратах, у концентрації 5% не викликає статистично достовірних змін метаболічної активності спленоцитів миші за результатами Alamar Blue®-тесту. Присутність в інкубаційному середовищі дезінтеграції лактобактерій у концентрації 20% спричиняє статистично достовірне зниження метаболічної активності тест-клітин порівняно з контролем (на $12,2 \pm 3,0\%$). Фільтрати культур лактобактерій, вирощених на власних дезінтегратах, у концентрації 10% викликають статистично достовірне зниження метаболічної ак-

тивності спленоцитів миші на $14,6 \pm 3,5\%$, а в концентрації 20% – на $43,2 \pm 3,3\%$ порівняно з контрольними показниками. Таким чином, за результатами Alamar Blue®-тесту, суттєвіше пригнічення метаболічної активності спленоцитів миші відбувається за дії комплексу структурних і метаболічних порівняно з аналогічним ефектом, викликаним дією структурних дериватів лактобактерій.

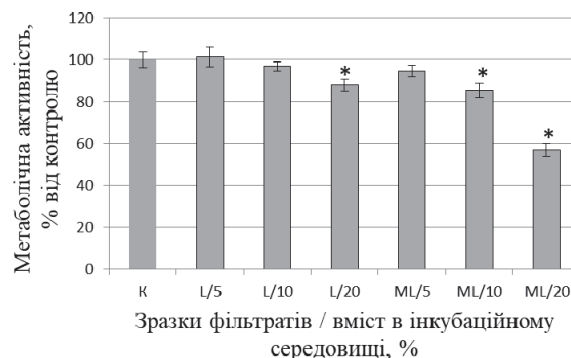


Рис. 3. Вплив дериватів лактобактерій на метаболічну активність спленоцитів миші, визначену за Alamar Blue®-тестом ($x \pm SD$, $n = 3$): L – фільтрати дезінтеграції лактобактерій; ML – фільтрати культур лактобактерій, вирощених на власних дезінтегратах; * – відмінності статистично достовірні за $P < 0,05$ порівняно з контролем

Результати дослідження впливу дериватів біфідобактерій на метаболічну активність спленоцитів миші в Alamar Blue®-тесті дозволили зробити висновок про те, що всі досліджувані дериват-умісні фільтрати за концентрації в інкубаційному середовищі 5% та фільтрати дезінтеграції біфідобактерій за концентрації 10% не викликають статистично достовірних змін метаболізму тест-клітин (рис. 4). За умови 20% вмісту в середовищі інкубації фільтратів дезінтеграції біфідобактерій метаболічна активність тест-клітин пригнічується на $38,2 \pm 2,0\%$ порівняно з контролем. Уведення в середовище інкубації спленоцитів фільтратів культур біфідобактерій, вирощених у власних дезінтегратах, в концентрації 10% пригнічує метаболічну активність спленоцитів на $10,0 \pm 2,8\%$, а в концентрації 20% – на $38,0 \pm 2,1\%$ порівняно з контрольними показниками. Отже, за даними Alamar Blue®-тесту, за дії комплексу структурних і метаболічних дериватів біфідобактерій відбувається таке саме за інтенсивністю пригнічення метаболічної активності спленоцитів миші, як і за дії структурних дериватів біфідобактерій.

Обговорення

Отримані дані щодо впливу дериватів лактобактерій на метаболічну активність ембріональних фібробластів миші добре узгоджуються з результатами аналогічних досліджень, які показали відсутність цитотоксичного впливу суміші фільтратів культуральних рідин двох штабів *L. reuteri* (ATCC PTA 5298 та DSM 17938) на життєздатність гінгивальних фібробластів із застосуванням МТТ-тесту (Castiblanco et al., 2017). Слід зазначити, що вміст метаболітів лактобактерій в інкубаційному середовищі, досліджений авторами, значно нижчий, ніж обраний безклітинний супернатант, який розводили до концентрації, еквівалентної тій, що виробляється бактеріями у кількості від $0,5$ до $5,0 \times 10^7$ КУО/мл. Інші автори (Sultana et al., 2013) показали, що лізат *L. reuteri* ATCC 55730 (отриманий із 1×10^8 КУО/мл бактерій) не впливає на життєздатність нормальних епідермальних кератиноцитів людини, визначену за допомогою МТТ-тесту. Відсутність цитотоксичного ефекту фільтратів ультразвукових дезінтеграцій іншого виду лактобактерій – *L. ruminis* відносно клітин HeLa за допомогою МТТ-тесту встановили Kim et al. (2014). Концентрація клітин, підданих дезінтеграції, відповідала обраній у нашому дослідженні. Вміст фільтрату в середовищі культивування тест-клітин становив 10% (у наших експериментах – 5% та 20%). Під час дослідження впливу різних компонентів лактобактерій (*L. gasseri* та *L. crispatus*): культуральних супернатантів, цитоплазматичних екстрактів, екстрак-

тів клітинних стінок і живих клітин на проліферативну активність нормальних та пухлинних (HeLa) цервікальних фібробластоподібних клітин за допомогою МТТ-тесту виявлено наявність цитотоксичної дії відносно пухлинних та відсутність – нормальних клітин (Motevaseli et al., 2013).

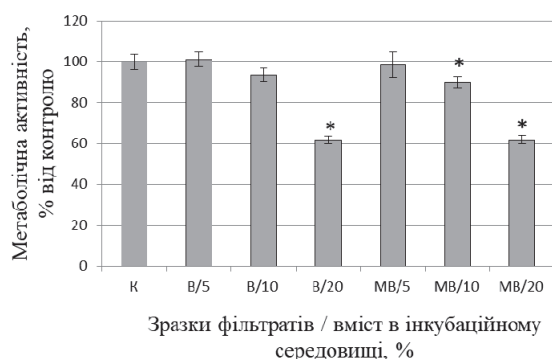


Рис. 4. Вплив дериватів біфідобактерій на метаболічну активність спленоцитів миші, визначену за Alamar Blue®-тестом ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$): B – фільтрати дезінтеграції біфідобактерій; MB – фільтрати культур біфідобактерій, вирощених на власних дезінтегратах; * – відмінності статистично достовірні за $P < 0,05$ порівняно з контролем

Одержані дані щодо впливу дериватів біфідобактерій на метаболічну активність ембріональних фібробластів миші подібні до повідомлених іншими авторами результатів аналогічних досліджень. Цитотоксичність клітинних похідних різних штамів біфідобактерій за допомогою МТТ-тесту дослідили Kim et al. (2014). Автори показали, що 10% вміст у середовищі культивування тест-клітин фільтратів ультразвукових дезінтеграцій біфідобактерій не спричиняє цитотоксичної дії відносно клітин HeLa. Схожі результати також навели Sultana et al. (2013): лізат *B. longum* ATCC 51870 (отриманий з 10^8 КУО/мл бактерій) не впливає на метаболічну активність нормальних епідермальних кератиноцитів людини, визначену за допомогою МТТ-тесту. Залежність ефекту екстракту *B. adolescentis* SPM0212, що містить структурні компоненти біфідобактерій, від виду тест-клітин, виявили Lee et al. (2008). Цитотоксична дія спостерігається відносно ракових клітин епітелію товстого кишечника та відсутня відносно не вражених неопластичним процесом епітеліальних клітин.

Низка авторів застосували Alamar Blue®-тест для оцінювання здатності спленоцитів до проліферації за дії похідних лактобактерій (Bauer et al., 2010; Kang et al., 2016). При цьому автори мали на увазі, що зміни метаболічної активності клітин – це відображення зміни їх проліферативної активності та маркера імунотропності досліджуваних речовин. Під час вивчення впливу лізатів (400–500 мг/мл) та супернатантів *L. reuteri* ATCC 55730 (що культивували в середовищі MRS із 50 mM гліцерином і без нього) на проліферативну активність лімфоцитів селезінки мишей BALB/c установлено, що лізати та супернатанти, отримані після культивування *L. reuteri* за відсутності гліцерину, викликають незначну дозозалежну стимуляцію проліферації лімфоцитів (Kang et al., 2016). Стимулювальний ефект супернатантів, отриманих після культивування лактобактерій за присутності гліцерину, значно перевищував навіть ефект відомих мітогенів – конкаваліну А, міогену лактоноса, фітогемаглютиніну та ліпополісахариду. Імуностимулювальний ефект екстрактів лактобактерій (*L. fermentum*, *L. rhamnosus*) на спленоцити мишей виявили під час застосування Alamar Blue®-тесту та інші дослідники (Bauer et al., 2010).

Дослідження цитотоксичності живих *L. reuteri* Protectis DSM 17938 відносно клітин рабдоміосаркоми (RD) та епітеліальної колоректальної аденокарциноми (Caco-2) із застосуванням резазурин-тесту показало, що година інкубації тест-клітин із живими лактобактеріями (10^{11} КУО) не викликає значної втрати їх життєздатності (Ang et al., 2016).

Вивчення впливу різних фракцій цитоплазматичних пептидів та білків *B. lactis* виявило стимулювальний вплив похідних на проліферативну активність спленоцитів у разі застосування Alamar

Blue® як маркера клітинної проліферації (Amrouche et al., 2006). Вираженість стимулювального впливу залежала від фракції та мала концентраційнозалежний характер. Стимулювальний ефект дозволив авторам зробити висновок, що досліджені білково-пептидні фракції біфідобактерій імунологічно активні.

Порівнюючи отримані дані та результати досліджень впливу дериватів лакто- та біфідобактерій на метаболічну активність спленоцитів миші із застосуванням Alamar Blue®-тесту іншими авторами (Amrouche et al., 2006; Bauer et al., 2010; Kang et al., 2016), ми дійшли висновку: ефект похідних пробіотичних бактерій залежить від штаму, умов культивування пробіотика, способу отримання та біохімічного складу кінцевого продукту. Різноступінчастий характер впливу дериватумісних продуктів на спленоцити у нашому (пригнічення) та вищезазначених дослідженнях (стимуляція) можна пояснити, спираючись на фундаментальну біомедичну парадигму гормезису, згідно з якою малі дози стимулюють, а великі – інгібують біологічні показники (Shafan et al., 2010). Ймовірно, для отримання стимулювального впливу на спленоцити необхідно застосування менших доз випробуваних нами дериватумісних фільтратів, що планується перевірити у подальших дослідженнях.

Висновки

Незважаючи на застосування в цій роботі модельних систем, що відрізняються використанням різних за морфофункціональними властивостями тест-клітин і субстратних речовин для ферментативного відновлення, характер впливу досліджуваних дериватумісних фільтратів на метаболічну активність тест-клітин подібний. Інтенсивність впливу досліджуваних похідних пробіотичних бактерій на метаболічну активність тест-клітин має залежність від концентрації дериватного продукту у середовищі інкубації та складу модельної системи (тест-клітин і редокс-індикатора). Уміст фільтратів дезінтеграцій лакто- та біфідобактерій в інкубаційному середовищі 5% та 10% суттєво не впливає на метаболічну активність ембріональних фібробластів і спленоцитів миші. Підвищення вмісту зазначених фільтратів у інкубаційному середовищі до 20% супроводжується статистично достовірним зниженням метаболічної активності тест-клітин. Фільтрати, які містять структурні та метаболічні деривати пробіотиків, у концентрації 5% не викликають значних змін метаболічної активності обох видів тест-клітин. Концентрація зазначених фільтратів у середовищі інкубації 10% не впливає на метаболічну активність ембріональних фібробластів, але спричиняє зниження відновного потенціалу спленоцитів миші. Підвищення вмісту в середовищі інкубації фільтратів культур пробіотиків, вирощених у власних дезінтегратах, до 20% супроводжується значним пригніченням метаболічної активності ембріональних фібробластів та спленоцитів миші.

Отримані результати дослідження цитотоксичності біологічно активних дериватів *B. bifidum* та *L. reuteri* спонукають до подальшого вивчення імунотропності досліджуваних дериватів пробіотичних бактерій і можуть бути використані для розроблення нових імунобіологічних препаратів дериватного типу.

References

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221.
- Al Kassaa, I. (Ed.). (2017). The antiviral activity of probiotic metabolites. In: *New insights on antiviral probiotics*. Springer, Cham.
- Amrouche, T., Boutin, Y., & Fliss, I. (2006). Effects of bifidobacterial cytoplasmic peptide and protein fractions on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food and Agricultural Immunology*, 17(1), 29–42.
- Ang, L. Y. E., Too, H. K. I., Tan, E. L., Chow, T. K. V., Shek, P. C. L., Tham, E., & Alonso, S. (2016). Antiviral activity of *Lactobacillus reuteri* protectis against Coxsackievirus A and Enterovirus 71 infection in human skeletal muscle and colon cell lines. *Virology Journal*, 13(1), 111.
- Arora, T., Mehta, A. K., Joshi, V., Mehta, K. D., Rathor, N., Mediratta, P. K., & Sharma, K. K. (2011). Substitute of animals in drug research: An approach towards fulfillment of 4Rs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(1), 1.

- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2013). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956.
- Bauer, J. A., Salvagni, M., Vigroux, J. P. L., Chalvet, L. L. G., & Chiavaroli, C. (2010). Immunomodulatory extracts from *Lactobacillus* bacteria and methods of manufacturing and use thereof. U.S. Patent No 20100055082A1. U.S. Patent and Trademark Office, Washington.
- Castiblanco, G. A., Yucel-Lindberg, T., Roos, S., & Twetman, S. (2017). Effect of *Lactobacillus reuteri* on cell viability and PGE2 production in human gingival fibroblasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(3), 278–283.
- Davila, J. C., Rodriguez, R. J., Melchert, R. B., & Acosta, J. D. (1998). Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 63–96.
- Fong, F. L. Y., Shah, N. P., Kirjavainen, P., & El-Nezami, H. (2015). Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *International Reviews of Immunology*, 35(3), 179–188.
- Griet, M., Zelaya, H., Mateos, M. V., Salva, S., Juarez, G. E., Font de Valdez, G., Villena, J., Salvador, G. A., & Rodriguez, A. V. (2014). Soluble factors from *Lactobacillus reuteri* CRL1098 have anti-inflammatory effects in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *PLoS One*, 9(10), e110027.
- Habrieu, R. U. (2005). Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Medicina, Moscow (in Russian).
- Jensen, G. S., Benson, K. F., Carter, S. G., & Endres, J. R. (2010). GanedenBC 30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects *in vitro*. *BMC Immunology*, 11(1), 15.
- Jozefczuk, J., Drews, K., & Adjaye, J. (2012). Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Journal of Visualized Experiments*, 64.
- Kang, H. J., & Connolly, E. (2016). Method of improving immune function in mammals using lactobacillus strains with certain lipids. U.S. Patent No 2016/0287702 A1. U.S. Patent and Trademark Office, Washington.
- Kim, M. J., Lee, D. K., Park, J. E., Park, I. H., Seo, J. G., & Ha, N. J. (2014). Anti-viral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM1605 against Cocksackievirus B3. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28(4), 681–688.
- Knysh, O. V., Isajenko, O. J., Babych, J. M., Poljanskaja, V. P., Zachepilo, S. V., Kompanijec, A. M., & Gorbach, T. V. (2018). Sposib oderzhannja biologichno aktyvnykh deryvativ bakterij probiotychnykh shtamiv [Method for obtaining biologically active derivatives of bacteria of probiotic strains]. Patent of Ukraine for useful model No 122859. Derzhavne Patentne Vidomstvo Ukrainy, Kyiv (in Ukrainian).
- Kozlov, I. G., & Andronova, T. M. (2013). Lekarstvennyye vozdeystviya cherez retseptory vrozhdennogo immuniteta [Effect of medicines via innate immunity receptors]. *Allergologiya i Immunologiya*, 14(4), 254–259 (in Russian).
- Lee, D. K., Jang, S., Kim, M. J., Kim, J. H., Chung, M. J., Kim, K. J., & Ha, N. J. (2008). Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*, 8(1), 310.
- Lew, L. C., & Liong, M. T. (2013). Bioactives from probiotics for dermal health: Functions and benefits. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1241–1253.
- Motevaseli, E., Shirzad, M., Akrami, S. M., Mousavi, A. S., Mirsalehian, A., & Modarresi, M. H. (2013). Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *Journal of Medical Microbiology*, 62(7), 1065–1072.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *The FEBS Journal*, 267(17), 5421–5426.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: Gilbert, D., Friedrich, O. (Eds.). *Cell Viability Assays. Methods in Molecular Biology*, 1601. Humana Press, New York.
- Presti, I., D'Orazio, G., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M., & Di Gennaro, P. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their *in vitro* effect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5613–5626.
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347–12360.
- Richards, J. L., Yap, Y. A., McLeod, K. H., Mackay, C. R., & Mariño, E. (2016). Dietary metabolites and the gut microbiota: An alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. *Clinical and Translational Immunology*, 5(5), e82.
- Riss, T. L., Moravec R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In: Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C. et al. (Eds.). *Assay guidance manual*. Eli Lilly & Company, Bethesda.
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 979.
- Shafra, L. M., Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Gozhenko, A. I., & Nasibullin, B. A. (2010). K obosnovaniyu gormezisa kak fundamentalnoy biomeditsinskoy paradigmy [On the substantiation of hormesis as fundamental biomedical paradigm]. *Sovremennye Problemy Toksikologii*, 49–50(2–3), 13–23 (in Russian).
- Shaikh, A. M., & Sreeja, V. (2017). Metabiotics and their health benefits. *International Journal of Fermented Foods*, 6(1), 11–23.
- Sharma, C., Singh, B. P., Thakur, N., Gulati, S., Gupta, S., Mishra, S. K., & Panwar, H. (2017). Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. *3 Biotechnology*, 7(1), 31.
- Sharma, M., & Shukla, G. (2016). Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1940.
- Shenderov, B. A. (2013). Metabiotics: Novel idea or natural development of probiotic conception. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 24(1), 20399.
- Shenderov, B. A., & Gabrichevsky, G. N. (2017). Metabiotics: An overview of progress, opportunities and challenges. *International Conference on Chronic Diseases & 6th International Conference on Microbial Physiology and Genomics Brussels, Belgium, 2017. Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 9(4 Suppl), 103.
- Stefanov, O. V. (2001). Doklinichni doslidzhennia likars'kyh zasobiv [Preclinical studies of drugs]. Avicena, Kyiv (in Ukrainian).
- Sultana, R., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. (2013). Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lysates. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4887–4894.



Comparative morphology and biology of nematodes of genus *Heterakis* (Nematoda, Heterakidae), parasites of the domestic goose (*Anser anser*) in Ukraine

V. A. Yevstafiyeva*, V. V. Melnychuk *, O. V. Nikiforova**, K. V. Suprunenko*,
L. N. Korchan*, T. P. Lokes-Krupka*, I. S. Nehrebetskyi*, N. I. Korchan*

*Poltava State Agrarian Academy, Poltava, Ukraine

**Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 16.03.2018

Received in revised form

25.04.2018

Accepted 28.04.2018

Poltava State Agrarian Academy,
Skovorody st., 1/3,
Poltava, 36003, Ukraine.
Tel.: +38-050-183-78-78.
E-mail: evstva@ukr.net

Kharkiv State Zooveterinary
Academy, Academichna st., 1,
Malaya Danylivka, Dergachi
district, Kharkiv, 62341, Ukraine.
E-mail: ixodes1795@gmail.com

Yevstafiyeva, V. A., Melnychuk, V. V., Nikiforova, O. V., Suprunenko, K. V., Korchan, L. N., Lokes-Krupka, T. P., Nehrebetskyi, I. S., & Korchan, N. I. (2018). Comparative morphology and biology of nematodes of genus *Heterakis* (Nematoda, Heterakidae), parasites of the domestic goose (*Anser anser*) in Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 229–236. doi:10.15421/021834

The genus *Heterakis* Dujardin, 1845 is one of the most widely distributed genera of nematode parasites of domestic and wild birds. Geographically and ecologically predominant species include *Heterakis gallinarum* Schrank, 1788 and *Heterakis dispar* Schrank, 1790. Prevalence and occurrence of these nematodes in the domestic goose (*Anser anser* dom.) depend on their biological and morphological specifics which ensure the highest viability, fast growth and maximum fertility in the host. This study presents the abundance and species composition of nematodes of the genus *Heterakis* in the domestic goose in Ukraine. Comparative study of morphological and metrical characteristics of *H. gallinarum* and *H. dispar* adult females and males is presented. Additional morphometric characteristics are proposed for easier identification of the two species. Stages and periods of embryonic development of *H. gallinarum* and *H. dispar* nematodes obtained from domestic geese are established according to morphological and metrical characters. Of the two species, *H. dispar* is prevalent in domestic geese from Poltava, Kharkiv and Kyiv regions. Abundance index of this species is 9.8 specimens, and intensity of infection index is up to 62 specimens. *H. gallinarum* is rarer, its abundance index is 1.2 specimens and maximum intensity of infection is 30 specimens. Species-specific morphological differences are more distinct in male nematodes in the size and structure of the spicules, lateral wing-like protrusions of pseudobursas, numbers and position of tail papillae. Additional metrical characteristics differ between *H. gallinarum* and *H. dispar* nematodes, allowing us to identify not only adult specimens but also eggs. Embryonic development of both species occurs in four morphologically distinct stages: protoplast, blastomere cleavage, formation of first and second stage larvae. Eggs of *H. gallinarum* nematodes become infectious in eight days at 27 °C, eggs of *H. dispar* in four days, their viability in laboratory culture is 84.3 ± 0.58 and $91.3 \pm 1.53\%$ respectively.

Keywords: heterakiasis, *Heterakis gallinarum*, *Heterakis dispar*, identification characters; embryogenesis; metrical parameters

Introduction

Nematodes are one of the leading groups of animals on Earth. Their expected diversity may well equal a million species, and most known species can parasitize in humans, animals and plants (Blaxter et al., 1998; Castagnone-Sereno & Danchin, 2014). Parasitic nematodes are essential components of biocoenoses; they utilize a lot of energy in ecosystems and can regulate the abundance of their hosts (Bongers & Ferris, 1999; Lok, 2016; Viney, 2017). Nematodes are the most widely distributed parasites of domestic and wild animals, and the genus *Heterakis* Dujardin, 1845 includes especially common and prevalent parasite species. Representatives of the genus have been found in domestic chickens in West and South Africa (Phiri et al., 2007; Ogbaje et al., 2012), Great Britain (Pennycott & Steel, 2001) and Germany (Kaufmann et al., 2011; Wongrak et al., 2014), in *Colinus virginianus*, *Branta bernicla nigricans*, *Chen caerulescens caerulescens*, *Chen rossii* and *Anser albifrons* in USA (Moore & Simberloff, 1990; Shutler et al., 2012; Amundson et al., 2016; Boone et al., 2017), in wild migratory birds and domestic waterfowl in South Asia (Hoque et al., 2014), and in birds of the families Psittacidae, Caccatiidae, Phasianidae and Anatidae in Spain (Cordón et al., 2009). In Ukraine, nematodes of the genus

Heterakis have been found in domestic birds (chickens, turkeys and geese) with prevalence ranging 2.9–100.0% (Bogach & Taranenko, 2003; Zaikina & Marshalkina, 2015).

Heterakis gallinarum Schrank, 1788 is a typical and most common species in domestic and wild terrestrial birds (*Gallus gallus* dom., *Numida meleagris*, *Meleagris gallopavo*, *Coturnix coturnix*) representative of the genus (Tompkins et al., 2000; Brener et al., 2006; Sherwin et al., 2013; Al-Moussawi, 2016). In waterfowl (*Anser anser* dom., *Anas platyrhynchos* dom.), *Heterakis dispar* Schrank, 1790 is the most characteristic and common species (Gicik & Arslan, 2003; Fedynich et al., 2005).

It was however proved that terrestrial birds can be infected with *H. dispar*, and waterfowl with *H. gallinarum*. Hence, these parasites can adapt to uncharacteristic hosts, especially in areas where different bird species are kept or found together (Avcioglu et al., 2008; Hoque et al., 2011; Wang et al., 2012; Kornaš et al., 2015). There are a few reports of these parasitic species being found together in waterfowl (Harradine, 1982; Dube et al., 2010; Nagwa et al., 2013).

Adult *H. gallinarum* and *H. dispar* nematodes are differentiated by morphological specifics of the tail ends in males, namely the shape and length of spicules and the number of tail papillae. Other morphological

characters are very similar, especially in females which can be considered identical (Abou Znada, 1993; Rahman & Manap, 2014; Sheikh et al., 2016). There are also diagnostically important metrical species characters, such as length and width of body, size of bulbous and esophagus. In males, other characters include size of preanal sucker, distance from anus to tail end and various parameters describing the position of tail papillae in relation to each other and to other body parts. Metrical characters of females include size of eggs in the vulva and position of the vulva. At the same time, data on metrical characters by different authors for one parasite species from different avian species vary (Avcioglu et al., 2008; Park & Shin, 2010; Tanveer et al., 2015).

Helminth abundance in general and that of *H. gallinarum* and *H. dispar* in particular in waterfowl populations depends on specifics of parasite biology and their maximum adaptation to the widest variety of hosts. Life cycles of the two parasite species are direct. Embryogenesis of *H. gallinarum* is researched relatively better, while development of *H. dispar* eggs is a subject of few studies (Clapham, 1933; Roberts, 1937; Madsen, 1950; Skrjabin et al., 1961).

Notably, nematodes of the genus *Heterakis* as other parasitic organisms are constantly evolving, which is a process associated with morphological, metrical and biological changes. Thus, morphology and biology of *Heterakis* nematodes should be studied in different species from varying climatic and geographic conditions. Also, new approaches should be implemented in studies of identifying characters in different taxa of the genus. The purpose of this work was to study the fauna, abundance, morphological and biological species-specific characters of nematodes of the genus *Heterakis* which parasitize domestic geese (*Anser anser* dom.) in Ukraine.

Materials and methods

The studies were conducted in 2016–2017 at the Laboratory of Parasitology and Veterinary-Sanitary Expertise of the Department of Veterinary Medicine of Poltava State Agrarian Academy. Material for species identification, abundance and parasitological analysis of nematodes of the genus *Heterakis* was collected during helminthological investigation of the intestine of 463 domestic geese (Skrjabin, 1928) from Poltava, Kharkiv and Kyiv regions. Abundance, occurrence and intensity of infection were used to quantify numbers of *Heterakis* nematodes. The roundworms were identified according to Skrjabin et al. (1961). In morphological analysis, 568 specimens of the species *H. gallinarum* (173 males and 395 females) and 4,541 specimens of the species *H. dispar* (3,077 males and 1,464 females) were used.

Biological specifics of embryogenesis of *H. gallinarum* and *H. dispar* in culture were studied on eggs collected from the gonads of female nematodes. The eggs were cultured to the infectious stage with the second stage larvae in a Petri dish for 10 days in a thermostat at 27 °C. The cultures were examined daily under a light microscope. Embryonic stage of development and morphological characteristics were studied. Eggs that stopped developing or were destroyed were also noted. Each experiment was performed in triplicate.

To measure metrical characteristics of adult and embryonic nematodes of the genus *Heterakis*, ImageJ for Windows® (version 2.00) software was used in interactive mode using 5×, 10×, 40× objective and 10× photo eyepiece. To calibrate the image analyzer, the ruled scale of an ocular micrometer was coincided with the scale of stage micrometer included in MikroMed microscope kit. Microphotographs were taken using a digital camera of MikroMed (China) microscope.

Standard deviation (SD) and average values ($\bar{x}$) were calculated. Significance of difference between average values in studied groups of nematodes was established using one-way analysis of variance and F-test for $P < 0.05$ confidence level.

Results

The genus *Heterakis* in domestic geese from Ukraine is represented by two species, *H. gallinarum* and *H. dispar*. The latter is more common, its prevalence in studied birds was 68.4%. The species *H. gallinarum* was less common, found in 16.4% of studied birds.

Abundance of both nematode species also varied. Index of Abundance for *H. dispar* was up to 9.8 specimens, intensity of infection was 14.3 specimens in average (ranging from 1 to 62 specimens). The abundance of *H. gallinarum* in geese was much lower, 1.2 specimens with average intensity of infection 7.4 specimens (ranging from 1 to 30 specimens). Helminthological investigation revealed adult male and female nematodes of the genus. Females were almost twice as common as males in both species. Their ratio ranged from 2.1 : 1 (for *H. dispar*) to 2.2 : 1 (for *H. gallinarum*).

Comparison of morphological characters of *H. gallinarum* and *H. dispar* from domestic geese revealed differentiating characteristics that are more distinct in males. The two species are in general visually identical. The mouth at the head ends of both female and male nematodes of either species is surrounded by three indistinct lips. The esophagus consists of three parts: short pharynx, cylindrical middle part and bulbous. The head end can be slightly curved (Fig. 1).

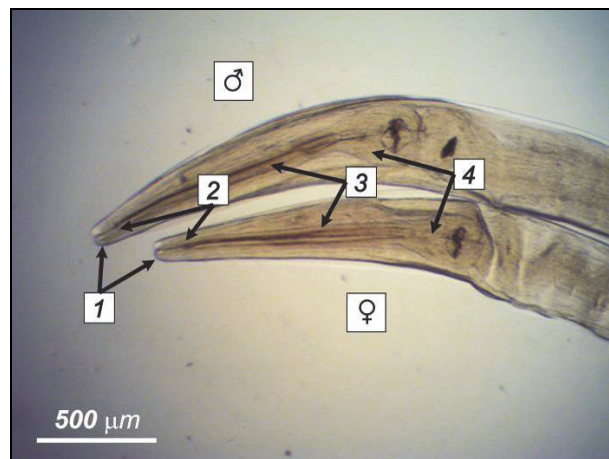


Fig. 1. Head end of nematodes of the genus *Heterakis*, isolated from geese: 1 – lips, 2 – pharynx, 3 – cylindrical part of esophagus, 4 – bulbous

Females of both species were visually identical. The tail end is elongated, gradually tapered. The anal opening is at the posterior part of body (Fig. 2d). The vulva of *H. gallinarum* female is located in the middle of the body. There are three bends in the vagina after the vulva, angled posteriorly, anteriorly and once again posteriorly (Fig. 2b). The vulva of the *H. dispar* female is located in the posterior part of body. Another characteristic feature is presence of small wart-like cuticular protrusions in the vulval area. The vagina has bends that are less pronounced than in *H. gallinarum* females (Fig. 2a). In both species, the vagina is connected to two opposing uteri. The uteri contain oval eggs with distinct two-contour shells (Fig. 2c).

The main species characters of the studied males were specifics of spicule size and structure, and numbers and position of tail papillae. Male *H. gallinarum* have stylet-like tail end and pseudobursa with well-developed lateral “wings” that smoothly taper. The left spicule is significantly longer than the right, and has a tapered sharp end. The right short spicule is larger, has wing-like protrusions, its distal end is partly coarse, gradually tapered to a pointy hook. Gubernaculum is absent (Fig. 3).

Twelve pairs of tail papillae are located at the tail end (four postanal pairs, six adanal pairs, two preanal pairs) and one medial unpaired preloacal papilla. The preanal sucker is easily seen, round, well-developed, surrounded by a chitinized ring (Fig. 4).

The tail pseudobursa of *H. dispar* males also consists of lateral wings. However, they are smaller than in *H. gallinarum* and have wavy edges that follow the shape of the tail papillae, which support the wings. The tail ends into a stylet-like protrusion. Two spicules are visually equal. The proximal ends of both spicules are wide and blunt. Distally, spicules taper to sharp ends. The gubernaculum is absent. Males of *H. gallinarum* similarly to *H. dispar* males have round preanal suckers with a well-developed chitinized ring and an unpaired medial papilla. Distinctively, *H. dispar* males have 13 pairs of tail papillae: four preanal pairs (two pairs of stalked papillae at the sides of the sucker, and two

lateral pairs of papillae supporting the anterior part of the pseudobursa), four adanal pairs of papillae (two pairs of unstalked papillae at the sides of the anus and two lateral pairs of large papillae that support the middle of the pseudobursa), five postanal pairs of papillae (one pair of large papillae lateral to the anus; one pair of averagely sized papillae directly behind the former; three pairs of small papillae grouped together at the

divide between the tail end and tail protrusion) (Fig. 5). Hence, the metrical parameters of adult females and males of *H. gallinarum* and *H. dispar* are significantly different, which is very important in species identification. For males of these species, 20 morphological parameters were found, 19 of which are significantly different and can be considered as taxonomic characters (Table 1).

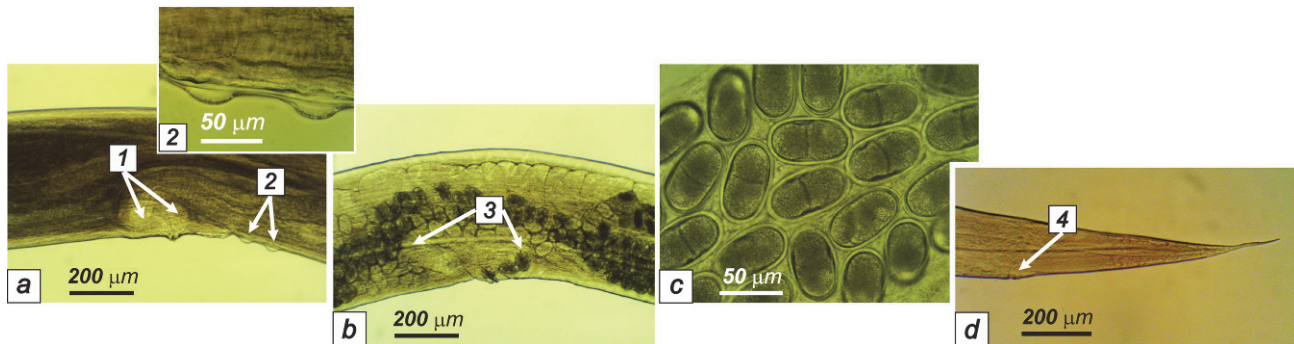


Fig. 2. ♀ *Heterakis* from geese: *a* – *H. dispar* vulval area, 1 – vaginal bends, 2 – cuticular protrusions; *b* – *H. gallinarum* vulval area, 3 – vaginal bends; *c* – eggs in uterus; *d* – tail end, 4 – anus

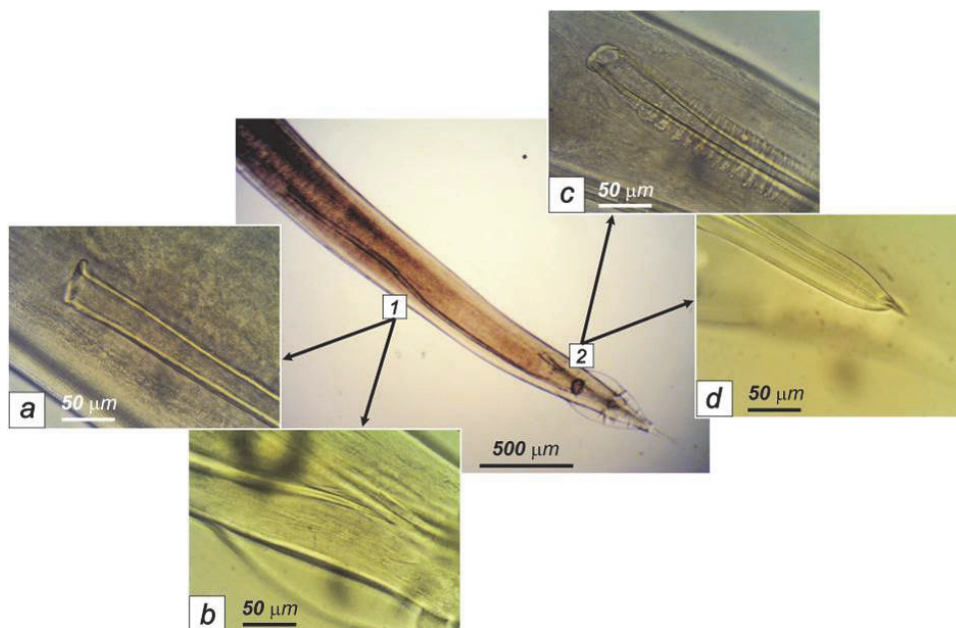


Fig. 3. Spicule structure in ♂ *H. gallinarum*: 1 – left spicule, *a* – proximal end, *b* – distal end; 2 – right spicule, *c* – proximal end, *d* – distal end

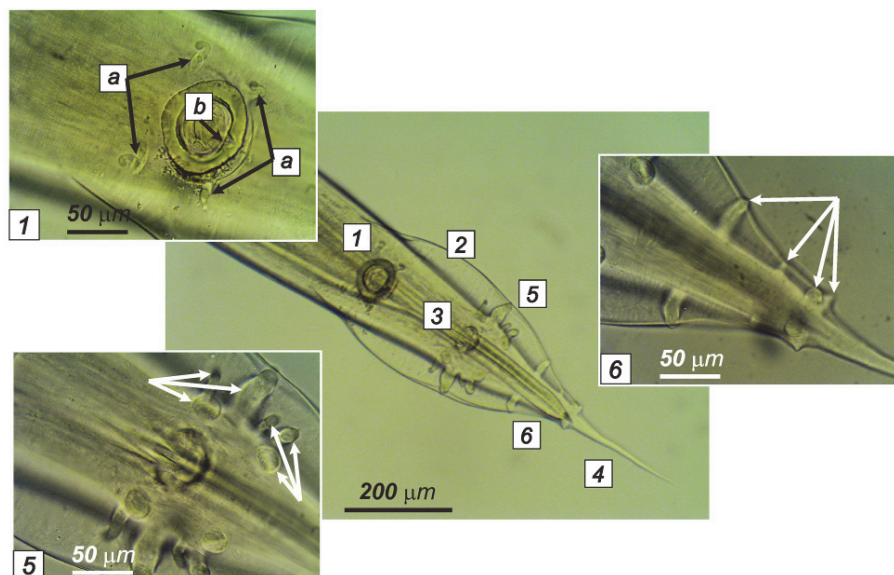


Fig. 4. Tail end of ♂ *H. gallinarum*: 1 – preanal sucker; *a* – position of two preanal pairs of papillae; *b* – medial unpaired papilla; 2 – wings of pseudobursa; 3 – anus; 4 – stylet-like protrusion; 5 – position of six pairs of adanal papillae; 6 – position of four pairs of postanal papillae

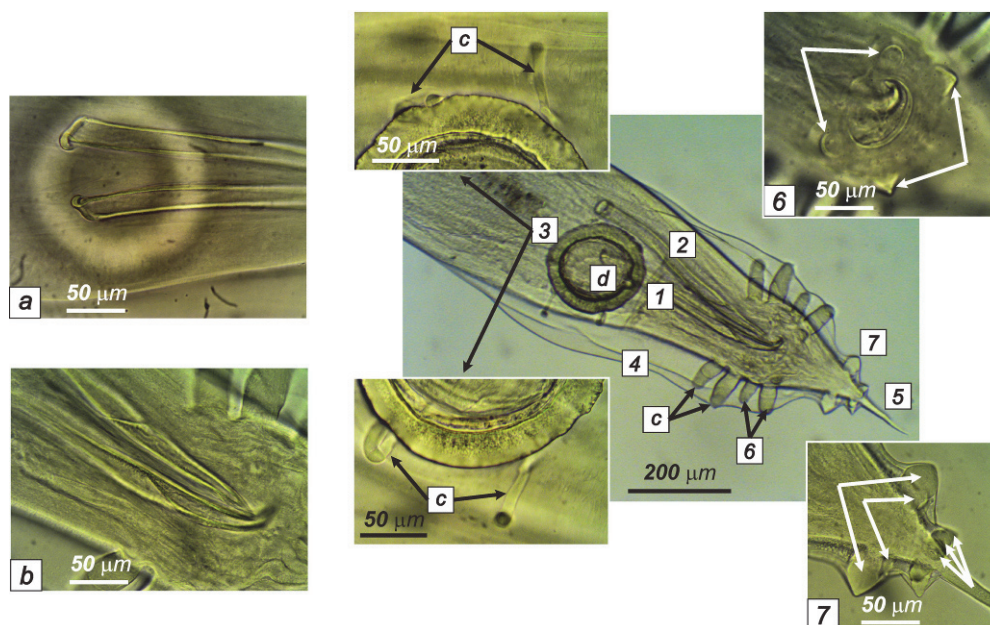


Fig. 5. Tail end ♂ *H. dispar*: 1 – left spicule; 2 – right spicule; a – proximal end of spicule, b – distal end of spicule; 3 – preanal sucker, c – position of four preanal pairs of papillae, d – medial unpaired papilla; 4 – lateral wing of pseudobursa; 5 – stylet-like protrusion; 6 – position of four adanal pairs of papillae; 7 – position of five postanal pairs of papillae

Table 1

Morphometric characters of ♂ *H. dispar* and *H. gallinarum* (n = 20)

Characters	<i>H. dispar</i>			<i>H. gallinarum</i>		
	x ± SD	Min	Max	x ± SD	Min	Max
Length of body, mm	13.36 ± 0.98	11.58	15.67	8.26 ± 1.14*	6.12	10.25
Width of body:						
– at bulbus, mm	0.41 ± 0.03	0.37	0.46	0.27 ± 0.03*	0.23	0.32
– in the middle, mm	0.39 ± 0.02	0.36	0.42	0.31 ± 0.03*	0.27	0.38
– at base of wings of pseudobursa, mm	0.31 ± 0.02	0.28	0.34	0.22 ± 0.02*	0.19	0.25
Width of pseudobursa wings at:						
– preanal sucker, mm	0.32 ± 0.02	0.29	0.35	0.24 ± 0.01*	0.21	0.26
– adanal papillae, mm	0.30 ± 0.02	0.27	0.33	0.21 ± 0.01*	0.19	0.24
– first pair of postanal papillae, mm	0.12 ± 0.01	0.10	0.14	0.12 ± 0.02	0.10	0.15
– the maximum width of first pair of postanal papillae, mm	0.34 ± 0.02	0.31	0.38	0.28 ± 0.02*	0.25	0.31
– division between tail end and tail protrusion, mm	0.07 ± 0.01	0.06	0.08	0.06 ± 0.01*	0.05	0.07
Sucker diameter, μm	149.58 ± 5.03	140.88	158.69	76.00 ± 3.95*	69.98	82.15
Length of medial unpaired papilla, μm	13.69 ± 1.69	11.05	16.01	11.23 ± 0.80*	9.67	12.19
Width of medial unpaired papilla, μm	12.01 ± 1.54	9.42	14.39	5.64 ± 0.83*	4.12	6.98
Distance from preanal sucker to tail end, mm	0.57 ± 0.06	0.44	0.67	0.63 ± 0.02*	0.59	0.67
Length of left spicule, mm	0.39 ± 0.02	0.37	0.42	2.27 ± 0.23*	1.92	2.85
Width of left spicule:						
– at proximal end, μm	29.33 ± 1.01	27.15	30.85	43.64 ± 2.77*	38.14	47.22
– in the middle, μm	25.42 ± 1.03	23.61	27.44	21.94 ± 2.10*	19.54	26.33
Length of right spicule, mm	0.40 ± 0.01	0.38	0.42	0.66 ± 0.07*	0.55	0.77
Width of right spicule:						
– at proximal end, μm	30.30 ± 1.34	28.16	32.45	25.04 ± 1.76*	22.45	28.15
– in the middle, μm	27.40 ± 1.29	22.66	27.33	13.77 ± 1.27*	12.00	16.33
Left to right spicule length ratio	0.99 : 1	0.88 : 1	1.11 : 1	3.47 : 1*	2.82 : 1	4.75 : 1

Note: * – P < 0.05 compared to values for *H. dispar*.

According to the metrical data, the values of most parameters (73.6%) in *H. gallinarum* males are significantly lower than in *H. dispar*. For example, *H. gallinarum* males are shorter (by 38.2%, $P < 0.05$) and narrower in different parts of body (by 20.5–34.1%). The wings of the pseudobursa in *H. gallinarum* males are narrower by 14.2–30.0% ($P < 0.05$) than in *H. dispar*. However, in other areas of the pseudobursa, width parameters are not significantly different for these two species. For example, width of wings of the pseudobursa measured at the level of first postanal papillae is similar in *H. gallinarum* and *H. dispar* (0.12 ± 0.02 and 0.12 ± 0.01 mm, relatively). Other characteristic metrical differences in *H. gallinarum* are the two times smaller preanal sucker ($P < 0.05$) and smaller medial unpaired papilla (17.9–53.0%, $P < 0.05$). In this species, the preanal sucker is located farther from the tail end (by 9.5%, $P < 0.05$) than in *H. dispar*. Due to morphological differences, males of the two species differ in length of the left spicule,

which is confirmed by measurements. In *H. gallinarum* average length of the left spicule was 2.27 ± 0.23 mm, which is 5.8 times longer ($P < 0.05$) than in *H. dispar* (0.39 ± 0.02 mm). Males of the different species are also significantly different by the following parameters: width of left spicule, size of right spicule. The proximal end of the left spicule in *H. gallinarum* is wider (by 32.7%, $P < 0.05$) and its middle is, conversely, narrower (by 13.6%, $P < 0.05$) compared with *H. dispar*. The right spicules for the two species are visually equal but are statistically different by measurements. The right spicule of male *H. gallinarum* is longer by 39.3% ($P < 0.05$) and narrower by 17.3–49.7% ($P < 0.05$) than that of *H. dispar*. Respectively the ratios of lengths of right to left spicule are 3.47 : 1 in *H. gallinarum* and 0.99 : 1 in *H. dispar* and are significantly different ($P < 0.05$). Females of *H. gallinarum* and *H. dispar* are significantly different by 14 morphological parameters which can make their species identification easier (Table 2).

Table 2Morphometric characters of ♀ *H. dispar* and *H. gallinarum* (n = 20)

Characters	<i>H. dispar</i>			<i>H. gallinarum</i>		
	x ± SD	Min	Max	x ± SD	Min	Max
Length of body, mm	16.43 ± 1.80	13.18	19.25	9.41 ± 0.89*	7.60	11.08
Width of body:						
– at bulbus, mm	0.51 ± 0.06	0.39	0.62	0.34 ± 0.03*	0.28	0.40
– in the middle, mm	0.58 ± 0.04	0.52	0.65	0.37 ± 0.03*	0.32	0.42
– at vulval area, mm	0.42 ± 0.02	0.38	0.46	0.35 ± 0.03*	0.30	0.41
– at anus level, mm	0.19 ± 0.01	0.18	0.21	0.13 ± 0.02*	0.10	0.16
Distance:						
– from vulva to the last cuticular protrusion, µm	0.38 ± 0.04	0.32	0.48	–	–	–
– from anus to tail end, mm	0.87 ± 0.04	0.78	0.92	1.17 ± 0.05*	1.09	1.28
– from head end to vulva, mm	9.50 ± 0.92	8.19	11.12	4.35 ± 0.37*	3.19	4.98
– from vulva to tail end, mm	6.93 ± 0.94	4.94	8.25	5.06 ± 0.68*	3.63	6.52
– from vulva to anus, mm	8.63 ± 0.92	7.27	10.28	3.18 ± 0.37*	2.07	3.86
Egg length, µm	68.34 ± 1.52	65.73	71.25	66.58 ± 1.57*	63.55	69.33
Egg width, µm	46.24 ± 1.17	44.25	47.98	39.01 ± 0.48*	38.18	39.85
Eggshell width, µm	1.84 ± 0.07	1.73	1.96	1.59 ± 0.16*	1.22	1.82
Area of inner egg surface, µm ²	1798 ± 57	1713	1910	1728 ± 56*	1614	1874

Note: * – P < 0.05 compared to values for *H. dispar*.

Values of metrical indices of *H. gallinarum* females are lower than those of *H. dispar*, similarly to males. The differences are even more statistically significant in females (100%) than in males (73.6%). Females of *H. gallinarum* are shorter (by 1.7 times, $P < 0.05$) and consistently narrower (by 1.2–1.6 times, $P < 0.05$) compared to *H. dispar* females. Another characteristic difference is the position of the vulva relative to the tail and head ends. In *H. gallinarum* females, the vulva is positioned almost at the middle of the body, and in *H. dispar* females it is positioned nearer to the tail end. The latter species is also characterized by cuticular protrusions near the vulva. Hence we suggest the distance between the vulva and the last cuticular protrusion (0.38 ± 0.04 µm) as a metrical index. The distance between vulva and anus in *H. gallinarum* females was shorter by 2.7 times ($P < 0.05$) than in *H. dispar* females. Visually, eggs of both nematode species were very alike, however their measurements were statistically different ($P < 0.05$). All studied egg parameters in *H. gallinarum* nematodes were lower compared to *H. dispar*. Eggs from gonads of *H. gallinarum* females were shorter (by 2.6%) and narrower (by 15.6%), their eggshell was thinner (by 13.6%), and inner egg surface area was lower (by 3.8%) than in eggs from uteri of *H. dispar* females.

The four stages of embryogenesis of *H. gallinarum* and *H. dispar* at 27 °C in laboratory culture are protoplast (Fig. 6a), blastomere cleavage

(Fig. 6b), formation of first stage larvae, L1 (Fig. 6c), and second stage larvae, L2 (infectious egg) (Fig. 6d). Infectious eggs developed in *H. gallinarum* in eight days, in *H. dispar* in four days. Viability of *H. dispar* nematode eggs during embryogenesis was $91.3 \pm 1.5\%$ and was higher than in *H. gallinarum* ($84.3 \pm 0.6\%$) (Fig. 7).

All of isolated egg cultures (100%) were at the protoplast stage. Though the later embryonic development was similar in both species, it varied quantitatively. On the second day culture, $72.7 \pm 2.5\%$ eggs of *H. gallinarum* were at the blastomere cleavage stage while $55.0 \pm 1.7\%$ eggs of *H. dispar* contained L1. Also in the second day culture, $23.7 \pm 2.1\%$ of eggs of the latter species contained L2 and were therefore infectious. Development of *H. gallinarum* was longer in comparison: at the fourth day of culture, $55.0 \pm 1.7\%$ of eggs contained L1. Later, in the sixth to eighth day cultures, numbers of infectious eggs of *H. gallinarum* increased from 52.7 ± 1.5 to $84.3 \pm 0.6\%$. The development of $15.7 \pm 0.6\%$ of *H. gallinarum* eggs and $8.7 \pm 1.5\%$ of *H. dispar* eggs was not successful and they gradually decayed. Morphologically this manifested as broken egg shells, resorption of embryos, air bubbles under egg shells.

Metrical parameters of eggs also changed during embryogenesis. However these changes are very different in *H. dispar* and *H. gallinarum* which can also be used in species identification (Table 3).

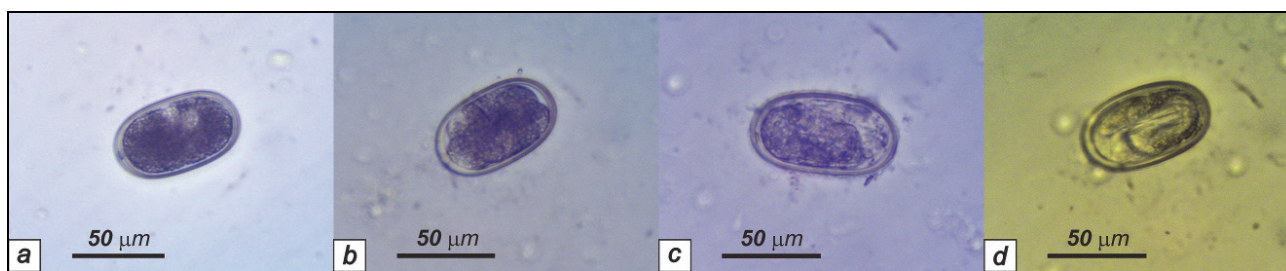


Fig. 6. Embryonic stages of development of *Heterakis* nematodes from domestic geese: a – protoplast, b – blastomere cleavage, c – L1 formation, d – L2 formation (infectious egg)

Table 3Morphometric parameters of developing *Heterakis gallinarum* and *H. dispar* eggs in experimental culture (x ± SD, n = 20)

Characters	<i>Heterakis dispar</i>		<i>Heterakis gallinarum</i>	
	Protoplast stage	L2 stage	Protoplast stage	L2 stage
Length, µm	68.29 ± 1.46	69.37 ± 1.84*	66.70 ± 1.99	64.93 ± 1.78*
Width, µm	46.10 ± 1.65	39.02 ± 1.47*	38.59 ± 0.87	39.44 ± 0.92*
Eggshell thickness, µm	1.85 ± 0.09	1.71 ± 0.10*	1.60 ± 0.16	1.59 ± 0.14
Area of inner egg surface, µm ²	1786 ± 79	1695 ± 65*	1711 ± 67	1739 ± 75

Note: * – P < 0.05 compared to values of eggs at protoplast stage.

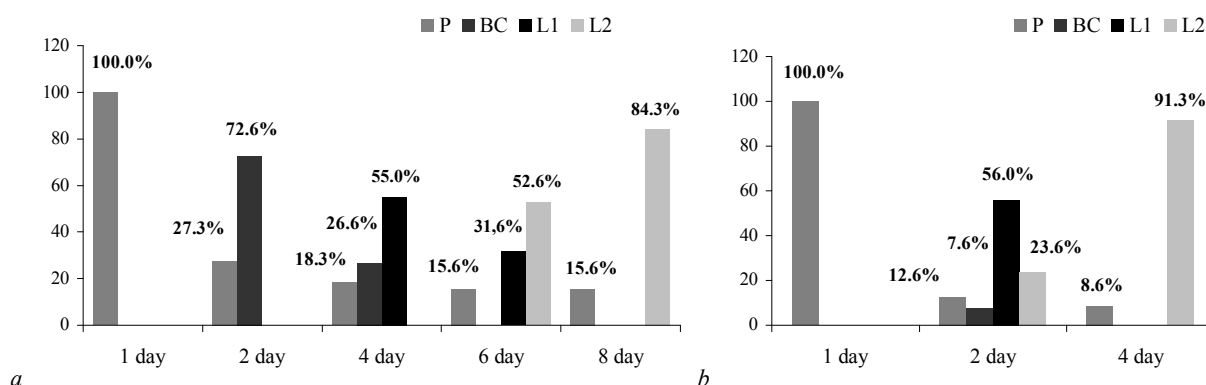


Fig. 7. Embryonic stages of development of *Heterakis gallinarum* (a) and *H. dispar* (b) in experimental culture *in vitro*: P – protoplast, BC – blastomere cleavage, L1 – formation of first stage larva, L2 – formation of second stage larva (n = 100)

Eggs of *H. dispar* cultured from protoplast stage to L2 lengthened (by 1.6%, $P < 0.05$), became narrower (by 15.4%, $P < 0.05$), and lost 7.6% of their eggshell thickness ($P < 0.05$) and 5.1% of inner egg surface area ($P < 0.05$). Length and width of *H. gallinarum* eggs changed during embryonic development, L2 eggs were shorter (by 2.7%, $P < 0.05$) and wider (by 2.2%, $P < 0.05$) compared to protoplast stage, but their eggshell thickness and inner egg surface area did not change. Such changes are connected to different biological species specifics, and possibly to specifics of viability and ability to adapt to nonspecific hosts.

Discussion

There are two species of the genus *Heterakis* parasitizing in domestic geese from Poltava, Kharkiv and Kyiv regions of Ukraine. One of them is a specific parasite of geese, *H. dispar*, another, *H. gallinarum*, is mostly adapted to parasitizing in terrestrial birds. The species *H. gallinarum* was found in domestic geese for the first time in Ukraine. According to many studies, the latter species is widely distributed in domestic, synanthropic and wild terrestrial birds all over the world (Menezes et al., 2001; Malatji et al., 2016; Wuthijaree et al., 2017). In our opinion, *H. gallinarum* adapted to parasitizing geese that were cross-infected when kept together with chickens and turkeys. Density indices also indicate that *H. dispar* nematodes are better adapted to parasitizing domestic geese. The maximum occurrence index of *H. dispar* was 68.4%, maximum abundance was 9.8, maximum intensity of infection was 62 specimens per host. Density of *H. gallinarum* nematodes in domestic geese was significantly lower and was 16.4%, 1.2 and 7.4 specimens per host, respectively. There are many reports of specificity of *H. dispar* to waterfowl and *H. gallinarum* to terrestrial birds (Skrjabin et al., 1961; Fedynich et al., 2005; Sherwin et al., 2013). However there are several studies showing adaptation of both species to waterfowl and terrestrial birds, especially if hosts are kept or found together (Wang et al., 2012; Nagwa et al., 2013; Komaš et al., 2015), in accordance to our results.

Comparative analysis of morphological and metrical characteristics of adult male and female *H. gallinarum* and *H. dispar* nematodes resulted in new data on their morphometric structure that can facilitate the species identification. Morphologically, male *Heterakis* nematodes are more distinct. Males of *H. dispar* have two almost equal spicules and 13 specifically positioned pairs of tail papillae. The lateral wings of their pseudobursas have wavy edges. The left spicules of *H. gallinarum* males are visually longer than the right spicules, there are only 12 pairs of tail papillae, and the lateral wings of the pseudobursa are symmetrically arched. Microscopy study of the structure and position of tail papillae in males of those species shows significant differences. In *H. dispar* there are four preanal, four adanal, and five postanal pairs of papillae. In males of *H. gallinarum* there are two preanal, six adanal, and four postanal pairs of papillae. The position of one unpaired medial papilla is same in both species. These distinct characters in males of both species are confirmed in long-term morphological studies of *H. gallinarum* nematodes obtained mostly from domestic terrestrial birds

and *H. dispar* nematodes obtained mostly from waterfowl (Abou Znada, 1993; Rahman & Manap, 2014; Sheikh et al., 2016). Females are more morphologically similar. We found additional species specific characters of female nematodes, namely cuticular protrusions near the vulva in *H. dispar*, and shape and position of the vaginal bends. In *H. dispar* females, the vaginal bends are shorter and intersecting. In *H. gallinarum* females they are significantly longer and easily seen in one plane. These morphological characters can be used if male nematodes are absent in a sample, which is a common situation.

Comparison of metrical parameters of adult *H. gallinarum* and *H. dispar* nematodes resulted in 19 parameters in males and 14 in females by which the species statistically differ ($P < 0.05$). By most measurements (73.6%) of male and by all measurements (100%) of females *H. gallinarum* nematodes are smaller than *H. dispar* specimens. However, our metrical data on *H. gallinarum* obtained from domestic geese differ from those for specimens obtained from domestic terrestrial poultry. For our specimens, average length of body was 8.26 ± 1.14 mm for *H. gallinarum* males, and 9.41 ± 0.89 mm for females; width of body ranged from 0.22 ± 0.02 to 0.31 ± 0.03 mm in males and 0.13 ± 0.02 to 0.37 ± 0.03 mm in females. According to other studies, length and width of body can vary from 5.0 to 10.0 mm and 0.2 to 0.3 mm in males, and from 6.0 to 13.2 mm and 0.2 to 0.4 mm in females of the species (Abou Znada, 1993; Al-Moussawi, 2016; Sheikh et al., 2016). Measurements of *Heterakis* nematodes obtained from different birds reportedly can vary significantly due to their adaptive variability to more or less suitable hosts (Madsen, 1950). Only a few studies deal with metrical characteristics of *H. dispar*. According to those, the length and width of males range from 10 to 15 mm and from 0.36 to 0.38 mm, and from 15 to 17 mm and 0.45 to 0.47 mm in females, respectively (Madsen, 1950; Skrijabin et al., 1961; Avcioglu et al., 2008). In our study, average length of body was 13.36 ± 0.98 mm and width of body $0.31 \pm 0.02 - 0.41 \pm 0.03$ mm in male *H. dispar* specimens, and for females the respective values were 16.43 ± 1.80 mm (length of body) and from 0.19 ± 0.01 to 0.58 ± 0.04 mm (width of body at different areas).

Laboratory cultures revealed that eggs of *H. gallinarum* and *H. dispar* have very similar embryonic development. According to morphological characters, there are four stages of embryonic development: protoplast, blastomere cleavage, formation of L1 and L2 (infectious egg). The egg at the protoplast stage was filled with amorphous mass. At the stage of blastomere cleavage, the protoplast was actively cleaving into round blastomeres. At L1 stage, a mobile though grainy and nebulous larva of indistinct shape was observed. At L2 stage, the larva was mobile, distinctly structured, with graininess in the middle. These data are in line with the published morphological data on egg development of *Heterakis*, however the stages of embryonic development had not been described before. Comparative study of embryogenesis of *H. gallinarum* and *H. dispar* revealed that eggs from gonads of *H. dispar* females become infectious at 27 °C in four days with $91.3 \pm 1.5\%$ viability. Eggs from gonads of *H. gallinarum* females developed at the same temperature to infectious stage longer, in eight days with $84.3 \pm 0.6\%$ viability. Reports on the duration of development of infectious eggs in *H. gallinarum* and *H. dispar* vary significantly.

According to one study, *H. gallinarum* eggs at 33 °C become infectious at the fifth day of embryogenesis and at 27 °C at the seventh day (Roberts, 1937). At 25 to 30°C, embryogenesis of *H. gallinarum* in the external environment is reported to last from 12 to 17 days (Skrjabin et al., 1961). The biology of *H. dispar* is insufficiently studied, there are but a few reports according to which infectious eggs develop in five to six days at 20–24 °C (Hildenblat, 1956). We also found that metrical parameters of *H. gallinarum* and *H. dispar* eggs during embryogenesis were significantly different. The development of *H. dispar* eggs obtained from gonads was associated with more changes. They slightly (by 1.6%) lengthened, became narrower (by 15.4%), the eggshell became thinner by 7.6%, inner egg surface area decreased by 5.1%. In our opinion, these changes sustain the high viability of developing eggs. Metrical characteristics of *H. gallinarum* eggs did not change greatly during embryonic development. The eggs became shorter (by 2.7%) and wider (by 2.2%). Our data on the duration of development of infectious eggs and their viability can be used in species identification by eggs, if adult helminths are not observed in coprological surveys.

Conclusion

In Ukraine, there are two species of the genus *Heterakis* which are adapted to parasitizing domestic goose (*Anser anser dom.*), *H. gallinarum* and *H. dispar*. The latter species is more prevalent (occurrence and abundance indices were 68.4% and 9.8 specimens, respectively). Males of *H. gallinarum* and *H. dispar* can be differentiated by morphological characters including length and structure of spicules, number and position of tail papillae. Morphological characters used in species identification of females are the shape and position of the bends of the vagina, and in *H. dispar*, presence of cuticular protrusions near the vulva. Nineteen statistically different metrical parameters in males and 14 in females are proposed to assist in differentiation between *H. gallinarum* and *H. dispar* species.

There are four stages in embryonic development of *H. dispar* and *H. gallinarum* nematodes: protoplast, blastomere cleavage, L1 and L2 formation. The stages are morphologically distinct. Eggs of *H. dispar* become infectious in fourth day culture at 27 °C, and are highly viable (91.3%). Embryonic development of *H. gallinarum* eggs occurs in eight days, and the average egg viability is 84.3%. The two species differ by changes in egg metrical parameters during embryonic development. In *H. dispar*, significant changes are observed in length and width of eggs, eggshell thickness and inner egg surface area, while in *H. gallinarum* they are found only in the length and width of eggs. These data add to our understanding of the biological specifics of nematodes of these two species parasitizing in the domestic goose.

References

Abou Znada, N. Y. (1993). First record and prevalence of the caecal nematodes, *Heterakis gallinarum* and *Subulura suctorica* from the Guinea Fowl, *Numidia meliagriss* in Saudi Arabia. *Journal of King Saud University*, 5(1), 59–65.

Al-Moussawi, A. A. (2016). Nematodes of the Turkey *Meleagris gallopavo* (Galliformes: Phasianidae) from Al-Nasiriyah, Iraq. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 8(4), 126–131.

Amundson, C. L., Traub, N. J., Smith-Herron, A. J., & Flint, P. L. (2016). Helminth community structure in two species of arctic-breeding waterfowl parasites and wildlife. *International Journal for Parasitology*, 5, 263–272.

Avcioglu, H., Burgu, A., & Bölükbaş, C. S. (2008). *Ascaridia numidae* (Leiper, 1908; Travassos, 1913) in Rock Partridge (*Alectoris chukar*) in Turkey. *Parasitology Research*, 102(3), 527–530.

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., & Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392(6671), 71–75.

Bogach, M. V., & Taranenko, I. L. (2003). Parazytami hvoroby indykiv fermers'kyh i prysadybnyh gospodarstv Pivdnja Ukraïny [Parasitic diseases in turkeys in commercial and household farms of Southern Ukraine]. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*, 21, 311–317 (in Ukrainian).

Bongers, T., & Ferris, H. (1999). Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(6), 224–228.

Boone, E. C., Meiners, S. J., & Laursen, J. R. (2017). Gut helminth composition in newly migrating light geese (lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* and ross' goose *Chen rossii*). *Comparative Parasitology*, 84(1), 36–41.

Brener, B., Tortelly, R., Menezes, R. C., Muniz-Pereira, L. C., & Pinto, R. M. (2006). Prevalence and pathology of the nematode *Heterakis gallinarum*, the trematode *Paratanaisia bragai*, and the protozoan *Histomonas meleagridis* in the turkey, *Meleagris gallopavo*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 677–681.

Castagnone-Sereno, P., & Danchin, E. G. (2014). Parasitic success without sex – the nematode experience. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(7), 1323–1333.

Clapham, P. A. (1933). On the life-history of *Heterakis gallinae*. *Journal of Helminthology*, 11(2), 67–86.

Cordón, G. P., Prados, A. H., Romero, D., Moreno, M. S., Pontes, A., Osuna, A., & Rosales, M. J. (2009). Intestinal and haematic parasitism in the birds of the Almuñecar (Granada, Spain) ornithological garden. *Veterinary Parasitology*, 165(3–4), 361–366.

Dube, S., Zindi, P., Mbanga, J., & Dube, C. (2010). A study of scavenging poultry gastrointestinal and ecto-parasites in rural areas of Matebeleland province, Zimbabwe. *International Journal of Poultry Science*, 9(9), 911–915.

Fedynich, A. M., Finger, R. S., Ballard, B. M., Garvon, J. M., & Mayfield, M. J. (2005). Helminths of ross' and greater white-fronted geese wintering in South Texas, U.S.A. *Comparative Parasitology*, 72(1), 33–38.

Gicik, Y., & Arslan, M. O. (2003). The prevalence of helminths in the alimentary tract of geese (*Anser anser domesticus*) in Kars District, Turkey. *Veterinary Research Communications*, 27(5), 391–395.

Harradine, J. (1982). Some mortality patterns of greater magellan geese on the Falkland Islands. *Wildfowl*, 33, 7–11.

Hildenblat, A. A. (1956). Biologija vobzuditelej ganguliterakidoza gusej *Heterakis dispar* [Biology of *Heterakis dispar*, pathogen of ganguliterakidosis in geese]. Collection of Scientific Works of Moscow Veterinary Academy, 12, 207–213 (in Russian).

Hoque, M. A., Hassan, M. M., Haque, E., Shaikat, A. H., Khan, S. A., Alim, A., Skerratt, L. F., Islam, A., Tun, H. M., Dissanayake, R., Day, T. K., Debnath, N. C., & Yamage, M. (2014). A survey of gastro-intestinal parasitic infection in domestic and wild birds in Chittagong and Greater Sylhet, Bangladesh. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(1), 305–312.

Hoque, M. A., Skerratt, L. F., Rahman, M. A., Alim, M. A., Grace, D., Gummow, B., Rabiul Alam Beg, A. B., & Debnath, N. C. (2011). Monitoring the health and production of household jinding ducks on Hatia Island of Bangladesh. *Tropical Animal Health and Production*, 43(2), 431–440.

Kaufmann, F., Daş, G., Sohnrey, B., & Gauly, M. (2011). Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. *Livestock Science*, 141(2–3), 182–187.

Komaš, S., Basiaga, M., Kowal, J., Nosal, P., Wierzbowska, I., & Kapkowska, E. (2015). Zatorska goose – a subject of parasitological research. *Annals of Parasitology*, 61(4), 253–256.

Lok, J. B. (2016). Signaling in parasitic nematodes: Physicochemical communication between host and parasite and endogenous molecular transduction pathways governing worm development and survival. *Current Clinical Microbiology*, 3(4), 186–197.

Madsen, H. (1950). Studies on species of *Heterakis* (nematodes) in birds. *Danish Review of Game Biology*, 1(3), 1–43.

Malatji, D. P., Tsotetsi, A. M., van Marle-Koster, E., & Muchadeyi, F. C. (2016). A description of village chicken production systems and prevalence of gastrointestinal parasites: Case studies in Limpopo and KwaZulu-Natal provinces of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83(1), a968.

Menezes, R. C., Mattos, J. D. G., & Tortelly, R. (2001). Frequência e patologia das infecções causadas por nematóides e cestóides em galinhas-d'angola (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) criadas extensivamente no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 8, 35–39.

Moore, J., & Simberloff, D. (1990). Gastrointestinal helminth communities of Bobwhite Quail. *Ecology*, 71(1), 344–359.

Nagwa, E. A., Loubna, M. A., El-Madawy, R. S., & Toulan, E. I. (2013). Studies on helminthes of poultry in *Gharbia governorate* Benha. *Veterinary Medical Journal*, 25(2), 139–144.

Ogbaje, C. I., Agbo, E. O., & Ajanusi, O. J. (2012). Prevalence of *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinarum* and tapeworm infections in birds slaughtered in makurdi township. *International Journal of Poultry Science*, 11(2), 103–107.

Park, S. I., & Shin, S. S. (2010). Concurrent *Capillaria* and *Heterakis* infections in zoo rock partridges, *Alectoris graeca*. *Korean Journal of Parasitology*, 48(3), 253–257.

Pennycott, T. W., & Steel, F. (2001). Parasitic worms in commercial free-range poultry flocks in England and Wales. *Veterinary Record*, 149(14), 428.

Phiri, I. K., Phiri, A. M., Ziela, M., Chota, A., Masuku, M., & Monrad, J. (2007). Prevalence and distribution of gastrointestinal helminths and their effects on weight gain in free-range chickens in Central Zambia. *Tropical Animal Health and Production*, 39(4), 309–315.

- Rahman, W. A., & Manap, N. H. (2014). Descriptions on the morphology of some nematodes of the Malaysian domestic chicken (*Gallus domesticus*) using scanning electron microscopy. *Malaysian Journal of Veterinary Research*, 5(1), 35–42.
- Roberts, F. H. S. (1937). Studies on the life history and economic importance of *Heterakis gallinae* (Gmelin, 1790 Freeborn, 1923), the caecum worm of fowls. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 15(4), 429–439.
- Sheikh, B. A., Ahmad, F., & Sof, T. A. (2016). Morphology and prevalence of some helminth parasites in *Gallus domesticus* from Gurez Valley of Jammu and Kashmir, India. *Journal of Fisheries and Livestock Production*, 4(1), 159.
- Sherwin, C. M., Nasr, M. A., Gale, E., Petek, M., Stafford, K., Turp, M., & Coles, G. C. (2013). Prevalence of nematode infection and faecal egg counts in free-range laying hens: Relations to housing and husbandry. *British Poultry Science*, 54(1), 12–23.
- Shutler, D., Alisauskas, R. T., & McLaughlin, J. D. (2012). Associations between body composition and helminths of lesser snow geese during winter and spring migration. *International Journal for Parasitology*, 42(8), 755–760.
- Skrjabin, K. I. (1928). Metod polnyh gel'mintologicheskikh vskrytij pozvonochnyh, vkluchaja cheloveka [The method of complete helminthological autopsy of vertebrates, including humans]. Moscow State University, Moscow (in Russian).
- Skrjabin, K. I., Shikhobalova, N. P., Lagodovskaya, E. A. (1961). Osnovy nematologii: Oksiratozy zhivotnyh i cheloveka [Essentials of nematodology. Oxyurata of animals and man]. Russian Academy of Sciences, Moscow (in Russian).
- Tanveer, S., Ahad, S., & Chishti, M. Z. (2015). Morphological characterization of nematodes of the genera *Capillaria*, *Acuaria*, *Amidostomum*, *Streptocara*, *Heterakis*, and *Ascaridia* isolated from intestine and gizzard of domestic birds from different regions of the temperate Kashmir valley. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(4), 745–760.
- Tompkins, D. M., Greenman, J. V., Robertson, P. A., & Hudson, P. J. (2000). The role of shared parasites in the exclusion of wildlife hosts: *Heterakis gallinarum* in the ring-necked pheasant and the grey partridge. *Journal of Animal Ecology*, 69(5), 829–840.
- Viney, M. (2017). How can we understand the genomic basis of nematode parasitism? *Trends in Parasitology*, 33(6), 444–452.
- Wang, X. Q., Lin, R. Q., Gao, Y., Cheng, T., Zou, S. S., He, Y., Li, G. Y., Weng, Y. B., & Zhu, X. Q. (2012). Prevalence of intestinal helminths in domestic goose (*Anser domesticus*) in Qingyuan, Guangdong Province, China. *African Journal of Microbiology Research*, 6(40), 6843–6846.
- Wongrak, K., Daş, G., Moors, E., Sohnrey, B., & Gauly, M. (2014). Establishment of gastro-intestinal helminth infections in free-range chickens: A longitudinal on farm study. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 127, 314–321.
- Wuthijaree, K., Lambert, C., & Gauly, M. (2017). Prevalence of gastrointestinal helminth infections in free-range laying hens under mountain farming production conditions. *British Poultry Science*, 58(6), 649–655.
- Zaikina, G. V., & Marshalkina, T. V. (2015). Epizootychna sytuacija shhodo shlunkovo-kyshkovykh invazij sil'skogospodars'koi' ptyci central'nogo regionnu Ukrainy [Epizootic situation of gastrointestinal invasions of poultry of the central region of Ukraine]. *Journal of Veterinary Medicine of Ukraine*, 5, 13–15 (in Ukrainian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 237–243
doi: 10.15421/021835

Ontogeny of *Lobelia dortmanna* genets in lake ecosystems

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

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

**Cherepovets State University, Cherepovets, Russia

Article info

Received 14.02.2018

Received in revised form
27.03.2018

Accepted 02.04.2018

I. D. Papanin Institute for Biology
of Inland Waters RAS, Borok,
Nekouz District, Yaroslavl
Region, 152742, Russia.

Cherepovets State University,
Lunacharsky Ave., 5,
Cherepovets, 162600, Russia.
Tel.: +7-920-109-05-42.
E-mail: panovaeg@mail.ru

Lapirov, A. G., Belyakov, E. A., & Lebedeva, O. A. (2018). Ontogeny of *Lobelia dortmanna* genets in lake ecosystems. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 237–243. doi:10.15421/021835

Lobelia dortmanna L. is one of the few rare, slowly growing relict plants occupying areas of the littoral zone of water bodies with low nutrient content and subject to wave action. Even in such difficult conditions, this plant successfully passes its entire life cycle, actively blossoms and fruits. That is why the peculiar features of the individual development of this plant in various geographical conditions is a matter of great interest. For the first time, this study considers in detail the ontogeny of the genet of *L. dortmanna* in oligotrophic lakes of Tver oblast. Detailed characteristics of the following age stages of individuals are given: resting seeds, seedlings, juvenile, young and adult vegetative, latent generative, middle-aged and old generative and quasisenile plants. It is shown that the transition to the juvenile age stage occurs at the end of the first year of life, the virginile age stage lasts two years, and the generative stage of development occurs in the fourth year of life. The change in the growth pattern of the rosette main shoot of *Lobelia*, from orthotropic to anisotropic, occurs in the second year of life. The establishment and further development of the generative organs of the plant and associated change in the growth of the main shoot from monopodial to simpodial occurs in the fourth year of life. At the same time, the branching of the main shoot begins by formation in the axils of the uppermost assimilating leaves (the last in front of the apical inflorescence) – 1–2 lateral rosette shoots. These are future ramets (vegetative diaspores), which ensure, in the future, the vegetative reproduction of the individual and spread to new territories. Taking into account that in lakes of Tver oblast, *Lobelia* groupings form dense aggregated clusters on the bottom, the transition of individuals to a quasisenile age state (in the fifth year of life) enables them to rejuvenate and survive after the death of the maternal shoot. The formation and further development of rosette lateral shoots allows the plant to re-occupy the territory via vegetative or seed propagation. Complete morphological disintegration (vegetative reproduction) occurs in the fifth year of life. The genets' ontogeny is completed by the formation of a compact clone from the detached lateral rosette shoots.

Keywords: individual development; periods of ontogenesis; age states of individuals; oligotrophic lakes

Онтогенез генеты лобелии Дортманна (*Lobelia dortmanna*) в озерных экосистемах

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

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

**Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия

Лобелия Дортманна (*Lobelia dortmanna* L.) – одно из немногих редких, медленно растущих реликтовых растений, занимающих участки литоральной зоны водоемов с низким содержанием питательных веществ и подверженных волновому действию. Даже в таких сложных условиях это растение успешно проходит весь жизненный цикл, активно цветет и плодоносит. Именно поэтому пристальный интерес вызывают особенности индивидуального развития этого растения в различных географических условиях. В работе впервые подробно рассмотрен онтогенез генеты лобелии Дортманна в олиготрофных озерах Тверской области. Дана развернутая характеристика следующим возрастным состояниям особей: покоящиеся семена, проростки, ювенильные, молодые и взрослые вегетативные, скрытогенеративные, средневозрастные и старые генеративные и квазисенильные растения. Показано, что переход в ювенильное возрастное состояние наблюдается в конце первого года жизни, виргинильное возрастное состояние длится в течение двух лет, а генеративный этап развития наступает на четвертый год жизни. Смена характера роста розеточного главного побега лобелии с ортотропного на анизотропный происходит на втором году жизни. Заложение и дальнейшее развитие генеративных органов растения и, связанная с этим, смена нарастания главного побега с моноподиального на симподиальное осуществляется на четвертом году жизни растения. В это же время начинается ветвление главного побега за счет формирования в пазухах самых верхних ассимилирующих листьев (последних перед верхушечным соцветием) одного – двух боковых розеточных побегов. Это будущие раметы (вегетативные диаспоры), обеспечивающие, в дальнейшем, вегетативное размножение особи и захват новых территорий. Учитывая то, что в озерах Тверской области группировки лобелии образуют на дне водоемов плотные агрегированные скопления, переход особей в квазисенильное состояние (на пятом году жизни) дает возможность им омоложиться и выжить

после гибели материнского побега. Формирование и дальнейшее развитие розеточных боковых побегов позволяют растению вновь занять территорию вегетативным или семенным путем. Полная морфологическая дезинтеграция (вегетативное размножение) наступает на пятом году жизни. Онтогенез генеты завершается образованием компактного клона из отделившихся боковых розеточных побегов.

Ключевые слова: индивидуальное развитие; периоды онтогенеза; возрастные состояния особей; олиготрофные озера

Введение

Среди разнообразных направлений биоморфологических исследований «онтогенетическое направление пополняет научное знание представлениями об изменениях жизненных форм в онтогенезе» (Savinykh and Cheryomushkina, 2015, p. 660). В этой связи несомненный интерес вызывает изучение онтогенеза редких водных растений, таких как *Lobelia dortmanna* Linnaeus, 1753. Это растение, вместе с *Isoetes lacustris* Linnaeus (1753), *Isoetes echinospora* Durieu, 1861, *Subularia aquatica* Linnaeus (1753) представляет собой группу видов, характерных для литоральной зоны пресноводных олиготрофных озер с мягкой водой (Pulido et al., 2012; Markov, 2017; Lewicka-Rataj et al., 2018).

Сведения по онтогенезу лобелии Дортманна в отечественной литературе нами не обнаружены, а в зарубежных источниках их крайне мало. Среди них работы английского автора Woodhead (1951), представившего рисунки и описания начальных стадий развития проростка, и польского исследователя Szmaja (1987a, 1987b, 1994), выделившего в онтогенезе *L. dortmanna* пять стадий и показавшего схемы прохождения жизненного цикла этого растения в открытых (подверженных волновому действию) и защищенных местообитаниях. При этом в данных работах отсутствуют подробные описания онтогенетических (возрастных) состояний.

Заметим также, что исследование особенностей онтогенеза лобелии Дортманна является продолжением серии наших работ, связанных с этим реликтовым видом. Ранее нами уже были изучены особенности прорастания семян этого растения в лабораторных условиях, а также его биоморфология и ритм сезонного развития в олиготрофных озерах Тверской области (Lebedeva & Belyakov, 2016; Lapirov et al., 2017).

Исходя из вышеизложенного, цель работы – изучить онтогенез лобелии Дортманна из зачатка генеративного происхождения в олиготрофных озерах Тверской области.

Материал и методы исследований

Материал собран в 2014–2016 гг. в естественных популяциях *L. dortmanna* на озерах Сиг (окрестности деревень Курьево – 57°01'28,4" N, 33°06'36" E, Буковичи – 57°03'15" N, 33°11'02" E и Краклово – 57°01'28" N, 33°06'38" E) и Бельском (близ д. Белое – 57°43'41" N, 34°14'07" E), расположенных в Осташковском и Вышневолоцком районах Тверской области. Исследования в течение трех лет в одних и тех же местообитаниях позволили охватить в целом весь вегетационный сезон с ранней весны (май) до поздней осени (сентябрь – октябрь). Как мы писали ранее (Lapirov et al., 2017), на исследованных озерах это растение занимает глубины от 0,2 (0,3) до 1,2 и более метров и произрастает на песчаном или песчаном с наилком грунтах. Растет в виде отдельных экземпляров либо небольших групп или обширных пятен (проективное покрытие до 100%). Группировки данного вида сосредоточены в основном в тростниковых зарослях либо на защищенных (реже не защищенных) от волнового действия открытых пространствах.

Начальные этапы онтогенеза прослежены нами как в природных, так и лабораторных условиях. В последнем случае семена проращивали в люминистате (освещенность 1200–1500 лк, фотопериод 9/15, температура – +23 °C) в чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной отстоявшейся водопроводной водой. Во всех вариантах опытов использовали три чашки Петри по 50 семян в каждой.

В процессе работы проводили тщательный морфологический анализ надземной и подземной сферы растений. У них измеряли длину и ширину наибольшего листа, максимальную длину корней, цветоноса, длину и диаметр розеточной части побега, емкость верхушечной почки побега, подсчитывали количество придаточ-

ных корней, листьев и цветоносов. При этом относили растения к тому или иному возрастному состоянию на основании комплекса наиболее существенных качественных признаков, среди которых «способ питания (связь с семенем), наличие зародышевых, ювенильных или взрослых структур, способность особей к семенному или вегетативному размножению, соотношение и интенсивность этих процессов; соотношение процессов новообразования и отмирания у особи, степень сформированности у особи основных признаков биоморфы» (Сенорупация растений..., 1976, p. 17). Дополнительно, для анализа морфологических признаков растений различных возрастных состояний, использовали гербарные материалы ИБВВ РАН (IBIW), а также более ранние данные (1974 г.), полученные первым автором при изучении растительного покрова оз. Бельское. Для исследования основных морфометрических показателей растений применяли бинокулярные микроскопы МБС-10 и МСП-2, снабженные микрометрическими шкалами. Изучено около 100 особей различных возрастных состояний. В тексте работы и в таблицах данные представлены в виде $x \pm SD$.

Результаты

У лобелии Дортманна нами выделены и описаны такие периоды онтогенеза и возрастные состояния особей, формирующихся из семени.

Период первичного покоя (латентный период). Представлен покоящимися семенами. Они очень мелкие, «пылевидные», правильной эллиптической формы, длиной 0,4–0,6 мм и шириной 0,3–0,4 мм. Семенная оболочка блестящая темно- либо светло-коричневая с неровной, «бугристой» скульптурой.

Прегенеративный (виргинильный период). Проростки. Данное возрастное состояние в лабораторных условиях длится около 30 суток. Характеризуется появлением всех основных органов, ортотропным нарастанием побеговой оси и началом ее утолщения.

Период набухания семян длится до 7 суток. Затем семенная крышечка (operculum), к которой примыкает конец зародышевого корешка, постепенно начинает отделяться от семени. Такие особые образования, по-видимому, являются своеобразной защитой апикальной части первичного корня в самом начале прорастания. В процессе прорастания крышечка выдавливается зародышевым корешком, дальнейший рост которого способствует разрыву покровов семени (на 5–6 частей, рис. 1a, b). Зародышевый корешок проростка утолщенный, слегка загнутый, белого цвета. У отдельных проростков отмечено наличие на нем очень редких корневых волосков. Гипокотиль тонкий, верхняя часть его светло-зеленая. Место перехода корня в гипокотиль, так называемая «корневая шейка», иногда очень слабо опушена. Семяздоли вслед за гипокотилем постепенно освобождаются от семенной оболочки, выносятся на поверхность грунта, начиная выполнять функцию первых ассимилирующих листьев (рис. 1c). Обе пластинки семяздолей овально-ланцетовидные, цельнокрайние, сростаются в основании, прикрывая зародышевую почечку. Через 5–7 суток у проростка развивается первый настоящий линейный лист (рис. 1d), следом за ним, через двое суток – второй, плотно прижатый к первому. С появлением первых ассимилирующих листьев наблюдается начало формирования розеточного участка побега. Появление первого (иногда второго) листа нередко сопровождается формированием первого гипокотильного придаточного корня. Чаше он развивается в базальной части гипокотили, реже – при основании семяздолей. Полностью сформированный проросток представляет собой одноосное моноподиально и ортотропно нарастающее розеточное растение с двумя настоящими ассимилирующими листьями. Главный корень продолжает функционировать наряду с первым придаточным. В лабораторных условиях на этой стадии развития проростки погибали.

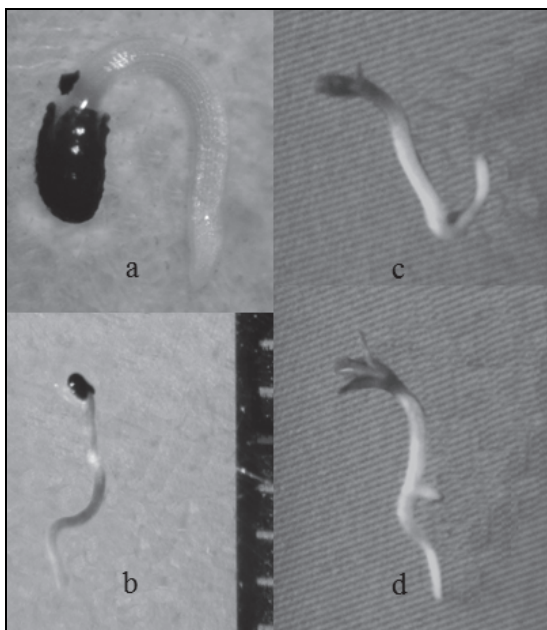


Рис. 1. Проростки *L. dortmanna* в лабораторных условиях:
a–d – стадии развития проростка

В природных популяциях проростки обнаружены нами во второй декаде мая и в конце августа – начале сентября (спустя 4–5(6) недель после начала диссеминации), между листьями либо корнями материнского розеточного побега (рис. 2a) или плавающими на поверхности воды. Все морфологические показатели проростков, развивающихся в природных водоемах, отличались от лабораторных большими размерами и числом структурных элементов (табл. 1, рис. 2b). Кроме того, на побеге еще сохранялись остатки семядольных листьев.

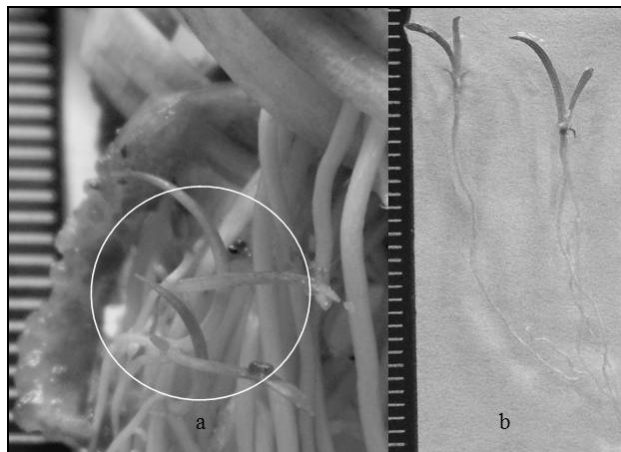


Рис. 2. Проростки *L. dortmanna* (b) на корнях материнского растения (a) в природных условиях (очерчены эллипсом)

Дальнейшие наблюдения за ходом онтогенеза проводили в естественных местах произрастания растений.

Ювенильные растения. Переход растений в ювенильное онтогенетическое состояние происходит в конце первого вегетационного сезона и характеризуется увеличением числа ассимилирующих листьев и стеблеродных придаточных корней (табл. 2, рис. 3a). На концах последних отмечены специфические утолщения, связанные с наличием арбускулярно-везикулярной микоризы. Отдельные придаточные корни ветвятся до $n + 1$ порядка. В два раза (при сравнении с проростками) возрастает длина и диаметр розеточного участка побега (табл. 2). При этом в фазе третьего ассимилирующего листа и четырех придаточных корней у отдельных растений главный корень начинал отмирать. Листья ювенильных растений по форме соответствуют листьям взрослого растения.

Они линейно-ланцетные, полые, вальковатые, с отогнутой апикальной частью и расширенным основанием. Верхняя часть листовой пластинки ярко-зеленая, а расширенное основание листа лишено окраски. В этом возрастном состоянии растения зимуют.

Таблица 1

Основные морфологические показатели проростков *L. dortmanna* в лабораторных и природных условиях ($n = 12$, $x \pm SD$)

Морфологические показатели	Размеры органов, мм	
	лабораторные условия	природные условия
Длина семядолей	$0,66 \pm 0,10$	$1,78 \pm 0,14$
Ширина семядолей	$0,20 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,05$
Длина гипокотыля	$1,98 \pm 0,49$	–
Диаметр гипокотыля	$1,80 \pm 0,03$	–
Длина главного корня	$1,16 \pm 0,13$	$12,0 \pm 4,50$
Длина первого придаточного корня	$0,24 \pm 0,09$	$3,75 \pm 0,75$
Длина первого ассимилирующего листа	$0,14 \pm 0,05$	$6,50 \pm 0,50$
Ширина первого ассимилирующего листа	$0,12 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,00$
Длина второго ассимилирующего листа	$0,20 \pm 0,01$	$4,50 \pm 0,50$
Ширина второго ассимилирующего листа	менее 0,20	$0,38 \pm 0,04$
Длина розеточного участка побега	$0,25 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,08$
Диаметр розеточного участка побега	$0,25 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,05$

Примечание: «–» – данный элемент структуры отсутствует.

Таблица 2

Основные морфологические показатели растений *L. dortmanna* в ювенильном возрастном состоянии ($n = 12$, $x \pm SD$)

Морфологические показатели	Размеры органов
Длина розеточного участка побега, мм	$1,83 \pm 0,22$
Диаметр розеточного участка побега, мм	$1,83 \pm 0,22$
Число ассимилирующих листьев, шт.	$3,01 \pm 0,01$
Число придаточных корней, шт.	$4,02 \pm 0,01$
Максимальная длина придаточных корней, мм	$29,7 \pm 5,8$
Максимальная длина ассимилирующих листьев, мм	$18,0 \pm 1,3$
Максимальная ширина ассимилирующих листьев, мм	$1,01 \pm 0,01$
Длина главного корня, мм	$47,7 \pm 1,8$

Второй год жизни. Виргинильные (молодые вегетативные) растения второго года жизни. Характеризуются появлением основных черт, типичных для взрослых вегетативных растений. Первичный моноподиально нарастающий розеточный побег состоит из участка прошлого года, несущего коричневые остатки листьев и нынешнего года. На последнем существенно возрастает число ассимилирующих листьев и придаточных корней, а также увеличиваются их линейные размеры (табл. 3, рис. 3b). Отмирание сформированных ранее листьев и рост новых, а также формирование большого числа стеблеродных придаточных корней вносит изменения в структуру базальной части побега. Она увеличивается в длину и утолщается в диаметре (табл. 3), темнеет и втягивается корнями в плотный песчаный грунт. В результате этого розеточный участок побега меняет характер роста с ортотропного на анизотропный. Емкость верхушечной почки побега – 2–3 листовых зачатка. Подобный характер роста сохраняется до конца вегетационного сезона.

Третий год жизни. Виргинильные (взрослые вегетативные) растения третьего года жизни. Несмотря на то, что основные морфологические параметры этих растений (табл. 3, рис. 3c) в начале вегетационного сезона существенно не отличаются от предыдущей группы, у них в 1,5–3,0 раза возрастает количество ассимилирующих листьев и придаточных корней на участке побега нынешнего года, в 2 раза – емкость верхушечной почки главного побега (табл. 3). При этом у последнего отмирает участок первого года жизни. В течение вегетационного сезона у растений наблюдается дальнейший рост основных параметров вегетативной сферы растений: максимальной длины и ширины листьев ($5,3 \pm 0,3$ и $0,3 \pm 0,0$ см, соответственно), максимальной длины придаточных корней ($9,1 \pm 1,2$ см), общего числа ассимилирующих листьев и придаточных корней ($28,4 \pm 6,1$ и $96,0 \pm 28,4$), а также емкости верхушечной почки главного побега ($7,0 \pm 0,8$). Возрастает длина и диаметр розеточной части побега нынешнего года ($1,1 \pm 0,3$ и

0,4 ± 0,1, соответственно). Анизотропный характер роста и моноподиальный тип нарастания главного побега сохраняются.

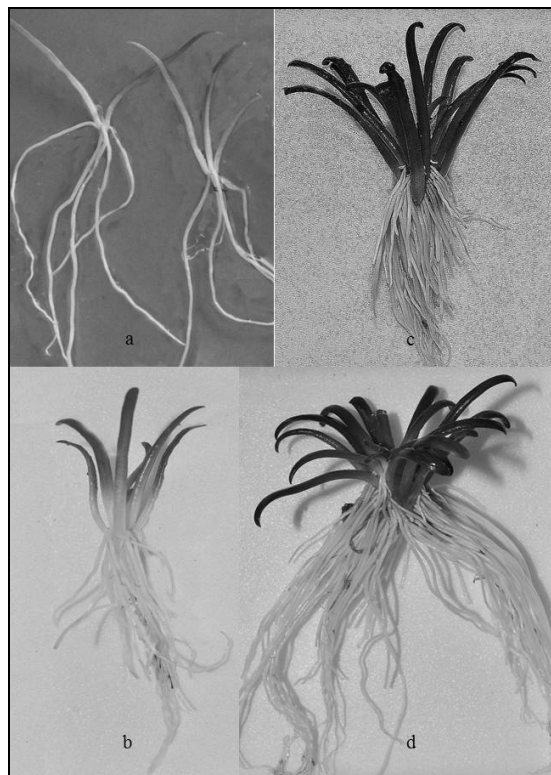


Рис. 3. *L. dortmanna* в ювенильном (а), молодом вегетативном (второй год жизни) (b), взрослом вегетативном (третий год жизни) (c) и скрытогенеративном (d) возрастных состояниях

Четвертый год жизни. Генеративный период онтогенеза. Скрытогенеративные растения. Переход растений в скрытогенеративное онтогенетическое состояние отражает наступление генеративного периода онтогенеза (рис. 3d). Важнейшей отличительной особенностью растений в это время является не только наличие внешне незаметного верхушечного соцветия, длиной $0,9 \pm 0,3$ мм, но и почек, расположенных в пазухах одного–трех самых верхних ассимилирующих листьев побега нынешнего года. Их длина – от 0,1 до 0,6(0,9) мм, емкость 1–4 листовых зачатка. Почки (1–2), трогаясь в рост без периода покоя, формируя боковые розеточные побеги, несущие 3–4 ассимилирующих листа. Емкость верхушечных почек боковых побегов – 7–8 листовых зачатков. С момента закладки генеративных органов нарастание главного побега становится симподиальным. Начинает постепенно перегнивать участок побега третьего года жизни. Биометрические характеристики этих растений представлены в таблице 4.

Средневозрастные генеративные растения. У подавляющего большинства растений участок главного побега третьего года жизни на этом этапе отмирает полностью. У растений сохраняется только участок побега нынешнего года. У значительного числа растений на большинстве придаточных корней (ветвящихся до второго порядка) имеются вздутия, представляющие собой везикулярно-арбускулярную микоризу. С ростом верхушечного соцветия, достигающего длины $91,0 \pm 16,4$ см, растение становится полурозеточным (рис. 4a, b). Наблюдается дальнейшее развитие боковых розеточных побегов (1–2), которые несут до $14,4 \pm 6,5$ листьев (длиной $4,5 \pm 1,2$ и шириной $0,3 \pm 0,0$ см) и $28,6 \pm 12,2$ придаточных корней. Емкость их верхушечной почки – 7–8 листовых зачатков. Биометрические характеристики этих растений представлены в таблице 4.

У старых генеративных растений процессы отмирания преобладают над процессами новообразования (рис. 4c). Отгнивает верхушечное соцветие. На главном побеге (представленном только участком нынешнего года), несущем 1–2 розеточных боковых

побега, погибает значительная часть придаточных корней (их количество снижается практически в два раза – 95 ± 8) и ассимилирующих листьев ($17,5 \pm 3,3$). В таком виде растения зимуют.

Таблица 3

Основные биометрические показатели растений *L. dortmanna* в виргинильном возрастном состоянии ($n = 12$, $x \pm SD$)

Морфологические показатели	Возрастное состояние	
	молодые вегетативные (второй год жизни)	взрослые вегетативные (третий год жизни)
Число листьев, шт.	$6,01 \pm 1,01$	$9,70 \pm 2,11$
Число придаточных корней, шт.	$16,00 \pm 1,02$	$41,80 \pm 12,40$
Емкость верхушечной почки (число листовых зачатков)	$2,03 \pm 1,02$	$4,63 \pm 0,57$
Длина листьев, мм	$30,50 \pm 0,50$	$27,80 \pm 2,74$
Ширина листьев, мм	$2,50 \pm 0,01$	$2,01 \pm 0,36$
Длина придаточных корней, мм	$52,50 \pm 7,50$	$70,70 \pm 5,52$
Длина / диаметр розеточной части побега нынешнего года, мм	$6,01 \pm 1,01 /$	$4,91 \pm 1,90 /$
Длина / диаметр розеточной части побега прошлого года, мм	$2,90 \pm 1,01$	$2,98 \pm 1,40$
	$3,02 \pm 2,01 /$	$3,45 \pm 2,05 /$
	$1,82 \pm 0,32$	$2,90 \pm 1,01$
	(первого года)	(второго года)

Таблица 4

Основные биометрические показатели растений *L. dortmanna* в генеративном периоде онтогенеза ($n = 15$, $x \pm SD$)

Морфологические показатели	Возрастное состояние	
	скрытогенеративные	средневозрастные
Число листьев, шт.	$18,6 \pm 1,9$	$23,3 \pm 3,3$
Число придаточных корней, шт.	$91,0 \pm 16,4$	$153,2 \pm 25,8$
Длина листьев, мм	$39,4 \pm 2,9$	$51,0 \pm 3,7$
Ширина листьев, мм	$2,80 \pm 0,32$	$3,80 \pm 0,27$
Длина придаточных корней, мм	$80,4 \pm 19,4$	$107,0 \pm 21,0$
Длина / диаметр розеточной части побега нынешнего года, мм	$22,00 \pm 3,02 /$	$18,00 \pm 8,03 /$
Длина / диаметр розеточной части побега прошлого года, мм	$3,20 \pm 0,32$	$4,01 \pm 1,01$
	$4,91 \pm 1,90 /$	–
	$2,98 \pm 1,40$	–
	(третьего года)	

Пятый год жизни. Постгенеративный период онтогенеза. Характерная особенность этого периода развития – переход растений в начале вегетационного сезона в квазисенильное состояние. Квазисенильность определяется как «явление морфологической имитации сенильности, возникающее у растений в фитоценоотически неблагоприятных условиях» (Smirnova et al., 1984). По внешнему виду квазисенильные растения представляют собой «двуили однорогоую вилку», состоящую из участка главного побега прошлого года, несущего перегнившие остатки ассимилирующих листьев, и одного или двух розеточных побегов второго порядка ветвления. Именно за счет их развития осуществляется омоложение особи. Рисунок квазисенильного растения представлен в опубликованной ранее работе (Lapirov et al., 2017).

У подавляющего большинства растений развивается, как правило, один боковой розеточный побег. У единичных растений – два, при этом один, как правило, опережает в своем развитии другой. По-видимому, у квазисенильных растений, крайне редко, они способны одновременно достигать генеративного состояния. Подобное явление отмечено во второй декаде июля 2014 г. у единичных растений на оз. Бельское. При этом боковые побеги второго порядка, связанные с главным побегом, цвели (длина цветоносов – 50–60 см) и имели хорошо развитые боковые розеточные побеги третьего порядка (по отношению к главному побегу), длиной 0,3–0,4 см, несущие 4–5 листьев. Емкость их верхушечной почки 5–8 листовых зачатков. Однако у большинства растений дальнейшее развитие претерпевает, как правило, один боковой побег второго порядка, редко – два. Их цветения в текущем году мы не наблюдали. В середине (конце) вегетационного сезона происходит полная дезинтеграция растений (за счет разрушения участка главного побега прошлого года), приводящая к формированию компактного клона из отделившихся боковых побегов. На этом онтогенез генеты завершается.

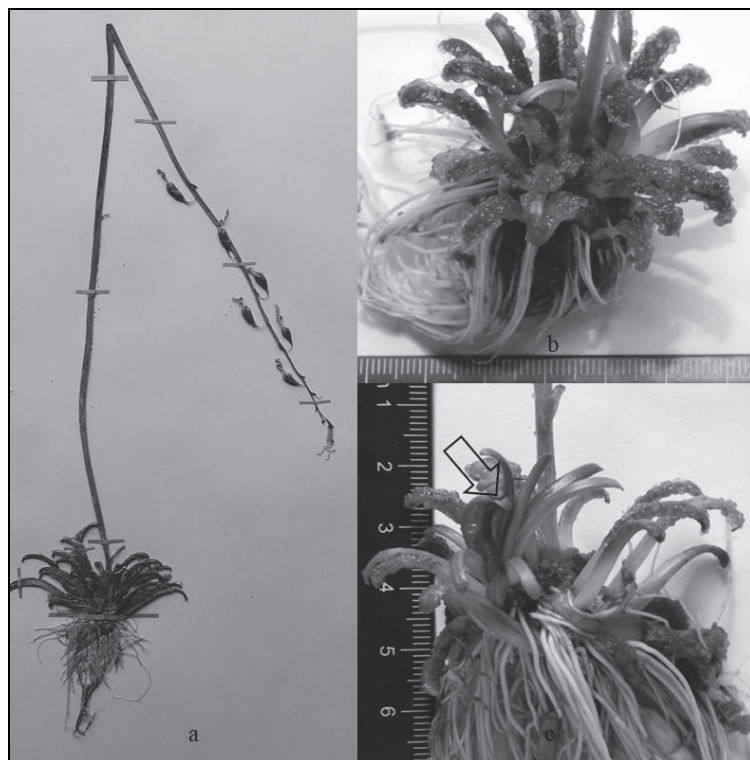


Рис. 4. Средневозрастное генеративное (a, b) и старое генеративное (c) растение *L. dortmanna*: стрелкой указан развивающийся побег $n + 1$ порядка ветвления



Рис. 5. Агрегации *L. dortmanna* в озерах Тверской области (a, b) и их фрагменты (c, d)

Обсуждение

Как и на маленьком мелководном олиготрофном полимиктическом оз. Краснэ (Lake Krasne – 53°52'N, 17°16'40"E), расположенном в Северной Польше (Szmeja, 1994), в исследованных озерах Тверской области онтогенез лобелии Дортманна из зачатка генеративного происхождения длился в течение пяти лет. При

этом польский автор отмечает, что как в условиях, подверженных волновому действию, так и защищенных условиях, онтогенез этого вида может длиться в течение четырех лет (Szmeja, 1994). Полагаем, что и в наших условиях подобный «сценарий» развития также возможен.

При этом Szmeja (1994) отмечает, что в оз. Краснэ в обоих типах местообитаний (защищенных и открытых) гибель пророст-

ков составляет довольно значительную величину (85,1–99,1%). Поэтому вполне объяснима отмеченная нами в лабораторных условиях гибель растений на самых ранних, наиболее уязвимых стадиях развития (проростки). Заметим, что полная морфологическая характеристика семян, а также особенности их прорастания представлены в наших предыдущих статьях (Lebedeva & Belyakov, 2016; Lapirov et al., 2017). Нами показано, что переход растений в ювенильное онтогенетическое состояние происходит в конце первого вегетационного сезона. Однако по данным Szmeja (1987b) переход в это возрастное состояние возможен еще в весенний период. Указанный автор связывает это с более быстрым ростом проростков на илистых и песчано-илистых участках дна, чем на песчаных. Существовать в подобных условиях молодым растениям помогает наличие на придаточных корнях арбускулярно-везикулярной микоризы (Nielsen et al., 2004), отмеченное нами ранее (Lapirov et al., 2017). По-видимому, и в наших условиях такая группа растений в весенний период может присутствовать, учитывая то, что нормально развитые проростки обнаружены нами на песчаном с наилком грунте уже 11.05.2016 года. При этом заметим, что смертность в популяции ювенильных растений, даже в защищенных местах обитания, достигает 26,4% (Szmeja, 1994).

На второй год развития смена двух последующих возрастных состояний (имматурного и виргинильного) у лобелии происходит достаточно быстро. Мы поддерживаем точку зрения о том, что «выделение имматурных и виргинильных растений представляется большие трудности» (Cenopopulation of plants, 1976, p. 19) и, поэтому, «некоторыми авторами [эти возрастные состояния] объединяются в одно» (ibid). Поэтому в данной работе мы выделяем только виргинильное возрастное состояние.

К сожалению, краткость и размытость характеристик, которые даны различным возрастным состояниям особей лобелии (Szmeja, 1987a), не позволяют провести их качественное сравнение с нашими данными. На основании описаний периода зрелости (mature state): «накопление корневой системы, неразветвленное, плагиотропное корневище 2–4 см в длину, и полностью развитая розетка из 15–25 листьев («a bunched root system, unbranched, a plagiotropic rhizome 2–4 cm long, and a fully-developed, 15–25-leaved rosette»)» (ibid, p. 18) можно предположить, что данный исследователь имел в виду (в нашем понимании) взрослые вегетативные растения. Отличия в размерных величинах между нашими и польскими данными, по-видимому, связаны с различиями экологических условий в местах произрастания растений. В другой работе (Szmeja, 1987b, p. 537) этот же автор, давая характеристику зрелых особей, причисляет к ним и генеративные растения («Морфологически зрелые особи, т. е. зрелые и генеративные» («Morphologically mature individuals, i.e., mature and generative»)). В данном случае, в нашем понимании, автор имел в виду скрытогенеративные растения, не имеющие внешне видимых генеративных органов. Поэтому эти растения внешне напоминают взрослые вегетативные.

Анализ структуры различных популяций лобелии в озерах Доброгощ (Lake Dobrogoszcz) и Великое Оцко (L. Wielkie Oczko) приводит Szmeja (1987b) к выводу о численном преобладании зрелых особей над всеми другими стадиями развития («numerical dominance of mature individuals over all the other developmental stages», ibid, p. 537). По его данным, морфологически зрелые особи в различных популяциях оз. Доброгощ составляют 47,5–61,5%, проростки – 10,5–18,2%, ювенильные – 18,4–23,6%, в оз. Великое Оцко – 52,6–77,8%, 7,7–25,9% и 9,4–20,7%, соответственно. Генеративные особи – это всегда наименее многочисленная часть популяции (4,2–10,7%, озеро Доброгощ и 1,6–5,1%, в оз. Великое Оцко). Характеристика генеративного периода развития польским исследователем (Szmeja, 1987a) представлена кратко: «[генеративная стадия] встречается только у зрелых особей и длится от появления цветоноса до его исчезновения» (ibid, p. 18). Между тем генеративный период развития у лобелии важен не только из-за возникновения и развития генеративных органов. Большое значение для будущего благополучия популяции этого растения имеет формирование у лобелии, в этот период развития, почек в пазухах самых верхних ассимилирующих листьев. Это будущие рамы (ве-

гетативные диаспоры), обеспечивающие, в дальнейшем, вегетативное размножение особи и захват ею новых территорий. Szmeja (1987a) считает, что их наличие всегда сопровождается увяданием соцветия и всех листьев растения. Однако, по нашим сведениям (смотри выше, а также Lapirov et al., 2017), формирование латеральных почек у генеративных особей происходит в период завершения закладки терминального соцветия, либо на начальных этапах его развития. По-видимому, возможны оба варианта развития. В первом из них (увядание соцветия) полностью снимается так называемое апикальное доминирование – контроль верхушки побега над ростом пазушных почек (Cline, 1997, цит. по Dun et al., 2006). Во втором (начальные этапы, либо конечная стадия закладки соцветия) – развитие пазушных почек может встречаться и в присутствии сильной верхушки побега и модулироваться сигналами, поступающими из корня и стебля (Dun et al., 2006). Кроме того, имеющиеся отличия, возможно, связаны с различиями в географическом расположении изучаемых водоемов (польские озера в широтном плане располагаются южнее, чем тверские).

По своему внутреннему содержанию субсенильная (постгенеративная) стадия развития лобелии, описанная Szmeja (1987a, 1987b, 1994), вполне соответствует квазисенильному состоянию растений, рассмотренному нами выше. При этом мы согласны с мнением Smirnova et al. (1984, с. 224), что «вероятно, необходимо отличать истинную онтогенетическую старость от «старости» ценотической, которая представляет собой не что иное как квазисенильность». По нашим наблюдениям в изучаемых озерах особи лобелии образуют достаточно плотные скопления – «подводные ковры или луга» различной формы и степени протяженности (рис. 5). Формирование такой агрегированной структуры, по справедливому мнению Szmeja (1987b), является результатом борьбы растений за пищевые ресурсы и пространство и обеспечивает им более эффективную адаптацию к среде обитания. «В этой ситуации формирование агрегатов для *L. dortmanna*, а также для многих конкурентно слабых видов – наиболее выгодный адаптивный вариант, оправданный как с точки зрения защитных реакций на давление конкурентов (Zarzycki 1965, цит. по Szmeja, 1987b), тяжести условий жизни (Symonides 1979, цит. по Szmeja, 1987b), а также хода основных физиологических процессов» (ibid, p. 540). Szmeja (1987b, p. 541) отмечает, что «в случае *L. dortmanna* размер агрегатов и их плотность обратно пропорциональны интенсивности давления видов конкурентов и плодородия местообитаний. Это основные факторы, определяющие пространственную организацию популяций и социальный статус особей, живущих в нем».

Переход растений в квазисенильное состояние в компактных клонах способствует выживанию, а после гибели материнских растений, позволяет особям омолодиться и занять территорию вегетативным или семенным путем (Smirnova et al., 1984). Это так называемое циклическое развитие компактных клонов по типу: молодость – зрелость – старость – омоложение, дающее популяции возможность длительно удерживать занятое место в ценозе (ibid). Подобное развитие, по нашему мнению, характерно и для лобелии Дортманна. Так, в оз. Бельское изученные нами сообщества этого вида в тех же самых местообитаниях были отмечены первым автором еще в 1974 году, и, возможно, сформировались там еще раньше.

Выводы

Результаты исследований показали, что в олиготрофных озерах Тверской области онтогенез генеты лобелии Дортманна длится в течение пяти лет. В онтогенезе генеты *L. dortmanna* выделено и описано четыре периода (первичного покоя, прегенеративный, генеративный и постгенеративный) и девять возрастных состояний особей (покоящиеся семена, проростки, ювенильные, молодые и взрослые вегетативные, скрытогенеративные, средневозрастные и старые генеративные и квазисенильные). Полная морфологическая дезинтеграция (вегетативное размножение) у лобелии наступает на пятом году жизни и приводит к образованию компактного клона.

References

- Cenopopulyacii rastenij (osnovnye ponyatiya i struktura) [Cenopopulation of plants (basic concepts and structure)] (1976). Nauka, Moscow (in Russian).
- Dun, E. A., Ferguson, B. J., & Beveridge, C. A. (2006). Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiology*, 142, 812–819.
- Lapirov, A. G., Belyakov, E. A., & Lebedeva, O. A. (2017). Biomorphology and rhythm of seasonal development of the relic species *Lobelia dortmanna* in oligotrophic lakes of Tver region. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(3), 349–355 (in Russian).
- Lebedeva, O. A., & Belyakov, E. A. (2016). Osobennosti prorrastaniya semyan *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) v usloviyah ehksperimenta [Features of seed germination of *Lobelia dortmanna* (Lobeliaceae) under experimental conditions]. *Rastitelnye Resursy*, 52(3), 375–380 (in Russian).
- Lewicka-Rataj, K., Świątecki, A., & Gómiak, D. (2018). The effect of *Lobelia dortmanna* L. on the structure and bacterial activity of the rhizosphere. *Aquatic Botany*, 145, 10–20.
- Markov, M. V. (2017). K izucheniyu polushnikovyh oligotrofnyh ozer Tverskoy oblasti: Fotosinteziruyushchaya biota kak indikator ih troficheskogo statusa [Research on the Isoetid oligotrophic Lakes in Tver region: Photosynthetic biota as their trophic state indicator]. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*, 2(1), 1–19 (in Russian).
- Nielsen, K. B., Kjølter, R., Olsson, P. A., Schweiger, P. F., Andersen, F. Ø., & Rosendahl, S. (2004). Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in Southern Sweden. *Mycological Research*, 108(6), 616–625.
- Pulido, C., Keijsers, D. J. H., Lucassen, E. C. H. E. T., Pedersen, O., & Roelofs, J. G. M. (2012). Elevated alkalinity and sulfate adversely affect the aquatic macrophyte *Lobelia dortmanna*. *Aquatic Ecology*, 46(3), 283–295.
- Savinykh, N. P., & Cheryomushkina, V. A. (2015). Biomorphology: Current status and prospects. *Contemporary Problems of Ecology*, 8(5), 541–549.
- Smirnova, O. V., Chistyakova, A. A., & Istomina, I. I. (1984). Kvazisenil'nost' kak odno iz proyavlenij fitocenoticheskoy tolerantnosti rastenij [Quasisenility as one of the manifestations of phytocenotic plant tolerance]. *Zhurnal Obshchej Biologii*, 45(2), 216–222.
- Szmeja, J. (1987a). The seasonal development of *Lobelia dortmanna* L. and annual balance of its population size in an oligotrophic lake. *Aquatic Botany*, 28(1), 15–24.
- Szmeja, J. (1987b). The ecology of *Lobelia dortmanna* L. II. Population structure and dynamics within a constant depth interval in oligotrophic lakes. *Ekologia Polska*, 35, 523–544.
- Szmeja, J. (1994). Effect of disturbances and interspecific competition in isoetid populations. *Aquatic Botany*, 48, 225–238.
- Woodhead, N. (1951). Biological flora of the British Isles: *Lobelia dortmanna* L. *Journal of Ecology*, 39(2), 458–464.



Biochemical and hematological composition of blood of cattle fed with *Chlorella*

A. A. Bogdanova*, E. A. Flerova* **

*Yaroslavl Research Institute of Livestock and Fodder Production – Affiliate of “FWRC FPA”, Yaroslavl Oblast, Russia

**The Yaroslavl Demidov State University, Yaroslavl, Russia

Article info

Received 27.03.2018

Received in revised form
22.04.2018

Accepted 25.04.2018

Yaroslavl Research Institute of
Livestock and Fodder Production –
Affiliate of “FWRC FPA”,
Mikhailovsky village, 150517,
Yaroslavl Oblast, Yaroslavl
District, Russia.

E-mail:
bogdanova.ale@gmail.com

The Yaroslavl Demidov
State University,
Yaroslavl, 150003, Russia.

Bogdanova, A. A., & Flerova, E. A. (2018). Biochemical and hematological composition of blood of cattle fed with *Chlorella*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 244–249. doi:10.15421/021836

We researched the influence of the additive *Chlorella* cultivated in a closed bioreactor under the influence of an electrostatic field, on the biochemical and hematological parameters of blood in different age groups of cattle. The experiment was conducted on two groups of three month old heifers and two groups of lactating cows in the 7th month of lactation, with 15 individuals in each group; all animals in the groups were given the basic diet. During the 120-day experiment, the experimental group of heifers was fed on a suspension of *Chlorella* cultivated with the technology using an electrostatic field, in the following amounts: 1–30th day – 1.51 g, 31–60th day – 1.82 g, 61–90th day – 2.01 g, 91–120th day – 2.28 g of dry substance per individual daily; the group of lactating cows during 60 days was given the *Chlorella* additive to the amount of 6 g of dry substance per individual per day. Over the following 30 days the heifers and lactating cows were kept under observation to determine the “aftereffects” of the *Chlorella* suspension fodder additive. On the first day of the experiment and after every 30 days, blood was drawn from the animals’ jugular veins for determination of the biochemical and hematological parameters of the blood. During the experiment, the experimental groups of heifers and lactating cows were observed to have a strengthened antioxidant system due to increase in the activity of superoxide dismutase and catalase, and also to have a strengthened hematopoietic function and intensified metabolic and redox processes. Due to the stimulating effect of the suspension of *Chlorella* cultivated using the intense technology involving using an electrostatic field on the erythro- and leukopoiesis of different age groups of the cattle, we determined a strengthening of the cellular element of the animals’ immune system. During the following 30 days, the heifers and lactating cows of the experimental groups were observed to exhibit “aftereffects” of the *Chlorella* suspension additive, namely increases in the values of biochemical, hematological and morphological indicators of the blood in comparison with these indicators for the animals in the control groups. As a result, we concluded that feeding different age groups of cattle with suspension of *Chlorella* cultivated in the conditions of a closed bioreactor under the influence of an electrostatic field, in the dosage of 155 ml per kg of dry substance of the animals’ diet, contributes to the strengthening of non-specific defence of their organism, forming a potential for increasing the productive indicators and maintenance of the livestock.

Keywords: lactating cows; heifers; bioreactor; electrostatic field; fodder additive; leukogram

Introduction

A promising method of improving the efficiency of the indicators of productivity of agricultural livestock is improving their digestion of fodder, which is achieved through adding a broad spectrum of highly biologically active micro-nutrients. It is known that the natural food additives made of algae possess a broad spectrum of biologically active substances with high biological accessibility for the organism of cattle. One such additive is suspension of *Chlorella*. The latter is one of the most widely cultivated eukaryotic green microalgae and is grown to be used as an additive to the food of animals and humans, and is also used in the pharmaceutical and cosmetological industries all around the world, especially in Asian countries, such as Japan, Taiwan, and Korea (Ogbonna, 1997; Lee, 2001; Pulz & Gross, 2004; Becker, 2006; Spolaore, 2006; Bishop & Zubeck, 2012; Lum et al., 2013; Guccione, 2014; Costa et al., 2016).

In the conditions of optimum growth, the biomass of *Chlorella* consists 25–50% of protein, 5–35% of carbohydrates and 5–20% of fat which is present as non-saturated fatty acids, the greater part of which is stearic, oleic, arachidonic, linolenic and linoleic acids, 5–10% of mineral substances, mostly consisting of phosphorus, sulfur and magnesium, and also carotene, vitamins C and K and vitamins of

group B (Panahi et al., 2015). The microalgae contains peptides, alkaloids, polysaccharides, which can be used as both antimicrobial and antibacterial substances, and likewise, *Chlorella* has antioxidant properties, for it contains antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase and catalase (Shibata et al., 2003; Lee et al., 2010; Aliahmat et al., 2012; Zheng et al., 2012; Flerova & Bogdanova, 2014).

The most economically efficient biotechnological solution is cultivating *Chlorella* microalgae in devices of an open type, but in territories of mild climatic zones with constantly changing weather conditions, this method is impossible to implement (Borowitzka, 1999; Carvalho et al., 2006; Del Campo et al., 2007; Christaki et al., 2011; Huo, 2012). To solve this problem, a technology was developed to cultivate *Chlorella* in conditions of a closed type bioreactor using the stimulating effect of an electrostatic field, which allows a large amount of biomass to be obtained on small areas at low cost and with no loss of the algae’s nutritional values and fodder qualities necessary for improving the productivity and maintenance of livestock. This technology allows a suspension of *Chlorella* to be obtained with a density of no less than 50 M cells per a ml every 48 hours (Flerova & Bogdanova, 2014; Schmigel et al., 2015a, 2015b).

The effect of suspension of *Chlorella* grown using the developed technology on the organism of cattle remains an open question. The study of this issue is impossible without analyzing the biochemi-

cal composition and hematological parameters of the blood, which characterize the functional condition of an organism.

The objective of this study was the analysis of biochemical and hematological blood parameters of different age groups of Yaroslavl breed cattle following addition of a suspension of *Chlorella* cultivated in an electrostatic field to their main diet.

Materials and methods

The studies were carried out on the premises of “Mologa” Ltd. in Yaroslavl Oblast on heifers and lactating cows of Yaroslavl breed of cattle. The animals for experiments were selected using the principle of analogous pairs in accordance with standard methodological recommendations, taking into account breed, age, average live body weight, origin, average daily growth among heifers, and average daily milk yield of lactating cows (Table 1) (Viktorov & Menkin, 1991). Throughout the experiment, the heifers and cows of the control and experi-

mental groups received a daily food diet of nutritional value which equaled the norm for animals of a corresponding age (Makartsev, 2012).

Apart from the main daily diet, the animals of the experimental groups in “Mologa” Ltd. were fed with *Chlorella* suspension. These microalgae were cultivated in the conditions of a closed bioreactor under the influence of an electrostatic field of 15 kV pressure (Schmigel et al., 2015a; Schmigel et al., 2015b). This bioreactor is a device for cultivating *Chlorella*, which consists of 2 aquariums on a metal frame (in the upper aquarium, the water is held and a growth medium is prepared; in the lower aquarium, the *Chlorella* grows), two reservoirs, in this case barrels, were placed on a frame for maintenance of the prepared *Chlorella* suspension and a control unit for automatizing the process of *Chlorella* suspension cultivation. The stimulation of *Chlorella* suspension by electrostatic field was carried out using a system of electrodes fixed on the parallel walls of the reservoirs. The electrodes were applied to the source of constant electric current, which was placed in the control unit (Fig. 1).

Table 1

Characteristics of experimental groups of Yaroslavl breed cows

Indicators	Heifers		Lactating cows	
	control	experimental	control	experimental
Number of animals, ind.	15	15	15	15
Average live body weight, kg	68.3 ± 3.5	69.7 ± 4.1	480 ± 21.7	499 ± 23.4
Average daily growth, g	567 ± 23.7	560 ± 25.1	—	—
Age group	heifers below one year		first heifers	
Origin	Dobry line		Dobry line	
Maintenance	1 st to 6 th month – group; 6 th month – tie housing		tie housing	
Average daily milk yield of natural milk during 100 days of lactation, kg	—	—	24.38 ± 1.18	24.53 ± 0.92
Average daily yield of 4% milk during 100 days of lactation, kg	—	—	24.56 ± 1.19	24.86 ± 0.93

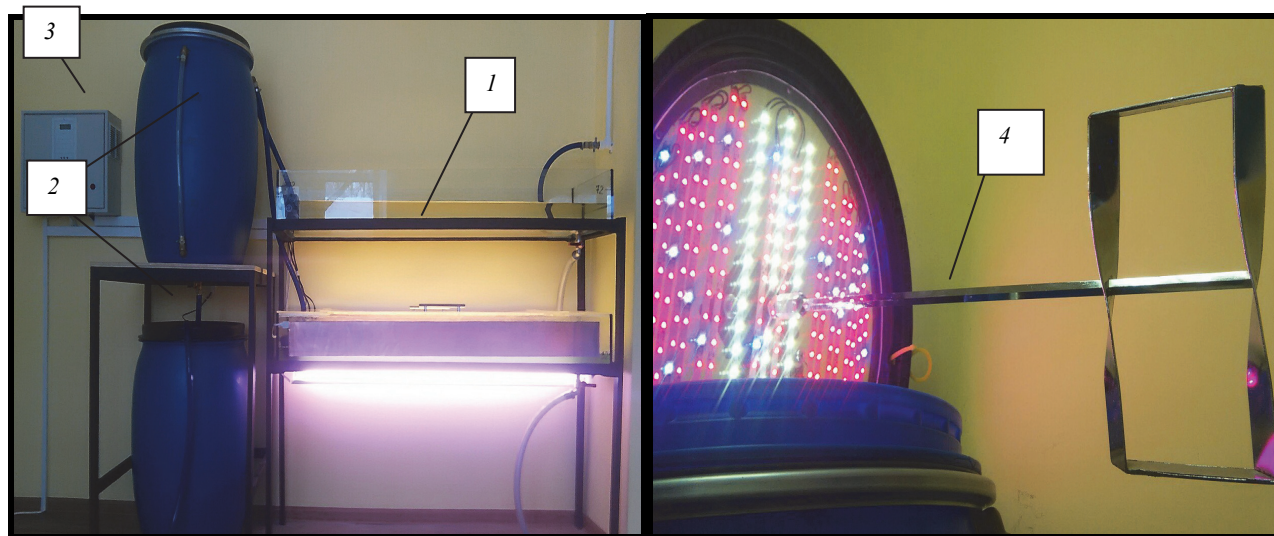


Fig. 1. Bioreactor for cultivating *Chlorella* in an electrostatic field: 1 – device for cultivating *Chlorella* in an electrostatic field; 2 – barrels for maintaining the prepared suspension of *Chlorella*; 3 – control unit with a source of constant electrostatic field and automatization of the process of cultivating *Chlorella* suspension; 4 – cover of the reservoir for maintaining *Chlorella* with a system of light-emitting diodes and an impeller mixer

Throughout the experiment, a new portion of *Chlorella* suspension with cellular density no less than 50 M/ml was obtained every 48 hours. The amount of *Chlorella* suspension for heifers and cows was calculated using the recommendations stating that the heifers which change their diet to roughage require 300–500 ml of *Chlorella* suspension per individual daily (Bogdanov, 2004). For determining the norm of feeding with *Chlorella* suspension, an experiment had been previously conducted on Yaroslavl breed heifers r. On the basis of this experiment, a recalculation for lactating cows was made, which determined that the norm of feeding with the *Chlorella* suspension per kg of dry substance of daily ration for one animal is 155 ml (Bogdanova & Flerova, 2016).

The heifers received *Chlorella* suspension in the following amount (ml/individual per days): 1–30th day of the experiment – 550, 31–60th – 660, 61–90th day – 730, 91–120th day – 830, which in

recalculation to dry substance (g/individual per days) was: 1–30th day of the experiment – 1.51, 31–60th day – 1.82, 61–90 day – 2.01, 91–120th day – 2.28. The *Chlorella* suspension was fed to the heifers individually using special plastic bottles. During 60 days, the lactating cows were given 2,180 ml per individual a day, which in recalculation to dry substance was 6.02 g per individual a day.

Chlorella suspension was given individually after morning feeding: the heifers received it throughout 120 days, the cows received it during 60 days, and over the following 30 days were kept under observation to determine the “aftereffects” of the fodder additive. On the first day of the experiment and after every 30 days, before morning feeding, blood was drawn into a vacuum test tube from the jugular vein of the control and experimental animals.

The composition and ratio of leukocytes were analyzed using Giemsa stain. The identification of leukocytes used “The Atlas of

Blood Cells of Agricultural and Laboratory Animals" (Nikitin, 1949). Under the Mikmed-6 microscope, 200 cells were calculated on each blood smear, including lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils, basophils. The number of leukocytes was calculated using the standard method of a hemocytometer (Kondrahin, 2004). The number of erythrocytes and the amount of hemoglobin was determined using an Advia 60 automatic hematological analyzer with a Timepac box complex reagent (USA-Germany).

The activity of superoxide dismutase was determined in blood hemolysate obtained by adding 0.9 ml of water to 0.1 ml of blood, and centrifuged at 5,000 rotations per minute during 30 minutes. We used the spectrophotometric method based on recovering of nitroterazolium by superoxide radicals formed as a result of interaction between phenazinemetasulfate and recovered form (NAD). The activity of the enzyme was determined at 540 nm wave length and expressed in conventional units per mg of hemoglobin (Chevari et al., 1985). The catalase activity was determined in the blood serum using the spectrophotometric method after adding 0.1 ml of homogenate to

2 ml of 0.03% solution of hydrogen peroxide. Instead of homogenate, 0.1 ml of distilled water was added to a dummy tube. The reaction was stopped after 10 min by adding 1 ml of 4% solution of ammonium orthomolybdate, the activity of the enzyme was expressed in IU. The staining intensity was determined at 410 nm wave length (Korolyuk et al., 1988).

The parameters of the studied features were calculated using statistical methods. We determined the arithmetic mean (M), and the standard error (SE). For determining the differences between the average values, we tested the statistical hypotheses using Student's t-test ($P < 0.05$) after a preliminary calculation of normal distribution.

Results

Heifers. The results of the study showed that the proportion of different forms of leukocytes in the blood of heifers from the control and experimental groups was within the physiological norm throughout the experiment (Table 2).

Table 2

Proportion of different forms of leukocytes in the blood of heifers ($M \pm SE$, $n = 15$)

The period of the experiment	Groups	Basophils, %	Eosinophils %	Neutrophils, %		Lymphocytes, %	Monocytes, %
				Band neutrophils	with segmented nuclei		
	Norm ⁺	0–2	3–8	2–5	20–35	40–75	2–7
1 st day	control	0	4.10 ± 0.33	3.10 ± 0.11	20.6 ± 1.1	68.4 ± 0.7	3.70 ± 0.49
	experimental	0	4.40 ± 0.59	3.20 ± 0.14	20.6 ± 0.4	69.4 ± 3.6	3.40 ± 0.33
30 th day	control	0	4.50 ± 0.35	3.29 ± 0.33	20.5 ± 0.7	68.3 ± 1.5	2.79 ± 0.26
	experimental	0	4.71 ± 0.29	3.36 ± 0.23	20.5 ± 0.7	68.2 ± 1.6	2.86 ± 0.15
60 th day	control	0	4.75 ± 0.42	3.20 ± 0.22	20.6 ± 0.4	68.2 ± 0.4	2.80 ± 0.22
	experimental	0	4.91 ± 0.54	3.30 ± 0.14	20.9 ± 0.7	68.3 ± 0.2	2.90 ± 0.21
90 th day	control	0	4.46 ± 0.23	3.21 ± 0.24	20.1 ± 0.3	68.7 ± 1.0	3.21 ± 0.39
	experimental	0	4.65 ± 0.34	3.64 ± 0.23	20.9 ± 0.5	68.9 ± 0.8	3.29 ± 0.16
120 th day	control	0	4.56 ± 0.34	3.28 ± 0.39	20.3 ± 0.5	69.1 ± 0.3	3.07 ± 0.21
	experimental	0	4.74 ± 0.23	3.71 ± 0.29	20.7 ± 0.4	69.6 ± 0.9	3.21 ± 0.35
150 th day	control	0	4.59 ± 0.27	3.24 ± 0.25	20.6 ± 0.5	69.5 ± 0.2	3.18 ± 0.26
	experimental	0	4.64 ± 0.17	3.68 ± 0.33	20.9 ± 0.9	69.6 ± 0.7	3.25 ± 0.43

Note: * – $P < 0.05$ according to Student's t-test compared to the control; ⁺ – according to Nikitin (1949), Kondrahin (2004).

It should be mentioned that at all stages of the experiment, no basophils were found in the blood of heifers from the control and experimental groups (Table 2). The heifers of the experimental group were observed on the 90th day and before the end of the experiment to have some increase in the relative number of band neutrophils compared to the control values (Table 2).

Table 3

Hematological parameters of Yaroslavl heifers ($M \pm SE$, $n = 15$)

Period of the experiment	Groups	Erythrocytes, $10^{12}/l$	Hemoglobin, g/l	Leukocytes, $10^9/l$
	norm ⁺	5.0–7.5	99–129	4.5–12.0
1 st day	control	5.74 ± 0.24	109.2 ± 5.3	6.87 ± 0.23
	experimental	5.72 ± 0.29	110.0 ± 5.0	7.16 ± 0.39
30 th day	control	5.70 ± 0.21	105.2 ± 2.2	8.28 ± 0.41
	experimental	5.82 ± 0.56	109.8 ± 6.4	8.67 ± 0.51
60 th day	control	5.76 ± 0.16	109.0 ± 3.0	9.57 ± 0.21
	experimental	5.88 ± 0.22	117.0 ± 2.0*	10.24 ± 0.49
90 th day	control	5.91 ± 0.21	109.8 ± 3.9	10.30 ± 0.43
	experimental	6.38 ± 0.19*	114.2 ± 2.9	11.01 ± 0.38
120 th day	control	5.93 ± 0.27	108.8 ± 3.8	10.50 ± 0.26
	experimental	6.46 ± 0.25*	113.5 ± 4.1	10.36 ± 0.06
150 th day	control	5.98 ± 0.21	110.6 ± 2.7	10.23 ± 0.43
	experimental	6.41 ± 0.23*	114.2 ± 2.0	10.45 ± 0.18

Note: * – $P < 0.05$ according to t-criterion compared to the control; ⁺ – according to Nikitin (1949), Kondrahin (2004).

During the study, we observed a statistically insignificant increase in the total number of leukocytes within the physiological norm in both groups of animals (Table 3). The number of erythrocytes among heifers of the experimental group was a little higher on the 30th and 60th days of feeding with *Chlorella* suspension compared to this parameter in the blood of animals from the control group. Then, this parameter reliably increased on the 90th and 120th days of the experiment in comparison to the same parameters for the control by 7.95% and 8.93% respect-

tively, and this excess remained on the 30th day after the feeding with *Chlorella* suspension was over and equaled 7.20% (Table 3). At the same time, the hemoglobin content of animals from the experimental group exceeded this parameter in the control group, and by the 60th day, the difference between the content of hemoglobin in blood of animals from the control and experimental group was 7.30% and was statistically significant (Table 3). On the 90th and 120th days of the experiment, we observed some increase in the content of hemoglobin in blood of animals from experimental group compared to the control, and this tendency remained on the 30th day after the feeding with the suspension additive was over (Table 3).

Table 4

Activity of the enzymes of anti-oxidant system of Yaroslavl heifers at the stages of study ($M \pm SE$, $n = 15$)

Period of the experiment	Groups	SOD, conv.units/mg of hemoglobin	CAT, IU
	Norm ⁺	1.0–7.5	20–60
1 st day	control	4.39 ± 0.33	39.40 ± 0.30
	experimental	4.97 ± 0.14	42.00 ± 2.91
30 th day	control	4.13 ± 0.58	34.80 ± 1.52
	experimental	4.70 ± 0.76	36.00 ± 2.72
60 th day	control	4.86 ± 0.75	32.90 ± 1.25
	experimental	5.22 ± 0.37	36.00 ± 0.50*
90 th day	control	4.68 ± 0.19	35.78 ± 2.78
	experimental	5.06 ± 0.28	40.20 ± 2.06*
120 th day	control	4.74 ± 0.24	35.38 ± 1.44
	experimental	5.10 ± 0.19	39.40 ± 1.71*
150 th day	control	4.81 ± 0.28	36.18 ± 1.74
	experimental	5.15 ± 0.34	39.42 ± 2.29*

Note: * – $P < 0.05$ according to t-criterion compared to the control, SOD – superoxide dismutase, CAT – catalase; ⁺ – according to Kondrahin (2004).

At the beginning of the experiment, the heifers of the experimental group were observed to have an increase in the activity of catalase

in the blood serum; on 60th, 90th and 120th days it was significantly higher compared to the control, equaling 9.4%, 12.4% and 11.4% respectively ($P < 0.05$), on the 30th day after the end of feeding with *Chlorella* suspension, this increase remained statistically significant, equaling 8.9% (Table 4). It should be mentioned that throughout the experiment the activity of superoxide dismutase in the experimental group was a little higher than in the control group. However no statistically reliable increase in this parameter compared to the control was observed (Table 4).

Lactating cows. The proportion of separate forms of leukocytes in the blood of lactating cows of the control and experimental groups was also within the physiological norm (Table 5). No basophils were found in the blood of animals from either group. By the 30th day of

the experiment, the relative number of band and neutrophils with segmented nuclei in the blood of lactating cows of the experimental group had slightly increased compared to the similar parameters of the control, and this tendency remained throughout the period of feeding with the additive.

It should be mentioned that on the 60th day, we observed a statistically significant increase in the number of eosinophils in the blood of lactating cows of the experimental group by 2.2% compared to the control value. On the 90th day, the number of monocytes in the blood of cows from the experimental group increased by 2% compared to the control (Table 4). Over the experiment, the hematological parameters of blood of lactating cows from the control and experimental groups were within the physiological norm (Table 5).

Table 5

The proportion of separate forms of leukocytes of lactating cows of Yaroslavl breed ($M \pm SE$, $n = 15$)

Period of the experiment	Groups	Basophils, %	Eosinophils %	Neutrophils, %		Lymphocytes, %	Monocytes, %
				band neutrophils	with segmented nuclei		
	Norm ⁺	0-2	3-8	2-5	20-35	40-75	2-7
1 st day	control	0	4.00 ± 1.16	4.93 ± 0.70	20.6 ± 1.4	73.6 ± 2.5	2.57 ± 0.86
	experimental	0	3.71 ± 2.30	4.79 ± 1.26	20.1 ± 1.3	75.0 ± 3.1	2.86 ± 1.70
30 th day	control	0	3.92 ± 0.88	4.43 ± 0.69	20.6 ± 1.3	69.4 ± 2.7	2.07 ± 0.25
	experimental	0	4.00 ± 0.54	4.64 ± 1.43	22.0 ± 1.2	73.7 ± 3.1	3.14 ± 0.85
60 th day	control	0	4.29 ± 0.75	3.88 ± 1.88	20.6 ± 1.8	68.5 ± 2.6	3.23 ± 1.05
	experimental	0	6.50 ± 0.51*	4.14 ± 1.79	20.6 ± 1.4	70.9 ± 3.6	3.21 ± 1.24
90 th day	control	0	6.64 ± 1.66	4.00 ± 2.08	20.1 ± 1.9	63.0 ± 3.8	2.36 ± 0.84
	experimental	0	6.71 ± 2.08	4.43 ± 1.87	21.9 ± 1.9	59.9 ± 4.4	4.36 ± 1.19*

Note: * – $P < 0.05$ according to t-criterion compared to the control; ⁺ – according to Nikitin (1949), Kondrahin (2004).

On the 30th day of the experiment, the number of erythrocytes of animals from the experimental group statistically significantly increased by 15.3% compared to the parameters of the control group, the observed tendency remained on the 60th and 90th days of the experiment and the excess of this parameter in the blood of animals from the experimental group was 5.1 and 4.5% respectively. At the same time, against the background of increase in the number of erythrocytes, an increase occurred in the content of hemoglobin in the blood of animals from the experimental group, which by the end of the 60th day equaled 8.4% ($P < 0.05$), this excess remained on the 90th day of the experiment, equaling 6.8%. On the 30th and 60th days of the experiment, the total number of leukocytes in the blood of lactating cows of the experimental group was slightly higher than it was in the blood of animals from the control group (Table 6).

Table 6

Hematological parameters of lactating cows of Yaroslavl breed ($M \pm m$)

Period of the experiment	Groups, n = 15	Erythrocytes, $10^{12}/l$	Hemoglobin, g/l	Leukocytes, $10^9/l$
	Norm ⁺	5.0–7.5	99–129	4.5–12.0
1 st day	control	5.00 ± 0.23	99.2 ± 4.3	8.90 ± 1.31
	experimental	5.00 ± 0.34	100.0 ± 5.0	9.00 ± 1.49
30 th day	control	5.11 ± 0.13	99.0 ± 1.6	8.65 ± 0.50
	experimental	5.89 ± 0.42*	102.0 ± 5.0	9.02 ± 0.58
60 th day	control	5.06 ± 0.16	96.9 ± 2.8	7.72 ± 0.83
	experimental	5.32 ± 0.19*	105.0 ± 3.0*	7.90 ± 0.80
90 th day	control	5.31 ± 0.12	103.0 ± 2.0	7.98 ± 0.25
	experimental	5.55 ± 0.22	110.0 ± 3.0*	7.97 ± 0.20

Note: * – $P < 0.05$ according to t-criterion compared to the control; ⁺ – according to Kondrahin (2004).

Throughout the experiment, the parameters of activity of catalase and superoxide dismutase among animals of the control and experimental groups were within the physiological norm. It should be mentioned that the parameters of the activity of superoxide dismutase and the activity of catalase of cows which received the *Chlorella* additive, were slightly higher than those of animals from the control group throughout the experiment (Table 7).

Discussion

Analysis of data from the literature showed that no experiment with usage of suspension of *Chlorella* stimulated by electrostatic field as a fodder additive for animals had been conducted before. However, there

are detailed descriptions of the impact of the microalgae cultivated using other technologies, on the organism of both laboratory and agricultural animals. Use of concentration of *Chlorella* had a physiological and pharmaceutical effect on the organism of mice and rats, manifesting a stimulating effect on the lipid metabolism, immune modulating and antibacterial activity of the organism of laboratory animals (Hasegawa et al., 1997; Shibata et al., 2001). Also, this microalgae showed strong antioxidant properties which prevent the effect of oxidative stress, when it is used in treating mice with naphthalene intoxication, and also rats suffering from diabetic disorders and oxidative stress under the impact of cadmium (Shibata et al., 2003; Vijayavel et al., 2007; Kim et al., 2009). It has been demonstrated that *Chlorella* participates in modeling immune reactions in the organism of animals and increases the activity of hematopoietic cells which prevent the development of tumours (Tanaka et al., 1984; Tanaka et al., 1990; Ramos, 2010).

Table 7

Activity of enzymes of anti-oxidant system of lactating cows of the Yaroslavl breed at the stages of the study ($M \pm SE$, $n = 15$)

Period of the experiment	Group	SOD, unit /mg of hemoglobin	CAT, $\mu\text{mol/l}$
	Norm ⁺	1.0–7.5	20–60
1 st day	control	3.59 ± 0.38	27.33 ± 2.39
	experimental	3.64 ± 0.33	27.17 ± 3.59
30 st day	control	3.45 ± 0.96	31.69 ± 2.80
	experimental	4.15 ± 1.01	32.12 ± 4.48
60 th day	control	2.36 ± 0.50	33.67 ± 5.39
	experimental	2.39 ± 0.37	34.76 ± 8.35
90 th day	control	2.48 ± 0.24	29.45 ± 0.23
	experimental	2.67 ± 0.37	29.57 ± 0.29

Note: * – $P < 0.05$ according to the t-criterion in comparison with the control; SOD – superoxide dismutase, CAT – catalase; ⁺ – according to Kondrahin (2004).

Feeding different age groups of pigs and cattle with *Chlorella* suspension contributed to increase in hemoglobin in the blood, increase in the number of erythrocytes and some forms of leukocytes. Using *Chlorella* suspension as a fodder additive in diets of different age groups of pigs caused increase in the number of monocytes and decrease in the level of cholesterol in blood serum, and using the microalgae in the diet of young cattle caused normalization of the physiological parameters of the animals' blood serum, strengthened enzyme activity and increased content of γ – globuline fraction of protein (Kotrbaček et al., 1995; Doucha et al., 2009; Yan et al., 2012; Oshurkova et al., 2015; Panov et al., 2016; Lamminen et al., 2017).

The results of our experiments coincide with the data provided by other researchers and demonstrate that the biochemical composition and hematological parameters of the blood of heifers and lactating cows which received an additive of suspension of *Chlorella* cultivated in a closed bioreactor under stimulation by electrostatic field, in the amount of 155 ml per a kg of dry substance of the animals' diet were within the physiological norm regardless of the duration of feeding. We demonstrated the *Chlorella* suspension's stimulating effect on erythro- and leukopoiesis of different age groups of cattle, and also the shift of leukogram towards increase in the relative number of separate forms of leukocytes and increase in the hemoglobin count. Increase in hemoglobin when there is increase in the number of erythrocytes within the physiological norm according to the data on blood parameters of heifers and lactating cows of the experimental groups indicates the increase in the speed of redox reactions, contributes to increase in the oxygen capacity and provides the tissues with oxygen, thus causing strengthening in metabolic processes in the organism of animals (Nadarinskaya, 2004; Krisanov et al., 2014). At all stages of the experiment, we found no basophils in the blood of heifers and lactating cows of the experimental groups, which indicates absence of allergic reactions in the organism, such as allergic reactions to fodder elements, including *Chlorella* suspension (Kondrahin, 2004; Karasuyama et al., 2011).

The animals which received the addition of *Chlorella* were observed to have an increase in parameters of catalase and superoxide dismutase throughout the experiment. We demonstrated that the increase in the activity of superoxide dismutase was followed by activation of catalase activity parameters both among heifers and cows of the experimental groups, which indicates absence of disbalance in the antioxidant system (Nisticò et al., 1992). We determined that feeding different age groups of cattle with *Chlorella* additive stimulates the system of antioxidant protection of the organism of animals, thus increases the level of non-specific resistance (Kondrahin, 2004). As we know, the overall changes in the biochemical and hematological parameters analyzed in the study within the physiological norm also indicate the increase in non-specific immunity of animals (Krapivina et al., 2011). It should be mentioned that regardless of the age of animals which received the *Chlorella* additive, the organism's response occurred on the 30th day of the experiment, and also the "aftereffect" was observed for a period of 30 days after the feeding with the additive was stopped.

Conclusion

Therefore, we demonstrated the usefulness of including the suspension of *Chlorella* cultivated using the intensive technology using an electrostatic field, with cellular density of no less than 50 M per a ml in a dosage of 155 ml per kg of dry substance of the diet, in feeding different age groups of cattle, for it has a complex effect on increase in the biochemical, hematological and morphological blood parameters, strengthening metabolic processes and increasing the non-specific immunity of animals, which in its turn contributes to the formation of the potential for increase in productive parameters and maintenance of cattle. Therefore, we demonstrated that the suspension of *Chlorella* cultivated with intensive technology using an electrostatic field, with cellular density of no less than 50 m per a ml is useful in feeding cattle of different age groups in a dosage of 155 ml per kg of dry substance of the diet.

References

- Aliahmat, N. S., Noor, M. R. M., Yusof, W. J. W., Makpol, S., Ngah, W. Z. W., & Yusof, Y. A. M. (2012). Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by Piper betle, tocotrienol rich fraction and *Chlorella vulgaris* in aging C57BL/6 mice. *Clinics*, 67(12), 1447–1454.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210.
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(5), 1–6.
- Bogdanov, N. I. (2004). Ispol'zovanie chlorelly v racione sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh [Use of *Chlorella* in the diet of farm animals]. *Rossijskaja Sel'skohozjajstvennaja Nauka*, 1, 34–35 (in Russian).
- Bogdanova, A. A., & Flerova, E. A. (2016). Vlijanie dobavki chlorelly na fiziologo-biohimicheskie i produktivnye pokazateli u telochek [Effect of chlorella on physiological, biochemical parameters and productive traits in heifers]. *Problemy Biologii Produktivnyh Zhivotnyh*, 2, 66–75 (in Russian).
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 313–321.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, 22(6), 1490–1506.
- Chevari, S., Chaba, I., & Sekej, J. (1985). Rol' superoksiddismutazy v oksislitel'nyh processah kletki i metod opredeleniya ee v biologicheskikh materialah [The role of superoxide dismutase in the oxidative processes of the cell and the method of its determination in biological materials]. *Laboratornoe Delo*, 11, 678–680.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: A novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 794–799.
- Costa, D. F. A., Quigley, S. P., Isherwood, P., McLennan, S. R., & Poppi, D. P. (2016). Supplementation of cattle fed tropical grasses with microalgae increases microbial protein production and average daily gain. *Journal of Animal Science*, 94(5), 2047–2058.
- Del Campo, J. A., Garcia-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1163–1174.
- Doucha, J., Livanský, K., Kotrbáček, V., & Zachleder, V. (2009). Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(6), 1001–1008.
- Flerova, E., & Bogdanova, A. (2014). The features of biochemical indices of strain *Chlorella vulgaris* IGF No. C-111, grown in closed system. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3, 311.
- Guccione, A., Biondi, N., Sampietro, G., Rodolfi, L., Bassi, N., & Tredici, M. R. (2014). *Chlorella* for protein and biofuels: From strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 84.
- Hasegawa, T., Kimura, Y., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Yamada, A., Maki-no, M., Okuda, M., Sano, T., Nomoto, K., & Yoshikai, Y. (1997). Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacology*, 35(3), 273–282.
- Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Zhou, W., Dong, R., & Yuan, Z. (2012). Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresource Technology*, 121, 76–82.
- Karasuyama, H., Obata, K., Wada, T., Tsujimura, Y., & Mukai, K. (2011). Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy*, 66(9), 1133–1141.
- Kim, Y. J., Jeong, S., Kwon, S., & Kim, M. K. (2009). Effect of *Chlorella vulgaris* intake on antioxidative capacity in rats oxidatively stressed with dietary cadmium. *Food Science and Biotechnology*, 18(5), 1055–1062.
- Kondrahin, I. P. (2004). Metody veterinarnoj i klinicheskij laboratornoj diagnostiki [Methods of veterinary and clinical laboratory diagnostics]. KolosS, Moscow (in Russian).
- Korolyuk, M. A., Ivanova, L. K., Majorova, I. G., & Tokareva, V. A. (1988). Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [Method for determination of catalase activity]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 4, 44–47.
- Kotrbacek, V., Filka, J., Ingr, I., & Dvorak, J. (1995). The effect of application of the alga *Chlorella vulgaris* on the occurrence of the pork defects. *Zivocisna Vyroba*, 11(40), 519–522.
- Krapivina, E. V., Ivanov, D. V., & Lifanova, J. V. (2011). Vlijanie raznyh doz probiotika "Tetralaktobakterin" na morfibiohimicheskie harakteristiki gomeostaza teljat [Influence of different doses of the probiotic "Tetralactobacterin" on the morphobiochemical characteristics of calves' homeostasis]. *Vestnik Orlovskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta*, 31(4), 41–44 (in Russian).
- Krisanov, A. F., Gorbacheva, N. N., & Demin, V. V. (2014). Gematologicheskie pokazateli korov pri kruglogodovom odnotipnom kormlenii. [Hematological indices of cows with year-round feeding of the same type]. *Vestnik Ul'janovskoj GSHA*, 27, 107–109 (in Russian).
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Simpura, I., Jaakkola, S., & Vanhatalo, A. (2017). Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 295–311.
- Lee, S., Kang, H., Lee, H., Kang, M., & Park, Y. (2010). Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. *Nutrition*, 26(2), 175–183.

- Lee, Y. K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13(4), 307–315.
- Lum, K. K., Kim, J., & Lei, X. G. (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 53.
- Makartsev, N. G. (2012). *Kormlenie sel'skhozjajstvennyh zhivotnyh* [Feeding of farm animals]. Noosfera, Kaluga (in Russian).
- Nadarinskaya, M. A. (2004). Vliyanie razlichnyh urovnej selena na produktivnost' i gematologicheskie pokazateli korov s udoem 6–7 tys. kg za laktaciju [The effect of various levels of selenium on the productivity and haematological parameters of cows with milk yield of 6–7 thousand kg for lactation]. *Zhivotnovodstvo*, 8, 6–9 (in Russian).
- Nikitin, V. N. (1949). *Atlas kletok krovi sel'skhozjajstvennyh i laboratornyh zhivotnyh* [Atlas of blood cells of agricultural and laboratory animals]. GISHL, Kharkov (in Russian).
- Nisticò, G., Ciriolo, M. R., Fiskin, K., Iannone, M., de Martino, A., & Rotilio, G. (1992). NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(3), 177–181.
- Ogbonna, J. C., Masui, H., & Tanaka, H. (1997). Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *Journal of Applied Phycology*, 9(4), 359–366.
- Oshurkova, Y. L., Fomina, L. L., Mekhanikova, M. V., & Soboleva, Y. N. (2015). Vliyanie kormovoj dobavki *Chlorella* na nekotorye pokazateli krovi teljat [Influence of fodder supplement of *Chlorella* on some parameters of calves' blood]. *Molochnohozjajstvennyj Vestnik*, 19, 47–52 (in Russian).
- Panahi, Y., Darvishi, B., Jowzi, N., Beiraghdar, F., & Sahebkar, A. (2016). *Chlorella vulgaris*: A multifunctional dietary supplement with diverse medicinal properties. *Current Pharmaceutical Design*, 22(2), 164–173.
- Panov, D. K., Patieva, A. M., & Koshchaev, A. G. (2016). Nekotorye biochimicheskie pokazateli krovi molodnyaka krupnogo rogatogo skota pri vypojke suspenzii mikrovodorosli [Some biochemical indicators of the blood of young cattle during the digestion of a suspension of microalgae]. *International Research Journal*, 17, e85 (in Russian).
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648.
- Ramos, A. L., Torello, C. O., & Queiroz, M. L. (2010). *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1170–1180.
- Shibata, S., Natori, Y., Nishihara, T., Tomisaka, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Nguyen, V. C. (2003). Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 49(5), 334–339.
- Shibata, S., Oda, K., Onodera-Masuoka, N., Matsubara, S., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, F., Iwabuchi, A., & Sansawa, H. (2001). Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella regularis* in cholesterol-fed rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47(6), 373–377.
- Shmigel', V. V., Fljorova, E. A., Bogdanova, A. A., & Suhovskij, N. A. (2015). *Ustanovka dlja vyrashhivaniya chlorelly* [Installation for cultivation of *Chlorella*]. Patent RF, No 2562867 (in Russian).
- Shmigel', V. V., Fljorova, E. A., Bogdanova, A. A., & Suhovskij, N. A. (2015). *Sposob vyrashhivaniya chlorelly* [Way of cultivation of *Chlorella*]. Patent RF, No 2558300 (in Russian).
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
- Tanaka, K., Konishi, F., Himeno, K., Taniguchi, K., & Nomoto, K. (1984). Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 17(2), 90–94.
- Tanaka, K., Tomita, Y., Tsuruta, M., Konishi, F., Okuda, M., Himeno, K., & Nomoto, K. (1990). Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 12(2), 277–291.
- Vijayavel, K., Anbuselvam, C., & Balasubramanian, M. P. (2007). Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 303(1–2), 39–44.
- Viktorov, P. I., & Menkin, V. K. (1991). *Metodika i organizacija zootehnicheskikh opytov* [Methods and organization of zootechnical experiments]. Agropromizdat, Moscow (in Russian).
- Yan, L., Lim, S. U., & Kim, I. H. (2012). Effect of fermented *Chlorella* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(12), 1742.
- Zheng, L., Oh, S. T., Jeon, J. Y., Moon, B. H., Kwon, H. S., Lim, S. U., & Kang, C. W. (2012). The dietary effects of fermented *Chlorella vulgaris* (CBT[®]) on production performance, liver lipids and intestinal microflora in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(2), 261–266.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 250–257
doi: 10.15421/021837

***Triticum spelta*: Origin, biological characteristics and perspectives for use in breeding and agriculture**

L. M. Babenko*, H. M. Hospodarenko**, R. V. Rozhkov***, Y. F. Pariy***,
M. F. Pariy***, A. V. Babenko*, I. V. Kosakivska*

*M. G. Kholodny Institute of Botany, Kyiv, Ukraine

**Uman National University of Horticulture, Uman, Ukraine

***All-Ukrainian Scientific Institute of Breeding, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 07.04.2018

Received in revised form
11.05.2018

Accepted 14.05.2018

M. G. Kholodny Institute
of Botany, Tereshchenkivska st.,
2, Kyiv, 01601, Ukraine.
Tel.: +38-050-358-27-90.
E-mail:
lilia.babenko@gmail.com

Uman National University
of Horticulture, Institutka st., 1,
Uman, 20300, Ukraine.
Tel.: +38-047-444-69-89.
E-mail: udau@udau.edu.ua

All-Ukrainian Scientific Institute
of Breeding, Vasylkivska st., 30,
Kyiv, 03022, Ukraine.
Tel.: +38-044-507-11-70.
E-mail: info@vnis.com.ua

Babenko, L. M., Hospodarenko, H. M., Rozhkov, R. V., Pariy, Y. F., Pariy, M. F., Babenko, A. V., & Kosakivska, I. V. (2018). *Triticum spelta*: Origin, biological characteristics and perspectives for use in breeding and agriculture. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 250–257. doi:10.15421/021837

In today's wheat production, the trends focused on the revival, selection and implementation of forgotten regional grain crops, the so-called "antique" cereals, have been clearly identified. One of these is the ancient hexaploid species of wheat – spelt (*Triticum spelta*). One of the main reasons that have contributed to the revival of this type of wheat in recent years is its tolerance to growing conditions and capacity to endure the natural and climatic factors of the environment, which allows it to be grown without an excessive use of plant protection products. It is precisely because of this feature that hulled wheat is referred to as "environmentally friendly". Spelt is capable of yielding stable crops without strict adherence to the production technology and may be a great alternative to soft wheat. The growth in demand for this crop is also due to a complex of economic and valuable traits inherited from its wild ancestors. This review analyzes and summarizes the information about the origin of spelt, presents biological characteristics, discusses the perspectives for using the species in breeding work when implementing interspecific hybridization and compares the structure and genome evolution. The achievements on the revival of spelt as an independent species and its use as a source of economic and valuable traits in breeding programs of crosses with soft wheat are highlighted, examples of successful use of the economic and valuable traits of spelt for the improvement and creation of new high-quality wheat varieties are presented. Data on this superiority of grain from this species over that of genetically close wheat species are presented. The varieties' characteristics for spelt varieties of Ukrainian selection are given. Such important spelt characteristics as resistance to biotic and abiotic stressors, high quality grain composition and yield have been analyzed.

Keywords: hulled wheat; free-threshing wheat; phylogeny; wheat genome; economically essential features; selection process

***Triticum spelta*: походження, біологічна характеристика, перспективи використання в селекції та сільському господарстві**

Л. М. Бабенко*, Г. М. Господаренко**, Р. В. Рожков***, Я. Ф. Парій***,
М. Ф. Парій***, А. В. Бабенко*, І. В. Косаківська*

*Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного, Київ, Україна

**Уманський національний університет садівництва, Умань, Україна

***Всеукраїнський науковий інститут селекції, Київ, Україна

У сучасному виробництві пшениці чітко позначилися тенденції, зосереджені на відродженні, селекції та впровадженні забутих регіональних зернових культур, так званих «античних» злаків. Один із таких злаків – стародавній гексаплоїдний вид пшениці – спельта (*Triticum spelta*). Спельта невимоглива, росте на малородючих ґрунтах, стійка до холоду, надмірного зволоження, добре схрещується з тетраплоїдними пшеницями, завдяки чому використовується у селекційних програмах для поліпшення твердості та м'якої пшениць. Увага до спельти у країнах Європи зумовлена її придатністю до маловитратного органічного землеробства, харчовою та технологічною якістю. Використання спельти, як джерела з високим вмістом білка багатьох незамінних амінокислот, для поліпшення технологічного потенціалу борошна під час виробництва хліба, досить перспективне. Основна причина, що сприяла відродженню спельти, – її невибагливість до умов культивування та витривалість до природно-кліматичних чинників середовища. Спельта не потребує надмірного застосування засобів захисту рослин, через що її називають «екологічно дружньою». В огляді проаналізовано та узагальнено відомості про походження та поширення спельти, наведено схему еволюції поліплоїдних видів пшениць, відомості про генетичне різноманіття та біологічні ознаки спельти, обговорено

перспективи використання виду в селекційній роботі для здійснення міжвидової гібридизації та порівняння будови та еволюції геномів. Висвітлено досягнення з відродження спельти як самостійної культури та використання виду в селекційних програмах схрещувань із пшеницею м'якою, наведено приклади успішного використання господарсько-цінних ознак спельти для поліпшення та створення нових високопродуктивних сортів пшениці. Подано відомості про переваги зерна цієї культури над генетично спорідненими видами пшениці. Наведено сортові характеристики спельти української селекції. Проаналізовано такі важливі показники спельти як стійкість до біотичних та абіотичних стресорів, якісний склад зерна, врожайність.

Ключові слова: плівчаста пшениця; голозерна пшениця; філогенія; геном пшениці; господарсько-цінні ознаки; селекційний процес

Вступ

Пшениця належить до головних зернових культур в Україні та світі. Її справедливо вважають рослиною культурного землеробства – вона дає стійкі врожаї тільки за високого рівня агро-технології. Важливий елемент технології її вирощування, котрий впливає на продуктивність, – використання високоврожайних сортів, стійких до біотичних і абіотичних стресорів (Morgun et al., 2016). Розвиток аграрної галузі, що відбувся впродовж останніх двох століть, мав одним із наслідків генетичну ерозію культурних рослин, яка чи не найбільше позначилась на пшениці. Припинено або зведено до мінімуму культивування всіх видів роду *Triticum*, окрім *T. aestivum* L. та *T. durum* Desf., що спричинило звуження різноманіття генів, які зумовлюють стійкість до біотичних і абіотичних стресорів (Faris, 2014). Посіви пшениці стали вразливими, а обсяги та якість урожаю – нестабільними. Нині найпоширеніші за площами та валовими зборами – *T. aestivum* і *T. durum* (Goncharov & Kondratenko, 2008; Tverdohlib & Boguslavs'kij, 2012).

T. aestivum вирощується на площі майже 240 млн га. Таких обсягів не займає жодна інша зернова культура. За рахунок зростання чисельності населення у світі до 2030 року попит на пшеницю, як очікується, збільшиться на 40% (Dixon et al., 2009). Для задоволення харчових потреб необхідне щорічне збільшення врожайності на 2%. Проте середньорічні темпи виробництва зерна пшениці значно відстають від темпів росту населення планети. Зростаючий дисбаланс можливо скоротити збільшенням виробництва зерна як за рахунок розширення посівних площ, так і шляхом підвищення врожайності. Перевага віддається саме підвищенню врожайності, оскільки посівні площі у багатьох регіонах Землі досягли або перевищили межі екологічної безпеки (Reynolds et al., 2001). Ця мета може бути досягнута генетичним поліпшенням і поглибленням розуміння біологічних процесів рослини. Розширення наших знань і розуміння еволюції пшениці, включаючи генетичні механізми, що лежать в основі базових процесів доместикації, які сформували теперішню пшеницю, може забезпечити нові ключі до розуміння того, як генетичне різноманіття, доступне прабатькам дикої пшениці, може бути використане для ініціації нової сільськогосподарської революції в умовах мінливого клімату (Faris, 2009).

На території України за впливу природних і антропогенних факторів із поступово зростаючою частотою набувають певної реальності зміни клімату, які посилюють контрастність погодних умов між роками та окремими періодами року. В найближчому майбутньому прогнозуються аномально холодні зими з різкими перепадами температур, нестачею снігового покриву, частими відлигами, що сприяють утворенню льодової кірки (Ivashenko & Ivashenko, 2008). Зимові відлиги, які чергуються з раптовими морозами, завдають реальної шкоди та знижують урожайність озимих злаків, для яких умови перезимівлі – визначальні у процесі вегетації. Раннє настання метеорологічної весни збільшує ймовірність ушкодження рослин внаслідок весняних заморозків. Через несприятливі екологічні чинники спостерігається тенденція до зниження виробництва зерна пшениці. Вважається, що до 50% урожаю втрачається тільки через вплив абіотичних стресорів (екстремальні температури, посуха, засолення, важкі метали, ультрафіолетове опромінення тощо). Ще 10–30% врожаю може бути втрачено внаслідок біотичних чинників (Morgun & Major, 2009; Morgun et al., 2016). Інтенсивна селекція, спрямована на підвищення врожайності, спричинила значне збіднення генофонду пшениці, що спонукало вчених до пошуку природних джерел господарсько-цінних ознак для її поліпшення.

Розвиток культури землеробства та споживання, особливо у провідних країнах світу, викликав усвідомлення цих та інших негативних результатів генетичної ерозії та привернув увагу до видового та внутрішньовидового різноманіття пшениці. Щодалі активніше використовують місцеві форми та сорти пшениці добре адаптовані до умов вирощування (так званий первинний генофонд), види пшениці іншого рівня плоідності, представники близькоспорідненого роду *Aegilops* (вторинний генофонд), а також види інших родів – *Agropyron*, *Secale*, *Hordeum* (третинний генофонд) (Golik et al., 2016). При цьому значну увагу приділяють спельті. Спельта невимоглива до умов вирощування, росте на малородючих ґрунтах, стійка до холоду та надмірного зволоження (Morgun et al., 2015), добре схрещується з тетраплоїдними пшеницями, завдяки чому широко використовується в селекційних програмах для покращення твердості та м'якої пшениць (Tverdohlib & Boguslavs'kij, 2012). Увага до цієї культури у країнах Європи зумовлена її придатністю до маловитратного органічного землеробства, харчовою та технологічною якістю, що дозволяє частково замінити спельтою традиційно домінуючі пшениці (Golik et al., 2016). Останнім часом стає актуальним збагачення харчових продуктів компонентами різних зернових культур. Тому використання спельти як джерела з високим умістом білка, багатого незамінними амінокислотами, для поліпшення технологічного потенціалу борошна під час виробництва хліба досить перспективне (Podprjatov & Jashhuk, 2013; Hospodarenko et al., 2016). Мета огляду – аналіз і узагальнення відомостей про історію походження *T. spelta*, біологічні характеристики та перспективи використання спельти у селекційній роботі для здійснення міжвидової гібридизації та порівняльного вивчення будови та еволюції геномів пшениці.

Походження та історія поширення спельти

Питання філогенії спельти нерозривно пов'язане з виникненням загалом гексаплоїдних видів, і до цього часу немає однозначності поглядів щодо її походження. Ми зупинимось на найбільш поширених сучасних теоріях виникнення та еволюції гексаплоїдних видів пшениці та спельти зокрема. Оскільки гексаплоїдні види походять від тетраплоїдних, першочергове завдання – виявити той тетраплоїдний вид, який дав початок первинному гексаплоїду. Серед можливих первинних тетраплоїдних видів пшениці, що могли відіграти провідну роль, виділяють такі стародавні види як *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. cartholicum*, *T. ispananicum*, *T. thimopheevii* чи навіть припускають можливість поширення в минулому гіпотетичних видів *T. parvicoccum* чи *T. protopersicum*, які в результаті спонтанної гібридизації пшениці з носієм геному D ssp. *strangulata* Ae. *squarrosa* (Ae. *tauschi*), що, швидше за все, відбулась у районі Родючого півмісяця, дали початок гексаплоїдним видам пшениці (Zhukovskij, 1971; Goncharov, 2009) (рис. 1). Що стосується первинного гексаплоїдного виду, то і на це питання однозначності поглядів немає. Нині більшість учених схильється до теорії походження голозерних гексаплоїдних видів пшениці від плівчастих (*T. spelta* L., *T. macha* Dek. et Men.) шляхом накопичення мутацій (Kuckuck, 1959), або спадково закріпленої зупинки на кінцевих етапах розвитку в онтогенезі як біологічному механізмі доместикації пшениці – явище неотенії в культурних рослин (Boguslavsky, 2008). Однак існують припущення, що ці дві групи гексаплоїдних пшениць (голозерні та плівчасті) могли розвиватись і паралельно, тобто мали поліфілетичне походження або навіть виводять плівчасті види від голозерних. Такі припущення базуються на відсутності археологічних та лінгвістичних даних, які б

указували на більш раннє існування спельти порівняно з м'якою пшеницею. Археологічним знахідкам *T. spelta* з Близького Сходу близько 8 тис. років (Kislev, 1984); тоді як знайдені залишки м'якої пшениці старші за них на тисячу років (Nesbitt, 2001; Goncharov, 2009). Втім, більшість авторів припускають, що півчаста пшениця *T. spelta* – найдавніший гексаплоїдний вид, від якого утворилися всі інші види, у тому числі пшениця м'яка (Horf, 1983; Luo et al., 2007). Проте, зважаючи на значні відмінності у будові між європейським підвидом спельти та азійським (за типом ламкості колосу, будовою колоскових лусок), і відсутність археологічних залишків спельти на шляху з Азії в Європу, нині домінує погляд про незалежне походження підвидів цієї пшениці.



Рис. 1. Територія Родючого Півмісяця (дані Diamond, 2009)

Першим припущення про передньоазійське походження спельти висловив М. І. Вавилов (1926). Однак Е. Tschernak, J. Percival та інші зареєстрували факти відгалуження спельти під час міжвидової гібридизації, які переконали М. І. Вавилова у вторинному гібридному походженні європейської спельти (Vavilov, 1992; Dvorak et al., 2011). Гіпотезу про первинне азіатське походження спельти підтримує низка авторів (Kuckuck & Schiemann, 1957; Zonary & Horf, 2000), які вважають азіатську спельту родоначальницею пшениці м'якої.

Стосовно європейської спельти, вона могла мати інше походження (Dvorak et al., 2006), тобто була продуктом гібридизації тетраплоїдної пшениці *T. dicoccum*, (AABB) та *Ae. squarrosa* (DD). Існує гіпотеза (Bertsch, 1943) про походження європейської спельти від схрещування між *T. compactum* Host. (AABBDD) і *T. dicoccum* Schrank. (AABB) на початку бронзового віку. Отримані повністю фертильні типи спельти від схрещувань *T. compactum* Host × *T. dicoccum* Schrank можуть слугувати на користь цього припущення (Ohtsuka, 1998). Аналізуючи міжвидові гібриди пшениці, В. Ф. Дорофеев також зробив висновок на користь вторинного поліфілетичного походження азійської та європейської спельти. На поліфілетичне походження спельти вказує географічна локалізація генів відновлення фертильності, гібридного некрозу та хлорозу (Dorofeev et al., 1987). Спельта Іспанії містить ген Ch2, а також гени Ne1 спельт Центральної Європи та Ne1 і Ch2 спельт Ірану й Азербайджану. Також, за результатами порівняльного аналізу генів гібридного некрозу та хлорозу зразків спельти з різних еколого-географічних зон (Tsunewaki, 1971) встановлено, що спельта європейського походження та інші важкообмолочувані види пшениці, подібно до *T. macha*, походять від різних пентаплоїдних гібридів, отриманих від схрещувань між тетраплоїдним *T. dicoccum* і гексаплоїдним *T. aestivum*. Аналіз генів високомолекулярних глютенінів європейських і азійських зразків спельти, м'яких і твердих пшениць (Blatter et al., 2004), виявив різний географічний розподіл β-алелів Glu-B1-1 і Glu-A1-2, що підтвердило незалежне походження європейської та азійської спельти (Blatter et al., 2004; Dvorak & Luo, 2006). Аналіз шести субодиниць високомолекулярного глютеніну виявив, що алелі Glu-B1-1, Glu-A1-2 і Glu-B1-2 стародавньої спельти та сучасної аборигенної швейцарської спельти відрізнялися від

алелів глютенінкодувальних локусів хромосом стародавніх і сучасних м'яких пшениць (Blatter et al., 2002). Причому спельтоїдний алель Glu-B1-1 зчеплений з алелем β-субкластера, який ідентифікований переважно в тетраплоїдних видів пшениці (Brown, 1999), тоді як алелі глютенінкодувальних локусів D-гену спельти та пшениці м'якої не відрізняються (Blatter et al., 2004).

Одержані дані підтверджують гіпотезу про те, що європейська спельта утворилася в результаті інтрогресії тетраплоїдної пшениці в гексаплоїдну легкообмолочувану м'яку пшеницю. Вивчення глютенінкодувальних локусів стародавньої спельти свідчить, що β-алелі Glu-B1-1 і Glu-A1-2 існують щонайменше 300 років (Blatter et al., 2004). Спельта містить специфічні алелі α-гліадинів β-гену, відмінні від алелів тетраплоїдної пшениці. β-Алель Glu-B1-V тетраплоїдної пшениці відрізняється від β-алеля Glu-B1-VI європейської спельти двома мутаціями (Blatter et al., 2004). Припускають, що європейська спельта отримала β-алелі високомолекулярного глютеніну від вихідної тетраплоїдної пшениці. Вивчення складу субодиниць глютенінів європейських спельт, а також споріднених тетраплоїдних і гексаплоїдних видів роду *Triticum* підтверджує гіпотезу вторинного походження європейської спельти (Yan et al., 2003). Що стосується субодиниць низькомолекулярного глютеніну, мінливість LMW-глютеніну у спельти вища порівняно з іншими видами (Caballero et al., 2004). Мінливість С-зони низькомолекулярного глютеніну спельти вища, ніж у *T. tauschii* (Gianibelli et al., 2002) і пшениці твердої (Nieto-Taladriz et al., 1997) і нижча, ніж у диплоїдних видів пшениці (Gianibelli et al., 2002).

На відміну від європейських зразків спельт, поділ глютенінкодувальних алелів між азійськими спельтами та пшеницею м'якою можна допустити лише якщо азійські спельти походять від висхідної півчистої пшениці м'якої. Склад високо- та низькомолекулярних субодиниць глютенінів іранської спельти більше подібний до пшениці м'якої. Окремі європейські спельти містять компоненти гліадину та алелі генів некрозу, які відрізняються від іранської спельти (Campbell, 2007). На користь генетичної спорідненості спельти та пшениці м'якої свідчать подібність структури каріотипів і розподіл гетерохроматинових ділянок хромосом (Dedkova, 2008). Результати С-бендингу вказують на те, що *T. spelta* займає проміжне місце між тетраплоїдними та гексаплоїдними видами пшениць (Dedkova, 2008).

Поділ спельти на азійський і європейський підвиди підтверджений результатами С-диференційного забарвлення хромосом, а також технологіями штучних нейронних мереж (Dedkova, 2008). Засвідчено поділ європейської спельти на іспанську та власне європейську групи.

Отже, найвірогідніша – гіпотеза поліфілетичного походження спельти (рис. 2). Вона передбачає, що азійська спельта вперше виникла на каспійському узбережжі Ірану та стала родоначальником пшениці м'якої, а європейська – продуктом гібридизації м'якої та тетраплоїдної пшениці (Salamini et al., 2002).

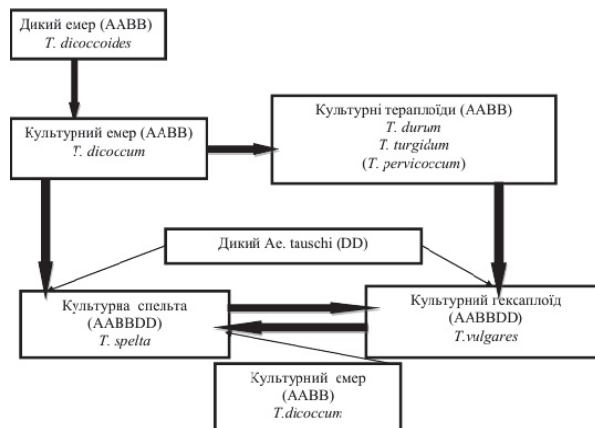


Рис. 2. Схема еволюції поліплоїдних видів пшениць у результаті окультурення (дані Salamini et al. (2002))

Проаналізувавши дані літератури стосовно походження спельти, можна зазначити, що це питання перебуває в полі зору багатьох вітчизняних і зарубіжних учених і потребує подальших досліджень. Зважаючи на ймовірне поліфілетичне походження азійської та європейської спельти, розглянемо історію їх поширення та вирощування.

Як зазначалось раніше, археологічні дослідження вказують на існування спельти близько VI тисячоліття до н. е. в Іраку, що відповідає часу неоліту. Експедиція Н. Kuckuck, проведена в середині XX століття, виявила чисті посіви спельти на плоскогір'ї Східно-Центрального Ірану (Kuckuck & Schiemann, 1957). Ізольовані посіви спельти або її домішки серед м'якої пшениці знайдені в інших районах Центральної Азії та Закавказзя (Азербайджан, Вірменія, Таджикистан, Туркменистан) (Dorofeev et al., 1987; Zohary, 2004).

Що стосується європейської спельти, дані вказують на її появу в Центральній Європі в ранньому бронзовому віці (Andrews, 1964; Nesbitt, 2001), тоді як зерна голозерних м'яких пшениць були знайдені в Європі вже на початку неоліту. Отже, в Європі голозерна м'яка пшениця з'явилася раніше за спельту. За археологічними даними, поширення спельти обмежене саме територією Центральної Європи (Nesbitt & Samuel, 1996). Щодо Центральної Європи, на яку вказував Фляксбергер (1935) як на область найдавнішої культури спельти, то на всій її території (Німеччина, Австрія, Угорщина), де проведено велику кількість археологічних розкопок, спельта не знайдена. Лише у Швейцарії є низка знахідок *T. spelta* у залишках бронзового віку (Fljaksberger, 1935; Nesbitt, 2001). Основне поширення спельти у стародавній Європі пов'язане перш за все з місцями проживання германських племен, звідки вона після завоювання Римською імперією цих територій поширилась в інші європейські країни. На території України вирощування спельти, як і полби, пов'язують із населенням буго-дністровської культури, яку датують близько 5–6 тис. років до н. е. (Pashkevich & Videjko, 2006; Poltoretskyi et al., 2018).

У першій половині XX століття спельта широко вирощувалась в Іспанії (Астурія), Німеччині, Австрії, Швейцарії та Бельгії. Ареал її поширення пов'язаний із гірськими районами з достатнім зволоженням. Спельта охоплювала гірські області Північно-Західних Альп із Вогезами, Шварцвальдом, заходячи у Тюрінгервальд і Швабську Юру. У Швейцарії – на північ від хребта Berner Alpen і Todi-Kette в кантонах Цюрих і Берн. Особлива група ярої остистої спельти збереглась в Астурії (Іспанія, Північні відроги Кантабрійських гір). Як і полба, з широким упровадженням сучасних технологій вирощування на початку минулого століття спельта швидко перетворюється на «острівну культуру», що вирощується на обмеженій території в місцях із традиційним укладом. Проте в останні десять років ситуація почала змінюватись, і нині попит на спельту суттєво зріс, вона з категорії просто малопоширених ботанічних видів перейшла в розряд нішевих. Нині спельта за посівними площами посідає третє місце серед пшениць, її почали активно вирощувати не лише на традиційній для неї території, а й на території Франції, Італії, Ізраїлю, США, Австралії (Tverdohlib & Boguslavs'kij, 2013). Збільшились посіви під цією культурою і на території України, де сільгоспвиробники вирощують її переважно на експорт.

Генетичне різноманіття, біологічні та господарсько-цінні ознаки спельти

Пшеницю спельту (*Triticum spelta* L.) відносять до плівчастих пшениць і називають полбою або справжньою полбою. Щоб уникнути подальшої плутанини, доцільно полбою називати тільки двозернянку *T. dicoccum* ($2n = 28$) як первісну назву цієї пшениці, а для *T. spelta* залишити назву «спельта», (Dorofeev et al., 1987). Спельта (*T. spelta* L.) – гексаплоїдний вид пшениці ($2n = 42$), її геном – A^uBD. Має форми ярого та озимого типу розвитку. Рослини спельти зазвичай високорослі, колоси довгі, вузькі, за досягання ламкі, зернівки продовгуваті, тісно охоплені лусками. Ця зернова культура була розповсюджена в давні часи, ві-

дома з епохи раннього неоліту. Вона була поширена в Європі та Азії. Людство тисячоліттями харчувалось цим злаком (Podprjatov & Jashhuk, 2013; Poltoretskyi et al., 2018). Відмова від вирощування плівчастих видів пшениці зумовлена декількома причинами. По-перше, вирощувані форми майже винятково являють собою продукти народної селекції: це екстенсивні сорти, витривалі до суворих умов, але з обмеженим потенціалом продуктивності. По-друге, полба та спельта мають ознаки, що ускладнюють застосування засобів механізації під час вирощування та переробки врожаю: ламкість колоса при досяганні, яка спричиняє втрати врожаю, та плівчастість, що вимагає додаткових витрат енергії та праці для шеретування та очищення зерна, а також більшого обсягу сховищ порівняно з голозерною пшеницею. Плівчастість також не дає змоги провести якісну сівбу зерновими сіялками, оскільки невимолочені колоски забивають насіннепроводи, а спроби вимолотити їх до одержання чистого зерна викликають пошкодження зернівок, внаслідок чого знижується схожість. Була ще одна причина, можливо, навіть найбільш вагома: під час переходу до обробки ґрунту бороною стало неможливим утримувати колоски, бо вони чіплялися за зубці борони та виходили на поверхню. З іншого боку, плівчастість – позитивна ознака, оскільки під час сівби та проростання луски захищають зернівку, а потім і проростки від впливу негативних чинників природного середовища, що сприяє формуванню здорових та міцних сходів. Невимолочене зерно у лусках («ворох») добре зберігається завдяки нещільному приляганням колосків один до одного, що зменшує перегрів зерна. Плівчастість – також додатковий захист від пошкодження птахами та комахами (Pukhalskiy et al., 2008; Tverdohlib et al., 2013).

Як зазначалось вище, за походженням спельта поділяється на два підвиди: європейську та азійську (Hospodarenko et al., 2016). Оскільки в наших умовах практичне значення мають різновиди європейського підвиду спельти, ми зупинимось, у першу чергу, на їх характеристиці. Європейська спельта (subsp. *spelta*) поділяється на дві еколого-морфологічні групи: західноєвропейська (німецька, баварська) та астурійська (іспанська, іберійська). У складі першої групи переважають озимі форми, у другої – ярі (Alvarez & Guzmán, 2013). Відмінні для цих груп – окремі ознаки колоса. Західноєвропейські форми в основному представлені безостими різновидами, а астурійські – завжди остисті (Dorofeev et al., 1987). Азійська спельта характеризується наявністю як озимих, так і ярих форм.

Серед корисних ознак спельти варто відмітити невибагливість, здатність зростати на бідних гірських ґрунтах, значну зимостійкість, стійкість до надлишкового зволоження. На ґрунтах важкого гранулометричного складу, в умовах значної кількості опадів, холодної зими та високої р'я (до 1 000 мм), порівняно з пшеницею м'якою спельта дає стабільно високий урожай (Schmitz, 2006). Спельта – волого- та світлолюбива культура, тому стійкість до атмосферної та ґрунтової посухи в неї слабка, а продуктивне кушіння та облистняність – сильні. Іберійська спельта стійка до бурой та жовтої іржі, баварська спельта не стійка до грибкових захворювань. У багатьох зразків відмічено стійкість до видів-збудників фузаріозу. Спельті притаманна сприятливість до летючої сажки, особливо до рас, що вражають м'яку пшеницю; слабкосприйнятливі та стійкі зразки малопоширені (Dorofeev et al., 1987).

Західноєвропейські форми на початкових стадіях відзначаються сповільненим темпом розвитку. Німецька спельта екологічно досить одноманітна (Schmitz, 2006). Вона пристосована до гірських і передгірних районів, відрізняється відносно тривалим вегетаційним періодом, волого- та світлолюбива, з низькими вимогами до технології вирощування.

Під час дослідження впливу короткотривалої гіпертермії та ґрунтової посухи на морфологічні процеси у рослин *T. spelta* сорту Франкенкорн – представника європейської групи, показано, що вплив обох стресорів викликав зменшення маси та довжини пагонів і кореневої системи, проте вираженіші зміни зареєстровані після дії ґрунтової посухи. За морфометричними

показниками корені виявилися чутливішими до гіпертермії, ніж пагони. За гіпертермії та ґрунтової посухи зафіксовано зменшення вмісту фотосинтетичних пігментів. Ґрунтова посуха та гіпертермія істотно не впливають на мікроструктуру епідерми листової пластинки. Разом із тим, зростає щільність воску на листовій пластинці (Kosakisvska et al., 2017). На рівні ультраструктури короточасна гіпертермія викликала часткову деструкцію тилакоїдних мембран хлоропластів. Спостерігалася хвилеподібна упаковка тилакоїдів гран, значне розширення люменальних проміжків, відрив термінальних кінців тилакоїдів один від одного. За гіпертермії мітохондрії помітно «розбухали», при цьому мембрани крист ставали менш контрастними. Спостерігалася часткове просвітлення матриксу органел. Зростала також їх кількість порівняно з контролем. В ядрі виявлено порушення в конденсації хроматину. У цитоплазмі клітин зростала кількість ліпідних крапель. Короточасна гіпотермія викликала інтенсивне утворення пластоглобул, збільшення кількості та розміру крохмальних зерен. Однак деструкції тилакоїдних мембран не спостерігалася. Частина мітохондрій набувала округлої форми (40%) і мала розміри, близькі до контролю, 26% органел мали ліноподібну, 16% – «гантелеподібну» і 18% – «чашоподібну» форму. Форма мітохондрій належить до динамічних структурних показників (Van Gestel & Verbelen, 2002; Logan, 2010). У теплолюбних рослин її зміна супроводжується зникненням крист, що розглядається як симптом пошкодження (Krasch & Wise, 2000). У холодостійких рослин, таких як арабідопсис або пшениця, зміна форми мітохондрій на витягнену «гантелеподібну» та «чашоподібну» має обернений характер (Yu et al., 2011; Vella et al., 2012). Передбачається, що така форма органел сприяє збільшенню площі їх поверхні та полегшує обмін метаболітами з цитоплазмою (Yu et al., 2011; Vella et al., 2012). У працях інших учених показано, що збільшення розмірів мітохондрій за короткочасного стресу свідчить про підвищення дихальної здатності клітини (Armstrong et al., 2006; Venzhik et al., 2017). Такі зміни форми мітохондрій зумовлені складом, головним чином, ненасичених жирних кислот (Theocharis et al., 2012). Така реакція клітин мезофілу листка *T. spelta* на дію екстремальних температур виражається у структурно-функціональній реорганізації фотосинтетичного та енергетичного апарату, яка починається у перші години дії на рослину стресових температур і є обов'язковою умовою реалізації адаптивних програм. Дослідження показали значну адаптацію сорту Франкенкорн до низьких позитивних температур (Schmitz, 2006).

Азійські та європейські спельти різняться морфологічною будовою. Люо (2000) доводить, що це зумовлено генами, які контролюють морфологію колоса. Більш ламкий колосовий стрижень мають європейські спельти (Dorofeev et al., 1987), які генетично споріднені до пшениці м'якої (Dvorak et al., 2006). Водночас інші вчені (Liu & Tsunewaki, 1991) наголошують, що європейська спельта та пшениця м'яка відрізняються генами, які відповідають за ламкість колосу та лусок. В азійській спельти членник стрижня прикріплений до основи колоска своєю верхньою частиною. Іберійська спельта, стійка до бурі та жовтої іржі, в аграрному виробництві представлена лише ярими формами. Баварська спельта нестійка до грибкових захворювань і представлена озимими пізньостиглими формами (Dorofeev et al., 1987). Серед досліджуваних різновидностей спельти тільки зразки з Ірану та Туркменістану, в яких налив зерна відбувається за умови підвищеної температури повітря, містять ген гібридного некрозу Vm3. Більшість європейських зразків спельти (57,9%) містять ген гібридного некрозу Vm2. Подібна закономірність установлена і для м'якої пшениці: в європейських сортів присутній ген Vm2, а ген Vm3 характерний для азійських м'яких пшениць. Для азійських зразків спельти характерний ген Ne1, а для європейських – ген Ne2 (Goncharov, 2008). Подібний розподіл генів гібридного некрозу спостерігається у пшениці м'якої (Pukhalskiy et al., 2008). Так, ген Ne2 містять більшість європейських сортів, при цьому в них переважають генотипи Ne1Ne2 і Ne1Ne2. Необхідно також зазначити, що у спельти, яка росте на території

Німеччини, Швейцарії, Австрії, Чехії, а також на південному сході Іспанії, відсутні гени гібридного некрозу.

Друга, не менш важлива особливість спельти, ніж витривалість до умов вирощування, – якість її зерна, що також сприяло поверненню цієї культури на сучасний ринок. Зерно спельти використовують переважно для випікання хліба, хоча, як будь-яка зернова культура, вона може використовуватись і для одержання крупи чи борошна (Liubych et al., 2017). Спельта високо цінується своїми харчовими перевагами зерна. Воно має вищу порівнянно з м'якою пшеницею енергетичну цінність, а перетравність білка спельти перевищує 80%. Збалансована за амінокислотним складом, містить більше бета-каротину, ретинолу, на 30–60% більше вітамінів, ніж у м'якій пшениці; має більш розтягнутий клейковину, але менш еластичну, ніж у м'якої пшениці. Борошнистий ендосперм має високий вміст білка (до 25%, для порівняння у м'якої пшениці – 8–10%) і високу в'язкість (Podprjatov & Jashhuk, 2013; Liubych et al., 2017). Спельта багатша, ніж пшениця м'яка, на протеїн, ненасичені жирні кислоти та клітковину, однак вона слабка, тому борошно спельти використовується як домішка під час випікання хліба. Завдяки високій водоутримувальній здатності борошна хліб зі спельти довго не черствіє (Osokina et al., 2018). Клейковина спельти містить менше білкових компонентів, які провокують целиакову хворобу. Вчені зі Швейцарії встановили, що всі продукти зі спельти (хліб, макарони, крупи) сприяють зміцненню імунної системи. Це зумовлено наявністю в зерні особливих розчинних вуглеводів – мікополісахаридів (Podprjatov & Jashhuk, 2013).

Кормове, а також технологічне значення має солома спельти. У деяких публікаціях висвітлюються досягнення розвинених країн у використанні зернових культур для виготовлення екологічно чистих меблів із пресованої соломи.

Використання спельти у селекційній роботі

Інтрогресія генетичного матеріалу від дикорослих родичів до геному м'якої пшениці залишається актуальною, оскільки являє собою природне та невичерпне джерело збагачення генофонду пшениці за генами, що поліпшують її адаптивний потенціал (Iefimenko et al., 2018). У вітчизняній та світовій практиці існує багато прикладів успішного використання різних екотипів спельти в селекції та наступній гібридизації з голозерними пшеницями з метою поліпшення останніх і надання їм стійкості до абіотичних та біотичних стресорів, підвищення якісних показників зерна (Golik et al., 2016). Ще М. І. Вавилов для поліпшення харчових цінностей пшениці м'якої пропонував використовувати у схрещуваннях спельту як партнера (Vavilov, 1935). За структурою каріотипу та розподілом гетерохроматичних сегментів на хромосомах спельта не відрізняється від м'якої пшениці, однак вона характеризується вищим рівнем внутрішньовидового поліморфізму за хромосомними перебудовами (інверсіями та транслокаціями). Відповідно до розподілу гетерохроматичних районів спельта займає проміжне положення між тетраплоїдними та гексаплоїдними видами пшениці (Chekalin et al., 2008).

Починаючи з другої половини XIX сторіччя і донині, спельту використовують як джерело спадкової основи низки господарсько-цінних ознак (Dorofeev et al., 1987; Golik et al., 2016). Схрещування пшениці м'якої зі спельтою дозволяє отримати нові форми пшениці спельти, в яких можна очікувати поліпшення показників якості за рахунок інтрогресії в їх генотип генетичного матеріалу пшениці м'якої (Diordieva & Eshhenko, 2016). У першій половині XX ст. у Центральній Європі вирощували місцеві сорти з Австрії та Німеччини, а також створені простим добором із них: Oberkulmer Rotkorn, Schwabenkorn, Bauerlaender, Ostro, Holstenkorn, Frankenkorn тощо. Серед сортів, створених останнім часом у Сербії, – озими Nirvana, NSS 3/01, NSS 6/01, NSS 1/02; в Італії – ярі B1030, S2013, S2070, P12; у Канаді – озима Heritage та ярі CDC Nexon, CDC Origin, CDC Zorba; у США – Lentz Spelt, Frank. Останніми роками в Росії створений і проходить держсортотипування озимий сорт Алькоран. В Інсти-

туті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва розмножується для передачі на сорто випробування сорт ярої спельти. В Україні створення перших вітчизняних сортів спельти започаткував Ф. М. Парій. Він на базі Всеукраїнського наукового інституту селекції (ВНІС) спільно з Уманським національним університетом садівництва (УНУС) створив сорти озимої спельти з полегшеним вимолотом зерна, врожайністю до 6 т/га, вмістом білка понад 20% і широко адаптованих до природно-кліматичних умов України. До реєстру сортів рослин України занесено два сорти спельти: Зоря України та Європа, ще один – Альберта – зараз проходить державне сорто випробування (Parj et al., 2013). Розглянемо характеристики внесених до реєстру сортів детальніше.



Рис. 3. Колос та зерно *T. spelta* сорту Зоря України



Рис. 4. Колос та зерно *T. spelta* сорту Європа

Зоря України (рис. 3) – перший сорт озимої спельти, занесений до Державного реєстру сортів України. Сорт створено в результаті добору з місцевої популяції стародавнього сорту спельти, що вирощувався в Карпатах. Придатний для органічного землеробства екстенсивного типу, показує високу врожайність за інтенсивної технології вирощування. Як і більшість спельт, має ламкий, видовжений (до 16 см) і нещільний колос із кількістю зерен 48 шт. і масою 1 000 зерен 43,5–45,0 г. Середня врожайність за роки випробування – 5,5 т/га, а потенційна – 6,2 т/га. Сорт пізньостиглий. Невибagliвий до умов вирощування, має підвищену зимостійкість (8,2–8,7 бала), високою посухостійкістю та стійкістю до вилягання та осипання. Висота – 110–120 см. Стійкий до основних хвороб пшениці: бурію іржі, борошнистої роси, фузаріозу. Для сорту притаманне оптимальне поєднання врожайності з високими якість зерна. У зерні цього сорту міститься 18–22% білка та 48–49% сирої клейковини, що більше, ніж у будь-яких голозерних сортів із реєстру сортів України. Натура зерна 650 г/л. Сорт добре показав себе в усіх ґрунтово-кліматичних зонах України, рекомендований

до вирощування у Степу, Лісостепу та Поліссі (The state register of plant ..., 2015).

Європа (рис. 4) – інший сорт озимої спельти, створений ВНІС і УНУС, – результат схрещування спельти із м'якою пшеницею. Від спельти сорт успадкував високу якість зерна, адаптивний потенціал, а від м'якої пшениці – високу урожайність і легкий обмолот зерна. Придатний для органічного землеробства екстенсивного типу. На відміну від Зорі України, сорт Європа має дещо вищу середню (5,8 т/га) та потенційну урожайність (6,5 т/га), хоча поступається першому сорту якісними показниками зерна. У зерні сорту Європа вміст білка складає 18–20%, сирої клейковини 40–45%, сирої протеїну 20–22% із натурою 670 г/л. Як і сорт Зоря України, Європа – високостійкий сорт до основних хвороб і несприятливих чинників навколишнього середовища. Рекомендований для вирощування в усіх природно-кліматичних зонах України (The state register of plant ..., 2015).

Висновки

Визначено два напрями селекційної роботи зі спельтою: відродження її як самостійної культури та використання як джерела господарсько-цінних ознак у селекційних програмах із м'якою пшеницею (Hospodarenko et al., 2016; Liubych et al., 2017). Нині селекцією спельти займаються як вітчизняні, так і зарубіжні вчені. Серед вітчизняних установ найбільшого практичного результату в селекційній роботі зі спельтою досягли Всеукраїнський науковий інститут селекції, Уманський науковий інститут садівництва та Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, в яких уже створені сорти, внесені до Державного реєстру сортів України.

Висока продуктивність *T. aestivum* забезпечується завдяки умовам культивування: тривалому та теплову вегетаційному періоду з м'якою зимою, зрошенню, багатим мінеральними речовинами ґрунтам. В Україні з її досить суворими та різноманітними агрокліматичними умовами вирощування зернових культур – досить складна та ризикована справа. Спельта здатна давати стабільні врожаї без суворого дотримання технології виробництва у багатьох господарствах нашої країни і може бути прекрасною альтернативою пшениці м'якій. Зважаючи на те, що останніми десятиріччями в Україні, як і в інших країнах, зростає попит на спельту як до культури органічного землеробства та джерела «органічної або здорової їжі» («organic / health food»), вирощування цієї культури стає привабливим в умовах ринкової економіки. Тому сподіваємось, що узагальнені матеріали з питань генетики, біології, походження та поширення спельти, її господарсько-цінні ознаки та інші характеристики стануть у нагоді науковцям-практикам, які планують займатись вирощуванням чи впровадженням спельти.

Робота виконана в рамках проекту № III-82-17.454 «Фітогормональна система нових генотипів *Triticum aestivum* L. та її диких попередників за дії екстремальних кліматичних факторів» (2017–2021 рр.), що фінансується Національною академією наук України.

References

- Alvarez, J. B., & Guzmán, C. (2013). Spanish Ancient Wheat: A genetic resource for wheat quality breeding. *Advances in Crop Science and Technology* 1(1), 1–7.
- Andrews, A. C. (1964). The genetic origin of spelt and related wheats. *Der Züchter*, 34, 17–22.
- Armstrong, A. F., Logan, D. C., Tobin, A. K., O'Toole, P., & Atkin, O. K. (2006). Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environment*, 29(5), 940–949.
- Blatter, R. H. E., Jacomet, S., & Schlumbaum, A. (2002). About the origin of European spelt (*Triticum spelta* L.): Allelic differentiation of the HMW Glutenin B1-1 and A1-2 subunit genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2), 360–367.
- Blatter, R. H. E., Jacomet, S., & Schlumbaum, A. (2002). Spelt-specific alleles in HMW glutenin genes from modern and historical European spelt (*Triticum spelta* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2–3), 329–337.

- Boguslavsky, R. L. (2008). O biologicheskikh mekhanizmah domestikatsii pshe-nici [About mechanisms of wheat domestication]. *Vesnik Vavilovskogo Obshchestva Seleksionerov i Genetikov*, 12(4), 680–685 (in Russian).
- Bohuslavskiy, R. L., & Golik, O. V. (2001). Henetychni resursy kulturnoyi dvo-zernyanky *Triticum dicoccum* Schrank (Schuebl.) dlya selektsiyi pshe-nytsi v Ukraini [Genetic resources of the cultivar *Triticum dicoccum* Schrank (Schuebl.) for wheat selection in Ukraine]. *Selektsiya i Nasinnystvo*, 85, 72–83 (in Ukrainian).
- Brown, T. A. (1999). How ancient DNA may help in understanding the origin and spread of agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 354(1379), 89–98.
- Caballero, L., Martin, L. M., & Alvarez, J. B. (2007). Agrobiodiversity of hulled wheats in Asturias (North of Spain). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(2), 267–277.
- Chekalin, M. M., Tishchenko, V. M., & Batashova, M. E. (2008). Selekcija ta genetika okremih kul'tur [The selection and genetics of individual crops]. FOP Govorov, Poltava (in Ukrainian).
- Dedkova, O. S., Badaeva, E. D., Mitrofanova, O. P., Zelenin, A. V., & Pukhal'skiy, V. A. (2004). Analysis of intraspecific divergence of hexaploid wheat *Triticum spelta* L. by C-banding of chromosomes, 40(10), 1111–1126.
- Derzhavnyj rejestr sortiv roslin, prydatnyh dlja poshyrennja v Ukraini na 2015 rik [State register of plant varieties suitable for distribution in Ukraine for 2015]. Kyiv (in Ukrainian).
- Diamond, J. (2009). Zbroja, mikroby i kharch: Vytoky nerivnostey mizh narodamy [The arms, microbes and food: The origins of differences between peoples]. Nika-Tsent, Kyiv (in Ukrainian).
- Dixon, J., Braun, H. J., Kosina, P. P., & Crouch, J. (2009). Wheat facts and futures. CIMMYT, Mexico.
- Dorofeev, V. F., Udachin, R. A., & Semenova, L. V. (1987). Pshenicy mira [Wheat of the world]. Agropromizdat, Leningrad (in Russian).
- Dvorak, J., Akhunov, E. D., Akhunov, A. R., Deal, K. R., & Luo, M. C. (2006). Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1386–1396.
- Dvorak, J., Luo, M. C., & Akhunov, E. D. (2011). N. I. Vavilov's theory of centers of diversity in the light of current understanding of wheat diversity, domestication and evolution. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47, 20–27.
- Fari, J. (2015). Wheat domestication: Key to agricultural revolutions past and future. In: Tuberosa, R., Graner, A., & Frison, E. (Eds.). *Genomics of plant genetic resources*. Springer, Netherlands.
- Fljaksberger, K. A. (1935). Hlebnye zlaki, pshenitsa [The cereals, wheat]. *Kulturnaja flora SSSR. Vol. 1, Gosudarstvennoje Izdatel'stvo Sovhoznoj i Kolhoznoj Literatury, Leningrad* (in Russian).
- Gianibelli, M. C., Echaide, M., Larroque, O. R., Carrillo, J. M., & Dubcovsky, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of Glu-1 loci in Argentinean wheat cultivars. *Euphytica*, 128(1), 61–73.
- Golik, O. V., Tverdokhle, E. V., Pozdnyakov, S. Y., Didenko, R. L., & Boguslavsky, O. V. (2016). Plenchatye vidy pshe-nytsi dlja organicheskogo zemledelija [The fillet types of wheat for organic farming]. *Fundamentalnye i prikladnye issledovaniya v byoorganicheskom selskom hozjajstve Rossii, SNG i ES. Mezhdunarodnaja nauchno-praktycheskaja konferentsiya* (9–12.08.2016). Moscow. 1, 368–378 (in Russian).
- Goncharov, N. P. (2009). Opredelitel' raznovidnostej mjakokoj i tvjordoj pshe-nic [The determinant of varieties of soft and hard wheat]. Izd-vo RAN, Novosibirsk (in Russian).
- Goncharov, N. P., & Kondratenko, E. Y. (2008). Proishozhdenie, domestikatsija i evolucija pshe-nic [The origin, domestication and evolution of wheat]. *Vestnik Vserossijskogo Obshhestva Genetikov i Seleksionerov*, 12, 159–179 (in Russian).
- Hospodarenko, H. M., Kostogryz, P. V., Lyubich, V. V., Pariy, M. F., Polto-retsky, I. A., Polianetsky, I. A., Ryabovol, L. A., Ryabovol, Y. S., & Suhodum, V. G. (2016). Pshenytsya spelta [The wheat of spelt]. Stik Hrup Ukrayina, Kyiv (in Ukrainian).
- Iefimenko, T. S., Antonyuk, M. Z., Martynenko, V. S., Navalihina, A. G., & Temovska, T. K. (2018). Introgression of *Aegilops mutica* genes into common wheat genome. *Cytology and Genetics*, 52(1), 21–30.
- Ivashchenko, O. O., & Ivashchenko, O. O. (2008). Shljahy adaptatsiji zemlerobstva v umovah zmin klimatu [The ways of adapting agriculture in the context of climate change]. *Zbirkik Naukovyih Prats Natsionalnogo Naukovogo Centru «Institut Zemlerobstva UAAN»*, Ekmo, Kyiv (in Ukrainian).
- Kosakisvska, I. V., Babenko, L. M., Vasyuk, V. A., & Voytenko, L. V. (2017). Vplyv gipertermiji ta gruntovoi posuhy na rist, vmist fotosyntetychnyh pigmentiv ta mikrostrukturu epidermisu listka *Triticum spelta* L. [Hyperthermia and ground drought effects on growth, content of photosynthetic pigments and epidermis microstructure in leaf of *Triticum spelta* L.]. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, 42(3), 81–91 (in Ukrainian).
- Kratsch, H. A., & Wise, R. R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*, 23, 337–350.
- Kuckuck, H. (1959). On the findings of *Triticum spelta* L. in Iran and on the arising of *Triticum aestivum*-types through crossing of different *spelta*-types. *Wheat Information Service*, 3, 9–10.
- Kuckuck, H., & Schiemann, E. (1957). Über das Vorkommen von Spelz und Emmer (*Triticum spelta* L. und *T. dicoccum* Scübl.) im Iran. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 38, 383–396.
- Liubych, V. V., Hospodarenko, H. M., & Polto-retsky, S. P. (2017). Quality features of spelt wheat grain. *Lap Lambert Academic Publishing, Saarbrücken*.
- Logan, D. C. (2010). Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochemical Society Transactions*, 38, 789–795.
- Luo, M. C., Yang, Z. L., & Dvorak, J. (2000). The Q locus of Iranian and European spelt wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 602–606.
- Morgun, V. V., & Major, P. S. (2009). Zimo- i morozostijistik' ozimih zlakovyh kul'tur [Winter and frost resistance of winter cereals]. *Fiziologija roslin: Problemy ta perspektivy rozvytku. Vol. 2. Logos, Kyiv* (in Ukrainian).
- Morgun, V. V., Dubrovna, O. V., & Morgun, B. V. (2016). Suchasni biotekhnologiji otrymannia stjikh do stresiv roslin pshe-nyci [Modern biotechnologies for obtaining stress-resistant wheat plants]. *Fiziologija Rastenij i Genetika*, 48(3), 196–214 (in Ukrainian).
- Morgun, V. V., Sichkar, S. M., Pochinok, V. M., Golik, O. V., & Chugunkova, T. V. (2015). Analiz struktury produktyvnosti kolekcijnih zrazkiv malo-poshyrenyh vydiv pshe-nyci [Analysis of the productivity structure of collection samples of rare wheat species]. *Faktyory Eksperymental'noji Evoluciji Organizmiv*, 16, 136–140 (in Ukrainian).
- Nesbitt, M. (2001). Wheat evolution: Integrating archaeological and biological evidence. *Wheat taxonomy: The legacy of John Percival*, 3, Linnean, Special Issue. London Linnean Society. Pp. 37–59.
- Nesbitt, M., & Samuel, D. (1996). From staple crop to extinction? The archaeology and history of hulled wheats. In: Padulosi, S. (Ed.). *Hulled wheats. Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats*. Int. Plant Genet. Resources Institute, Rome.
- Nieto-Taladriz, M. T., Ruiz, M., Martinez, M. C., Vázquez, J. F., & Carrillo, J. M. (1997). Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 1155–1160.
- Osokina, N., Liubych, V., Novak, L., Pushkariova-Bezdl, T., Priss, O., Verkholtantseva, V., Hryhorenko, O., Pusik, V., & Pusik, L. (2018). Elucidation of the mechanism that forms breadmaking properties of the spelt grain. *Eastern European Journal of Enterprise Technologies*, 2, 39–47.
- Parij, F. M., Ljubich, V. V., & Suhodum, O. G. (2013). Otsinka gospodars'ko cinnih vlastyvostej novogo sortu pshe-nyci spelti ozymozi Zoria Ukrainy [The evaluation of economic valuable properties of a new wheat variety spelled winter Zoria Ukraine]. *Nasinnictvo*, 125, 5–15 (in Ukrainian).
- Pashkevich, G. O., & Videjko, M. J. (2006). Rilnyctvo plemen Trypill's'koji kul'tury [The agriculture of tribes of Trypillian culture]. Kyiv (in Ukrainian).
- Podprjatov, G. I., & Jashuk, N. O. (2013). Prydatnist' zerna pshe-nyci spelti ozymozi dlja hlibopekars'kih ta kormovyh cilej [The suitability of wheat grain for winter bread for baking and feed purposes]. *Novitni Agrotehnologiji*, 1(1), 71–79 (in Ukrainian).
- Polto-retsky, S., Hospodarenko, H., Liubych, V., Polto-retska, N., & Demydas, H. (2018). Toward the theory of origin and distribution history of *Triticum spelta* L. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8, 263–268.
- Pukhalskiy, V. A., Bilinskaya, E. N., Obolenkova, G. A., Martynov, S. P., & Dobrotvorskaya, T. V. (2008). New data on the distribution of hybrid necrosis genes in winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Russian Journal of Genetics*, 44(2), 171–179.
- Reynolds, M., Ortiz-Monasterio, J., & McNab, A. (2001). Application of physiology in wheat breeding. D. F. Cimmyt, Mexico.
- Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 429–441.
- Schmitz, K. (2006). Dinkel – ein Getreide mit Zukunft. *Backmittelinstitut Aktuell. Sonderausgabe*, 1–8.
- Skurdina, Z. M. (1992). Pshenica spelta: Sostojanie i perspektivy kul'tury v sovremennyh uslovijah za rubezhom [The wheat spelt: The state and prospects of culture in modern conditions abroad]. *Agropromyshlennoe proizvodstvo: Opyt, problemy i tendencii razvitiya. Zemledelie, rastenievodstvo, kormoproizvodstvo, plodoovoshhnoe hozjajstvo, zashhita rastenij*. Moscow (in Russian).
- Theocharis, A., Clement, C., & Barka, E. A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235, 1091–1105.
- Tsunewaki, K. (1966). Comparative gene analysis of common wheat and its ancestral species. II. Waxiness, growth habit and awnness. *Japanese Journal of Botany*, 19, 175–229.
- Tverdohlib, O. V., & Boguslavskij, R. L. (2012). Vydove riznomanittia pshe-nytsi, naprjamky i perspektivy jogo vykorystannia [The species variety of

- wheat, directions and prospects of its use]. Zbirnik Naukovih Prac' Uman-skogo NUS, 80(1), 37–47 (in Ukrainian).
- Tverdohlib, O. V., Golik, O. V., Ninieva, A. K., & Boguslavs'kij, R. L. (2013). Spelta i polba v organichnomu zemlerobstvi [Spelt and emmer in organic farming]. Posibnyk Ukrajin'skogo Hliboroba, 150–172 (in Ukrainian).
- Van Gestel, K., & Verbelen, J. P. (2002). Giant mitochondria a response to low oxygen pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 53, 1215–1218.
- Vavilov, N. I. (1935). *Nauchnye osnovy selekcii pshenicy* [The scientific foundations of wheat selection]. Moscow (in Russian).
- Vavilov, N. I. (1992). *Origin and geography of cultivated plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vella, G. F., Joss, T. V., & Roberts, T. H. (2012). Chilling-induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant rewarming. *Protoplasma*, 249, 1137–1149.
- Venzhik, Y. V., Titov, A. F., & Talanova, V. V. (2017). Kratkovremennoe oh-lazhdenie prorostkov ili kornej pshenicy vyzyvaet izmenenija v ul'trastruk-ture kletok mezofilla lista [Short-term chilling of wheat seedlings or roots affects the ultrastructure of mesophyll cells]. *Trudy Karel'skogo Nauch-nogo Centra RAN*, 5, 66–78 (in Russian).
- Yan, Y., Hsam, S. L. K., & Yu, J. Z. (2003). HMW and LMW glutenin alleles among putative tetraploid and hexaploid European spelt wheat (*Triticum spelta* L.) progenitors. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1321–1330.
- Yu, J., Cang, J., Zhou, Z., & Liu, L. (2011). Anatomical structure composition between leaves of two winter wheat cultivars with different cold/freezing tolerance under low temperature stress. *Journal of Northeast Agricultural University*, 18, 1–3.
- Zhukovskij, P. M. (1971). *Kul'turnye rastenija i ih sorodichi* [The cultivated plants and their relatives]. Kolos, Leningrad (in Russian).
- Zohary, D. (2004). Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Economic Botany*, 58, 5–10.
- Zohary, D., & Hopf, M. (1993). *Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. Clarendon Press, Oxford.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 258–266
doi: 10.15421/021838

The influence of light regime on the growth data and pigment composition of the plant *Gentiana lutea* cultured *in vitro*

L. R. Hrytsak*, A. I. Herts*, N. V. Nuzhyna**, M. M. Cryk*, V. V. Shevchenko***, N. M. Drobyk*

*Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine

**Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

***Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 10.03.2018

Received in revised form

12.04.2018

Accepted 15.04.2018

Ternopil Volodymyr Hnatiuk
National Pedagogical University,
M. Kryvonosa st., 2,
Ternopil, 46027, Ukraine.
Tel.: +38-067-453-94-19.
E-mail: hrytsak1972@gmail.com

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

Institute of Plant Physiology
and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine,
Vasylykivska st., 31/17,
Kyiv, 03022, Ukraine.
Tel.: +38-067-405-79-24.
E-mail: biochemkiev@ukr.net

Hrytsak, L. R., Herts, A. I., Nuzhyna, N. V., Cryk, M. M., Shevchenko, V. V., & Drobyk, N. M. (2018). The influence of light regime on the growth data and pigment composition of the plant *Gentiana lutea* cultured *in vitro*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 258–266. doi:10.15421/021838

New technologies of reintroduction of plant species presuppose implementing both traditional and biotechnological methods for obtaining certain planting materials. However, plants cultivated *in vitro* exist in specific conditions that lead to changes in their structural and functional state. This explains why it is hard for them to adapt to *ex vitro* and *in situ* conditions. Therefore, there is a need for the development of a multistage method of cultivating *in vitro* plants that would make the influence on their adaptive mechanism in *ex vitro* and *in situ* conditions possible. One of its stages is the optimization of the light regime of cultivation which can both initiate the change of the state of the photosynthetic apparatus of plants and increase their bioproductivity stimulating the work of their protective system. This work studies changes in the morphogenesis, growth data and pigment composition of the rare species of *Gentiana lutea* L. of three populations in the Ukrainian Carpathian (mountains Pozhyzhenska and Sheshul-Pavlyk, plateau Lemska) *in vitro* focusing particularly on the cultivation light regime. The research has proved the inefficiency of using fluorescent lamps of daylight lamps (LD) type as source of illumination because the low intensity of luminous flux in the area of photosynthetically active radiation (PAR), as well as high proportion of wavelength of blue (400–500 nm) and green (500–600 nm) range in the spectrum cause specific reactions of photomorphogenesis, which, despite the high content of pigments in plastids, lead to poor development of root systems, stretching the stems, formation of small leaves with thin leaflet plate, generally low productivity and low adaptive potential of *G. lutea* plants to *ex vitro* and *in situ* conditions. Complement of cold white light lamps to the fluorescent lamps LD type in the ratio of 1 : 1 enables one to increase the intensity of illumination in the field of PAR and raise the fraction of wavelength of red range (600–700 nm). Such light conditions both improve the bio-productivity of *G. lutea* plants of all three populations cultured *in vitro* in comparison to the LD type regimen, reducing the content of chlorophyll *b* and carotenoids in light-harvesting complexes of photosystems and facilitate an increase in the microclonal multiplication factor without using higher concentrations of exogenous growth regulators, which significantly reduces the cost of the process of obtaining planting materials. It was proved that a combination of LD type lamps, cold white light lamps and phytolamps in the ratio 1 : 1 : 0.6 should be used on the final stages of preparation of the planting material of *G. lutea* before transferring it to *ex vitro* and *in situ* conditions. This relates to the fact that the increase of the wavelength of the red range results in the widening of the active surface of the leaves, rise in the content of photosynthetic pigments, and the noticeable growth of the aboveground and underground parts of the plants. The article assumes that the use of such illumination mode will ensure a faster transition of cultured *in vitro* *G. lutea* plants from heterotrophic to autotrophic nutrition, improving their adaptive potential and enabling easier adaptation to non-sterile *ex vitro* and *in situ* conditions.

Keywords: *in vitro* cultivation; morphogenesis; intensity of the flux; photosynthetically active radiation; radiation spectrum

Вплив світлового режиму на ростові параметри та пігментний склад культивованих *in vitro* рослин *Gentiana lutea*

Л. Р. Грицак*, А. І. Герц*, Н. В. Нужина**, М. М. Крук*, В. В. Шевченко***, Н. М. Дробик*

*Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

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

Нові технології реінтродукції видів рослин передбачають застосування не лише традиційних, а і біотехнологічних методів для отримання посадкового матеріалу. Однак культивовані *in vitro* рослини перебувають у специфічних умовах, які викликають зміни їх структурно-

функціонального стану. Це пояснює складність адаптації до умов *ex vitro* та *in situ*. Тому виникає необхідність розроблення багатоступеневої технології культивування *in vitro* рослин, яка б дозволила цілеспрямовано впливати на їх адаптаційний потенціал до умов *ex vitro* та *in situ*. Один з її етапів – оптимізація світлового режиму культивування, здатного не лише ініціювати зміну стану фотосинтетичного апарату рослин, а й підвищувати їх біопродуктивність та стимулювати роботу захисної системи. Вивчено зміну морфогенезу, ростових параметрів та пігментного складу рослин *in vitro* трьох популяцій Українських Карпат (із гір Пожижевська, Шешул-Павлик і полонини Лемська) рідкісного виду *Gentiana lutea* L. залежно від світлового режиму культивування. Встановлено недоцільність використання як джерела освітлення люмінесцентних ламп денного світла, оскільки низька інтенсивність їх світлового потоку в області фотосинтетично активної радіації, висока частка у спектрі хвиль синього (400–500 нм) та зеленого (500–600 нм) діапазонів запускають специфічні реакції фотоморфогенезу, які, незважаючи на високий вміст пігментів у пластидах, спричиняють слабкий розвиток кореневої системи, витягування стебел, утворення дрібних листків із тонкою листовою пластинкою, загальної низької продуктивності та низького адаптаційного потенціалу рослин *G. lutea* до умов *ex vitro* та *in situ*. Корекція світлового режиму ламп денного світла лампами холодного білого світла у співвідношенні 1 : 1 дозволяє підвищити інтенсивність освітлення в області ФАР та збільшити частку хвиль червоного діапазону (600–700 нм). Такі світлові умови не лише поліпшують біопродуктивність культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* усіх трьох популяцій порівняно з режимом ЛД ламп, зменшують вміст хлорофілу *b* і каротиноїдів у світлозбиральних комплексах фотосистем, а і дозволяють збільшити коефіцієнт мікроклонального розмноження без додаткового застосування концентрацій екзогенних регуляторів росту. Це значно здешевлює процес отримання посадкового матеріалу. Комбінацію люмінесцентних ламп денного світла, холодного білого світла та фітоламп у співвідношенні 0,6 : 1 : 1 доцільно використовувати на заключних етапах підготовки посадкового матеріалу *G. lutea* до перенесення в умови *ex vitro* та *in situ*. Це пов'язано з тим, що підвищення частки хвиль червоного діапазону сприяє збільшенню ефективної поверхні листків, вмісту фотосинтетичних пігментів, найбільшому приросту надземної та підземної частин рослин. Зроблено припущення, що використання такого режиму освітлення забезпечить швидший перехід культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* від гетеротрофного до автотрофного живлення, поліпшить їх адаптаційний потенціал і дозволить легше пристосуватися до нестерильних умов *ex vitro* та *in situ*.

Ключові слова: культивування *in vitro*; морфогенез; інтенсивність світлового потоку; фотосинтетично активна радіація; спектри випромінювання

Вступ

Антропогенна трансформація довкілля викликала руйнування структури більшості рослинних угруповань. Це спричинило порушення популяцій багатьох видів, заміну конкурентного типу стратегій на стресотолерантний або рудеральний з ознаками дигресії, зниження показників продуктивності та життєвості рослин і, як наслідок, фрагментацію місць зростання, зменшення кількості особин у популяціях і генетичну ерозію (Kramer & Havens, 2009; Mayurova et al., 2015a). З цієї причини в останні десятиліття інтенсивно розробляються нові інтегровані технології, які поєднують у собі елементи збереження як *in situ*, так і *ex situ* та передбачають реінтродукцію рідкісних та зникаючих видів у природні умови, де вони раніше росли, однак були знищені внаслідок антропогенного навантаження на популяції (Burney & Burney, 2007; Maschinski & Albrecht, 2017). Volis & Blecher (2010) запропонували нову стратегію реінтродукції, під назвою «квазі *in situ*», яка передбачає п'ять важливих етапів від первинного аналізу розподілу рідкісних видів у природі, відбору їх матеріалу, розмноження рослин в умовах, які максимально відповідають їх екологічним потребам, дослідження життєвого циклу видів та визначення комплексу абіотичних та біотичних факторів, що впливають на їх популяційну структуру, до заключного етапу моніторингу успішності реінтродукції цих таксонів у природні умови. При цьому поряд із традиційними методами розмноження та отримання посадкового матеріалу все частіше пропонується використовувати біотехнологічні (Sarasan et al., 2006; Bisht et al., 2017; Keziah & Devi, 2017), зокрема, метод мікроклонального розмноження *in vitro*, який дозволяє швидко отримати рослинний матеріал, необхідний для відтворення та повернення у природу представників багатьох видів рослин (Kiran et al., 2014), у тому числі видів роду *Gentiana* L. (Drobyk et al., 2015), зокрема, його рідкісного високогірного таксона – *Gentiana lutea* L. (Drobyk et al., 2015; Hrytsak et al., 2017).

Рослини, отримані з використанням культури клітин і тканин *in vitro*, здатні швидше проходити етапи онтогенезу, характеризуються високою якістю, високим коефіцієнтом розмноження, інтенсивним приростом біомаси тощо (Belokurova, 2010; Oceania et al., 2015). Однак процеси росту, розвитку та продуктивності культивованих *in vitro* рослин залежать від багатьох факторів, у тому числі від стану їх фотосинтетичного апарату. На думку V. P. Kucheriavyi et al. (2003), це пояснюється тим, що функціональні процеси в рослинному організмі за значимістю розташовуються у такій послідовності: фотосинтез, дихання, біосинтез вторинних речовин, транспірація, ріст і розвиток. Функціонування фотосинтетичної системи, з одного боку, залежить від ендогенної регуляції (гормональної та метаболічної) (Ling & Jarvis,

2015; Sun & Zerges, 2015), а з іншого, від екзогенної, оскільки пігмент-білковий комплекс фотосинтетичних мембран реагує на зміну зовнішніх умов вирощування (Gururani et al., 2015).

Культивування рослин *in vitro* передбачає створення штучного живильного середовища, що за багатьма параметрами відрізняється від природних умов зростання видів (Cruz-Cruz et al., 2013). Відмінності стосуються також інтенсивності та якості освітлення, газового складу повітря культиваційного посуду, рівня відносної вологості, особливостей мінерального живлення тощо. Живильні середовища часто збагачені сахарозою, яка, з одного боку, є джерелом карбону та зумовлює швидший ріст рослин, а, з іншого, пригнічує накопичення хлорофілів, зменшує активність ферментів хлоропластів і процеси фіксації CO₂ (Banas & Gabrys, 2007; Dingenen et al., 2016). Зміна складу та метаболізму пігмент-білкових комплексів фотосинтетичних мембран хлоропластів впливає на загальний рівень метаболізму, рух асимілятів, синтез ростових речовин тощо (Schöttler & Tóth, 2014; Ling & Jarvis, 2015). Тому це позначається не лише на формуванні фотосинтетичної системи, а й на її здатності у подальшому адаптуватися до функціонування в умовах *ex vitro* (Kodun-Ivanova, 2017).

Із літературних джерел відомо, що видова специфіка рослин визначає їх потреби у спектрі світла та його інтенсивності випромінювання у різних ділянках фотосинтетично активної радіації (ФАР) (Ouzounis et al., 2015). Для промислової технології вирощування рослин використовують різні співвідношення хвиль синього (Ес), зеленого (Ез) та червоного (Еч) діапазонів, зокрема: для сціофітів –

Ес : Ез : Еч = 15–20% : 35–45% : 40–45%,

а для геліофітів –

Ес : Ез : Еч = 10–20% : 15–20% : 60–75%.

При цьому мінімально допустимий діапазон інтенсивності ФАР, за якого вегетативні органи ще здатні рости, становить 15–30 Вт/м²; оптимальна для сціофітів інтенсивність світлового потоку 70 Вт/м², а для геліофітів її діапазон коливається в межах 150–220 Вт/м² (Govorov et al., 2011).

Рідкісний вид *G. lutea* – високогірний таксон, природні популяції якого зростають у «холодній зоні» субальпійського поясу Українських Карпат (Kobiv et al., 2017), Піреней та Малої Азії (Rossi et al., 2015). В Українських Карпатах протягом вегетаційного періоду кількість днів із середньодобовою температурою +15 °C не перевищує 60–70, внесок прямої радіації в сумарну – менший 40% (1234 МДж/м²) і навіть влітку через значну хмарність не досягає середнього рівня, характерного для інших територій (Rybchenko & Savchuk, 2015). За таких умов освітлення у спектрі випромінювання збільшується частка синьо-фіолетових хвиль. Це зумовлює розвиток компенсаторних механізмів у високогірних рослин, які змінюють інтенсивність фотосинтетич-

них реакцій, співвідношення світлозбиральних пігментів у реакційних центрах фотосистеми II, перебігу фізіологічних та біохімічних процесів (Kuster et al., 2016; Gong et al., 2018). Тому вибрати оптимальний для культивування в умовах *in vitro* високогірних рослин режим освітлення, який би не порушував процеси їх морфогенезу, дуже складно.

Поетапне зменшення у живильному середовищі MC/2 (середовище MC (Murashige & Skoog, 1962) з половинним вмістом макро- та мікросолей) концентрації NH_4NO_3 , заміна джерела карбону із сахарози на низькомолекулярний маніт, використання як підтримувального субстрату агару у поєднанні з перлітом сприяє ефективнішому вкоріненню мікроклонально розмножених рослин *G. lutea*, поліпшує їх адаптацію до умов *ex vitro* та забезпечує високий (до 51%) відсоток їх приживання у природі на першому році життя (Mayorga et al., 2015b). Отримані в таких умовах біотехнологічні рослини мали морфологічні ознаки, які зазвичай спостерігають за недостатнього освітлення, або за неоптимального спектрального складу світла, що, можливо, стало причиною значного зменшення показників виживання особин (до 15%) упродовж наступних двох років. Тому для успішної реінтродукції *G. lutea* необхідне обґрунтування та розроблення ефективнішої, багатоступінчастої технології адаптації отриманих *in vitro* рослин цього таксона як до умов *ex vitro*, так і до *in situ*. Ця технологія повинна сприяти швидкій структурній перебудові культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* під час перенесення їх в умови *ex vitro* та *in situ*; не допускати порушення функціонування механізмів їх фотозахисту за суттєвого збільшення кількості прямої та сумарної сонячної радіації (до 350–400 Вт/м²) в умовах відкритого ґрунту (Sáez, 2012). Оскільки Viazov & Shalyho (2016) на прикладі *Cucumis sativus* L. показали, що оптимізація світлового режиму не лише здатна викликати модифікацію стану фотосинтезуального апарату рослин, а і стимулювати роботу їх захисної системи, у тому числі антиоксидантної та антипатогенної, одним із підходів для вирішення вищезгаданої проблеми може стати зміна світлового режиму під час вирощування рослин *in vitro*.

Виходячи з вищезазначеного, мета наших досліджень – оцінити залежність ростових параметрів, культивованих *in vitro* рослин *G. lutea*, вмісту та співвідношення в них основних фотосинтезувальних пігментів (хлорофілів *a*, *b*, каротиноїдів) від спектрального складу та інтенсивності світлового потоку в області ФАР штучних джерел освітлення.

Результати цих досліджень послужать основою для оптимізації світлового режиму вирощування *in vitro* рослин *G. lutea* та розроблення схеми підвищення їх адаптаційного потенціалу на першому етапі багатоступінчастої технології стабілізації / реінтродукції його популяцій в Українських Карпатах.

Матеріал і методи досліджень

Досліджували рідкісний лікарський вид – *G. lutea*, який росте у високогір'ї Українських Карпат у межах гіпсометричних рівнів 1300–1500 м н. р. м.

Вихідний насіннєвий матеріал зібрано під час експедицій в Українських Карпатах у популяціях на горах (г.) Пожижевська (хр. Чорногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл., 1 427 м н. р. м., 48°09'19" N, 24°31'94" E), г. Шешул-Павлик (хр. Чорногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл., 1 627 м н. р. м., 48°08'99" N, 24°21'58" E), полонині (п.) Лемська (хр. Чорногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл., 1816 м н. р. м., 48°05'34" N, 24°34'89" E). Збирали насіння *G. lutea* відповідно до дозволу, наданого Міністерством екології і природних ресурсів України №4344/11–09 від 12.05.2009 р. та №7657/19–12 від 25.07.2012 р.

Отримані *in vitro* проростки пересаджували у рідке живильне середовище MC/2, доповнене 0,1–0,2 мг/л кінетину. Мікроклональне розмноження рослин проводили за раніше розробленими методиками (Strashniuk et al., 2004), використовуючи для досліджень апікальні живці з двома парами листків. Для їх росту та вкорінення використовували живильне середовище MC/2, доповнене 0,1 мг/л кінетину.

Мікроклонально розмножені рослини культивували у пробірках під люмінесцентними лампами денного світла (ЛД) фірми «General Electric» (Hungary) за інтенсивності світлового потоку в області ФАР 25 Вт/м², фотоперіод 16/8, температура 19–21 °C. Ці умови культивування розглядали як контроль. Згідно з технічними характеристиками, коефіцієнт корисної дії ЛД ламп в області ФАР коливається в межах 9–12% (або 3,71–4,94 Вт/м²), спектральний склад: 22,3% – 400–450 нм, 19,5% – 450–500 нм, 22,3% – 500–550 нм, 22,3% – 550–600 нм, 11,8% – 600–650 нм, 3,7% – 650–700 нм (Velyt & Guzyk, 2013).

Для експерименту відібрано по 10 вихідних, отриманих шляхом пророщування *in vitro* насінин рослин *G. lutea* з трьох популяцій (г. Пожижевська, г. Шешул-Павлик, п. Лемська), які мікроклонально розмножували з метою отримання потрібної для дослідження кількості рослинного матеріалу. Для з'ясування впливу інтенсивності освітлення та спектрів випромінювання на ростові параметри та вміст пігментів у культивованих *in vitro* рослинах додатково використано люмінесцентні лампи Lumilux 36W 840 холодного білого світла (ЛХБ) та фітолампи Fluora L36W/77 G13 (ФЛ) фірми Osram (Німеччина). Світловий потік ЛХБ згідно з технічними даними – 2 700 люмен, його інтенсивність в області ФАР (7,5 Вт/м²), спектральний склад у діапазоні ФАР: 12,8% – 400–450 нм, 20,1% – 450–500 нм, 12,3% – 500–550 нм, 29,7% – 550–600 нм, 20,2% – 600–650 нм, 4,9% – 650–700 нм (Velyt & Guzyk, 2013)). ФЛ мають такі характеристики: інтенсивність в області ФАР – 35,28 Вт/м² або 28,22 Вт/м² через 5 000 годин, спектральний склад: 15,5% – 400–450 нм, 3,7% – 450–500 нм, 7,4% – 500–550 нм, 9,6% – 550–600 нм, 59,9% – 600–650 нм, 3,9% – 650–700 нм (Velyt & Guzyk, 2013). Застосування цих ламп дозволило підвищити інтенсивність світлового потоку з 25 до 135 Вт/м² і здійснити два варіанти корекції спектрального складу (СК) контролю:

– перший варіант: інтенсивність світлового потоку в області ФАР 44 Вт/м², співвідношення ламп ЛД до ЛХБ становить 1 : 1, сумарний спектральний склад:

$$\text{Ес} : \text{Ез} : \text{Еч} = 37,35\% : 42,35\% : 20,3\%;$$

– другий варіант: інтенсивність світлового потоку в області ФАР – 135 Вт/м², співвідношення ламп ЛД до ЛХБ та ФЛ становить 0,6 : 1 : 1, спектральний склад:

$$\text{Ес} : \text{Ез} : \text{Еч} = 29,5\% : 32,42\% : 38,01\%.$$

У кожному із трьох варіантів (контроль та два варіанти корекції) використовували по 30 рослин – по 10 із кожної з трьох популяцій. Інтенсивність світлового потоку в області ФАР розраховували згідно з «Нормами технологічного проектування теплиць і тепличних комбінатів для вирощування овочів та розсади НТП10-95», за формулою:

$$N = \frac{S \cdot W}{W_{\text{л}}},$$

де *N* – кількість ламп (шт.); *S* – площа приміщення (м²); *W* – питома потужність освітленості (Вт/м²); *W_л* – питома потужність лампи в області ФАР (Вт) (Velyt & Guzyk, 2013).

Ростові параметри аналізували через 90 діб культивування. Підраховували кількість листків (NL), визначали висоту стебла (LS), довжину міжвузлів (LIN), сиру масу листків (WL), кореня (WR), надземної частини (WS) та рослин у цілому (WP); площу усієї листової поверхні (A) та площу одного листка (AIL) вимірювали за допомогою програми Petiole (<https://petiole.com>). Аналіз цих параметрів дозволив визначити ефективність утворення рослинами листової поверхні та показники розвитку фотосинтетичного апарату (Bidl, 1989): відношення площі листків до біомаси рослин (LAR), фотосинтетичне зусилля (LWR), площу одиниці маси листка (SLA), а також відношення біомаси стебла до біомаси кореня (LSR).

Пігменти з листків екстрагували диметилсульфоксидом (ДМСО, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$) за методикою Mezherits (2009). Визначення вмісту хлорофілів *a* (Chl *a*), *b* (Chl *b*) та суми каротиноїдів (Carot) проводили на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвиль 663, 645 і 440,5 нм, відповідно. Концентрацію хлорофілів визначали за формулами Макінні – Арнона, а суму каротиноїдів – Веттштейна

(Mezhuts, 2009). Критерій достовірної різниці групових середніх Тьюкі (Honestly Significant Difference) розраховано за допомогою програмного забезпечення Prism 6 та R-studio. Для узагальнення даних та виявлення взаємозв'язків між кількісними змінними використано метод головних компонент (Principal component analysis). Критичний рівень значимості для перевірки статистичних гіпотез у дослідженні приймали рівним 0,05.

Результати

Аналіз морфометричних і алометричних параметрів культивованих *in vitro* рослин виду *G. lutea*, які репрезентують генофонд його двох природних (г. Шешул-Павлик, п. Лемська) та однієї інтродукованої популяції (г. Пожижевська) показав, що інтенсивність їх ростових процесів і розвиток значною мірою залежать від спектрального складу світла та інтенсивності його потоку в ділянці ФАР.

У природному середовищі нижні листки *G. lutea* утворюють розетку, а верхні – стеблообгортні. Культивування *in vitro* особин цього виду в умовах контролю за низької інтенсивності освітлення та збільшеної у спектрі частки хвиль Ес та Ез діапазонів викликає зміни їх габітусу. Це проявляється у не характерному для інтактних рослин видовженні міжвузлів, значному витягуванні стебел і утворенні дрібних довгочерешкових листків (рис. 1в). Низька також біопродуктивність рослин контрольної групи всіх досліджених популяцій, про що свідчать показники фітомаси їх надземних органів і площі листової поверхні, які у 2,9–3,7 раза (у випадку г. Пожижевська), 2,0–3,4 (п. Лемська), 2,5–3,7 раза (г. Шешул-Павлик) нижча порівняно з першим варіантом СК і у 2,9–5,1 раза (г. Пожижевська), 2,7–5,7 (п. Лемська), 3,1–5,5 раза (г. Шешул-Павлик) – із другим варіантом досліді (табл. 1).

У рослин контролю найгірше, порівняно з обома варіантами СК, розвивається коренева система та утворюється тонша на 18–52% листкова пластинка. Низькі й величини фотосинтетичного зусилля, а також показники, що характеризують потужність роз-

витку листової поверхні (LAR). Відмінність контрольних рослин достовірно не значна лише від параметра SLA рослин першого варіанта СК (у випадку г. Пожижевська та г. Шешул-Павлик); за іншими параметрами рослини контрольної групи статистично достовірно ($P < 0,001$) відрізняються від обох варіантів досліді.

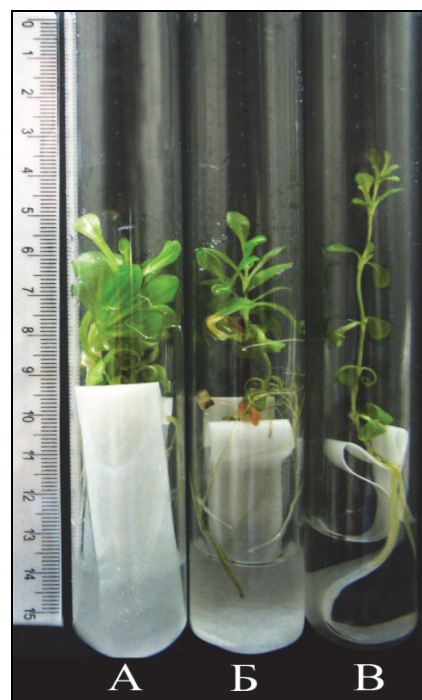


Рис. 1. Зміна габітусу культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* популяції г. Шешул-Павлик за різних світлових режимів їх вирощування: А – другий варіант світлової корекції; Б – перший варіант світлової корекції; В – контроль

Таблиця 1

Зміна морфометричних і алометричних параметрів культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* з різних популяцій залежно від джерела світла та інтенсивності світлового потоку (Вт/м^2) в області ФАР, ($n = 10$, $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Варіант	NL, шт	LS, см	LIN, см	WR, мг	WS, мг	WP, мг	WL, мг	A, cm^2	ALI, cm^2	LSR, мг/мг	LAR, $\text{cm}^2/\text{мг}$	SLA, $\text{cm}^2/\text{мг}$	LWR, мг/мг
Рослини з г. Пожижевська													
Контроль	$10,6 \pm 1,9^b$	$9,1 \pm 2,1^a$	$1,7 \pm 0,1^a$	$12,1 \pm 1,3^c$	$87,4 \pm 10,8^b$	$99,4 \pm 12,1^b$	$31,8 \pm 4,8^c$	$2,7 \pm 0,4^c$	$0,26 \pm 0,03^c$	$7,24 \pm 0,18^a$	$0,026 \pm 0,001^c$	$0,085 \pm 0,002^a$	$0,32 \pm 0,01^c$
Варіант 1	$12,4 \pm 1,6^a$	$5,6 \pm 0,7^b$	$0,9 \pm 0,1^b$	$45,3 \pm 7,3^b$	$253,7 \pm 41,3^a$	$299,0 \pm 48,6^a$	$111,3 \pm 5,9^b$	$8,0 \pm 1,2^b$	$0,64 \pm 0,06^b$	$5,59 \pm 0,11^b$	$0,026 \pm 0,001^b$	$0,072 \pm 0,002^b$	$0,34 \pm 0,01^b$
Варіант 2	$10,3 \pm 1,3^b$	$2,7 \pm 0,4^c$	$0,6 \pm 0,1^c$	$54,5 \pm 9,6^a$	$255,2 \pm 16,7^a$	$301,9 \pm 35,4^a$	$160,9 \pm 18,3^a$	$9,1 \pm 0,7^a$	$0,89 \pm 0,07^a$	$4,62 \pm 0,37^c$	$0,029 \pm 0,002^a$	$0,056 \pm 0,003^c$	$0,53 \pm 0,02^a$
Рослини з п. Лемська													
Контроль	$10,7 \pm 1,7^b$	$9,4 \pm 1,7^a$	$1,8 \pm 0,1^a$	$11,3 \pm 0,8^c$	$84,5 \pm 4,8^b$	$95,8 \pm 5,6^b$	$29,2 \pm 2,3^c$	$2,6 \pm 0,2^c$	$0,24 \pm 0,02^c$	$7,48 \pm 0,18^a$	$0,024 \pm 0,001^c$	$0,087 \pm 0,002^a$	$0,30 \pm 0,01^c$
Варіант 1	$12,8 \pm 1,5^a$	$4,5 \pm 0,5^b$	$0,6 \pm 0,1^b$	$39,1 \pm 5,1^b$	$222,0 \pm 35,9^a$	$261,1 \pm 21,6^a$	$85,9 \pm 10,7^b$	$6,4 \pm 0,5^b$	$0,48 \pm 0,05^b$	$5,68 \pm 0,10^b$	$0,026 \pm 0,001^b$	$0,071 \pm 0,010^b$	$0,33 \pm 0,02^b$
Варіант 2	$10,5 \pm 0,9^b$	$2,5 \pm 0,2^c$	$0,5 \pm 0,1^c$	$64,5 \pm 6,7^a$	$224,2 \pm 21,8^a$	$287,7 \pm 27,9^a$	$145,3 \pm 13,5^a$	$9,7 \pm 0,6^a$	$0,9 \pm 0,06^a$	$3,48 \pm 0,13^c$	$0,033 \pm 0,001^a$	$0,065 \pm 0,001^c$	$0,50 \pm 0,01^a$
Рослини з г. Шешул-Павлик													
Контроль	$10,4 \pm 1,5^a$	$9,8 \pm 1,4^a$	$1,9 \pm 0,1^a$	$10,2 \pm 1,7^c$	$77,6 \pm 12,9^b$	$88,5 \pm 13,6^b$	$24,4 \pm 3,2^c$	$2,3 \pm 0,1^c$	$0,22 \pm 0,05^c$	$7,62 \pm 0,26^a$	$0,025 \pm 0,002^a$	$0,092 \pm 0,001^a$	$0,28 \pm 0,02^c$
Варіант 1	$12,2 \pm 1,8^a$	$6,2 \pm 0,8^b$	$1,0 \pm 0,1^b$	$37,9 \pm 3,1^b$	$220,6 \pm 30,6^a$	$258,5 \pm 35,8^a$	$80,9 \pm 12,5^b$	$6,9 \pm 0,2^b$	$0,56 \pm 0,03^b$	$5,81 \pm 0,10^b$	$0,026 \pm 0,001^b$	$0,083 \pm 0,001^b$	$0,31 \pm 0,01^b$
Варіант 2	$11,6 \pm 1,7^a$	$3,7 \pm 0,5^c$	$0,6 \pm 0,1^c$	$44,7 \pm 5,8^a$	$236,5 \pm 37,9^a$	$281,2 \pm 38,6^a$	$134,7 \pm 24,1^a$	$8,6 \pm 0,4^a$	$0,72 \pm 0,08^a$	$5,32 \pm 0,26^c$	$0,029 \pm 0,001^a$	$0,062 \pm 0,002^c$	$0,48 \pm 0,02^a$

Примітки: ^{a, b, c} – однакові латинські букви означають статистично незначущі розбіжності середніх у ряді за критерієм Тьюкі (HSD); NL – кількість листків, LS – висота стебла, LIN – довжина міжвузля, WL – сира маса листків, WR – сира маса кореня, WS – сира маса надземної частини, WP – загальна сира маса рослин, A – площа листової поверхні, ALI – площа одного листка, LSR – відношення біомаси надземної частини до біомаси кореня, LAR – відношення площі листків до біомаси рослин, LWR – фотосинтетичне зусилля, SLA – площа одиниці маси листка.

Застосування ламп ЛХБ у першому варіанті СК дозволило підвищити інтенсивність світлового потоку до $44,0 \text{ Вт/м}^2$, а також скоригувати спектральний склад світла, зменшивши у ньому частку хвиль синього діапазону та збільшивши частку хвиль червоного спектра порівняно з контролем. При цьому частка хвиль зеленого спектра (500–600 нм) залишилася майже незмінною. Аналіз габітусу та ростових процесів показав, що такі світлові умови культивування сприятливіші для *G. lutea*. Висота стебел особин усіх досліджених популяцій в 1,6 раза (г. Пожижевська, г. Шешул-Павлик) та 2,1 раза (у випадку п. Лемська) зменшується порівняно з контролем (рис. 1б). Водночас поліпшуються параметри, що визначають продуктивність рослин: фітомаса кореневої системи та надземної частини, площа листової поверхні та відносна площі, що припадає на один листок. Слід за-

значити, що вибірка рослин усіх популяцій першого варіанта СК за показниками загальної сирової маси та маси надземної частини статистично достовірно не відрізняється від другого варіанта СК. Цей світловий режим стимулює утворення більшої кількості листків у розрахунку на одну рослину та активує розвиток пазушних меристем. Однак за результатами аналізу даних алометричних параметрів ефективність утворення листової поверхні ще доволі низька, що позначається на фотосинтетичному зусиллі рослин (табл. 1). Корекція світлового фону контрольно лампами ЛХБ та ФЛ (другий варіант), як і у випадку першого варіанта СК, дозволила підвищити освітленість до 3000 лк , значно збільшити інтенсивність світлового потоку ($135,4 \text{ Вт/м}^2$) та оптимізувати спектральний склад. Зменшилася в 1,4 раза частка хвиль синього та в 1,3 раза – зеленого діапазонів, а червоного – збільшилася у

2,5 раза. Аналіз морфометричних і алометричних показників показав, що у *G. lutea* в умовах другого варіанта СК порівняно з контролем більше ніж утричі скорочується довжина міжвузлів; в 1,6–1,7 раза зростають величини фотосинтетичного зусилля, у 5,5–9,9 раза збільшується маса листків, у 3,3–3,8 раза – загальна площа листової поверхні (рис. 1а). Значно краще розвивається коренева система, про що свідчать показники відношення біомаси пагона до біомаси кореневої системи (LSR).

Серед багатьох факторів, що впливають на інтенсивність фотосинтезу, і, як наслідок, на біосинтетичні процеси та продуктивність рослин, найважливіша роль у пігментній системі. Як показують наші дослідження, пігментний комплекс пластид культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* динамічно реагує на зміну режиму освітлення (табл. 2).

Таблиця 2

Зміна вмісту та співвідношення пігментів у культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* з різних популяцій залежно від джерела світла та інтенсивності світлового потоку (Вт/м^2) в області ФАР ($n=10$, $x \pm \text{SD}$)

Умови досліджу	Chl <i>a</i> , мг/100 г сирової маси	Chl <i>b</i> , мг/100 г сирової маси	Carot, мг/100 г сирової маси	Chl <i>a</i> / <i>b</i>	Chl <i>a</i> + <i>b</i> / <i>car</i>	Chl <i>a</i> / <i>car</i>	Chl <i>b</i> / <i>car</i>
Рослини з г. Пожижевська							
Контроль	109,5 ± 16,8 ^a	29,0 ± 2,4 ^a	44,1 ± 7,4 ^a	3,78 ± 0,05 ^b	3,12 ± 0,14 ^b	2,49 ± 0,08 ^b	0,65 ± 0,03 ^b
Варіант 1	80,5 ± 15,0 ^b	21,5 ± 3,0 ^b	32,4 ± 3,5 ^b	3,76 ± 0,14 ^b	3,13 ± 0,14 ^b	2,48 ± 0,11 ^b	0,66 ± 0,03 ^b
Варіант 2	103,7 ± 16,6 ^a	22,5 ± 3,1 ^b	38,3 ± 3,1 ^{ab}	4,59 ± 0,08 ^a	3,31 ± 0,13 ^a	2,71 ± 0,13 ^a	0,59 ± 0,04 ^a
Рослини з п. Лемська							
Контроль	102,5 ± 7,8 ^a	26,1 ± 2,0 ^a	36,3 ± 2,4 ^a	3,87 ± 0,14 ^b	3,48 ± 0,12 ^a	2,82 ± 0,07 ^a	0,72 ± 0,02 ^a
Варіант 1	86,3 ± 7,2 ^b	22,2 ± 1,9 ^b	35,4 ± 2,7 ^a	3,90 ± 0,06 ^b	3,06 ± 0,09 ^b	2,43 ± 0,07 ^c	0,63 ± 0,02 ^b
Варіант 2	100,8 ± 9,1 ^a	21,0 ± 2,0 ^b	38,1 ± 3,6 ^a	4,80 ± 0,15 ^a	3,20 ± 0,09 ^b	2,65 ± 0,17 ^b	0,56 ± 0,04 ^c
Рослини з г. Шешул-Павлик							
Контроль	111,3 ± 14,04 ^a	26,76 ± 3,9 ^a	35,8 ± 4,7 ^b	4,18 ± 0,22 ^a	3,90 ± 0,18 ^a	3,14 ± 0,17 ^a	0,75 ± 0,03 ^a
Варіант 1	74,0 ± 9,63 ^b	20,35 ± 3,5 ^b	27,6 ± 3,7 ^c	3,72 ± 0,10 ^b	3,40 ± 0,11 ^b	2,68 ± 0,9 ^b	0,72 ± 0,03 ^b
Варіант 2	100,43 ± 4,97 ^a	23,66 ± 1,0 ^{ab}	36,8 ± 3,2 ^a	4,30 ± 0,21 ^a	3,41 ± 0,16 ^b	2,77 ± 0,13 ^b	0,65 ± 0,26 ^c

Примітки: ^{a, b, c} – однакові латинські букви означають статистично незначущі розбіжності середніх у ряді за критерієм Тьюкі (HSD); Chl *a* – хлорофіл *a*, Chl *b* – хлорофіл *b*, Carot – каротиноїди, Chl *a* / *b* – відношення хлорофілу *a* до хлорофілу *b*, Chl *a* + *b* / *car* – відношення суми хлорофілів (*a* + *b*) до каротиноїдів, Chl *a* / *car* – відношення хлорофілу *a* до каротиноїдів, Chl *b* / *car* – відношення хлорофілу *b* до каротиноїдів.

Міжпопуляційне варіювання показників відношення суми (*a* + *b*) хлорофілів до каротиноїдів, а також хлорофілу *a* до каротиноїдів, не дозволяє чітко з'ясувати ступінь їх залежності від світлових умов культивування. Проте, як видно з таблиці 2, відношення частки хлорофілу *b* до каротиноїдів у пігментному комплексі рослин найвище у контролі. У міру зростання інтенсивності світлового потоку та частки хвиль Еч діапазону у спектрі випромінювання відносний вміст хлорофілу *b* у листках зменшується, що свідчить про зміну співвідношення пігмент-білкових комплексів, яка може виявитись оптимальною, оскільки наближена до природної популяції. Необхідно зазначити, що, на відміну від ростових параметрів, ступінь статистично значимої міжгрупової достовірної різниці у випадку пігментного складу дещо менший, особливо у випадку вибірок рослин із г. Пожижевська і п. Лемська. Для рослин г. Шешул-Павлик ступінь статистично достовірної різниці вмісту пігментів та їх співвідношення коливається в межах від $P < 0,001$ до $P < 0,05$.

Вміст пігментів у фотосинтетичному апараті, ростові процеси детермінуються генотипом рослин. Є певні міжпопуляційні відмінності показників досліджених параметрів як у рослин контрольної групи, так і обох варіантів СК (табл. 1, 2). Однак виявлені тенденції щодо зміни габітусу, морфометричних, алометричних параметрів та пігментного складу залежно від світлового режиму культивування *in vitro* характерні для вибірок рослин усіх трьох досліджених популяцій. Можна припустити, що це загальна видоспецифічна реакція *G. lutea* на зміну інтенсивності випромінювання та його спектрального складу.

Для встановлення кореляційних зв'язків між ростовими процесами, пігментним складом *G. lutea* та світловими режимами їх вирощування *in vitro* за значної дисперсії отриманих показників застосовано метод головних компонент. Це дозволило зменшити розмірність отриманих даних і сформувати їх у спеціальні факторіальні комплекси – головні компоненти (PC 1, PC 2), що більш інформативно відображають характер впливу світлового

Найвищі показники хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів характерні для рослин контрольної групи (табл. 2). Зміна спектрального складу та інтенсивності освітлення у першому варіанті СК знижує концентрації пігментів в 1,2–1,5 раза як за відношенням до контрольної групи, так і у другому варіанті СК. Ще більших змін зазнає пігментний комплекс рослин другого варіанта СК: вміст хлорофілу *a* і каротиноїдів у даному випадку достовірно значимо не відрізняється від контролю, однак концентрація хлорофілу *b* нижча. Це спричиняє збільшення величини відношення хлорофіл *a* / хлорофіл *b* у цьому варіанті СК порівняно з контролем і першим варіантом СК. Водночас, за показниками відношень хлорофіл *a* / хлорофіл *b* та хлорофіл *b* / каротиноїди рослини другого варіанта СК найбільше наближені до *G. lutea* із природних місць росту (неопубліковані дані).

режиму на перебіг морфофізіологічних процесів у культивованих *in vitro* рослин *G. lutea*. Як видно з рисунка 2, змінні (Dim 1 і Dim 2), що корелюють з відповідними компонентами PC 1 і PC 2 враховують 73,5% дисперсії вимірюваних показників у контрольній групі культивованих *in vitro* *G. lutea* та двох варіантах СК досліджених популяцій. При цьому Dim 1 вичерпує 57,7%, а Dim 2 – 15,8% сумарної дисперсії.

Основний внесок у визначення стану культивованих рослин за Dim 1 дають показники, які характеризують приріст біомаси та збільшення площі листової поверхні рослин, а також співвідношення пігментів у реакційних центрах і світлозбиральних комплексах фотосистем. Змінна Dim 2 об'єднує параметри, що відображають залежність кількості листків та вмісту хлорофілу *a*, хлорофілу *b*, каротиноїдів від світлових умов культивування.

Характер розташування параметрів у просторі головних компонент дозволив виділити три групи показників (кластерів), що детерміновані певним світловим режимом і відповідають контролю (А), першого варіанта СК (Б), другого варіанта СК (В) (рис. 2). При цьому в межах групи усі параметри між собою корелюють позитивно; між діаметрально протилежно розташованими параметрами спостерігається негативна кореляція.

Як видно з рисунка 2, кластер А включає параметри L, LIN, LSR, SLA, відношення хлорофіл *b* / каротиноїди. Це підтверджує той факт, що умови контролю найбільше впливають на зміну довжини (L, LIN) осевих органів. Тому з цими параметрами тісно пов'язаний показник LSR, який визначає відношення біомаси надземної частини до біомаси кореня. Сильним стохастичним зв'язком умови контролю пов'язані з показниками товщини листової пластинки (SLA) та відношенням хлорофілу *b* до каротиноїдів (*b* / *car*) у світлозбиральному комплексі ФС II. Приналежність параметра відношення хлорофіл *b* / каротиноїди до області кластера контролю дозволяє чіткіше інтерпретувати дані таблиці 2 та підтвердити сильний стохастичний зв'язок цієї величини лише з режимом освітлення контролю.

Застосування методу головних компонент дозволило підтвердити інші наші попередні висновки: що світлові умови першого варіанта СК сприяють збільшенню кількості листків у рослині; що між групою величин LWR, SLA, відношення хлорофілу *a* / хлорофілу *b* та режимом першого варіанта СК відсутній кореляційний зв'язок. Незначне перекривання областей кластерів Б і В означає, що на показники продуктивності рослин (WP, WS, WR, WL, A, ALI) світловий режим першого варіанта менше впливає, ніж ми це припускали під час аналізу усереднених даних таблиці 1.

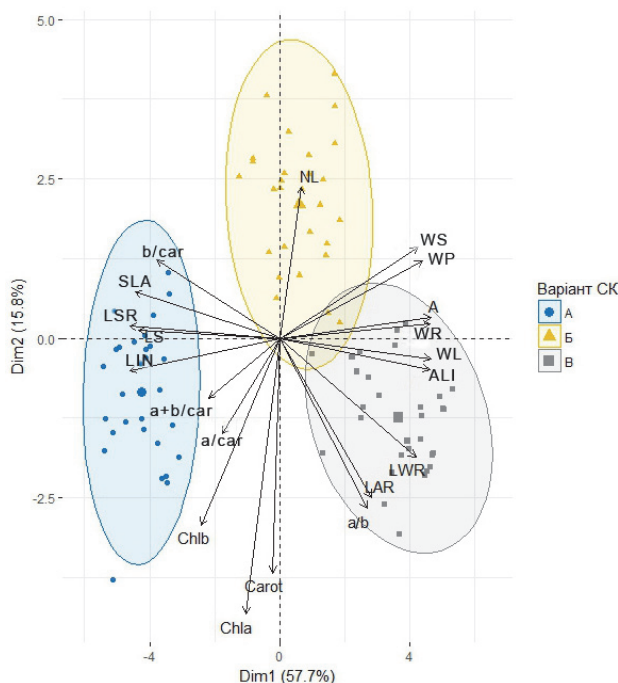


Рис. 2. Зв'язки морфометричних, алометричних параметрів та пігментного комплексу культивованих *in vitro* рослин із популяцій (г. Пожижевська, г. Шешул-Павлик, п. Лемська)

G. lutea зі світловими режимами їх вирощування:

A – контроль; B – перший варіант СК; V – другий варіант СК: позначення – див. табл. 1, 2

Тісне ж групування величин WP, WS, WR, WL, A, ALI, LWR, SLA, хлорофілу *a* / хлорофілу *b* у межах області кластера В вказує як на позитивну кореляцію між ними, так і на сильний стохастичний зв'язок між цими параметрами та світловим режимом цього варіанта.

Вище ми зазначали складність виявлення набору чинників, що впливають на пігментну систему пластид культивованих *in vitro* *G. lutea*. Застосування методу головних компонент дозволило точніше з'ясувати характер залежності показників як одного від іншого, так і від світлових умов. Особливості розташування у двовимірній площині величин, що стосуються вмісту пігментів (хлорофілу *a*, *b*, каротиноїдів), а також відношень суми хлорофілів (*a* + *b*) / каротиноїдів (*a* + *b* / car) і хлорофілу *a* / каротиноїдів (*a* / car) вказують на існування слабкого позитивного кореляційного зв'язку між ними. Вектор же їх тяжіння до проекції головних компонент PC 1 і PC 2 визначає ступінь кореляційного зв'язку з режимами освітлення контрольної та дослідних груп рослин. Тому розташування показників хлорофілу *a* і каротиноїдів в області нульової позначки головної компоненти PC 1 означає, що на їх величини майже однаково впливають як умови контролю, так і другого варіанта СК. Водночас відхилення їх векторів (Chl *a*, Carot) у бік контрольної групи вказує на дещо більшу домінуючу роль саме цього світлового режиму. Характер направленості векторів хлорофілу *a* та каротиноїдів відносно області кластера першого варіанта означає, що між ними існує негативний кореляційний зв'язок.

Вектор направленості величини хлорофілу *b* (Chl *b*) також вказує на її більший стохастичний зв'язок зі світловим режимом

контрольної групи, що зумовлено специфікою роботи світло-збирального комплексу ФС II за таких умов. Застосування методу головних компонент дозволило виявити кореляційні зв'язки з режимами освітлення величин, що характеризують відношення як суми хлорофілів (*a* + *b*) до каротиноїдів, так і хлорофілу *a* до каротиноїдів. Як видно з рисунка 2, напрям векторів цих величин свідчить про їх сильніший кореляційний зв'язок із контрольною групою, ніж із дослідними варіантами СК.

Обговорення

Аналіз отриманих експериментальних даних дозволяє припустити, що інтенсивність ростових процесів і морфогенез культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* за різних умов освітлення контролюються складними механізмами, які залежать не лише від особливості функціонування фотосинтетичної системи. Це пов'язано з тим, що світло здатне переключати механізми ендогенної регуляції та реалізувати відповідні програми морфогенезу. Його фізіологічне значення для рослин не обмежується лише фотосинтезом, а поширюється на численні системи контролю за ростом і розвитком організму (Kamachuk et al., 1990; Kaiserli & Chory, 2016). При цьому доведено, що ріст рослин визначає одночасне поєднання трьох параметрів: якості світла, його інтенсивності та тривалості дії (Folta & Childers, 2008).

Сучасними дослідженнями доведено, що до системи фоторегуляції морфогенезу входять рецептори та трансдуктори світлового сигналу: фітохроми, які поглинають хвилі Еч і дальнього червоного діапазонів; криптохроми, фототропіни та нефотосинтетичні каротини – ультрафіолет (УФ А, УФ В) та Ес; суперхром (неохром) – область Ес і Еч (Wang & Deng, 2002).

Нині немає єдиного погляду щодо механізмів трансляції світлового сигналу в клітині. Однак схиляються до думки, що поглинене сенсорними пігментами світло не лише спричинює синтез макроергічних хімічних сполук через реалізацію фотосинтетичної функції, а також утворює сигнал, здатний передаватися по компонентах цитозолу та геному, активізуючи цитозольні компоненти, експресію генів COP, DET, FUS, продукти яких беруть участь у регуляції процесів морфогенезу (Franklin et al., 2005). При цьому відбувається зміна ендогенного гормонального балансу рослини, який контролює як процеси росту та розвитку, так і роботу фотосинтетичного апарату. Припускають, що фоторегуляторні системи, які відповідають за фотосинтез і морфогенез, можуть мати як спільні фоторецептори, так і специфічні для кожної з них (Lau & Deng, 2010).

Складність взаємодії багаторівневих регуляторних механізмів, що інтегрують процеси росту та фотосинтезу не дозволяє на даний час з'ясувати всі кореляційні зв'язки між структурно-функціональними характеристиками фотосинтетичного апарату та продуктивністю рослин (Kabashnikova, 2011). Однак припускають, що механізми, які відповідають за ріст рослин, являють собою регуляторні системи першого порядку, а механізми, що визначають стан пігментної системи та інтенсивність перебігу фотосинтетичних реакцій, є регуляторними системами другого порядку (Nemoikyna, 2003; Zavoiev et al., 2011).

Застосування такого підходу дозволяє пояснити існуючу невідповідність між високим вмістом пігментів хлорофілу *a*, хлорофілу *b* і каротиноїдів у фотосинтетичному апараті та загальною низькою продуктивністю рослин *G. lutea* контрольної групи. За низьких значень інтенсивності освітлення рослини фактично не здатні поглинати хвилі Еч діапазону (Dong et al., 2014). Низька регуляторних фітохромів поглинає світло у ближньому та дальньому червоному діапазонах і регулює синтез вуглеводів у процесі фотосинтезу, тому перебіг морфофізіологічних реакцій може визначати низька інтенсивність світлового потоку Еч і висока частка хвиль Ес і Ез діапазонів (із перевагою зеленого світла у спектрі ЛД ламп).

Збільшення у спектрі частки синього діапазону змінює механізми регуляції функціонування так званої «системи високої енергії» (Margitay, 2006) та модифікації пігментного складу фо-

тосинтетичного апарату. Це супроводжується зростанням концентрацій хлорофілу *a*, хлорофілу *b* і каротиноїдів у рослин контролю, оскільки у хлорофілу *a* поглинання в синьому діапазоні в 1,3 рази більше, ніж у червоному, а у хлорофілу *b* – утричі (Margitay, 2006). Каротиноїди теж мають максимуми поглинання в Ес діапазоні. За нижчої інтенсивності освітлення вони виконують функцію додаткових світлозбиральних пігментів і їх частка збільшується у світлозбиральному комплексі ФС II (Navaux et al., 2000; Bailey et al., 2004; Syvash et al., 2016). Проте ефективність передачі енергії від каротиноїдів до хлорофілів залежить як від виду каротиноїдів, так і від їх положення у фотосинтетичному апараті та не перевищує 35–90%, тоді як ефективність передачі енергії в антенних комплексах хлорофілу становить 100% (Caffarri et al., 2007).

Такі зміни структури у світлозбиральному комплексі ФС II *G. lutea* контрольної групи мали б компенсувати для них нестачу світла та, як результат, поліпшити продуктивність. Проте різні спектри світла та різна його інтенсивність можуть здійснювати протилежний вплив на один і той самий фізіологічний процес (Dou et al., 2017). За даними багатьох досліджень (Vicente & Garcia, 1981; Tanada, 1984; Golovatskaya, 2005; Folt & Maruhnich, 2007), трансдукція світлових сигналів Ез і Ес діапазонів здійснюється не лише фотосинтетичними пігментами, фітохромами та криптохромами, а й додатковими фоторецепторами, що працюють на нижчих або вищих енергіях випромінювання. Це активізує сітку вторинних посередників та гормональну систему регуляції рослини й може зменшити концентрацію ендогенної індолілової кислоти (ІОК) і збільшити вміст деяких форм вільних гіберелінів (Nemoykina & Kamachuk, 2002). Згідно з дослідженнями Voskresenskaya (1987), Ес спектр стимулює білковий обмін, а Еч – вуглеводний. Тому сумація ефектів впливу хвиль Ес та Ез діапазонів у спектрі контролю, ймовірно, здатна змінити перебіг метаболічних процесів та природний гормональний баланс рослин контрольної групи *G. lutea* всіх досліджених популяцій. Це запускає специфічні реакції фотоморфогенезу, які спричиняють слабкий розвиток кореневої системи, витягування стебел, утворення дрібних листків із тонкою листовою пластинкою та загальну низьку продуктивність *G. lutea* в контролі. Подібні результати отримані Corel & Bugbee (2013) під час вивчення змін ростових параметрів рослин *Raphanus sativus* за впливу низької інтенсивності світла з високою часткою хвиль Ес і Ез. Як наслідок, такі особини мають слабкий адаптаційний потенціал. Це підтверджують наведені нами дані щодо їх значної летальності на першому та другому роках життя після перенесення у природу.

Тому додаткове використання ламп ЛХБ для корекції світлового режиму культивування *G. lutea* (перший варіант СК) дозволило підвищити інтенсивність світлового потоку, збільшити поглинання фотосинтетичним апаратом фотонів Ек спектра та, певною мірою, збалансувати регуляторні системи, що контролюють ростові процеси та фотосинтез *G. lutea*. Це підтверджують результати морфометричного аналізу та пігментного складу рослин цього варіанта СК. Зниження вмісту всіх пігментів, порівняно з контролем, ймовірно, означає перебування рослин у задовільніших світлових умовах. Однак низьке відношення хлорофіл *a* / хлорофіл *b* у хлоропластах вказує на ще відносно високу концентрацію хлорофілу *b* у світлозбиральному комплексі ФС II (Leong & Anderson, 1984; Matsuda et al., 2007).

Це дозволяє припустити, що світлові умови першого варіанта СК ще не повною мірою відповідають фізіологічному оптимальному світлозабезпеченню, необхідному для повноцінного функціонування фотосинтетичного апарату рослин *G. lutea*. На користь цього свідчать низькі показники розвитку фотосинтетичного апарату (табл. 2) в особин цього варіанта досліду. Проте такі світлові умови, порівняно з контролем та другим варіантом СК, ініціювали утворення у рослин *G. lutea* всіх досліджених популяцій більшої кількості листків та мікроклональне розмноження. Подібні результати отримали Nemoykina & Kamachuk (2002) під час культивування *in vitro* під лампами «білого спек-

тра» рослин виду *Yucca elephantipes* R. За переважання у спектрі хвиль Ес діапазону збільшується ефект впливу екзогенного цитокініну, доданого у живильне середовище для культивування (Nemoykina & Kamachuk, 2002). Імовірно, сумування спектрів ЛД і ЛХБ ламп посилює дію введеного до складу живильного середовища регулятора росту Кінетину, що не лише сприяло збільшенню кількості листків, а й активізувало ріст пазушних меристем *G. lutea*. Така оптимізація світлового режиму дозволяє збільшити коефіцієнт мікроклонального розмноження *G. lutea* без додаткового застосування більших концентрацій екзогенних регуляторів росту, що значно здешевлює процес отримання посадкового матеріалу.

Оптимізація спектрального складу в області ФАР штучного світла за рахунок підвищення частки хвиль Еч діапазону збалансовує регуляторні системи, що відповідають за ріст та фотосинтез (Nemoykina & Kamachuk, 2002). За таких умов у рослин не лише достатньо збільшується загальна площа листової поверхні, а й спостерігається максимальний фотосинтез із одиниці її поверхні. Це зумовлено декількома причинами: червоне світло у діапазоні 600–640 нм має найвищий квантовий вихід для фіксації CO₂, фотолізу води та виділення O₂, тому підвищує ефективність роботи фотосинтетичного апарату (Hogewoning et al., 2013); оптимізація спектрального складу та інтенсивності освітлення зрівноважує співвідношення фітогормонів та інгібіторів росту, що відображається на зміні швидкості росту та продуктивності рослин (Lau & Deng, 2010).

Ці висновки підтверджують і результати наших експериментальних досліджень, оскільки додаткове застосування фітоламп у другому варіанті СК, які у своєму спектрі мають високу частку хвиль червоного діапазону, дозволило отримати максимальний приріст сирової біомаси не лише надземної, а й підземної частини у рослин *G. lutea*. Згідно з дослідженнями Kamachuk (2002), корекція «білого спектра» лампами «червоного спектра» в культивованих *in vitro* рослин збільшує концентрацію ендогенної ІОК, що сприяє їх швидшому укоріненню. Добре же розвинена коренева система одна з головних умов фізіологічної стабільності рослинного організму, оскільки завдяки збільшенню площі всмоктування кореневої системи тканин і органів рослини краще забезпечуються необхідною кількістю макро- та мікроелементів (Bao et al., 2014).

Оптимізація світлових умов культивування *in vitro* рослин *G. lutea* у другому варіанті СК позначилася й на загальному балансі фотосинтетичних пігментів, які містяться в реакційних центрах і світлозбиральних комплексах фотосистем. Рослини, фотосинтез яких відбувається в оптимальних умовах, у пластидах містять зазвичай високий пул хлорофілу *a* (Leong & Anderson, 1984; Walters, 2005). Як показали наші дослідження, вміст хлорофілу *a*, а також каротиноїдів у пластидах рослин *G. lutea* другого варіанта СК високий і достовірно значимо (за винятком г. Шешул-Павлик) не відрізняється від контролю. Проте зниження концентрації хлорофілу *b* у світлозбиральних комплексах вказує на перебування рослин у комфортних щодо світлозабезпечення умовах. Високий вміст каротиноїдів у даному випадку зумовлений їх фотозахисною функцією (Bailey et al., 2004; Lichtenthaler et al., 2007). Можна припустити, що високі концентрації пігментів у фотосинтетичному апараті культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* другого варіанта СК забезпечать не лише більшу їх пластичність, а й швидший перехід від гетеротрофного до автотрофного живлення та кращу здатність особин адаптуватися до нестерильних умов *ex vitro* та *in situ*.

Зовнішній вигляд рослин *G. lutea* другого варіанта СК найбільше відповідає габітусу інтактних особин цього виду. Значно вкорочені міжвузля ускладнюють процедуру живцювання рослин *in vitro*. Тому доцільно використовувати світловий режим другого варіанта досліду лише на заключних етапах підготовки посадкового матеріалу *G. lutea* до перенесення в умови *ex vitro* та *in situ*.

На основі узагальнення експериментальних даних можна запропонувати схему оптимізації світлового режиму вирощування *in vitro* посадкового матеріалу *G. lutea*, яка передбачає двоетапне

культивування: 1) мікроклональне розмноження та ріст рослин *in vitro* за світлових умов першого варіанта СК; 2) вкорінення отриманих пагонів за режиму освітлення другого варіанта СК.

Висновки

Морфогенез і біопродуктивність культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* не лише залежать від вмісту пігментів та їх співвідношення в реакційних центрах і світлозбиральних комплексах фотосистем, а й регулюються складнішими механізмами, здатними змінювати ендогенний фітогормональний баланс і перебіг метаболічних реакцій. Фотосинтетичний апарат культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* за зміни спектрального складу світла та його інтенсивності упродовж 90 діб здатний повністю перебудуватися та змінити кількісне співвідношення пігментів, що позначається на інтенсивності його функціонування.

Отримані результати показали недоцільність культивування рослин *G. lutea* під лампами ЛД, оскільки такі світлові умови запускають специфічні реакції фотоморфогенезу, які викликають слабкий розвиток кореневої системи, витягування стебел, утворення дрібних листків із тонкою листовою пластинкою та загальної низької продуктивності рослин.

Виявлено ефективність впливу корекції спектрального складу та інтенсивності освітлення ламп ЛД лампами ЛХБ на процесі росту та розвитку *in vitro* рослин *G. lutea*. Зроблено припущення, що сумування спектрів ЛД і ЛХБ посилює дію екзогенного Кін, уведеного до складу живильного середовища. Це, у свою чергу, спричинило ініціювання росту пазушних меристем. Тому культивування *in vitro* рослин *G. lutea* в таких світлових умовах не лише поліпшує їх біопродуктивність порівняно із застосуванням лише лампи денного світла (контроль), а й дозволяє збільшити коефіцієнт мікроклонального розмноження без додаткового використання екзогенних регуляторів росту фітогормонів, що значно здешевлює процес отримання посадкового матеріалу. Показано ефективність застосування комбінації ламп ЛД, ЛХБ і фітоламп у співвідношенні 0,6 : 1 : 1, відповідно, для корекції світлового режиму вирощування рослин *G. lutea* на заключних етапах підготовки їх посадкового матеріалу до перенесення в умови *ex vitro* та *in situ*. Це пов'язано з тим, що підвищення частки хвиль Еч діапазону збільшує ефективність поверхні листків, вмісту фотосинтетичних пігментів, найбільшого приросту надземної та підземної частин. Припускаємо, що це забезпечить швидший перехід культивованих *in vitro* рослин *G. lutea* від гетеротрофного до автотрофного живлення, посилить їх адаптаційний потенціал і дозволить легше пристосуватися до нестерильних умов *ex vitro* та *in situ*.

Виявлені тенденції щодо зміни габітусу, морфометричних, алометричних параметрів та пігментного складу залежно від світлового режиму культивування *in vitro* характерні для вибірок рослин усіх трьох досліджених популяцій. Враховуючи ці дані та результати методу головних компонент, можна припустити, що це загальна видоспецифічна реакція *G. lutea* на зміну інтенсивності випромінювання та його спектрального складу.

Застосування дисперсійного аналізу та методу головних компонент дозволило точніше інтерпретувати результати дослідження. На основі отриманих результатів розроблено схему оптимізації світлового режиму вирощування *in vitro* рослин *G. lutea* для підвищення їх адаптаційного потенціалу та реалізувати завдання першого етапу багатоступінчастої технології стабілізації / реінтродукції популяцій цього виду на території Українських Карпат.

References

Bailey, S., Horton, P., & Walters, R. G. (2004). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: The relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta*, 218, 793–802.
 Banas, A. K., & Gabrys, H. (2007). Influence of sugars on blue light-induced chloroplast relocations. *Plant Signaling and Behavior*, 2(4), 221–230.
 Bao, Y., Aggarwal, P., Robbins II, N. E., Sturrock, C. J., Thompson, M. C., Tan, H. Q., Tham, C., Duan, L., Rodríguez, P. L., Vernoux, T., Mooney, S. J., Ben-

nett, M. J., & Dinneny, J. R. (2014). Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9319–9324.
 Belokurova, V. B. (2010). Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review). *Cytology and Genetics*, 44(3), 174–185.
 Bidl, K. L. (1989). Fotosintez i bioproduktivnost': Metody opredeleniya [Photosynthesis and bioproductivity: Methods of determination]. *Ahropromizdat, Moscow* (in Russian).
 Bisht, S. S., Bisht, A. S., & Chauhan, R. S. (2017). *In-vitro* mutagenesis induction to improve abiotic stress in tissue cultured plantlet of *Picrohiza kurroa* Royle ex. Benth: An endangered plant of Western Himalayas, India. *Medicinal and Aromatic Plants*, 6(2), 287.
 Burney, D. A., & Burney, L. P. (2007). Paleoecology and "inter-situ" restoration on Kaua'i, Hawai'i. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5, 483–490.
 Caffarri, S., Passarini, F., Bassi, R., & Croce, R. (2007). A specific binding site for neoxanthin in the monomeric antenna proteins CP26 and CP29 of Photosystem II. *FEBS Letters*, 581(24), 4704–4710.
 Cope, K. R., & Bugbee, B. (2013). Spectral effects of three types of white light-emitting diodes on plant growth and development: Absolute versus relative amounts of blue light. *HortScience*, 48(4), 504–509.
 Cruz-Cruz, C. A., González-Amao, M. T., & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2, 73–95.
 Dingenen, J. V., De Milde, L., Vermeersch, M., Maleux, K., De Rycke, R., De Bruyne, M., Storme, V., Gonzalez, N., Dhondt, S., & Inze, D. (2016). Chloroplasts are central players in sugar-induced leaf growth. *Plant Physiology*, 171(1), 590–605.
 Dong, C., Fu, Y., Liu, G., & Liu, H. (2014). Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) at different growth stages in BLSS. *Advances in Space Research*, 53, 1557–1566.
 Dou, H., Niu, G., Gu, M., & Masabni, J. G. (2017). Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. *Horticulturae*, 3(2), 36.
 Droblyk, N. M., Grytsak, L. R., Mel'nyk, V. M., Kravets, N. B., Konvalyuk, I. I., Twardovska, M. O., & Kunakh, V. A. (2015). *In vitro* manipulation and propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian Flora. In: *The Gentianaceae – Volume 2: Biotechnology and Applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, 45–79.
 Folta, K. M., & Childers, K. S. (2008). Light as a growth regulator: Controlling plant biology with narrow-bandwidth solid-state lighting systems. *HortScience*, 43(7), 1957–1964.
 Folta, K. M., & Maruhnich, S. A. (2007). Green light: A signal to slow down or stop. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3099–3111.
 Franklin, K. A., Lamer, V. S., & Whitelam, G. C. (2005). The signal transducing photoreceptors of plants. *The International Journal of Developmental Biology*, 49, 653–664.
 Golovatskaya, I. F. (2005). The role of cryptochrome 1 and phytochromes in the control of plant photomorphogenetic responses to green light. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(6), 822–829.
 Gong, J., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, J., & Ran, A. (2018). Ecophysiological responses of three tree species to a high-altitude environment in the south-eastern tibetan plateau. *Forests*, 9(2), 48.
 Govorov, P. P., Velyt, I. A., Shchyrenko, V. V., & Pylypchuk, R. V. (2011). Dzhirela svitla dlja vyroshhuvannya ovochiv v umovah zakrytoho gruntu [Lamp surfaces for vegetables in conditions of suspended soil]. *Dzhura, Ternopil'* (in Ukrainian).
 Gururani, M. A., Venkatesh, J., & Tran, L. S. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9), 1304–1320.
 Havaux, M., Bonfils, J. P., Lütz, C., & Niyogi, K. K. (2000). Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 *Arabidopsis* mutants deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology*, 124(1), 273–284.
 Hogewoning, S. W., Wientjes, E., Douwstra, P., Trouwborst, G., van Ieperen, W., Croce, R., & Harbinson, J. (2012). Photosynthetic quantum yield dynamics: From photosystems to leaves. *The Plant Cell*, 24(5), 1921–1935.
 Hrytsak, L. R., Melnyk, V. M., Konvalyuk, I. I., Kravets, N. B., Mosula, M. Z., & Droblyk, N. M. (2017). Mikroklonal'ne rozmnozhenня vydiv rodu *Gentiana* L. flory Ukraїny [Microclonal propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian flora]. *Scientific Issues Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Series Biology*, 1(68), 74–82 (in Ukrainian).
 Kabashnikova, L. F. (2011). Fotosinteticheskij apparat i potencial hlebnykh zlakov [Photosynthetic apparatus and the potential of cereals]. *Belorusskaja nauka, Minsk* (in Russian).
 Kaiserli, E., & Chory, J. (2016). The role of phytochromes in triggering plant developmental transitions. In: *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*.

- Karnachuk, R. A., Negretskii, V. A., & Golovatskaya, I. F. (1990). Gormonal'nyj balans lista rastenij na svetu raznogo spektral'nogo sostava [Hormonal balance in the plant leaf under light differing in quality]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 37(3), 527–534 (in Russian).
- Keziah, S. M., & Devi, C. S. (2017). Essentials of conservation biotechnology: A mini review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, 022047.
- Kiran, G., Venugopal, R. B., Jabeen, F. T. Z., Kaviraj, C. P., & Srinath, R. (2004). Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 594–598.
- Kobiv, Y., Prokopiv, A., Nachychko, V., Borsukevych, L., & Helesh, M. (2017). Distribution and population status of rare plant species in the Marmarosh Mountains (Ukrainian Carpathians). *Ukrainian Botanical Journal*, 74(2), 163–176.
- Kodun-Ivanova, M. A. (2017). Pokazatel vodnogo stressa mikroklonal'no razmnozhenykh rastenij osiny *Populus tremula* pri ih vyrashhivani v usloviyah *ex vitro* [Indicators of water-stress of microclonal aspen *Populus tremula* to the *ex vitro* conditions]. *Trudy Belarusian State Technological University*, 1(2), 146–155.
- Kramer, F. T., & Havens, K. (2009). Plant conservation genetics in changing world. *Trends in Plant Science*, 14(11), 599–607.
- Kucherjavi, V. P., Mokryj, V. I., Shymkiv, O. B., Bashue'ka, U. B., Bejnc, S., & Viljem, B. (2003). Diagnostyka ta optymizacija bio-naturu stikosti fitomeliorativ devastovanykh landshtafiv [Diagnostic and optimisation by bio-natura of vitality of phytomeliorant of devastated landscape]. *Scientific bulletin of UNFU*, 13(5), 303–307 (in Ukrainian).
- Kuster, V. C., De Castro, S. A. B., & Vale, F. H. A. (2016). Photosynthetic and anatomical responses of three plant species at two altitudinal levels in the Neotropical savannah. *Australian Journal of Botany*, 64(8), 696–703.
- Lau, O. S., & Deng, X. W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: Integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 571–577.
- Leong, T. Y., & Anderson, J. M. (1984). Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplast to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynthesis Research*, 5(2), 105–115.
- Lichtenthaler, H. K., Marek, A. A., Kalina, M. V., & Urban, O. J. (2007). Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 577–588.
- Ling, Q., & Jarvis, P. (2015). Functions of plastid protein import and the ubiquitin-proteasome system in plastid development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1847(9), 939–948.
- Margitay, L. (2006). Osoblyvosti vmistu fotosyntezujuchykh pigmentiv u roslin introdukovanykh vydiv rodov *Sedum* L. i *Crassula* L. [Features of the content of photosynthetic pigments in plants of introduced species of genera *Sedum* L. and *Crassula* L.]. *Bulletin Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series Introduction and Conservation of Plant Diversity*, 10, 38–40 (in Ukrainian).
- Maschinski, J., & Albrecht, M. A. (2017). Center for plant conservation's best practice guidelines for the reintroduction of rare plants. *Plant Diversity*, 39(6), 390–395.
- Matsuda, R., Ohashi-Kaneko, K., Fujiwara, K., & Kurata, K. (2007). Analysis of the relationship between blue-light photon flux density and the photosynthetic properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves with regard to the acclimation of photosynthesis to growth irradiance. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53(4), 459–465.
- Mayorova, O. Y., Hrytsak, L. R., & Drobyk, N. M. (2015a). The strategy of *Gentiana lutea* L. populations in the Ukrainian Carpathians. *Russian Journal of Ecology*, 46(1), 43–50.
- Mayorova, O. Y., Hrytsak, L. R., & Drobyk, N. M. (2015b). Adaptation of *Gentiana lutea* L. plants obtained *in vitro* to *ex vitro* and *in situ* condition. *Biotechnologia Acta*, 8(6), 77–86.
- Mezhuts, B. K. (2009). Primenenie dimetilsul'foksida v kachestve rastvoritelja fotosinteticheskikh pigmentov v polevykh issledovaniyah [Application of dimethylsulfoxide as a solvent of photosynthetic pigments in field investigations]. *Bulletin of State Agrarian University of Armenia*, 3, 40–44 (in Russian).
- Murashige, T., & Skoog, F. A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Nemoykina, A. L., & Karnachuk, R. A. (2002). Sovmestnoe dejstvie sveta raznogo spektral'nogo sostava i jekzogenykh gormonov na mezostrukтуру *Yucca elephantipes* R. v kul'ture *in vitro* [The combined action of light of different spectral composition and exogenous hormones on the *Yucca elephantipes* R. mesostructure *in vitro* culture]. *Journal Investigated in Russia*, 174, 1930–1937 (in Russian).
- Oceania, C., Doni, T., Tikendra, L., & Nongdam, P. (2015). Establishment of efficient *in vitro* culture and plantlet generation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and development of synthetic seeds. *Journal of Plant Sciences*, 10(1), 15–24.
- Ouzounis, T., Rosenqvist, E., & Ottosen, C.-O. (2015). Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: A review. *HortScience*, 50(8), 1128–1135.
- Rossi, M., Fisogni, A., & Galloni, M. (2016). Biosystematic studies on the mountain plant *Gentiana lutea* L. reveal variability in reproductive traits among subspecies. *Plant Ecology and Diversity*, 9(1), 97–104.
- Rybchenko, L. S., & Savchuk, S. V. (2015). Potencial gelioenergetychnykh klimatychnykh resursiv sonjachnoi' radiacii v Ukraїni [Potential of the climatic solar radiation energy resources in Ukraine]. *Ukrainian Geographical Journal*, 4, 16–23 (in Ukrainian).
- Sáez, P. L., Bravo, L. A., Sáez, K. L., Sánchez-Olate, M., Latsague, M. I., & Rios, D. G. (2012). Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: A comparison between *in vitro* and nursery plants. *Biologia Plantarum*, 56(1), 15–24.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 42(3), 206–214.
- Schöttler, M. A., & Tóth, S. Z. (2014). Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: Environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Frontiers in Plant Science*, 5, 188.
- Strashniuk, N. M., Hrytsak, L. R., Leskova, O. M., & Melnyk, V. M. (2004). Vvedennja v kul'turu *in vitro* dejakykh vydiv rodu *Gentiana* L. [Introduction to the *in vitro* culture of some species of genus *Gentiana* L.]. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 36(4), 327–334 (in Ukrainian).
- Sun, Y., & Zerges, W. (2015). Translational regulation in chloroplasts for development and homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(9), 809–820.
- Syvash, O. O., Fomishyna, R. N., Zaharova, T. O., & Zolotar'ova, E. K. (2016). Hhlorofilazna aktyvnist' i pigmentnyj sklad lystiv roslin riznykh jarusiv shyrokolystjanogo lisu [Chlorophyllase activity and pigment composition in leaves of forest plants of different layers of broad-leaved forest]. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, 2(38), 75–83 (in Ukrainian).
- Tanada, T. (1984). Interaction of green or red light with blue light on the dark closure *Albizia pinnules*. *Physiologia Plantarum*, 61(1), 35–37.
- Velyt, I. A., & Guzyk, D. V. (2013). Vybir dzherel svitla dlja optychnogo oprominennja roslin tomativ, ogirka ta rozsadu [Selection of light sources for optical irradiation of plants of tomatoes, cucumbers and seedlings]. *Control, Navigation and Communication Systems*, 25, 128–132 (in Ukrainian).
- Viazov, E. V., & Shalyho, N. V. (2016). Aktivnost' fotosinteticheskogo apparata i zashhitnaja sistema rastenij ogurca (*Cucumis sativus* L.) pri uzkopolosnom osveshhenii razlichnogo spektral'nogo sostava [Photosynthetic apparatus and defense system of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants under led lighting of different spectral composition]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Biological Sciences*, 4, 19–26 (in Russian).
- Vicente, C., & Garcia, I. (1981). Decrease in phytochrome pelletability induced by green + far-red light in *Trifolium repens*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 100(1), 17–22.
- Volis, S., & Blecher, M. (2010). Quasi *in situ*: A bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. *Biodiversity and Conservation*, 19(9), 2441–2454.
- Voskresenskaya, N. P. (1987). Fotoreguljatornye reakcii i aktivnost' fotosinteticheskogo apparata [Photoregulatory reactions and activity of the photosynthetic apparatus]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 34(4), 669–684 (in Russian).
- Walters, R. G. (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 435–447.
- Wang, H., & Deng, X. W. (2002). Phytochrome signaling mechanism. In: *The Arabidopsis book*, 3. The American Society of Plant Biologists, Rockville.
- Zavoruev, V. V., & Zavorueva, E. N. (2011). Fluorescencija list'ev topolej, rastushhih vblizi avtomobil'nykh dorog [Fluorescence of poplar leaves growing near highways]. *Atmospheric and Oceanic Optics*, 24(5), 437–440 (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2), 267–274
doi: 10.15421/021839

Regulation of biosynthesis of lipids in *Chlorella vulgaris* by compounds of zinc, chromium and selenium

O. I. Bodnar, H. B. Kovalska, V. V. Grubinko

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 02.03.2018

Received in revised form
15.04.2018

Accepted 17.04.2018

V. Hnatiuk Ternopil National
Pedagogical University,
M. Kryvonosa st., 2,
Ternopil, 46027, Ukraine.
Tel.: +38-097-78-216-98.
E-mail:
bodnar@chem-bio.com.ua

Bodnar, O. I., Kovalska, H. B., & Grubinko, V. V. (2018). Regulation of biosynthesis of lipids in *Chlorella vulgaris* by compounds of zinc, chromium and selenium. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 267–274. doi:10.15421/021839

We studied molecular and metabolic mechanisms of regulated lipid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* aquaculture. after addition of sodium selenite (10 mg/dm³) when added separately and in combination with Zn²⁺ (5 mg/dm³) and Cr³⁺ (5 mg/dm³) during 7 days of their action in order to obtain biotechnologically useful lipid products, enriched with microelements. Experiments were carried out in accordance with generally accepted hydrological and biochemical methods. It was established that micronutrients that were added into the medium result in an increase in the total content of lipids in the range of 10%. The redeployment of lipid classes in chlorella cells occurs due to the action of sodium selenite in favour of phospholipids by reducing the proportion of diacylglycerols, while the amount of triacylglycerols and nonetherified fatty acids does not change. Combined action of sodium selenite and zinc ions leads to the significant increase of the relative content of diacylglycerols, and partial increase of nonetherified fatty acids, at the same time in the cells we can observe a slight decrease in the proportion of triacylglycerols and phospholipids. Inclusion of ¹⁴C-bicarbonate in carbohydrates, proteins and lipids of *Ch. vulgaris* is significantly different both from the control group and from the group to which we added the investigated factors. However, the predominance of inclusion in lipids is 2–3 times higher than its inclusion into carbohydrates and 9–12 times higher in proteins. The increase of labeled bicarbonate inclusion intensity into carbohydrates occurs only in the case of joint action of sodium selenite and zinc ions, in proteins and lipids – in all cases of trace elemental activity. It was revealed that the general tendency is the reduction of the inclusion of bicarbonate in *Ch. vulgaris* triacylglycerols and its increase in phospholipids and nonetherified fatty acids, except for chromium ions, that modified the inclusion of the label into diacylglycerols, which may be due to the specific toxicity of the metal ions. The activation of lipogenesis after addition of selenium, zinc and chromium compounds was confirmed by an increase in the inclusion intensity of ¹⁴C-oleate in various classes of lipids that are present in chlorella and increased activity of glycerol-3-phosphatyltransferase. Direction and regulation of lipid metabolism in *Ch. vulgaris* in the direction of increasing the amount and accumulation of lipids and their separate classes using sodium selenite in combination with Zn²⁺ and Cr³⁺ with the purpose of forming selenium-metal-lipid complexes can be used to obtain biologically active lipidous preparations enriched with essential microelements.

Keywords: microalgae; micronutrients; lipid metabolism; fatty acids

Регуляція біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* сполуками цинку, хрому та селену

О. І. Боднар, Г. Б. Ковальська, В. В. Грубінко

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна

Досліджено молекулярні та метаболічні механізми регульованого біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* за дії натрію селеніту (10 мг/дм³) окремо та спільно з Zn²⁺ (5 мг/дм³) і Cr³⁺ (5,0 мг/дм³) упродовж 7 діб їх дії з метою отримання біотехнологічно корисних ліпідних продуктів, збагачених мікроелементами, в умовах аквакультури. Досліди виконували згідно із загальноприйнятими гідрологічними та біохімічними методиками. Внесені в середовище мікроелементи зумовлюють збільшення загального вмісту ліпідів (у межах 10%). Перерозподіл класів ліпідів у клітинах хлорели відбувається за дії натрію селеніту на користь фосфоліпідів за рахунок зменшення частки діацилгліцеролів, тоді як кількості триацилгліцеролів і неетерифікованих жирних кислот практично не змінюються. За дії натрію селеніту та іонів цинку зростає відносний вміст діацилгліцеролів, неетерифікованих жирних кислот і фосфоліпідів за незначного зниження частки триацилгліцеролів. Спільна дія натрію селеніту та іонів хрому зумовлює суттєве зростання відносного вмісту триацилгліцеролів та частково неетерифікованих жирних кислот за зниження частки у клітинах водорості діацилгліцеролів і фосфоліпідів. Включення ¹⁴C-бікарбонату у вуглеводи, протеїни та ліпіди *Ch. vulgaris* суттєво відрізняється як у контролі, так і за дії досліджених чинників, однак зберігається переважання включення у ліпіди у 2–3 рази відносно інтенсивності включення мітки у вуглеводи та у 9–12 разів – у протеїни. Зростання інтенсивності включення міченого бікарбонату у вуглеводи має місце тільки за спільної дії натрію селеніту та іонів цинку, у протеїни та ліпіди – в усіх випадках мікроелементної дії на клітини водорості. Загальною тенденцією виявилось зниження включення бікарбонату до триацилгліцеролів *Ch. vulgaris* та його зростання у

фосфоліпідах і неетерифікованих жирних кислотах, окрім іонів хрому, які модифікували включення мітки до діацилгліцеролів, що може виявитися наслідком специфічної токсикогенності іонів металів. Активність ліпогенезу за дії сполук селену, цинку та хрому підтвердилася здебільшого зростанням інтенсивності включення ^{14}C -олеату в різні класи ліпідів клітин хлорели та підвищення активності гліцерол-3-фосфатацилтрансферази. Спрямування та регуляція ліпідного метаболізму у *Ch. vulgaris* у напрямку збільшення кількості та накопичення ліпідів та їх окремих класів за допомогою натрій селеніту спільно з Zn^{2+} та Cr^{3+} із метою утворення селенметалліпідних комплексів можна використати для одержання ліпідних біологічно активних препаратів, збагачених есенційними мікроелементами.

Ключові слова: мікроводорості; мікронутрієнти; ліпідний метаболізм; жирні кислоти

Вступ

Природні біологічно активні сполуки, отримані з біомаси водоростей, виступають альтернативою синтетичним компонентам або аналогами інших, із вищою собівартістю виробництва, природних компонентів. Водоростеві субстанції нині мають надзвичайно широке поле до застосування – медицина та фармація (Abd & El-Baroty, 2013; Agatonovic-Kustrin & Morton, 2013), діабетологія, харчова промисловість і сільське господарство (Ođadjare et al., 2017), біотехнологія та біоенергетика (Khan et al., 2009; Park et al., 2011), фіторемерація (Perales et al., 2006; Shalaby, 2011) тощо. Враховуючи велике видове різноманіття наголосимо, що водорості містять значну кількість груп активних органічних компонентів, різної хімічної будови та властивостей. Серед них полісахариди (альгінати, фукоїдан, ламінарин, агар, манан тощо) (Kim, 2013; Park, 2015), пігменти (хлорофіли, фікобіліни, каротиноїди, лютеїн тощо) (El Gamal, 2010; Michalak & Chojnacka, 2015), ліпіди (насичені жирні кислоти та цінні поліненасичені жирні кислоти ($\text{C}_{20, \text{p-3}}$, $\text{C}_{22,6, \text{p-3}}$, $\text{C}_{18,3, \text{p-6}}$) (Chen & Chou, 2002; Haq et al., 2011), бетаїни, поліаміни, стерини, фітогормони (Lu & Xu, 2015), пептиди та протеїни, поліфеноли та їх похідні (Hamedy & Fitzgerald, 2011), а також основні вітаміни та мінерали (Croft et al., 2006; Tang & Suter, 2011). Щодо тварин і людини, то для багатьох цих сполук властивий широкий спектр потенційних лікувально-профілактичних властивостей: антиоксидантні (Fernando et al., 2016; Lukashiv et al., 2016), протиракові, антивірусні, антикоагулянтні, антибактеріальні (Bellou et al., 2014), антиалергічні, антидіабетичні, протизапальні та антигіпертензивні властивості (Lee & Kim, 2009; Ryu et al., 2014; Kim et al., 2016).

У статті Michalak et al. (2017), яка ґрунтується на детальному аналізі бази даних Web of Science, показано, що найбільшу наукову увагу з біологічно активних сполук водоростей отримали ліпіди та жирні кислоти, а відтак вони стали одними з найбільш затребуваних для практичного використання водоростевих субстанцій.

Завдяки своїм високим адсорбційним властивостям, водорості здатні поглинати та акумулювати метали та неметали проти градієнта концентрації, завдяки чому мікроелементи накопичуються клітинами та включаються до складу органічних молекул у кількостях, що в рази перевищують їх вміст у середовищі існування (Raja et al., 2008; Richmond & Hu, 2013).

Сучасні умови життя (несприятлива екологічна ситуація, неадекватне харчування, психоемоційні стреси, шкідливі звички тощо) зумовлюють чималий перелік хронічних захворювань, де на перше місце виходять порушення метаболізму, спричинені інтенсивним утворенням вільних радикалів та підвищенням пероксидних процесів. Тому актуальним і перспективним способом лікування та профілактики порушень обміну речовин може виявитися використання натуральних біологічно активних добавок (БАД) із водоростей, в яких мінеральні речовини природного походження перебувають у зв'язаній формі у природному комплексі з ліпідами. З огляду на це, значний інтерес становлять водоростеві комплекси селену та біологічно активних металів – цинку та хрому.

Селен – важливий мікроелемент для життєдіяльності організму, бо бере участь у клітинному захисті від вільнорадикальних реакцій, незамінний компонент глутатіонової системи, тому корисний для запобігання значної кількості захворювань та їх лікування (Kohrle et al., 2000; Wrobel et al., 2016). Хром (III) поліпшує метаболізм живих організмів, адже він регулює вуглеводний, протеїновий та ліпідний обмін (Vincent, 2013; Brownley et al., 2015; Ganguly et al., 2016). Дослідження показали, що хром

необхідний для лікування інсулінорезистентності та цукрового діабету в людей, бо відіграє важливу роль у підтриманні нормального рівня глюкози у крові (Jain et al., 2007; Hua et al., 2012), а також зумовлює зниження рівня холестеролу та триацилгліцеролів у плазмі, пригнічення секреції запальних цитокінів, а в комплексі із селеном – інгібує розвиток оксидативного стресу (Jain et al., 2007; Ganguly et al., 2016). Цинк – один із найголовніших мікроелементів усіх живих організмів, бо необхідний компонент понад 300 ензимів, які контролюють і регулюють протеїновий, ліпідний, вуглеводний і нуклеїновий метаболізм, транскрипцію генів і трансляцію генетичної інформації (Metzler, 2003). Він забезпечує нормальне функціонування репродуктивної системи та репаративні процеси, бере безпосередню участь в імунних реакціях організму. Також цинк – важливий біогенний елемент, що активує енергетичний метаболізм і спрямовує окисно-відновні процеси у клітинах у бік відновних реакцій. Він необхідний для синтезу та утворення гормонів (включно інсуліну), дихальних ензимів (цитохромоксидази), цитохромів *a* та *b* і хлорофілу, а відтак забезпечує функціонування клітин у стресових станах і адаптаційних процесах, які потребують підвищення енергоутворення (Metzler, 2003; Kostiuk & Grubinko, 2012; Maxfield et al., 2018).

Сучасне харчування не забезпечує повноцінного та комплексного надходження багатьох мікроелементів, тому споживання біодобавок може покрити потреби людини в необхідних сполуках (Abd & El-Baroty, 2013). Щодо хром-, цинк- і селенумісних препаратів, то чимало теперішніх добавок – синтетичні аналоги вітамінів та мінеральних речовин, вони не пов'язані у біологічні комплекси та можуть мати іншу структуру, ніж натуральні нутрієнти, а також вони часто проявляють низьку ефективність і побічні дії. Тому ефективними як джерела селену та інших мікроелементів зарекомендували себе препарати з хлорели *Ch. vulgaris* (Lukashiv et al., 2016), яка стає джерелом біологічно доступних мікроелементів, вітамінів, жирних кислот, ліпідів, хлорофілу, амінокислот тощо (Skrivan et al., 2010; Kim, 2013).

Хлорела – одна з найперспективніших мікроводоростей, яку масово культивують для промислового виробництва нутрицевтиків у формі таблеток або порошку. Перевага використання мікроводоростей для синтезу біоактивних молекул, у тому, що їх можна вирощувати на великомасштабному виробництві з регульованими фізико-хімічними параметрами. Тому оптимальне співвідношення мікроелементів, які вносяться у середовище культивування, наперед може визначати спрямування біохімічних реакцій і перебудову як загального метаболізму, так і ліпідного, що дає змогу ефективно та безпечно включати метали та неметали у ліпіди з метою отримання біотехнологічно корисних продуктів в умовах аквакультури.

Мета цього дослідження – з'ясувати молекулярні та метаболічні механізми регульованого біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris*, ліпідний склад водоростей, інтенсивність включення ^{14}C -бікарбонату в органічні сполуки та ^{14}C -олеату в ліпіди різних класів за дії натрій селеніту ($10,0 \text{ мг/дм}^3$) окремо та спільно з Zn^{2+} ($5,0 \text{ мг/дм}^3$) і з Cr^{3+} ($5,0 \text{ мг/дм}^3$) упродовж 7 діб їх дії.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – альгологічно чиста культура зеленої водорості *Chlorella vulgaris* Beij. CСAP-211/11в, отримана із колекцій Інституту гідробіології НАН України. Водорість культивували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера та Горхема № 11, за температури 22–25 °C та освітлення лампами

денного світла (інтенсивність 2 500 Лк) упродовж 16 год. на добу (Romanenko, 2004). В умовах експерименту до культури водоростей додавали водний розчин селеніту натрію (Na_2SeO_3) у розрахунку на кількість Se(IV) – 10,0 мг/дм³ та водні розчини $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ у розрахунку на вміст Zn^{2+} і Cr^{3+} – по 5,0 мг/дм³ (Lutsiv & Grubinko, 2012). Контролем слугувала культура, яку вирощували у середовищі без додавання натрію селеніту, солей хрому і цинку. Біомасу живих клітин відбирали на сьому добу культивування (Skrivan et al., 2010).

Включення ^{14}C -бікарбонату у протеїни, вуглеводи, ліпіди та ліпіди різних класів і ^{14}C -олеату у ліпіди різних класів досліджували шляхом інкубації суспензії хлорели відповідно з 20 кБк бікарбонатом натрію ($\text{NaH}_2^{14}\text{CO}_3$) та з 184 кБк ^{14}C -олеатом ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$) за температури 20–22 °C і освітленні 2500 лк протягом 90 хв (Lutsiv & Grubinko, 2012; Yang et al., 2015). Після зупинення реакції трихлороцтовою кислотою здійснювали екстракцію протеїнів, вуглеводів та ліпідів. Радіоактивність зразків вимірювали на сцинтиляційному лічильнику LS-100C «Beckman» (США). Для визначення загальної кількості вуглеводів у біомасі водоростей, їх осаджували трихлороцтовою кислотою, далі екстрагували розчином 75% етанолу, після чого центрифугували, двічі промивали, знову осаджували центрифугуванням, висушували до постійної ваги, зважували, та здійснювали авторадіографування отриманих зразків (Molecular-genetic and biochemical methods, 2012).

Визначення загального вмісту протеїнів у біомасі водоростей здійснювали через їх осадження 5% розчином трихлороцтової кислоти та центрифугуванням, далі осад розчиняли в етанолі та знову центрифугували, після чого його промивали сумішшю етанол : диетиловий ефір (3 : 1) та підсушували ефіром. Протеїни солюбілізували 5 М КОН за 70 °C протягом 24 год, нейтралізували, висушували та зважували та визначали їх радіоактивність (Vovk & Yanovich, 1988).

Для біохімічного дослідження ліпіди екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю у відношенні 2 : 1 методом Фолча (Hokin & Hexum, 1992). При цьому до однієї масової частки вологої біомаси додавали 20 масових часток екстрагуючої суміші та залишали на 12 годин для екстракції ліпідів. Неліпідні домішки з екстракту видаляли відмиванням 1% розчином KCl (Prokhorova, 1982; Stefanyk et al., 1985). Кількість загальних ліпідів визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші, висушували у термостаті та зважували.

Розділення ліпідів на окремі фракції здійснювали методом висхідної одновимірної тонкошарової хроматографії в герметич-

них камерах на пластинках із сумішшю силікагелів ЛС 5/40 μ і ЛІ 5/40 μ на скляній основі. Перед початком роботи пластинки активували протягом 30 хв за 105 °C у сушильній шафі, обробляли 10% спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти та висушували їх у потоці теплого повітря упродовж 10–15 хвилин. Хлороформний розчин проби ліпідів наносили на пластинку мікродозатором у кількості, яка не перевищувала 200 мкг ліпідів, після чого повільно поміщали пластинки у хроматографічні камери. Рухомою фазою слугувала суміш гексану, диетилового ефіру та льодяної оцтової (70 : 30 : 1). Одержані хроматограми проявляли в камері, насиченій парами йоду, для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти та очищені стандарти. У процесі роботи виявлено такі класи ліпідів: фосфоліпіди, діацилгліцеролі, триацилгліцеролі та неетерифіковані жирні кислоти (Stefanyk et al., 1985).

Кількість неполярних ліпідів визначали за допомогою біхроматного методу (Prokhorova, 1982) – до проби ліпідів додавали 1 N розчин біхромату калію та концентровану сульфатну кислоту. Ліпіди у досліджуваних зразках спалювали за температури 160–180 °C. Вимірювали інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 615 нм. Визначали вміст окремих класів ліпідів за калібрувальною кривою. Вміст фосфоліпідів визначали методом Васковського: за температури 180 °C концентрованою хлорною кислотою проводили мінералізацію фосфоліпідів, а оптичну густину розчину визначали за допомогою спектрофотометра (Stefanik, 1985; Vaskovsky et al., 1985).

Активність гліцерол-3-фосфатацилтрансферази (КФ 2.3.1.15) визначали за Yang et al. (2015). Вихідну суспензію водорості розтирали у фарфоровій посудині та інкубували у скляних колбах за 20 °C та освітлення 2 500 лк із 184 кБк ^{14}C -олеатом ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$) із 0,6 мМ гліцерол-3-фосфатом, тритоном X-100, 2 мМ MgCl_2 протягом 60 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 10% трихлороцтової кислоти. Далі центрифугували та з отриманого осаду екстрагували ліпіди методом Нічолса в модифікації (Stefanyk et al., 1985; Lutsiv & Grubinko, 2012). Отримані зразки авторадіографували. Одержані експериментальні дані опрацьовані методами варіаційної статистики за допомогою програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA).

Результати

Внесені у середовище мікроелементи зумовлюють часткову перебудову ліпідного метаболізму, насамперед змінюють вміст ліпідів різних класів (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість загальних ліпідів в аліквоті культури *Ch. vulgaris* і вміст ліпідів

різних класів у них за дії натрій селеніту (10,0 мг Se(IV) /дм³) окремо та спільно з Zn^{2+} і Cr^{3+} – по 5,0 мг/дм³ (мг, 7 діб, $M \pm m$, $n = 5$)

Варіанти досліджу з мікроелементами	Загальна кількість ліпідів	Триацилгліцеролі	Діацилгліцеролі	Неетерифіковані жирні кислоти	Фосфоліпіди
Контроль	7,74 $\pm$ 0,41	1,65 $\pm$ 0,40	1,01 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,08*	4,10 $\pm$ 0,38
Se(IV)	8,38 $\pm$ 0,51	1,68 $\pm$ 0,23	0,83 $\pm$ 0,04*	0,97 $\pm$ 0,04*	4,91 $\pm$ 0,34
Se(IV)+Zn ²⁺	8,79 $\pm$ 1,22	1,56 $\pm$ 0,13*	1,31 $\pm$ 0,28	1,47 $\pm$ 0,12*	4,45 $\pm$ 0,26*
Se(IV)+Cr ³⁺	8,51 $\pm$ 0,41*	2,91 $\pm$ 0,13**	0,86 $\pm$ 0,03*	1,19 $\pm$ 0,04**	3,54 $\pm$ 0,12*

Примітка: * – $P < 0,10$, ** – $P < 0,05$, різниця вірогідна порівняно з контролем.

За впливу натрію селеніту окремо та за спільної дії з іонами цинку та іонами хрому загальний вміст ліпідів у клітинах *Ch. vulgaris* зростає на 8,9%, 13,6% та 10,1%, відповідно. При цьому в експериментальних системах практично не змінюється щодо контролю вміст триацилгліцеролів за дії селеніту окремо та спільно із цинком, тоді як за спільної дії із хромом кількість триацилгліцеролів у хлорели збільшується на 76,4%. Щодо вмісту діацилгліцеролів у клітинах водорості, тут виявлені такі зміни: за впливу натрію селеніту окремо їх кількість зменшується на 17,8%, за спільної його дії з іонами цинку вміст діацилгліцеролів зростає щодо контролю на 29,7%, а за спільної дії селеніту та хрому – знижується на 14,9%. Зазнає змін також вміст фосфоліпідів у *Ch. vulgaris*: за впливу натрію селеніту окремо та спільної його дії з іонами цинку їх вміст відповідно зростає на

19,8% та 9,5% щодо контролю, а за спільної дії селеніту та хрому – знижується на 13,7%. Відповідно до виявлених тенденцій змінюється вміст неетерифікованих жирних кислот: за впливу натрію селеніту спільно з іонами цинку та з іонами хрому зростає, відповідно, на 48,5% та 20,2% порівняно з контрольними показниками, а за дії селеніту окремо практично не відрізняється від величини контролю.

Для оцінювання інтенсивності метаболізму загалом та ліпогенезу зокрема ми дослідили включення ^{14}C -бікарбонату в органічні сполуки клітин *Ch. vulgaris* (рис. 1).

Включення ^{14}C -бікарбонату у вуглеводи, протеїни та ліпіди *Ch. vulgaris* суттєво відрізняється як у контролі, так і за дії досліджених чинників, однак зберігається переважання включення у ліпіди у 2–3 рази відносно інтенсивності включення мітки у

вуглеводи. Включення мітки у протеїни теж виявилося меншим – у 9–12 разів відносно інтенсивності включення мітки в ліпіди за дії всіх досліджуваних мікроелементів. За культивування водорості у середовищі з мікроелементами цей процес інтенсифікується. Якщо тенденція до зростання включення міченого бікарбонату у вуглеводи має місце тільки за спільної дії натрію селеніту та з іонами цинку, то процес включення міченого бікарбо-

нату у протеїни активно відбувається в усіх випадках мікроелементної дії. Стосовно ліпідів водорості, у цьому випадку інтенсивність включення ^{14}C -бікарбонату достовірно стимулює всі використані суміші іонів: натрій селеніт окремо активує включення на 29,7%, спільно з іонами цинку – на 37,0%, а з іонами хрому – на 35,6% щодо контролю. Дія іонів металів на фоні селеніту посилює інтенсивність процесу на 9,2% для обох металів.

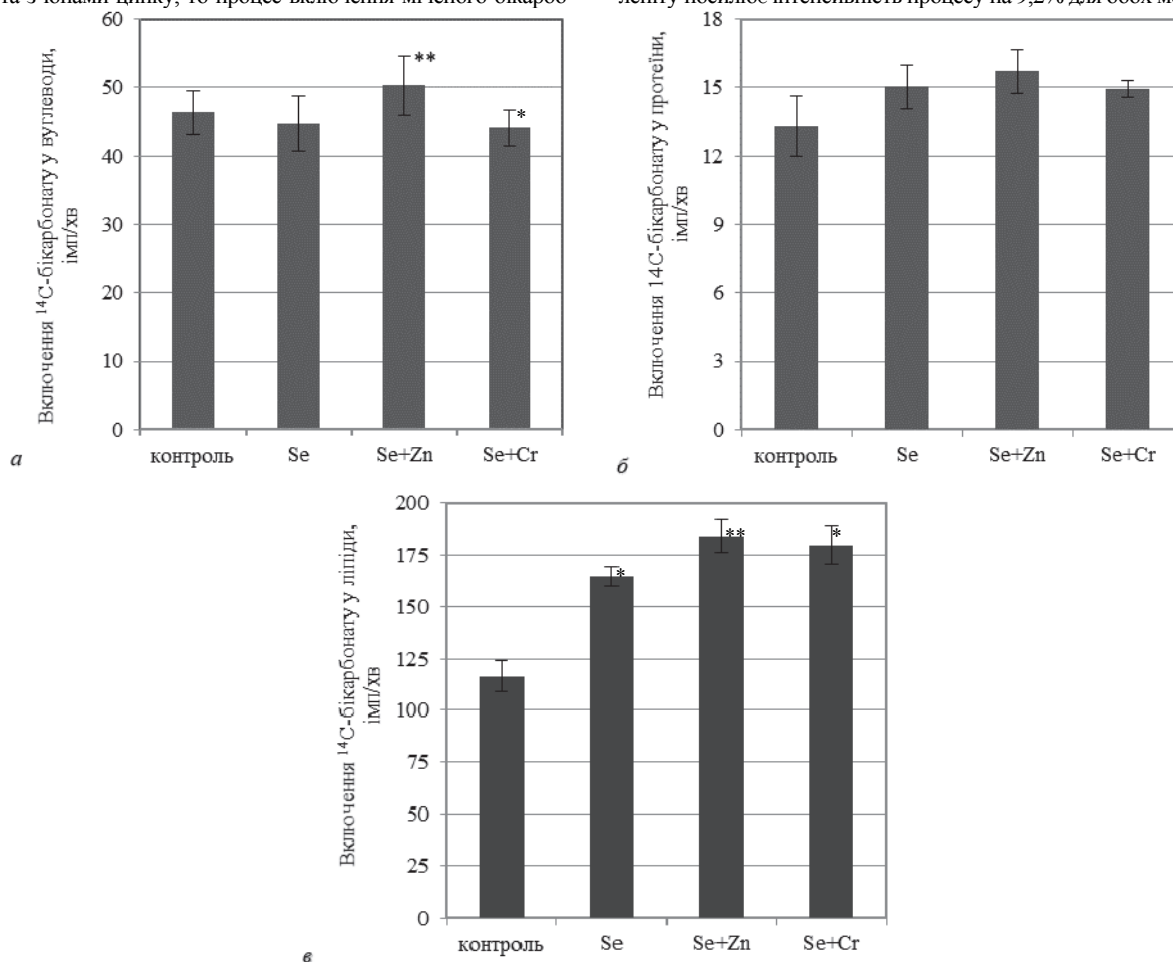


Рис. 1. Інтенсивність включення ^{14}C -бікарбонату в органічні сполуки клітин *Ch. vulgaris* за дії натрій селеніту (10,0 мг $\text{Se(IV)}/\text{дм}^3$) окремо та спільно із Zn^{2+} і Cr^{3+} – по 5,0 мг/дм 3 , імпл./хв·мг сухої маси, $M \pm m$, $n = 3$: а – вуглеводи; б – протеїни; в – ліпіди; * – $P < 0,10$, ** – $P < 0,05$ різниця вірогідна порівняно з контролем

У зв'язку з виявленим ефектом становить інтерес дослідження включення ^{14}C -бікарбонату до складу окремих класів ліпідів клітин *Ch. vulgaris* (табл. 2).

Таблиця 2

Інтенсивність включення ^{14}C -бікарбонату в окремі класи ліпідів у *Ch. vulgaris* за дії натрій селеніту (10,0 мг $\text{Se(IV)}/\text{дм}^3$) окремо та спільно з Zn^{2+} і Cr^{3+} – по 5,0 мг/дм 3 (імпл./хв·мг сухої маси ліпідів, $M \pm m$, $n = 5$)

Варіанти дослідів з мікроелементами	Триацил-гліцероли	Діацил-гліцероли	Неестерифіковані жирні кислоти	Фосфоліпіди
Контроль	86,38 ± 5,41	68,21 ± 1,86	14,49 ± 0,45	69,85 ± 3,21
Se(IV)	88,11 ± 7,09	68,09 ± 3,28	15,89 ± 0,09*	87,82 ± 5,11*
Se(IV) + Zn^{2+}	70,64 ± 4,47*	55,21 ± 3,76*	20,58 ± 1,12**	72,89 ± 3,11
Se(IV) + Cr^{3+}	44,47 ± 1,87***	93,59 ± 7,24*	21,07 ± 1,25**	71,58 ± 1,37**

Примітка: * – $P < 0,10$, ** – $P < 0,05$, *** – $P < 0,001$, різниця вірогідна порівняно з контролем.

У контролі максимальне включення мітки спостерігаємо в триацилгліцероли, рівною мірою в діацилгліцероли та фосфоліпіди, практично у 2 рази менше в неестерифіковані жирні кислоти. В усіх варіантах дії мікроелементів на клітини *Ch. vulgaris* загаль-

на тенденція щодо включення ^{14}C -бікарбонату в різні класи ліпідів зберігається, однак знижується частка її включення у триацилгліцероли, особливо за спільної дії натрію селеніту та іонів хрому (на 48,5%). Разом із тим, інтенсивність включення мітки в діацилгліцероли порівняно з контрольними показниками за дії селеніту окремо практично не змінюється, за спільної дії селеніту іонами цинку дещо зменшується (на 19,1%), але значно зростає (на 37,2%) за спільної дії натрію селеніту та іонів хрому. Щодо включення міченого бікарбонату в неестерифіковані жирні кислоти, то за дії селеніту окремо порівняно з контролем інтенсивність збільшується лише на 9,7%, тоді як, за спільної присутності селеніту з іонами цинку та селеніту з іонами хрому інтенсивність включення міченого елемента зростає відповідно на 42,0% та 45,4% в обох випадках. Інтенсивність включення ^{14}C -бікарбонату у фосфоліпіди хлорели порівняно з контролем має тенденцію до збільшення в усіх досліджуваних варіантах дослідів: за дії селеніту окремо – на 25,8%, за спільної дії селеніту із цинком і селеніту з хромом – до 5%.

Активізація ліпогенезу за дії сполук селену, цинку та хрому підтвердилася здебільшого зростанням інтенсивності включення ^{14}C -олеату в різні класи ліпідів клітин хлорели та підвищення активності гліцерол-3-фосфатацилтрансферази – одного з ключових ферментів біосинтезу ліпідів (рис. 2, 3), активність якого оцінювали за включенням у ліпіди ^{14}C -олеату.

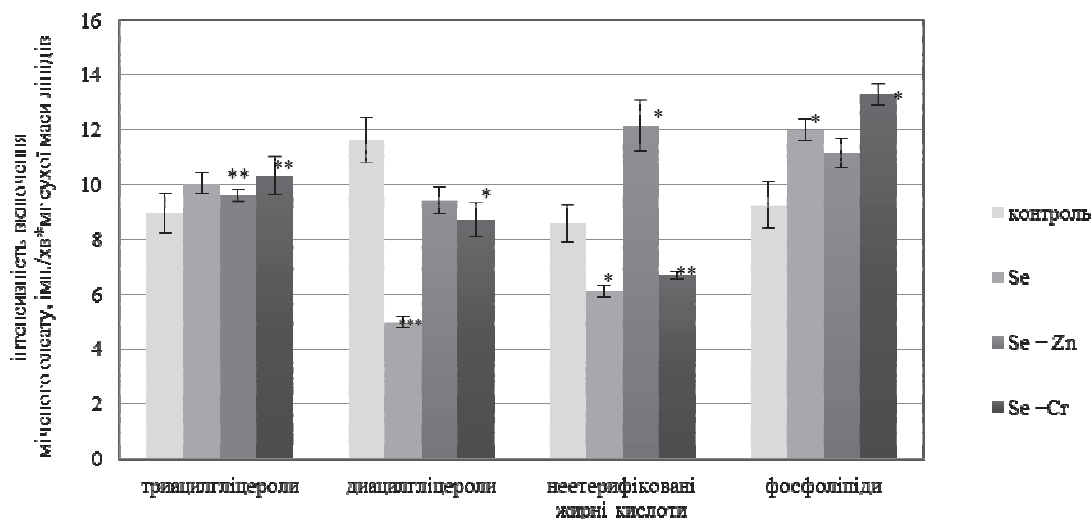


Рис. 2. Інтенсивність включення ^{14}C -олеату у *Ch. vulgaris* у ліпіді різних класів за дії натрій селеніту ($10,0 \text{ мг Se(IV)/дм}^3$) окремо та спільно з Zn^{2+} і Cr^{3+} – по $5,0 \text{ мг/дм}^3$, імпл./хв*мг сухої маси ліпідів ($M \pm m$, $n = 5$): * – $P < 0,10$, ** – $P < 0,05$, *** – $P < 0,001$, різниця вірогідна порівняно з контролем

Інтенсивність включення ^{14}C -олеату до складу триацилгліцеролів *Ch. vulgaris* вища порівняно з контролем на 11,9% за дії селеніту окремо, на 7,1% – за спільної дії селеніту та цинку та на 15,2% – за спільної дії селеніту та хрому. Аналогічний процес спостерігали щодо фосфоліпідів: інтенсивність включення міченого олеату більша, ніж у контролі, на 29,6%, 20,8% та 43,9% відповідно за дії селеніту окремо, спільної дії селеніту з цинку та селеніту із хромом. Однак використання ^{14}C -олеату у процесі утворення діацилгліцеролів у клітинах водорості зменшується за дії всіх мікроелементів. При цьому за дії лише селеніту зміни виявилися помітнішими (на 57,1% менше контролю), ніж за дії селеніту з металами: на 18,9% менше за дії з цинком та на 24,9% менше за дії із хромом.

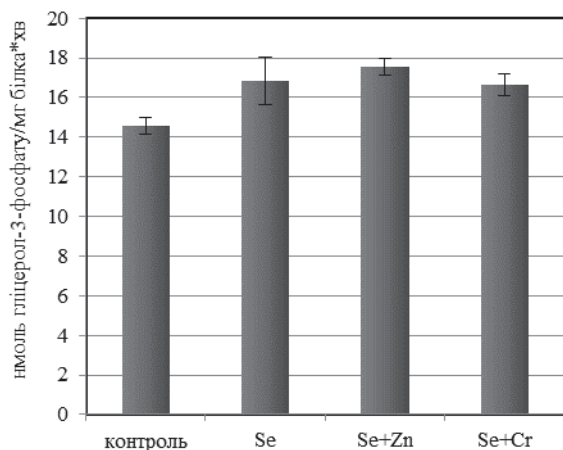


Рис. 3. Активність гліцерол-3-фосфатацилтрансфери у *Ch. vulgaris* за дії натрій селеніту ($10,0 \text{ мг Se(IV)/дм}^3$) окремо та спільно із Zn^{2+} і Cr^{3+} – по $5,0 \text{ мг/дм}^3$ (нмоль Г-3-Ф/мг білка*хв, $M \pm m$, $n = 5$): * – $P < 0,10$, різниця вірогідна порівняно з контролем

Щодо нетерифікованих жирних кислот, то дія селеніту окремо та селеніту із хромом зумовлює зменшення процесу включення міченого олеату до їх складу відповідно на 28,8% та 22,0% порівняно з показниками контролю, тоді як за спільної дії селеніту та цинку має місце підвищення інтенсивності включення мітки на 41,5% відносно контролю.

Щодо реакційної здатності ензиму гліцерол-3-фосфатацилтрансфери у хлорелі, яка регулює синтез діацилгліцеролів, а відтак і триацилгліцеролів, то в усіх варіантах досліджує має місце зростання її активності. За впливу селеніту окремо її активність збільшується на 15,4% порівняно з контролем, а на фоні додат-

кової мікроелементної дії активність Г-3-ФАТ більша на 20,3% за впливу із цинком і на 14,1% – за впливу із хромом відносно контрольної величини.

Обговорення

Загальною тенденцією впливу досліджуваних мікроелементів виявилися чіткі кількісні та якісні зміни вмісту окремих класів ліпідів у клітинах *Ch. vulgaris*. Перерозподіл класів ліпідів у клітинах хлорелі відбувається за дії натрію селеніту на користь фосфоліпідів за рахунок зменшення частки діацилгліцеролів, тоді як кількість триацилгліцеролів і нетерифікованих жирних кислот практично не змінюються. За дії натрію селеніту та іонів цинку зростає відносний вміст діацилгліцеролів, нетерифікованих жирних кислот і фосфоліпідів за незначного зниження частки триацилгліцеролів. Спільна дія натрію селеніту та іонів хрому зумовлює суттєве зростання відносного вмісту триацилгліцеролів і частково нетерифікованих жирних кислот за зниження частки у клітинах водорості діацилгліцеролів і фосфоліпідів.

Підвищення вмісту фосфоліпідів у клітинах хлорелі узгоджується з даними про його зростання за стресових ситуацій (Chirkova, 1997; Rozentsvet et al., 2005), і, очевидно, пояснюється тим, що ці ліпіди одні з чинників зміни плинності мембран за фізико-хімічних змін клітинного оточення (Kostyuk & Grubinko, 2012). Збільшенням вмісту діацилгліцеролів і нетерифікованих жирних кислот пояснюється активацією ліпаз за стресової дії факторів середовища (Schmid & Ohlrogge, 2002; Richmond & Hu, 2013). Іони хрому, ймовірно, здійснюють перебудову метаболізму ліпідів на користь триацилгліцеролів як наслідок адаптивної стабілізації мембран для запобігання проникнення цього токсиканту у клітини.

Відмічене зниження включення бікарбонату до триацилгліцеролів *Ch. vulgaris* та його зростання у фосфоліпідах і нетерифікованих жирних кислотах за дії мікроелементів, окрім іонів хрому, які модифікували включення мітки до діацилгліцеролів, може виявитися наслідком специфічної токсикогенності іонів важких металів (Rozentsvet et al., 2005; Chia et al., 2013; Chen et al., 2017).

Включення міченого олеату до складу триацилгліцеролів свідчить про зростання їх біосинтезу, а також має місце зниження біосинтезу діацилгліцеролів і тенденція до зростання біосинтезу фосфоліпідів у всіх випадках дії мікроелементів щодо контролю. Включення мітки олеату в нетерифіковані жирні кислоти – наслідок зміни пулу жирних кислот, пов'язаний з активацією ліпідного метаболізму за дії солей селену, цинку та хрому. Вищі жирні кислоти – одні з найбільшійших компонентів клітин водоростей, їх склад забезпечує первинну відповідь і адаптивні реакції організму та може змінюватися залежно від умов середови-

ща (Schmid & Ohlroge, 2002; Kelly et al., 2016). Біосинтез ліпідів у рослин, у тому числі й у водоростей, локалізований переважно у пластидах (Schmid & Ohlroge, 2002; Chen et al., 2017). Синтез більшості ліпідних жирних кислот *de novo* відбувається у хлоропластах, цитозоль клітин рослин, на відміну від тваринних організмів, у синтезі жирних кислот участі не бере. У ньому функціонує система модифікації ацильного ланцюга синтезованих у пластидах жирних кислот, що транспортуються на ендоплазматичний ретикулум завдяки ацилтрансферазам, утворюючи при цьому жирні кислоти, що використовуються у біосинтезі восків і запасних ліпідів (Dogmann, 2007), тобто переважно адаптивних форм ліпідів. Олеат виступає попередником і складовою частиною багатьох жирних кислот, які включаються до складу гліцероліпідів (Metzler, 2003). Щодо основного компонента клітинних мембран – фосфоліпідів, зростання інтенсивності включення ^{14}C -олеату свідчить про активацію мембранних процесів і формування токсикорезистентності клітин водорості до дії досліджуваних мікроелементів. Виявлена закономірність співвідноситься з результатами щодо збільшення кількості ліпідів (табл. 1) і фактом активного ліпогенезу у хлорели (Harwood & Guschina, 2009; Widjaja et al., 2009).

За включення олеату активується гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза – перший мембранозв'язаний ензим, що ініціює процес біосинтезу триацилгліцеролів шляхом Кеннеді при передаванні ацильної групи від ацил-CoA або ацил-АПБ (в пластидах) в $\text{S}_{\text{H}-1}$ або $\text{S}_{\text{H}-2}$ положення гліцерол-3-фосфату (Wang et al., 2004). Гліцерол-3-фосфатацилтрансфераза володіє високою специфічністю до субстрату, особливо до залишку мононенасиченої олеїнової кислоти як донора ацильної групи (Tumbull et al., 2001). Синтезовані продукти, очевидно, вступають у подальші реакції біосинтезу окремих класів ліпідів (триацилгліцеролів і фосфоліпідів), про що свідчить досить висока активність гліцерол-3-фосфатацилтрансферази та тенденція до її зростання за впливу мікроелементів. Цей факт співвідноситься з підтриманням клітинами стаціонарного вмісту триацилгліцеролів і фосфоліпідів у клітинах хлорели. Висока активність гліцерол-3-фосфатацилтрансферази також пов'язана з формуванням адаптивних відповідей, насамперед, зі зростанням вмісту у клітинних мембранах окремих (адаптивних) класів ліпідів (Kostyuk & Grubinko, 2012; Lutsiv & Grubinko, 2012). Ліпідний склад клітин за дії стресових чинників значно змінюється, а за адаптації гідробіонтів до екстремальних чинників середовища в клітинах змінюється не тільки співвідношення окремих класів ліпідів, а і їх жирнокислотний склад (Morash et al., 2009; Lv Jian et al., 2010; Chia et al., 2013). Дослідження Kostyuk & Grubinko (2012) свідчать про компенсаторно-адаптивні зміни в мембранах водних рослин, у тому числі *Chlorella vulgaris*, за дії чинників середовища існування. Один із важливих механізмів модифікації ліпідного метаболізму – біосинтез фосфоліпідів (Krebs, 1981).

Загальний механізм формування токсикорезистентності у водних рослин до дії чинників супроводжується зростанням кількості фосфоліпідів, бо саме їх вміст впливає не тільки на плинність мембран, а і на формування мікросередовища для мембранних ензимів, іонних каналів, а також даний підклас ліпідів регулює зв'язок клітин із зовнішнім середовищем (Abbas & Card, 1980). Інтенсивність цього процесу можлива завдяки високій сорбційній здатності заряджених фосфоліпідів (Wang et al., 2004), або ж виконанням ними функції месенджерів, які передають інформацію всередину клітини про зміни навколишнього середовища (Vigh et al., 1988). Первинними компенсаторними відповідями на стрес чи зміни фізико-хімічних параметрів середовища вирощування виступають зміни ступеня ненасиченості жирних кислот фосфоліпідів, що може порушувати плинність мембрани або інші її фізичні характеристики (Schmid & Ohlroge, 2002; Wang et al., 2004; Rozetsvet et al., 2005).

Щодо перерозподілу вмісту та біосинтезу ліпідів інших класів, такі зміни розвиваються повільніше. Підвищення вмісту триацилгліцеролів – один із чинників стабілізації клітинних мембран (Lewis & McElhaney, 2000) з одночасним процесом ущіль-

нення та зменшення їх плинності (Dyatlovitskaya & Bezuglov, 1998). Оскільки триацилгліцеролі – основний запасний енергетичний субстрат, збільшення їх вмісту свідчить про підвищення енергетичних потреб, що виникають у результаті дії змін навколишнього середовища. Для того, щоб забезпечити клітину необхідним енергетичним матеріалом, активується ліполіз, а рівень триацилгліцеролів після початкового підвищення їх вмісту зменшується.

Висновки

Дослідження показало можливість регуляції метаболізму в бік посилення біосинтетичних процесів в одноклітинній зеленій водорості *Ch. vulgaris* в умовах аквакультури з метою отримання елементліпідних сполук – перспективних фармацевтичних препаратів комплексного типу. За дії мікроелементів Se (IV) у концентрації (10 мг/дм³) окремо та спільно з Zn^{2+} (5 мг/дм³) і Cr^{3+} (5 мг/дм³) упродовж 7 діб мало місце збільшення загальної кількості ліпідів до 13% порівняно з контролем. Перерозподіл класів ліпідів у клітинах хлорели відбувається за дії натрію селеніту на користь фосфоліпідів за рахунок зменшення частки діацилгліцеролів, тоді як кількість триацилгліцеролів і нетерифікованих жирних кислот практично не змінюються. За дії натрію селеніту та іонів цинку зростає відносний вміст діацилгліцеролів, нетерифікованих жирних кислот і фосфоліпідів за незначного зниження частки триацилгліцеролів. Спільна дія натрію селеніту та іонів хрому зумовлює суттєве зростання відносного вмісту триацилгліцеролів та частково нетерифікованих жирних кислот за зниження частки у клітинах водорості діацилгліцеролів і фосфоліпідів. Включення ^{14}C -бікарбонату у *Ch. vulgaris* відбувається у 2–3 рази інтенсивніше в ліпіди, ніж у вуглеводи, та у 9–12 разів – ніж у протеїни за всіх варіантів дослідів. Зростання інтенсивності включення міченого бікарбонату у вуглеводи має місце тільки за спільної дії натрію селеніту та іонів цинку, у протеїни та ліпіди – в усіх випадках мікроелементної дії.

Загальна тенденція – зниження включення бікарбонату до триацилгліцеролів *Ch. vulgaris* та його зростання у фосфоліпідах і нетерифікованих жирних кислотах. Активація ліпогенезу за дії сполук селену, цинку та хрому підтвердилася здебільшого зростанням інтенсивності включення ^{14}C -олеату в різні класи ліпідів клітин хлорели та підвищення активності гліцерол-3-фосфатацилтрансферази. Спрямування та регуляція ліпідного метаболізму *Ch. vulgaris* у напрямку збільшення кількості та накопичення ліпідів та їх окремих класів за допомогою натрій селеніту спільно з Zn^{2+} та Cr^{3+} з метою утворення селенметаліпідних комплексів можна використати для одержання ліпідних біологічно активних препаратів, збагачених есенційними мікроелементами.

References

- Abbas, C. A., & Card, G. L. (1980). The relationship between growth temperature, fatty acid composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 602(3), 469–476.
- Abd, E. B., & El-Baroty, G. S. (2013). Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *Journal of Aquatic Science*, 1(1), 11–23.
- Agatonovic-Kustrin, S., & Morton, D. W. (2013). Cosmeceuticals derived from bioactive substances found in marine algae. *Oceanography*, 1(2), 106.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476–1493.
- Brownley, K. A., Boettiger, C. A., Young, L. A., & Cefalu, W. T. (2015). Dietary chromium supplementation for targeted treatment of diabetes patients with comorbid depression and binge eating. *Medical Hypotheses*, 85(1), 45–48.
- Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J.-S., Bai, F., & Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products: Review. *Biore-source Technology*, 244, 1198–1206.
- Chen, C. Y., & Chou, H. N. (2002). Screening of red algae filaments as a potential alternative source of eicosapentaenoic acid. *Marine Biotechnology*, 4(2), 189–192.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Gracé, M., Melro, G., & Parrish, C. C. (2013). Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function

- of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*, 128–129, 171–182.
- Chirkova, T. V. (1997). Kletochnye membrany i ustoychivost rasteniy k stressovym vozdeystviyam [Cell membranes and plant resistance to stress effects]. *Soros Journal of Education*, 9, 12–17 (in Russian).
- Croft, M. T., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2006). Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell*, 5(8), 1175–1183.
- Dörmann, P. (2007). Lipid synthesis, metabolism and transport. In: R. R. Wise, & J. K. Hooper (Eds.). *The structure and function of plastids*. Springer, Dordrecht (Netherlands). Pp. 335–353.
- Dyatlovitskaya, E. V., & Bezuglov, V. V. (1998). Lipidy kak bioeffektory [Lipids as bioeffectors]. *Biochemistry*, 63(1), 3–5 (in Russian).
- El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1–25.
- Fernando, I. P., Kim, M., Son, K. T., Jeong, Y., & Jeon, Y. J. (2016). Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: A mechanistic approach. *Journal of Medicinal Food*, 19(7), 615–628.
- Ganguly, R., Wen, A. M., Myer, A. B., Czech, T., Sahu, S., Steinmetz, N. F., & Raman, P. (2016). Anti-atherogenic effect of trivalent chromium-loaded CPMV nanoparticles in human aortic smooth muscle cells under hyperglycemic conditions *in vitro*. *Nanoscale*, 8(12), 6542–6554.
- Haq, I., Muhammad, A., & Hameed, U. (2014). Comparative assessment of *Cladophora*, *Spirogyra* and *Oedogonium* biomass for the production of fatty acid methyl esters. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(1), 69–72.
- Hamedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2011). Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *Journal Phycology*, 47(2), 218–232.
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679–684.
- Hokin, L. E., & Hexum, T. D. (1972). Studies on the characterization of the sodium – potassium transport adenosine triphosphatase: IX on the role of phospholipids in the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151(2), 453–463.
- Hua, Y., Clark, S., Ren, J., & Sreejayan, N. (2012). Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(4), 313–319.
- Jain, S. K., Rains, J. L., & Croad, J. L. (2007). High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. *Antioxidants and Redox Signaling*, 9, 1581–1590.
- Kelly, A. A., Kalisch, B., Hölzl, G., Schulze, S., Thiele, J., Melzer, M., Dörmann, P. (2016). Synthesis and transfer of galactolipids in the chloroplast envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy Science USA*, 113(38), 10714–10719.
- Khan, S. A., Rashmi, H., Mir, Z., Prasad, S., & Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 2361–2372.
- Kim, S. K. (2013). *Marine nutraceuticals: Prospects and perspectives*. CRC Press, Boca Raton.
- Kim, S., Kim, J., Lim, Y., Kim, Y. J., Kim, J. Y., & Kwon, O. (2016). A dietary cholesterol challenge study to assess *Chlorella* supplementation in maintaining healthy lipid levels in adults: A double-blinded, randomized, placebo controlled study. *Nutrition Journal*, 15, 54.
- Köhre, J., Brigelius-Flohé, R., Böck, A., Gärtner, R., Meyer, O., & Flohé, L. (2000). Selenium in biology: Facts and medical perspectives. *Biological Chemistry*, 381(9–10), 849–864.
- Kostiuk, K. V., & Grubinko, V. V. (2012). Change of composition of the cellular membranes of the aquatic plants under the impact of toxic substances. *Hydrobiological Journal*, 48(4), 75–92.
- Kreps, E. M. (1981). Lipidy kletochnyh membrane [Lipids of cell membranes]. Science, Leningrad (in Russian).
- Kuznetsov, V. V., Kuznetsov, V. V., & Romanov, G. A. (Eds.). (2012). *Molekulyarno-geneticheskie i biokhimicheskie metody v sovremennoy biologii rasteniy* [Molecular-genetic and biochemical methods in modern plant biology]. Binom, Moscow (in Russian).
- Lee, H. S., & Kim, M. K. (2009). Effect of *Chlorella vulgaris* on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet. *Journal of Medicinal Food*, 12(5), 1029–1037.
- Lewis, R. N. A. H., & McElhaney, R. N. (2000). Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming properties of lipid bilayer membranes: Calorimetric and ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids. *Biophysical Journal*, 79(3), 1455–1464.
- Lu, Y., & Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in Plant Science*, 20(5), 273–282.
- Lukashiv, O. Y., Bodnar, O. I., Vinyarska, H. B., & Grubinko, V. V. (2016). Vplyv selen-khrom-lipidnoi substansii iz *Chlorella vulgaris* Biej. na oksydatyvnyi status shchuriv [Effect of selenium-chromium-lipid substance on *Chlorella vulgaris* Biej. the oxidative status of rats]. *Medical and Clinical Chemistry*, 18(2), 28–33 (in Ukrainian).
- Lutsiv, A. I., & Grubinko, V. V. (2012). Localization of the lipids' synthesis in *Chlorella vulgaris* under the impact of lead and zinc ions and diesel fuel. *Hydrobiological Journal*, 48(6), 95–106.
- Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., & Chen, H.-L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101, 6797–6804.
- Metzler, D. (2003). *Biochemistry: The chemical reactions of living cells*. Academic Press, New York-London.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Science*, 15(2), 160–176.
- Michalak, I., Chojnacka, K., & Saeid, A. (2017). Plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO₂ algal extracts. *Molecules*, 22(1), 66.
- Morash, A. J., Bureau, D. P., & McClelland, G. B. (2009). Effects of dietary fatty acid composition on the regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT)I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152(1), 85–93.
- Odjadjare, E. C., Mutanda, T., & Olaniran, A. O. (2017). Potential biotechnological application of microalgae: A critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), 37–52.
- Park, J. B., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35–42.
- Park, J. K. (2015). Algal polysaccharides: Properties and applications. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4, 176.
- Perales-Vela, H. V., Pena-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64, 1–10.
- Prokhorova, M. I. (Ed.). (1982). *Metody biokhimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskii obmen)* [Methods of biochemical studies (lipid and energy metabolism)]. Leningrad University Press, Leningrad (in Russian).
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N. A., Sridhar, S., & Rengasamy, R. A. (2008). Perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2), 77–88.
- Richmond, A., & Hu, Q. (Eds.). (2013). *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd., Oxford.
- Romanenko, V. D. (Ed.). (2004). *Osnovy gidroekologii* [Fundamentals of hydroecology]. Geneza, Kyiv (in Ukrainian).
- Rozentsvet, O. A., Murzaeva, S. V., & Gushchina, I. A. (2005). Rol' membrannykh lipidov v ustoychivosti *Potamogeton perfoliatus* L. k izbytku kadmiiya v vode [The role of membrane lipids in the resistance of *Potamogeton perfoliatus* L. to excess of cadmium in water]. *Biology Bulletin*, 32(2), 232–239 (in Russian).
- Ryu, N., Lim, Y., Park, J. E., Kim, J. E., Kwon, S. W., & Kwon, O. (2014). Impact of daily *Chlorella* consumption on serum lipid and carotenoid profiles in mildly hypercholesterolemic adults: A double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Nutrition Journal*, 13(1), 57.
- Schmid, K. M., & Ohlrogge, J. B. (2008). Lipid metabolism in plants. In: D. E. Vance & J. E. Vance (Eds.). *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier Science B.V. Pp. 98–130.
- Shalaby, E. A. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling Behavior*, 6(9), 1338–1350.
- Skrivan, M., Skrivanova, V., Dlouha, G., Branyikova, I., Zachleder, V., & Vitova, M. (2010). The use of selenium-enriched alga *Scenedesmus quadricauda* in chicken diet. *Czech Journal Animal Science*, 55(12), 565–571.
- Stefanik, M. B., Skorokhid, V. I., & Eliseeva, O. P. (1985). Tonkoslojinnaya i gazozhydkostnaya chromatografiya lipidov [Thin-layer and gas-liquid chromatography of lipids]. LGU, Lvov (in Russian).
- Tang, G., & Suter, P. M. (2011). Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella* and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 1, 111–118.
- Turnbull, A. P., Rafferty, J. B., Sedelnikova, S. E., Slabas, A. R., Schierer, T. P., Kroon, J. T., Rice, D. W. (2001). Analysis of the structure, substrate specificity, and mechanism of squash glycerol-3-phosphate (1)-acyltransferase. *Structure*, 9, 347–353.
- Vaskovsky, V. E., Kostetsky, E. V., & Vasendin I. M. (1985). A universal reagent for phospholipids analysis. *Journal of Chromatography*, 114(1), 129–141.
- Vigh, L., Horvath, I., & Thompson, G. A. (1988). Recovery of *Dunaliella salina* cells following hydrogenation of lipids in specific membranes by a homogeneous palladium catalyst. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes*, 937(1), 42–50.
- Vincent, J. B. (2013). Chromium: Is it essential, pharmacologically relevant, or toxic? *Metal Ions Life Sciences*, 13, 171–198.
- Vovk, S. I., & Yanovich, V. G. (1988). Issledovanie sinteza belkov v tkanyakh selskokhozjaistvennykh zhivotnykh (metodicheskie rekomendatsii) [Investigation of protein synthesis in tissues of agricultural animals (guidelines)]. Unii, Lvov (in Russian).

- Wang, L., Zhou, Q., & Chua, H. (2004). Contribution of cell outer membrane and inner membrane to Cu^{2+} adsorption by cell envelope of *Pseudomonas putida* 5-x. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 39(8), 2071–2080.
- Widjaja, A., Chien, C.-C., & Ju, Y.-H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40(1), 13–20.
- Wrobel, J. K., Power, R., & Toborek, M. (2016). Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB Life*, 68(2), 97–105.
- Yang, J., Cao, J., Xing, G., & Yuan, H. (2015). Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, 175, 537–544.



Isolation of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* from beef and swine carcasses and the characterization of their genes

O. M. Berhilevych*, V. V. Kasianchuk*, O. M. Deriabin**, M. D. Kukhtyn***

*Sumy State University, Sumy, Ukraine

**State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

***Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 24.03.2018

Received in revised form 20.04.2018

Accepted 23.04.2018

Sumy State University,
Sanatorna st., 31,
Sumy, 40018, Ukraine.
Tel.: +38-067-903-89-96.
E-mail:
o.berhilevych@med.sumdu.edu.ua,
v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua

State Scientific Control Institute
of Biotechnology and Strains
of Microorganisms,
Donetska st., 30,
Kyiv, 03151, Ukraine.
Tel.: +38-097-239-89-96.
E-mail: don.lmb@gmail.com

Ternopil Ivan Puluj National
Technical University,
Ruska st., 56,
Ternopil, 40061, Ukraine.
Tel.: +38-097-239-20-57.
E-mail: kuchtynnic@gmail.com

Berhilevych, O. M., Kasianchuk, V. V., Deriabin, O. M., & Kukhtyn, M. D. (2018). Isolation of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* from beef and swine carcasses and the characterization of their genes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 275–280. doi:10.15421/021840

Escherichia coli is part of the normal microflora of the intestinal tract of humans and warm-blooded animals, but its presence in raw material and food of animal origin is considered as fecal contamination and can be very dangerous for consumers. The determination of the number of *E. coli* in raw material and food is important because among them can be pathogenic strains. The most dangerous strains are considered enterohemorrhagic *E. coli* as a causative agent of severe bloody diarrhea and hemorrhagic uremic syndrome in humans through the production of Shiga-toxin, which is the main virulence factor, responsible for disease. The aim of this study was to identify the prevalence of Shiga toxin-producing strains of *E. coli* (STEC) from swabs of beef and swine carcass in slaughterhouses in Ukraine and characterize their genes, which are responsible for pathogenic properties. A total of 230 samples of swabs from beef (130) and swine (100) carcasses were obtained from 5 slaughterhouses in Ukraine between 2012 and 2015. Samples of swabs from carcasses were randomly selected at the final point of the process after the final washing of the carcass from the following areas: distal hind limb, abdomen (lateral and medial) from swine carcasses, brisket, flank and flank groin areas from beef carcasses. All samples were examined by culture-dependent method, after that each positive isolate of STEC was analyzed by multiplex PCR to detect the *stx1*, *stx2*, and *eae* genes. Out of 230 collected samples, seven (7.2%) were contaminated with STEC. The highest prevalence of STEC was found in swabs from beef carcasses (8.1%) in comparison to swabs from swine carcasses (5.7%). The *stx1* gene was the predominant gene detected in all STEC positive samples. The *eae* gene was found in one of the examined isolates from beef carcass. Three isolates from swabs of beef carcass carried both *stx1* and *stx2* genes, one isolate showed association between *stx1* and *eae* genes, one isolate was positive for *stx1* gene only. In swabs from swine carcasses (2 isolates) *stx1* and *stx2* genes were presented simultaneously. The results of this study suggested that fresh raw meat could be a potential vehicle for transmission of the Shiga toxin-producing strain of *E. coli* to humans. This is the first report of STEC prevalence in beef and swine carcasses in Ukraine and these data will be valuable for microbiological risk assessment and help the appropriate services to develop strategies to mitigate health risk.

Keywords: STEC; beef carcasses; swine carcasses; *stx1*; *stx2*; *eae* genes; multiples PCR

Introduction

Escherichia coli is a bacterium that normally inhabits the intestines of humans and warm-blooded animals. Most strains of *E. coli* are not harmful for them, but some strains are pathogenic causing gastrointestinal infections (Dhama et al., 2013; Ray & Bhunia, 2014; Shuhong et al., 2015; Awadallah et al., 2016). Nowadays, more than 700 different serotypes of *E. coli* have been identified and divided into different serotypes according to their "O" (somatic or lipopolysaccharide) and "H" (flagellar) antigens. Pathogenic strains of *E. coli* are divided into six groups (enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, enteroaggregative and diffuse-adhering) based on their ability to produce toxins and to adhere and to invade intestinal epithelial cells (Rani et al., 2017; Vijayan et al., 2017). But the most pathogenic strains of *E. coli* of all known strains are enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Serogroup O157:H7 of EHEC is the most frequently associated with serious food poisoning, which is accompanied by severe bloody diarrhea, hemorrhagic uremic syndrome (HUS) and can be lethal for humans.

Other serogroups (O26, O45, O103, O111, O121, O145) of EHEC are less common. One of the main characteristics of all of these serogroups is the production of Shiga-toxin (Stx), which is an important virulence factor, responsible for HUS. Because all enterohemorrhagic *E. coli* produce Shiga-toxin, they are also known as Shiga-toxigenic *E. coli* (STEC) or verotoxigenic *E. coli* (VTEC) because of their cytotoxic effect on Vero cells (Momtaz & Jamshidi, 2013; Haugum et al., 2014; Ray & Bhunia, 2014; Sudershan et al., 2014).

There are two types of Shiga-like toxins (*Stx1* and *Stx2*) produced by STEC. Shiga-toxigenic *E. coli* can produce *Stx1* only, *Stx2* only, or both. The production of these toxins is regulated by bacteriophages which carry the *stx* genes and which lysogenize strains of STEC. These bacteriophages are representative of the *Stx*-encoding prophages. For *E. coli* O157:H7, the toxin genes are silent during lysogeny; however, if the phages are induced to enter the lytic cycle, phage and toxin production will occur. Induction to the lytic cycle can occur after exposure of the bacteria to DNA damaging agents, such as low iron conditions, UV light or mitomycin C, or to antibiotics (Puttalingamma et al., 2012; Rashid et al., 2013; Ray &

Bhunia, 2014). In addition to Shiga toxin production, another virulence factor expressed by STEC is intimin. Intimin is a membrane protein produced by all attaching enteric pathogens including STEC as an adherence factor for attachment to the intestinal epithelial cells. The *eae* gene codes produce this protein. STEC also have other adherence factors such as fimbriae, autotransporter, flagella, and EibG and Efa-1 adhesin. The most virulent strains of STEC have all these genes. However, some strains of STEC are capable of having the gene that codes the first toxin (*stx1*), or the gene that codes the second toxin (*stx2*), or both genes (*stx1* and *stx2*) at the same time, or other combinations of three virulence genes (*stx1*, *stx2* and *eae*) (Croxen et al., 2013; Awadallah et al., 2016; Soledad-Cadona et al., 2018).

Humans primarily become infected by Shiga toxin-producing *E. coli* through consumption of food of animal origin (Ju et al., 2012; Montaz & Jamshidi, 2013; Lozinak et al., 2016). Consumption of undercooked ground beef is the main source of infection as the meat can be easily contaminated with cattle feces during slaughter and butchering (Taye et al., 2013; Abdissa et al., 2017; Premarathne et al., 2017; Vijayan et al., 2017; Omoruyi et al., 2018). Although beef meat is considered as the main source of STEC for people, alimentary infections caused by STEC have also been described after consumption of swine meat (Troz-Williams et al., 2012; Tseng et al., 2014).

The disease caused by the toxin usually has very serious consequences for human health and can manifest by three different syndromes: hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS), thrombotic thrombocytopenic purpura and which can even cause death (Majowicz et al., 2014; Smith et al., 2014; ECDC, 2016).

Due to the danger of STEC at the international level and to ensure food safety, it is officially recognized as a requirement to carry out research on the testing of these microorganisms in meat and meat products (Tafida et al., 2014; ECDC, 2016). It is possible to determine STEC by bacteriological methods that include the preenrichment of studied samples in broth with antibiotics, then isolation on agar typical colonies and then serotyping. To control STEC in each country, culture-dependent methods are different, but PCR – methods are the most rapid, sensitive and highly specific. Therefore, development and modifying a general technique of PCR – methods for detection of Shiga toxin-producing strain of *E. coli* are the focus of attention of scientists in different countries. Often, for rapid detection of the presence of several virulence factors of STEC in the samples, polymerase chain reaction (PCR) in multiplex version is used (Puttalingamma et al., 2012; Rantsiou et al., 2012; Haugum et al., 2014; Hara-Kudo et al., 2016).

It should be noted that at present in Ukraine rapid control techniques for STEC, including PCR, have not been developed yet, which is a deterrent to ensuring access of Ukrainian goods to foreign markets, especially the EU. In this regard, it is important to modify or adapt a general specific and rapid method of detection and identification Shiga toxin-producing strains of *E. coli* (STEC).

Therefore, the aim of this study was to identify the presence of the Shiga toxin-producing strains of *E. coli* on beef and swine carcasses in Ukraine and investigate their genetic characteristics. The following tasks were pursued in this study: (i) isolation of STEC from beef and swine carcasses (ii) modification of multiplex PCR method to detect the *stx1*, *stx2*, and *eae* genes (iii) to find out main the genetic characteristics of STEC from beef and pork carcasses.

Materials and methods

Samples collection. The work was performed in the Microbiology Laboratory of Center "Ecomedhim" in Sumy State University (Sumy, Ukraine), in the State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Expertise (Kyiv, Ukraine) and in the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, (Kyiv, Ukraine). A total of 230 samples of swab from beef (130) and swine (100) carcasses were obtained from 5 slaughterhouses in Ukraine (Kyiv (3) and Sumy (2) regions) between 2012 and 2015. Swabs were collected with sterile tampons in sterile saline solution. Area selection of swabs was 100 cm² from each carcass

according to requirements ISO 17604. Samples of swabs from carcasses were selected randomly at the final point of the process after the final processing and washing of the carcass, from the following areas: distal hind limb, abdomen (lateral and medial) from swine carcasses, brisket, flank and flank groin areas from beef carcasses. After sampling, swabs were delivered to the laboratory at 4–5 °C in refrigerator-bags.

Methods of isolation and identification of *E. coli* from samples. Samples were examined for 2–12 hours. Swab samples were examined by standard methods: serial dilutions of samples were plated on the surface of commercial medium "Compact Dry™ EC" for isolation of *E. coli* in Petri dishes (NISSUI pharma). It is a ready-to-use chromogenic medium for performing *E. coli* and coliform counts. Petri dishes with isolates were incubated for 24 h at 37 °C. Interpretation of the results was performed by the following indicators: blue colonies were considered as *E. coli*.

Oligonucleotide primers. Alignment of nucleotide sequences and their homology analysis was performed by the module Clustalx software "Vector NTI" v.10.0.1 (Invitrogen) and Blast-analysis resource www.ncbi.nlm.nih.gov (National Center for Biotechnology Information, USA). Primers for PCR multiplex variant were calculated by the software "Vector NTI" v.10.0.1 and synthesized in the "Lytech" (Russia). Lyophilized primers were diluted to a concentration of 100 pmol/μl "Ultra Pure Distilled Water" (Invitrogen, Cat. # 10977-023, USA) and stored at –20 °C until use. Specific oligonucleotide primers that were used for the detection of STEC are shown in Figure 1.

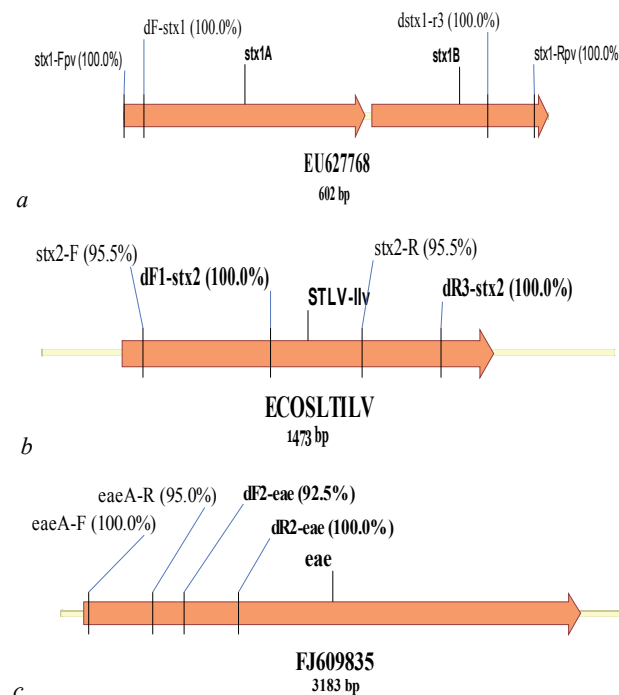


Fig. 1. Specific oligonucleotide primers specific to the toxin gene *stx1* (a), *stx2* (b) and intimin (*eae*) (c) that were used for the detection of *Escherichia coli* (STEC)

DNA isolation. DNA isolation was performed by three different methods: 1st – a colony of *E. coli* cultures was taken in a test tube with 0.5 microliters of sterile deionized water and was heated for 3 minutes at 100 °C, after that the tube was immediately transferred to ice; 2nd – selection using a commercial kit "DNA Sorb-B" (Amplisens, Russia); 3rd – using silica-modified (~ 15 nm) magnetic particles (synthesized and provided by N. Volkova, Institute of Physics and Biophysics NAS) with a concentration of 10 mg ml⁻¹ and saturation magnetization of 37 emu (Am²/kg), purification of bacterial DNA for spectrophotometric analysis was performed using a set of "Ultra Clean DNA Purification Kit" (Cat. # 12500-100; Mobio, USA). The concentration and purity of drugs obtained DNA was measured on a spectrophotometer "NanoDrop 2000c" (USA).

Polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed in thermo-cycles "Tertsyk" (DNA technology, Russia) and "T1" (Biometra, Germany). The reaction was carried out by "hot" start in a volume of 0.025 cm³. In order to minimize the formation of nonspecific dimers primer matrix and its amplification the method of preparation of the reaction mixture with the physical separation of PCR components was used.

To prepare the "lower" reaction mixture, nucleotidtriphosphate (2 mM) was mixed with appropriate primers in one tube at the rate of 0.025 cm³ each (final concentration from each primer 10–15 pmol/sample). After mixing in a vortex, the mixture was dropped in prepared for PCR microtubes in volume 0.005 cm³ in each and on the top of it molten wax in volume 0.015 cm³ was added. After solidification of wax in the tube, the "upper" reaction mixture in volume 0.017 cm³ and 2 drops of mineral oil were added. The "upper" reaction mixture (1 sample calculation) consisted of 0.005 cm³ (x5) PCR buffer; 0.0025 cm³ 50 mM MgSO₄; 0.009 cm³ H₂O MilliQ and 0.0005 cm³ Taq-polymerase (5 units/ml). Samples of bacterial DNA were placed under oil in the volume 0.003 cm³.

Thermal cycling parameters were as follows: 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; and a terminal extension step of 72 °C for 4 min. Negative control was a non-pathogenic *E. coli* strain.

Electrophoretic analysis of PCR products. Analysis of amplification products was performed by separation of DNA fragments in a 1.5% (w/v) agarose gel with containing 0.5 µg/cm³ ethidium bromides (Sigma, USA). Electrophoresis was performed at a constant voltage of 10 V/cm to confirm the presence of the amplified DNA. Location of obtained DNA stripes and their registration was performed by using gel documentation system "Molecular Image Gel Doc XR+" (BioRad, USA).

Results

Modifying of PCR for identification of stx1, stx2 and intimin (eae) genes in isolated STEC. For the modifying of PCR for detection and identification of Shiga toxin-producing *E. coli* in beef and swine carcasses, first we performed research on the products received in PCR with oligonucleotide primers specific to the toxin gene stx1, stx2 and intimin (eae), which are pathogenicity markers for STEC. To design specific oligonucleotide primers, gene sequences in the databases GenBank, EMBL (European Molecular Biology Library), DDBJ (Japanese database nucleotide sequences) and PDB sequences were analyzed. As a basis, the following sequence had been selected: AB647443, AF022236, BA000007, ECOSTLII, AB647559, AB647430, AB647374, AB334567, AJ308552.1, AB647553.1, DQ523611.1, AB647374.1, H19BSLTA, KF771380.1, AB647493.1, AB647432.1, AB647437.1, AB647449.1, DQ523603.1, AB647365.1, EU700490.1, EF441598.1, EF441588.1.

As a basis, we have chosen a pair of oligonucleotide primers for the detection of *E. coli* O157:H7, which had been developed by Puttalingamma et al. (2012). We found that aforementioned primers contain palindromes and loops, and they influence the formation of numerous homo- and heterodimers that generally affect the specificity of the reaction. Simultaneous use of these primers in PCR multiplex option is not effective. The correct choice of oligonucleotide primers is very important because it determines the effectiveness and reproducibility of PCR.

The first task in the development of PCR was to improve the current method of detecting DNA of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) by changing the composition of nucleotide sequences in primers for amplification of specific nucleic acid fragments. The developed primers could be used also in multiplex variant for detection of specific DNA fragments (stx1, stx2 and eae) of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in the samples.

Primer specificity was confirmed in test strains of heterological microorganisms *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasterella multocida* and *Yersinia enterocolitica*. To evaluate specificity and sensitivity of the reaction, optimal annealing temperature of the primers was determined (Fig. 2). To

determine the sensitivity of the developed primers, 10-fold serial dilutions of purified bacterial DNA were prepared. Concentration of purified DNA was determined with a spectrophotometer. Sensitivity for eae gene of O145 strain was 0.220 and 0.021 ng for genes stx1 and stx2 of O157 strain.

Results of isolation and identification of *E. coli* from samples. Among the 230 swabs, a total of 97 *E. coli* isolates (42.2%) with typical cultural properties (blue colonies) was isolated by using commercial medium "Compact Dry" for isolation of *E. coli* in Petri dishes. The study was conducted on 62 isolates from the surfaces of beef and 35 isolates from swine carcasses (Table 1). More positive samples were detected from surfaces of beef (47.7%) than from swine carcasses (35.0%).

Table 1

Results of isolated *E. coli* from the examined samples (n = 230)

Sample type	No. investigated samples	No. positive samples	Percentages, %
Swabs from beef	130	62	47.7
Swabs from swine	100	35	35.0
Total	230	97	42.2

These 97 isolates were further subjected to polymerase chain reaction (PCR). Multiplex PCR was used for detection of three target genes stx1, stx2 and eae in 97 *E. coli* isolates. Only 7 *E. coli* isolates (7.2%) had at least one of 3 genes. Most of the isolates (6/85.7%, 5/71.4%) carried the stx1 or/and stx2 genes and only one isolate had the eae gene. Fragments of positive result of detection of PCR products of fragment gene of stx2 and gene eae are shown on Figure 2.

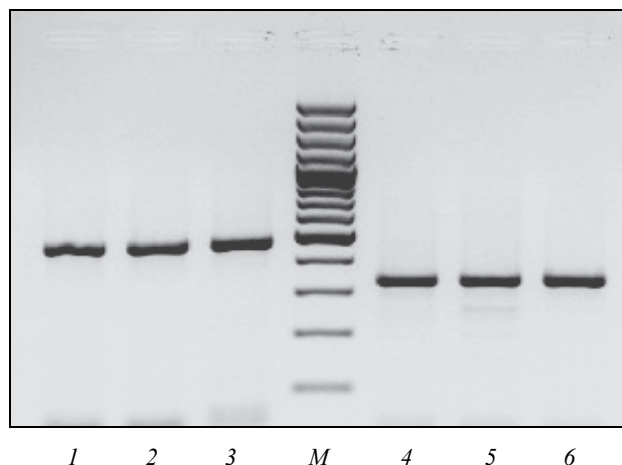


Fig. 2. Detection of PCR products of fragment gene of stx2 and gene eae after optimization of primer annealing temperature:

M – marker "100 bp Plus DNA Ladder" (Thermo Scientific);
gene stx2 – 1 – 63 °C, 2 – 64 °C, 3 – 65 °C;
gene eae – 4 – 63 °C, 5 – 64 °C, 6 – 65 °C

Seven isolates (7.2%) showed presence of stx1, stx2 and eae genes. The highest number of positive isolates was found in swabs from beef (5 isolates, 8.1%) then the swabs from pork (2 isolates, 5.7%). Among these 7 positive isolates: 6 isolates (4 isolates from beef carcasses and 2 isolates from swine carcasses) were confirmed for presence of the stx1, 5 isolates (3 isolates from beef carcasses and 2 isolates from swine carcasses) were confirmed for presence of the stx2 and only one isolate from beef carcass had a positive result for the eae gene (intimin) (Table 2).

Table 3 presents results of combinations of virulence genes (stx1, stx2, eae) in nine isolated strains of STEC. Three (60%) from five isolates of STEC from Swabs from beef carcasses carried both stx1 and stx2 genes, one isolate (20%) showed association between stx1 and eae genes, one isolate (20%) had a positive result for stx1 genes only.

In swabs from swine carcasses stx1 and stx2 genes were present simultaneously in 2 isolates. It was established that no isolates of STEC showed positive results for all 3 target genes at same time. Stx1 and stx2 positive *E. coli* isolates were found to be predominant.

All positive STEC isolates from swine carcasses were negative for virulence *eae* genes (Table 3).

Table 2

Results of incidence of virulence genes of STEC isolated from the examined samples (n = 97)

Sample type	No. investigated samples, (%)	Virulence genes		
		stx1	stx2	eae
Swabs from beef carcasses	5 (8.1%)	4	3	1
Swabs from swine carcasses	2 (5.7%)	2	2	0
Total	7 (7.2%)	6	5	1

Table 3

The combinations of virulence genes of STEC (stx1, stx2, *eae*) in isolated strains (n = 7)

Combination of virulence genes	No. investigated samples	No. positive samples	
		swabs from beef carcasses	swabs from swine carcasses
stx1+ stx2+ <i>eae</i>	0	0	0
stx1+ stx2	5	3	2
stx1 + <i>eae</i>	1	1	0
stx2+ <i>eae</i>	0	0	0
stx1	1	1	0
stx2	0	0	0
<i>eae</i>	0	0	0

Discussion

According to international epidemiological data, in all countries of the world, cases of foodborne illness among people are increasing. Therefore, within the framework of trade agreements between Ukraine and European countries, food and raw food of animal origin must be tested for safety before being shipped for export. One of the important criteria of current microbiological safety of raw meat and meat products (especially beef and pork) is the control of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), because they are food-borne pathogens that are very serious threats to public health. STEC infection is associated with sporadic outbreaks of clinical diseases in humans, including severe hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome, thrombotic thrombocytopenic purpura, which can even cause death (Majowicz et al., 2014; Smith et al., 2014; Sudershan et al., 2014; ECDC, 2016).

E. coli are the most intensively studied microorganisms in the Enterobacteriaceae family, as well as in the overall bacterial community. Most strains of *E. coli* are harmless to human health, and some even are beneficial to their host by helping in absorption of nutrients and provide the normal intestinal microflora. However, several strains of *E. coli* can be human and/or animal pathogens. Among such dangerous strains are Shiga toxin-producing *E. coli* through the production of a cytotoxin known as the Shiga toxin (Stx), or verotoxin, that is encoded by two types of the stx gene (Stx1, Stx2) (Gould et al., 2013; Ray & Bhunia, 2014; Bonardi et al., 2015; ECDC, 2016).

Shiga toxin-producing *E. coli* are enteropathogens which colonize the intestinal tracts of humans and animals. It is well-known that cattle and other ruminants are considered the primary reservoir of STEC (Jeon et al., 2013; Bonardi et al., 2015; Chui et al., 2015). The relationship between STEC of swine origin and human illness has yet to be determined, but some recent research data indicate that pigs also can be a source of STEC for humans through contaminated raw meat and products (ECDC, 2016; Bardasi et al., 2017). It is important to note that *E. coli* which colonize the gastrointestinal tract of cattle or pigs play an important role in STEC transmission to humans. (Ray & Bhunia, 2014; Bonardi et al., 2015; Bardasi et al., 2017). During processing, beef or swine carcasses can be contaminated with STEC directly by feces or from contaminated hides, which threatens food safety as carcasses are further processed into meat products (Stromberg et al., 2018). The contaminated raw meat and meat products are identified as major sources of STEC strains for humans. Animal carcass contamination by *E. coli* occurs through dirty skin or feces from the intestinal tract during slaughter process at processing plants. But the detection of STEC from different products of animal origin is

not only a reliable indicator of fecal contamination, but is also an indicator of poor hygiene and sanitary conditions during their production (Abdissa et al., 2016; Awadallah et al., 2016). Several scientific studies conducted in several countries have shown the prevalence of STEC strains in beef, swine and their products (Collins & Boitumelo, 2014; Merwad et al., 2014; Tseng et al., 2014; ECDC, 2016; Beyi et al., 2017; Anu et al., 2018). These studies show that the incidence of isolation of STEC strains in beef, swine and their products vary in different regions of the world. But there is a lack of information about presence of STEC on beef and pork carcasses in Ukraine. Besides, despite the fact that fewer cases of swine-associated outbreaks of STEC infection have been reported than cattle-associated outbreaks, we assume that swine should not be overlooked as an important source of STEC infections in humans. The increase in STEC infection outbreaks worldwide among humans, associated with raw material of animal origin necessitates detailed study of the sources of these pathogens in order to develop control strategies.

Therefore, the main task of this study was to identify the presence of STEC on the surface of beef and pork carcasses from slaughterhouse in Ukraine. Also currently in Ukraine quick and effective methods for the control of STEC have not yet been developed. To modify multiplex PCR to identify of these microorganisms was the second task of our study. The last task was to detect the main genetic characteristics of STEC from beef and pork carcasses from slaughterhouses in Ukraine.

In our study, the incidence of isolation *E. coli* was 42.2% (97 positive isolates from 230 total isolates) in swabs from the surface of beef and swine carcasses. Out of 97 positive isolates only seven (7.2%) were STEC. The higher prevalence of STEC in our study was found in swabs from beef (8.1%) in comparison with results from pork swabs (3.0%). Our result was higher than results reported by other researchers. In some reports STEC was detected from beef carcass at processing plants with a lower percentage: 0.5%, 3.3%, 4.5% (Abdissa et al., 2017; Beyi et al., 2017; Anu et al., 2018). But, the largest number of Shiga-toxin producing strains of *E. coli* from samples of beef carcass was 30.0% (Omoruyi et al., 2018). As other researchers have highlighted, pork carcasses sampled were positive in 4.1% (Colello et al., 2016). Even though these results differ from each other, they are consistent with the assumption that beef and pork can be potential sources of STEC.

Often, for rapid detection of the presence one or more pathogenic factors of STEC in samples, polymerase chain reaction in multiplex version is used. Two types of Shiga toxin, stx1 and stx2 (encoded by stx1 and stx2 genes) are bacterial virulence STEC determinants that are associated with human disease and they are used as a markers for multiplex PCR (Puttalingamma et al., 2012; Rantsiou et al., 2012; Haugum et al., 2014; Hara-Kudo et al., 2016). STEC strains producing Stx2 are considered more virulent than Stx1 producers (Kavaliuskiene et al., 2017; Stromberg et al., 2018). Besides Shiga toxin production, another virulence factor of STEC is known. It is a membrane protein intimin, which causes attaching of STEC to the intestinal epithelial cells. The *eae* gene codes produce this protein. But, many experts contend that the most virulent strains of STEC have all these genes (stx1, stx2 and *eae*) or other combinations (Croxen et al., 2013; Awadallah et al., 2016; Soledad-Cadona et al., 2018).

In the basis of our task, the multiplex PCR for the detection of stx1, stx2, *eae* virulence genes out of 97 isolates which were identified as *E. coli* by culture-dependent method (specific blue colonies on commercial medium «Compact Dry» for isolation of *E. coli*) was developed and used. We synthesized six pairs of original oligonucleotide primers for this method. Their homology and position on the corresponding genes are shown in Figure 1.

In the present work, no samples showed positive results for all 3 target genes (stx1, stx2, *eae*) in one sample. Most of the STEC isolates carried the stx1 gene (6 from 7 isolates, 85.8%) and stx1 gene (5 from 7 isolates, 71.4%). One isolate (14.3%) carrying the *eae* gene was found from one examined sample of beef carcass only. The stx1 gene was the predominant gene detected in all STEC positive samples from beef and swine carcasses. Some authors have reported similar

findings (Troz-Williams et al., 2012; Colello et al., 2016). But prevalence of STEC isolates carrying virulence genes *stx1*, *stx2*, *intimin* (*eae*) has been reported in lactating cows and in contact workers in dairy farms at Sharkia Province, Egypt (Merwad et al., 2014). Three isolates from swabs of beef carcass carried both *stx1* and *stx2* genes, one isolate showed association between *stx1* and *eae* genes, one isolate had positive result for *stx1* genes only (Table 3). In contrast to this study, some results have shown that *E. coli* O157:H7 was absent in raw minced beef samples in Tripoli, Lebanon by using real-time PCR-based method (Omari et al., 2018).

Although a small number of research articles which implicate pork as a source of human infection have been reported, the results of these investigations consider that meat other than beef also can be potential vehicles of STEC transmission (Troz-Williams et al., 2012). It is important to note that in swabs from swine carcasses (2 isolates) *stx1* and *stx2* genes were presented. So, the results of our study indicate that swine can be a potential reservoir of STEC strains. The same researchers isolated from 465 not ready to eat pork samples 65 (14.0%) *stx*-positive *E. coli*: the *stx2* gene was detected more frequently (13.3%) than the *stx1* gene (1.3%) and associations of genes in pork samples were next: *stx1+eae* (0.4%), *stx2+eae* (8.0%) and *stx1+stx2+eae* (0.7%) (Bardasi et al., 2017). At slaughter houses in Argentina 4.1% of carcasses of swine were *stx* positive: 50% of isolates positive for *stx2* and 16.0% for *stx1/stx2*. (Colello et al., 2016).

Conclusion

This study is the first report on the presence of Shiga toxin-producing strains of *E. coli* (STEC) in beef and swine carcasses in Ukraine. The results indicate that fresh raw meat (beef and pork) could be potential vehicles for transmission of enterohemorrhagic *E. coli* infections to humans since the highest prevalence these pathogenic microorganisms was found in swabs from beef carcasses and swine carcasses. These data will be valuable for microbiological risk assessment and help authorities to develop strategies to mitigate health risk.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Abdissa, R., Haile, W., Fite, A. T., Beyi, A. F., Agga, G. E., Edao, B. M., Tadesse, F., Korsaa, M. G., Beyene, T., Beyene, T. J., De Zutter, L., Cox, E., & Goddeeris, B. M. (2017). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle at slaughter and beef carcasses at retail shops in Ethiopia. *MC Infectious Diseases*, 17(1), 277–283.
- Anu, P. J., Latha, C., Vinodkumar, K., Vinod, V. K., & Sathu, T. (2018). An important approach for control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by identification of contaminating sources in beef production line. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 1921–1929.
- Awadallah, M. A., Ahmed, H. A., Merwad, A. M., & Selim, M. A. (2016). Occurrence, genotyping, shiga toxin genes and associated risk factors of *E. coli* isolated from dairy farms, handlers and milk consumers. *The Veterinary Journal*, 217, 83–88.
- Bardasi, L., Taddei, R., Flocchi, I., Pelliconi, M. F., Ramini, M., Toschi, E., & Meriardi, G. (2017). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in slaughtered pigs and pork products. *Italian Journal of Food Safety*, 6, 6579–6584.
- Beyi, A. F., Fite, A. T., Tora, E., Tafese, A., Genu, T., Kaba, T., Beyene, T. J., Beyene, T., Korsaa, M. G., Tadesse, F., Zutter, L., Goddeeris, B. M., & Cox, E. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 in beef at butcher shops and restaurants in central Ethiopia. *BMC Microbiology*, 17, 49–55.
- Bonardi, S., Alpigiani, I., Tozzoli, R., Vismarra, A., Zecca, V., Greppi, C., Bacchi, C., Bruini, I., & Brindani, F. (2015). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157, O26 and O111 in cattle faeces and hides in Italy. *Veterinary Record Open*, 2, 1–10.
- Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, H., and Tanouchi, A. (2016). An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 81–88.
- Haugum, K., Brandal, L. T., Lindstedt, B. A., Wester, A. L., Bergh, K., & Afseta, J. E. (2014). PCR-based detection and molecular characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains in a routine microbiology laboratory over 16 years. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3156–3163.
- Jeon, S. J., Elzo, M., Dileo, N., Lamb, G. C., & Jeong, K. C. (2013). Evaluation of animal genetic and physiological factors that affect the prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle. *PLoS One*, 8(2), 1–9.
- Ju, W., Shen, J., Li, Y., Toro, M. A., Zhao, S., Ayers, S., Najjar, M. B., & Meng, J. (2012). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail ground beef and pork in the Washington D.C. area. *Food Microbiology*, 32, 371–377.
- Kavaliuskiene, S., Dyve Lingelem, A. B., Skotland, T., & Sandvig, K. (2017). Protection against Shiga toxins. *Toxins (Basel)*, 9(2), e44.
- Lozinak, K. A., Jani, N., Gangiredla, J., Patel, I., Elkins, C. A., Hu, Z., Kassim, P. A., Myers, R. A., & Laksanalamai, P. (2016). Investigation of potential shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) associated with a local foodborne outbreak using multidisciplinary approaches. *Food Science*, 5(3), 163–168.
- Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton J., Angulo, F. J., Yeung, D. H., & Kirk, M. D. (2014). Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11, 447–455.
- Merwad, A., Gharieb, R., & Saber, T. (2014). Occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in lactating cows and in contact workers in Egypt: Serotypes, virulence genes and zoonotic significance. *Life Science Journal*, 11(5), 563–571.
- Microbiology of the food chain. Carcass sampling for microbiological analysis (2015). European Centre for Disease Prevention and Control. *Escherichia coli* factsheet Stockholm: ECDC. ISO 17604:2015.
- Momtaz, H., & Jamshidi, A. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Iran: Serogroups, virulence factors, and antimicrobial resistance properties. *Poultry Science*, 92, 1305–1313.
- Omari, K. E., Kassaa, I. A., Kara-Ali, H., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2018). Prevalence of *E. coli* O157:H7 in raw minced beef at slaughterhouses in Tripoli, Lebanon. *Virology and Immunology Journal*, 2(4), 2–4.
- Omoruyi, I. M., Uwadiae, E., Mulade, G., & Omoroku, E. (2018). Shiga toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) associated with beef products and its potential pathogenic effect. *Microbiology Research Journal International*, 23(1), 1–7.
- Premarathne, J. M. K. J. K., New, C. Y., Ubong, A., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Son, R. (2017). Risk of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to the consumption of beef. *Food Research*, 1(3), 67–76.
- Puttalingamma, V., Shylaja, R., Batra, H. V., & Bawa, A. S. (2012). A novel multiplex PCR system for the detection of virulence associated genes of *E. coli* O157:H7 from food system. *Recent Research in Science and Technology*, 4(5), 36–40.
- Rani, S., Singh, Y., Gulati, B. R., & Khurana, S. K. (2017). Occurrence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in buffalo meat. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(2), 208–214.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., & Coccolin, L. (2012). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 37–43.
- Rashid, M., Kotwal, S. K., Malik, M. A., & Singh, M. (2013). Prevalence, genetic profile of virulence determinants and multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin. *Veterinary World*, 6, 139–142.
- Ray, B., & Bhunia, A. (2014). *Fundamental food microbiology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Shuhong, Z., Xuemei, Z., Qingping, W., Jumei, Z., Xiaoke, X., & Haigang, L. (2015). Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in retail fresh raw meat in South China. *Annals of Microbiology*, 65, 1993–1999.
- Smith, J. L., Frattamico, P. M., & Gunther, N. W. T. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 145–197.
- Soledad-Cadon, J., Bustamante, A. V., González, J., & Mariel-Sanso, A. (2018). Pathogenicity islands distribution in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Genes*, 9, 81–99.
- Stromberg, Z. R., Redweik, G. A. J., & Mellata, M. (2018). Detection, prevalence, and pathogenicity of Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle hides and carcasses. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(3), 119–131.
- Sudershan, R. V., Naveenkumar, R., Kashinath, L., Bhaskar, V., Polasa, K. (2014). Foodborne infections and intoxications in Hyderabad India. *Epidemiology Research International*, 10, 1–5.
- Tafida, S. Y., Kwaga, J. K. P., Bello, M., Kabir, J., Umoh, V. J., Yakubu, S. E., & Nok, A. J. (2014). Occurrence of *Escherichia coli* O157 in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 481–487.

- Taye, M., Berhanu, T., Berhanu, Y., Tamiru, F., & Terefe, D. (2013). Study on carcass contaminating *Escherichia coli* in apparently healthy slaughtered cattle in Haramaya University Slaughter House with special emphasis on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 4, 132.
- Troz-Williams, L. A., Mercer, N. J., Walters, L. M., Maki, A. M., & Johnson, R. P. (2012). Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Canadian Journal of Public Health*, 103, 322–326.
- Tseng, M., Fratamico, P. M., Bagi, L., Manzinger, D., & Funk, J. A. (2014). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: Prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiology and Infection*, 8, 1–10.
- Vijayan, C., Ajaykumar, V. J., Bhattacharya, A., & Bhanurekka, V. (2017). Detection of enterohaemorrhagic *E. coli* O157: H7 from beef and chevon sold in and around Puducherry. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(6), 1395–1403.



Monitoring of multiresistant community-associated MRSA strains from patients with pathological processes of different localization

T. V. Sklyar*, K. V. Lavrentieva*, V. G. Gavriluk*, N. V. Kurahina*, M. O. Vereshchaha, O. A. Lykholat**

*Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

**University of Customs and Finance, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 30.03.2018

Received in revised form
21.04.2018

Accepted 27.04.2018

Oles Honchar Dnipro
National University,
Gagarin av., 72,
Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-94-00-098.
E-mail: microviro@ukr.net

University of Customs
and Finance,
Volodymyr Vernadsky
st., 2/4, Dnipro, 49000,
Ukraine.
Tel.: +38-056-247-18-82.

Sklyar, T. V., Lavrentieva, K. V., Gavriluk, V. G., Kurahina, N. V., Vereshchaha, M. O., & Lykholat, O. A. (2018). Monitoring of multiresistant community-associated MRSA strains from patients with pathological processes of different localization. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 281–286. doi:10.15421/021841

The therapy of infections, caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with multiple resistance to antibiotics remains one of the most acute problems all over the world. It is all the more complicated since a priori the MRSA strains are not sensitive to the group of β -lactam antibiotics and multiresistant isolates are resistant to other groups of antimicrobial preparations, including antibiotics of choice (rifampicin, vancomycin, fusidic acid, co-trimoxazole and linezolid). From the samples of biomaterials of patients with pathological processes of different localization, we isolated 335 strains of bacteria, which were identified as *Staphylococcus aureus*, 169 (50.4%) of which were methicillin-resistant variants: 57.5% cultures were isolated from the nasal discharge; 50.7% – from faeces at intestinal dysbioses; by 40.0% – from conjunctival discharge, pharyngeal swab, outer ear swab and sputum; 33.3% – from urine samples. Antibiotic susceptibility of the isolated cultures was estimated by the disc-diffusion method and the method of serial dilution. The MRSA strains appeared to be most resistant to gentamycin, erythromycin (by 59.5% of cultures) and ciprofloxacin (53.3% of isolates), most sensitive – to vancomycin, co-trimoxazole and fusidic acid. The frequency of isolation of the cultures that are resistant to antibiotics did not exceed 4.1%. Rifampicin suppressed the growth of 75.8% and linezolid – of 100.0% of strains. Depending on the kind of biomaterial taken, MRSA strains, isolated from the nasal cavity, outer ear, urine samples, samples of sputum and faeces at intestinal dysbioses proved to be most resistant to the tested antimicrobial preparations. Rifampicin- and vancomycin-resistant strains of methicillin-resistant staphylococci made up 21.3% of the total number of the detected MRSA. They were most often isolated from the clinical samples taken from the nasal cavity and faeces. When determining minimal inhibitory concentration (MIC) of rifampicin and vancomycin, which are antibiotics of choice for treatment of infections caused by multiresistant MRSA, it was found that for 55.5% of the MRSA strains isolated from faeces, MIC of rifampicin coincided with the threshold value for this antibiotic and for 44.5%, it exceeded the threshold value by 2 times (4 $\mu\text{g/ml}$). 22.2% of them were characterized by the critical value of susceptibility to vancomycin (MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$). From rifampicin- and vancomycin-resistant MRSA strains, isolated from the nasal cavity, MIC of rifampicin coincided with the threshold value for this antibiotic for 66.7% of cultures, and exceeded it at least by 2 times for 33.3%. 11.1% of them were characterized by the critical level of susceptibility to vancomycin (MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) and by 3.7% of strains exceeded MIC by 2 and 4 times respectively (4 and 8 $\mu\text{g/ml}$).

Keywords: *Staphylococcus aureus*; rifampicin; vancomycin; fusidic acid; co-trimoxazole; linezolid

Introduction

Staphylococcus infections have become widespread lately and they flow in a much more complicated way than 20–30 years ago (DeLeo et al., 2010; Dhanoa et al., 2012; Ehelepola et al., 2018). They are characterized by a considerable variety of localization of the pathogen and clinical manifestation, which complicates their diagnosis (Tong et al., 2015; Hibbitts et O'Leary, 2018).

Staphylococcus aureus is one of the most common microorganisms that causes a wide range of human diseases. It is capable of affecting almost all organs and tissues, demonstrating in this case a whole range of adaptive capabilities. However, the problem is not only the considerable propagation range and high frequency of isolation of *S. aureus*, but also the high level of its antibiotic resistance.

Methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) are the most dangerous in medical practice. In most countries (the USA, Latin America, SAR, India and China), the frequency of their isolation is 25.0% of the total number of *S. aureus* strains (Oh et al., 2018; Para

et al., 2018). MRSA are characterized by a high level of resistance to antibiotics of different pharmacological groups – macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones, especially to β -lactam group, including penicillin and cephalosporin of all generations (Gostev et al., 2015; Khan et al., 2018). Resistance of MRSA to β -lactam antibiotics is caused by the synthesis of penicillin-binding protein (PBP2A) by bacterial cells, which is coded by gene *mecA* and is characterized by high affinity to β -lactams (Aguayo-Reyes et al., 2018; Pardos de la Gandara et al., 2018).

Up to the end of the 1990s, MRSA strains were exclusively pathogens of nosocomial infections. In the last decades, the morbidity rate for MRSA-caused nosocomial infections has considerably decreased due to implementation of programs of infection control in hospitals. At the same time, the community-associated strains of methicillin-resistant staphylococci, which maintain constant circulation of variants with multiple resistance to antibiotics, are found increasingly often (García-Garrote et al., 2014; Becker et al., 2018). Community-associated MRSA strains differ from nosocomial ones

by genotype and phenotype and have a special IV type of *Staphylococcus* chromosome cassette that is normally resistant to β -lactam antibiotics but more sensitive to fluoroquinolones and clindamycin. In addition, community-associated MRSA strains differ by high virulence, caused by synthesis of exotoxins, and, primarily, Panton-Valentine leucocidin (Gomes et al., 2015; Bakthavatchalam et al., 2017).

For a long time, vancomycin remained the preparation of choice for treating infections caused by MRSA strains. But in the middle of the 1990s, first in Japan then in the USA, after that in other countries of the world, reports about more and more frequent isolation of methicillin-resistant staphylococci with decreased susceptibility to vancomycin started to appear: heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA) and vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) (Howden, 2014; Gostev et al., 2015; Sirichoat et al., 2016; Tran & Rybak, 2018). Due to this fact, new preparations for treating infections caused by methicillin-resistant staphylococci were implemented to medical practice: daptomycin, linezolid, ceftaroline, tigecycline. However, the resistance mechanisms of *Staphylococcus* spp. to these antibiotics have been also described today (Rybak et al., 2014; Miller et al., 2016; Sakoulas et al., 2017). Monitoring of the level of resistance both to traditional preparations and to the new ones is an important element in formation of a strategy of rational antibacterial therapy of infections caused by MRSA.

Based on the relevance of the topic, the aim of the research is the analysis of the level of resistance of MRSA strains, isolated from patients with pathological processes of different localization, to antibiotics of different pharmacological groups, used in clinical practice for treating staphylococcus infections.

Materials and methods

The object of the research is samples of biomaterial from patients with pathological processes of different localization. The subject is antibiotic resistance of methicillin-resistant strains of *S. aureus*, isolated from the studied biomaterial samples.

Sampling was carried out in accordance with the guidelines on observance of sanitary-epidemiology regime in health care establishments of Ukraine. Samples of urine, faeces at intestinal dysbioses, nasal and conjunctival discharges, pharyngeal swab, outer ear swab and sputum were used as clinical material.

The samples of the clinical material were inoculated on the blood and yolk-salt agars. Inoculated media were controlled thermostatically at 37 °C. After 18–24 h, microscopy of the growing colonies was performed. Only the colonies in which the microscopy revealed gram-positive cocci, arranged in the form of clusters of irregular shape, were inoculated on differential-diagnostic media for further identification. For the final identification of the isolated cultures, existence of such physiological and biochemical properties as lecithinase activity, ability to plasmocoagulase synthesis and mannitol fermentation were additionally investigated.

Lecithinase activity was tested on yolk-salt agar. Some strains of *S. aureus* formed a turbidity area around the colony, i.e. had a positive lecithinase reaction. Further, plasma coagulating activity in the reaction of blood plasma coagulation was determined. If both tests were

positive, the belonging of the isolated cultures to *S. aureus* was proved. If the cultures had only plasma coagulation or only lecithinase activity, the test on mannitol fermentation was conducted. *S. aureus* strains, unlike other staphylococci, fermented mannitol. The percentage of detection of methicillin-resistant strains of *S. aureus* was determined by inoculation of isolated cultures of *S. aureus* on meat infusion agar with methicillin (oxacillin) and cefoxitin.

Subsequently, susceptibility of the isolated strains of methicillin-resistant staphylococci to a range of antibiotic drugs of different pharmacological groups was determined using the disc-diffusion method and the method of minimal serial dilution (ISO20776-1:2006). When using the disc-diffusion method, the standard discs with antibiotics were used. The spectrum of antibiotic preparations included: tetracycline, ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin, cotrimoxazole, vancomycin, rifampicin, gentamycin, linezolid, fusidic acid. Optical density of the bacterial suspension for each of the test cultures, by the Macfarland standard, was brought to 0.5 before inoculation of the medium. The content of the microbial cells was $1,5 \times 10^8$ CFU/cm³.

The referent method for determining susceptibility of the selected pathogens to antibiotics is the method of serial dilution. It also allows determination of the magnitude of minimum inhibitory concentration (MIC) of an antibiotic relative of the tested strains. This is especially important in isolation of multiresistant MRSA from the clinical material. The range of antibiotics for determining MIC in relation to multiresistant MRSA includes rifampicin and vancomycin. These antibiotics are the preparations of choice in treatment of infections, caused by isolates of methicillin-resistant staphylococci with multiple resistance to antibiotics, and the situation of exceeded threshold values to them is estimated as extremely dangerous.

When applying the method of serial dilution, the daily culture of staphylococci was used to prepare the inoculum. The optical density of the bacterial suspension for each of the test cultures before inoculation of the medium was brought to 0.5 by the Macfarland standard. The content of the microbial cells was 10^9 CFU/cm³. Basic solutions of antibiotics were prepared in the concentration of 1000 μ g/cm³ of the tested antibiotic, from which the double dilution series in test tubes were performed. Then, the contents of each test tube were mixed with 20 ml of meat infusion agar and poured in sterile Petri dishes. After hardening of the medium, its surface was inoculated with the studied bacterial culture and cultivated within 18–24 h at the temperature of 37 °C. Such concentration of antibiotic that caused a complete inhibition of the growth of the test culture was accepted as MIC. MIC for rifampicin relative to MRSA isolates was 4 μ g/ml, and for vancomycin – 2 μ g/ml.

Results

From the samples of biomaterial from the patients with pathological processes of different localization, 335 strains of bacteria identified as *S. aureus* were selected. Most of the *S. aureus* isolates which made up 160 strains that constituted 47.8% of the total number of cultures were isolated from nasal discharge (Fig. 1).

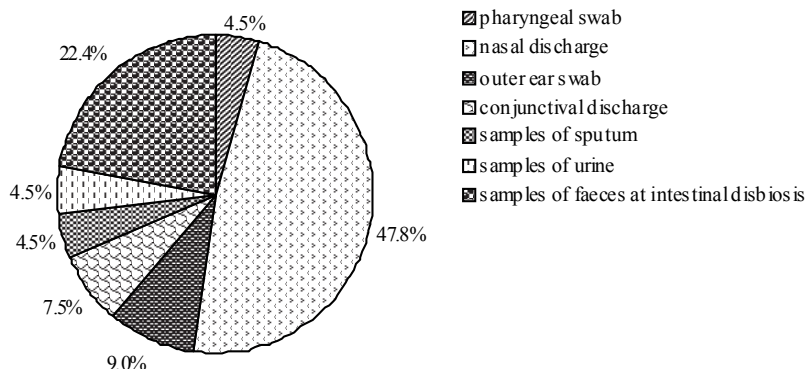


Fig. 1. Isolation of *Staphylococcus aureus* strains from samples of biomaterial from patients with pathological processes of different localization (n = 335)

Half as many, 75 cultures (22.4%), were isolated from the faecal samples from the patients with dysbiotic intestinal microflora disorders. 30 and 25 isolates of *S. aureus* – 9.0% and 7.5% of the total number of the isolated cultures, respectively – were the causes of diseases of the outer ear and the eye conjunctiva. The smallest number of *S. aureus* strains were isolated from pharynx and from the samples of sputum and urine – frequency of their isolation did not exceed 4.5%. MRSA accounted for 50.4% out of the total number of the isolated cultures of *S. aureus*. Most often, methicillin-resistant strains were isolated from nasal discharge (57.5% of the cultures) and faeces (50.7% of isolates). By 40.0% of MRSA strains were isolated from conjunctival discharge, pharyngeal swab, outer ear swab and sputum. The lowest number of MRSA isolates – 33.3% – was isolated from the samples of urine (Table 1).

During studying the antibiotic-resistant isolated MRSA strains, the following results were obtained (Fig. 2). They were found to be more resistant to gentamycin or erythromycin – 59.5%. A high percentage of resistance to ciprofloxacin was retained – 53.3%. The isolates of methicillin-resistant staphylococci appeared to be more sensitive to tetracycline, moxifloxacin and clindamycin. Resistance of strains to these antibiotics made up 41.4% and 33.7% respectively. Rifampicin suppressed the growth of 75.8% of MRSA cultures. They appeared to be most sensitive to vancomycin, co-trimoxazole and fusidic acid. The frequency of isolation of strains that are resistant to these antibiotics did not exceed 4.1%. Linezolid caused a delay in the growth of all the studied cultures.

Table 1

Isolation of MRSA strains from samples of biomaterial from patients with pathological processes of different localization

Samples of biomaterial	Isolated MRSA strains, absolute number / % of total in samples of biomaterial
Pharyngeal swab, n = 15	6 / 40.0
Outer ear swab, n = 30	12 / 40.0
Conjunctival discharge, n = 25	10 / 40.0
Samples of urine, n = 15	5 / 33.3
Nasal discharge, n = 160	92 / 57.5
Samples of sputum, n = 15	6 / 40.0
Samples of faeces, n = 75	38 / 50.7
Total, n = 335	169 / 50.4

It should be noted that the isolated MRSA strains differed considerably by the resistance level depending on the kind of biomaterial. MRSA strains isolated from nasal discharge appeared to be most resistant to gentamycin (68.5% of the cultures), erythromycin (58.7%), tetracycline (48.9%) and ciprofloxacin (43.5%) (Fig. 3). In the cultures from this type of biomaterial, the highest percentage of resistance to fusidic acid (3.3%) and co-trimoxazole (7.6%) was observed compared to the isolates isolated from clinical samples of other biotopes (Fig. 3–5). MRSA isolates were characterized by a rather high level of resistance to vancomycin and rifampicin. The number of strains that were resistant to these antibiotics was 29.3 and 5.4%, respectively.

MRSA strains, isolated from the outer ear proved to be most sensitive (100.0% of the cultures) to fusidic acid and co-trimoxazole, highly sensitive – to clindamycin and tetracycline. The percentage of the isolates resistant to the two latter antibiotics did not exceed 33.3%. By 41.7% of methicillin-resistant strains of *S. aureus* showed resistance to moxifloxacin and erythromycin. They appeared most resistant to gentamycin and ciprofloxacin. These antibiotics suppressed the growth of MRSA isolated from the outer ear just in 41.7 and 25.0% of the cases, respectively. 16.7% of isolates were resistant even to rifampicin.

Erythromycin, which suppressed the growth of cultures in 16.7% of cases, appeared ineffective relative to the strains of MRSA isolated from the pharynx. By 33.3% of the isolates showed resistance to ciprofloxacin and clindamycin and by 16.7% – to moxifloxacin, gentamycin, tetracycline and rifampicin. Fusidic acid, co-trimoxazole and vancomycin were recognized as the most effective preparations since they led to delays of the growth of all MRSA strains isolated from the pharynx.

From the samples of faeces from the patients with dysbiotic intestinal microflora disorders, the highest percentage (71.0%) of resistant MRSA isolates was recorded for ciprofloxacin (Fig. 4). Erythromycin

and gentamycin suppressed the growth of methicillin-resistant staphylococci in 57.9% and 55.3% of cases, respectively. 47.3% of the cultures were resistant to moxifloxacin, by 36.8% – to tetracycline and clindamycin. A rather high percentage of resistant strains, isolated from faeces samples, as in previous research, was retained for the preparations of choice: rifampicin and vancomycin. 23.7% of MRSA isolates have shown resistance to rifampicin and 5.3% – to vancomycin. MRSA strains isolated from the samples of urine were found not less resistant (Fig. 4). These cultures were found to be most resistant to ciprofloxacin (100.0% of isolates), and erythromycin (80.0%). Gentamycin and moxifloxacin suppressed the growth of strains in 60.0% of cases, clindamycin – in 40.0% of cases and tetracycline – in 20.0% of cases. All isolated cultures were sensitive to fusidic acid, co-trimoxazole, vancomycin and rifampicin.

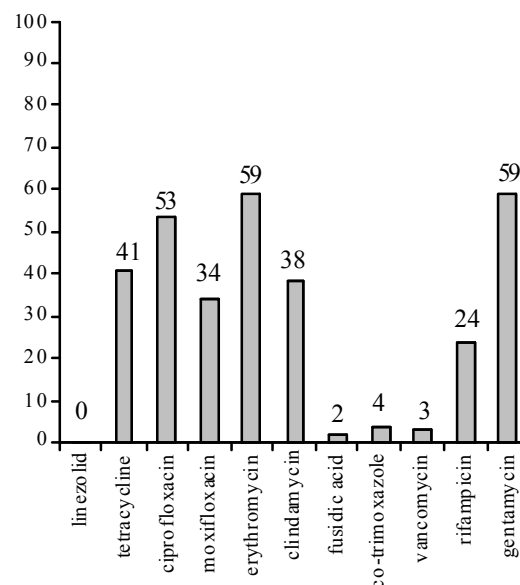


Fig. 2. Resistance to antibiotics of MRSA strains (%), isolated from samples of biomaterial from patients with pathological processes of different localization (n = 169)

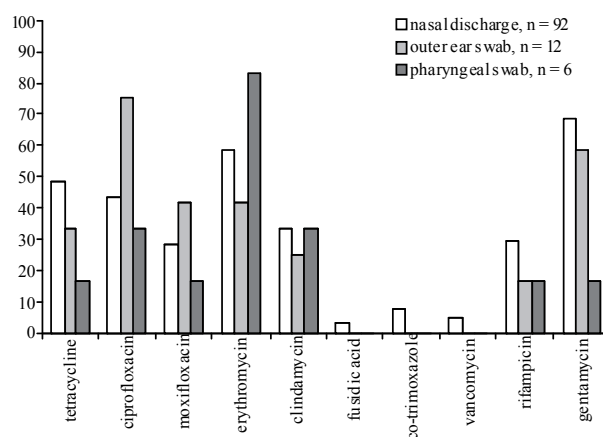


Fig. 3. Resistance to antibiotics of MRSA strains (%), isolated from samples of nasal discharge, outer ear and pharyngeal swabs

The following results were obtained for the MRSA from sputum (Fig. 5). All the isolates isolated strains resistance to erythromycin. The degree of resistance of the strains of methicillin-resistant staphylococci to tetracycline, ciprofloxacin and clindamycin did not exceed 33.3%, and to moxifloxacin, gentamycin and rifampicin – 16.7%.

The cultures isolated from the conjunctival discharge appeared to be the most sensitive from all MRSA isolates from the patients with pathological processes of different localization (Fig. 5). The total percentage of strains resistant to antibiotics of different pharmacological groups did not exceed 50.0%. Half of the cultures demonstrated resistance only to ciprofloxacin. By 40.0% of resistant isolates were obser-

ved in relation to erythromycin and gentamycin, respectively, by 30.0% – to tetracycline and moxifloxacin. Even lower percentage of insensitive strains (10.0%) was noted for rifampicin. Fusidic acid, co-trimoxazole and vancomycin proved to be most effective antibiotics for MRSA strains, isolated from sputum and conjunctival discharge.

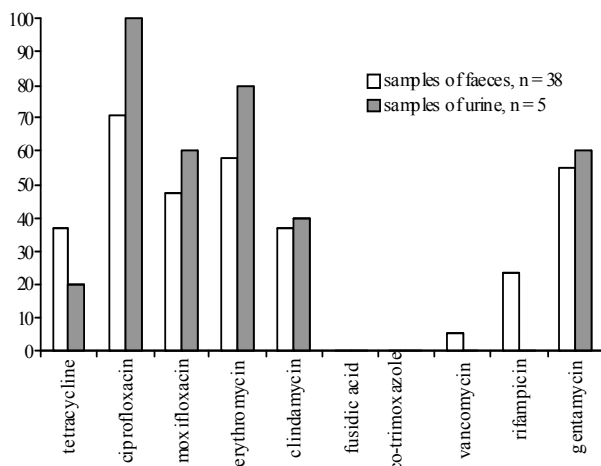


Fig. 4. Resistance to antibiotics of MRSA strains (%), isolated from the samples of urine and faeces

Analysis of frequency of isolation of resistant variants of MRSA from different clinical samples showed that the greatest number of the antibiotic resistant cultures were the cultures isolated from the nasal cavity, faeces and urine samples. Methicillin-resistant staphylococci were isolated to a somewhat lesser extent from the samples of sputum, external ear and pharynx swabs and conjunctival discharge.

It is known that rifampicin and vancomycin are the preparations of choice for the treatment of infections caused by strains of methicillin-resistant *S. aureus* with multiple resistance to antibiotics. Our findings show that a certain number of MRSA strains isolated from the nasal cavity and faeces appeared resistant to these antibiotics. Therefore, at the next stage of our work, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of rifampicin and vancomycin in relations to MRSA strains that are resistant to them (Tables 2, 3).

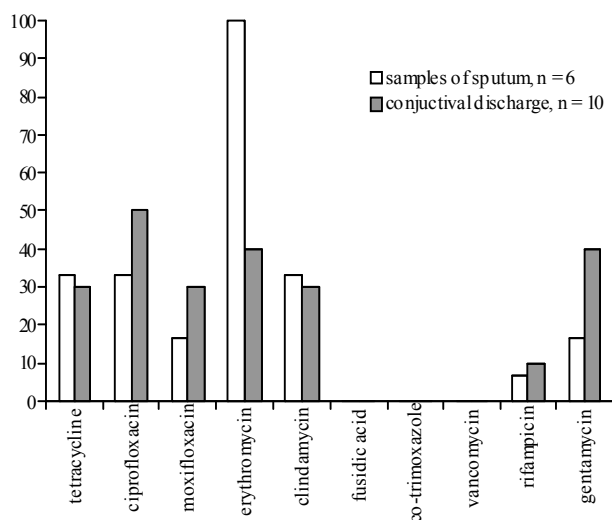


Fig. 5. Resistance to antibiotics of MRSA strains (%), isolated from the samples of sputum and conjunctival discharge

From 27 MRSA strains, isolated from nasal discharge, the value of the minimum inhibitory concentration (MIC) of rifampicin coincided with the threshold value for the given antibiotic (4 µg/ml) for 18 of them (66.7% of cultures), it exceeded the threshold value by two times (8 µg/ml) for 5 isolates (18.5%), for three (11.1%) – by four times (16 µg/ml), and for one (3.7%) – by 8 times (32 µg/ml) (Table 2). From 9 MRSA strains isolated from the faeces at intestinal dysbioses,

the value of MIC of rifampicin coincided with the threshold value and made up 4 µg/ml for 5 cultures (55.6%), it exceeded the threshold value by two times (8 µg/ml) for 4 strains (45.4 %).

Table 2

Isolation of rifampicin-resistant MRSA strains (absolute number / %) with regard to MIC of rifampicin

Samples of biomaterial	MIC, µg/ml			
	4	8	16	32
Nasal discharge, n = 27	18 / 66.7	5 / 18.5	3 / 11.1	1 / 3.7
Samples of faeces, n = 9	5 / 55.6	4 / 45.4	0 / 0	0 / 0

Table 3

Isolation of vancomycin-resistant MRSA strains (absolute number / %) with regard to MIC of vancomycin

Samples of biomaterial	MIC, µg/ml			
	2	4	8	16
Nasal discharge, n = 5	3 / 60.0	1 / 20.0	1 / 20.0	0 / 0
Samples of faeces, n = 2	2 / 100.0	0 / 0	0 / 0	0 / 0

From five MRSA strains isolated from the nasal discharge, the value of minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin coincided with the threshold value for the given antibiotic (2 µg/ml) for three of them (60.0% of cultures), for one isolate (20.0%) it exceeded the threshold value by two times (4 µg/ml), for another (20.0%) – by four times (8 µg/ml) (Table 3). Methicillin-resistant strains of staphylococci, isolated from faeces at intestinal dysbioses also proved resistant to vancomycin. In this case, the value of MIC of vancomycin coincided with threshold value and was equal to 2 µg/ml.

Discussion

In modern medical practice, the problem of propagation of community-associated methicillin-resistant strains of *S. aureus*, characterized by multiple resistance to antibiotics, including the preparations of choice, is becoming increasingly relevant (Jang et al., 2009; Marimuthu et Harbarth, 2014; Lawes et al., 2015; van Kleef et al., 2017; Hamdan-Partida et al., 2018). According to the results of our studies, it was found that the isolated MRSA strains accounted for 50.4% of the total number of cultures of *S. aureus* isolated from the patients with pathological processes of different localization. The obtained data prove the results, obtained by other researchers, according to which the frequency of detection of community-associated MRSA isolates makes up from 25.0 to 80.0% (Skov et al., 2012; Gostev et al., 2015; Lawes et al., 2015; Sirichoat et al., 2016).

Analysis of the level of antibiotic resistance of the isolated methicillin-resistant strains of *S. aureus* allowed us to divide conditionally all the tested preparations into three groups according to the degree of resistance of microbial cultures to them. The first group included the preparations with the highest level of resistance of MRSA strains to them: erythromycin, ciprofloxacin, gentamycin. The total number of MRSA isolates resistant to them was more than 50.0% (53.3–59.2%). The second group included the preparations with relatively high antimicrobial activity: tetracycline, clindamycin, moxifloxacin. The level of resistance of the isolated cultures to them was in the range 33.3–41.4%. The highest antibacterial activity was shown by: fusidic acid and co-trimoxazole, included to the third group. More than 95.0% of the isolated MRSA strains were sensitive to fusidic acid and co-trimoxazole, which makes it possible to use these preparations in combination with other antibiotics for treatment of the infections, caused by MRSA.

The isolated MRSA strains differed significantly in terms of resistance depending on the biomaterial taken, which is possible due to specificity of the treatment of infections of different localization. The strains of methicillin-resistant staphylococci isolated from the nasal cavity, outer ear swab and samples of urine appeared to be most resistant to gentamycin; those isolated from samples of urine and sputum appeared to be most sensitive to erythromycin. The MRSA strains isolated from the outer ear swab, conjunctival discharge, samples of urine and faeces appeared to be most sensitive to ciprofloxacin.

Rifampicin- and vancomycin-resistant strains of methicillin-resistant staphylococci were most often isolated from the clinical samples taken from the nasal cavity and faeces at intestine dysbioses. But, despite the fact that only 24.2% of the isolates were found resistant to rifampicin and 3.0% – to vancomycin, it is necessary to refer them to a separate group of preparations according to the degree of resistance of the microbial cultures to them, since rifampicin and vancomycin are the first preparations of choice for the therapy of infections caused by multiresistant isolates of methicillin-resistant staphylococci (Zhang et al., 2015; Zheng et al., 2018). On this basis, when isolating the MRSA strains that are resistant to vancomycin and rifampicin, it is necessary to determine MIC of these antibiotics in relation to the studied isolates of methicillin-resistant staphylococci.

It should be noted that a decrease in susceptibility to rifampicin is considered by some researchers as a predictor of formation of resistance to glycopeptide preparations and, above all, vancomycin, which ranks first among the drugs of choice for the therapy of the infections, caused by multiresistant MRSA strains. According to the literature, resistance to rifampicin is associated with mutations in the regulatory proB gene that encodes β -subunit of RNA-polymerase. It is believed that it is this gene that participates in formation of vancomycin-resistant variants (Howden et al., 2014; Li et al., 2016; Brinkman et al., 2017).

Since the mid 1990s, reports about the circulation of MRSA strains with decreased susceptibility to vancomycin – VISA, hVISA and VRSA – started to appear. The latter are characterized by a high level of resistance (MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) and are found rarely (only 20 isolates in the world were described) as a result of acquisition by staphylococci of resistance determinants from enterococci. VISA and hVISA are distinguished by low-levels of MIC (4–8 and 2–4 $\mu\text{g/ml}$, respectively), but are spread widely enough (Howden, 2005; Appelbaum, 2007).

The research, carried out by us, revealed 55.5% MRSA strains from the faeces of patients with dysbiotic intestinal microflora disorders, for which MIC of rifampicin coincided with the threshold value for this antibiotic and 44.5% – with the excess of the threshold by 2 times (4 $\mu\text{g/ml}$). 22.2% of them were characterized by the critical level of susceptibility to vancomycin (MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$). From rifampicin- and vancomycin-resistant MRSA cultures, isolated from the nasal cavity, MIC of rifampicin coincided with the threshold value for this antibiotic for 66.7% of them and exceeded the threshold at least by 2 times for 33.3% of them. 11.1% of them were characterized by the critical level of susceptibility to vancomycin (MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) and by 3.7% of the strains exceeded MIC by 2 and 4 times, respectively (4 and 8 $\mu\text{g/ml}$). This is consistent with the data, obtained by other researchers (Tremblay et al., 2013; Gostev et al., 2015).

Thus, the obtained results of evaluation of the level of antibiotic resistance of MRSA strains, as a whole, and to preparation of choice (rifampicin and vancomycin) with regard to their MIC, in particular, prove the necessity of the strict control over the frequency of isolation and propagation of community-associated methicillin-resistant strains of *S. aureus* with the aim of limiting their circulation among the population, development of measures to prevent an increase in resistance to antibiotics and introduction of the new therapy standards.

It should be noted that all MRSA strains isolated by us appeared sensitive to linezolid. According to the results of the monitoring studies, linezolid is characterized by a significant clinical efficiency relative to MRSA, compared to rifampicin and vancomycin. It has a wide range of actions and demonstrates high activity in relation to aerobic and anaerobic gram-positive microorganisms, including methicillin-resistant staphylococci and enterococci (MRSA and MRSE). Therefore, it can be regarded as an alternative preparation for the treatment of infections caused by multiresistant MRSA strains.

Conclusions

In our study of samples of biomaterial from the patients with pathological processes of different localization, we isolated 335 strains of bacteria identified as *S. aureus*, out of which methicillin-resistant strains composed 50.4%. Most often, MRSA were isolated from nasal discharge (57.5% of the cultures) and faeces of patients with

dysbiotic intestinal microflora disorders (50.7% of isolates). By 40.0% of MRSA strains were isolated from the conjunctival discharge, pharyngeal and outer ear swabs and sputum. Their smallest number (33.3%) was isolated from the urine samples.

MRSA strains appeared most resistant to gentamycin, erythromycin (59.5% of the cultures) and ciprofloxacin (53.3% of isolates). They appeared most sensitive to vancomycin, co-trimoxazole and fusidic acid. The frequency of isolation of the cultures that are resistant to these antibiotics did not exceed 4.1%. Linezolid caused a delay in the growth of all the studied isolates.

The isolated MRSA strains differed significantly by the resistance level depending on the kind of the biomaterial taken. The MRSA strains isolated from the nasal cavity, outer ear swab, samples of urine, sputum and faeces appeared to be most resistant to the tested antimicrobial preparations.

Rifampicin- and vancomycin-resistant strains of methicillin-resistant staphylococci (21.3% of the total number of MRSA) were most often isolated from the clinical samples taken from the nasal cavity and faeces at intestinal dysbioses. When determining the MIC of rifampicin and vancomycin, which are antibiotics of choice in the treatment of infections caused by multiresistant MRSA, it was found that MIC of rifampicin coincided with the threshold value for this antibiotic for 55.5% of MRSA strains from the faeces of patients with dysbiotic disturbances of the intestinal microflora and exceeded the threshold value by 2 times (4 $\mu\text{g/ml}$) for 44.5% of them. 22.2% of them were characterized by the critical level of susceptibility to vancomycin (MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$). From rifampicin- and vancomycin-resistant MRSA strains, isolated from the nasal cavity, MIC of rifampicin coincided with the threshold value for this antibiotic for 66.7% of the cultures and exceeded it at least by 2 times for 33.3% of the cultures. 11.1% of them were characterized by a critical level of susceptibility to vancomycin (MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) and by 3.7% of the strains exceeded MIC by 2 and 4 times, respectively (4 and 8 $\mu\text{g/ml}$).

References

- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capuro, A., Bello-Toledo, H., Dominguez, M., & González-Rocha, G. (2018). Molecular basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 7–14.
- Appelbaum P. (2007). Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agent*, 30(5), 398–408.
- Bakthavatchalam, Y., Veeraraghavan, B., Devanga Ragupathi, N., Babu, P., Munuswamy, E., & David, T. (2017). Draft genome sequence of reduced teicoplanin-susceptible and vancomycin-heteroresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from sepsis cases. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 169–171.
- Bakthavatchalam, Y., Veeraraghavan, B., Peter, J., Rajimanth, J., Inbanathan, F., Devanga Ragupathi, N., & Rajamani Sekar, S. (2016). Novel observations in 11 heteroresistant vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from South India. *Genome Announcements*, 4(6), e01425-16.
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., & Peters, G. (2018). Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 24(2), 242–248.
- Brinkman, C., Schmidt-Malan, S., Mandrekar, J., & Patel, R. (2017). Rifampin-based combination therapy is active in foreign-body osteomyelitis after prior rifampin monotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), e01822-16.
- DeLeo, F., Otto, M., Kreiswirth, B., & Chambers, H. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 375(9725), 1557–1568.
- Dhanoo, A., Singh, V. A., Mansor, A., Yusof, M. Y., Lim, K. T., & Thong, K. L. (2012). Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: Case report and review of literature. *BMC Infectious Diseases*, 12, 270.
- Ehelepola, N., Rajapaksha, R., Dhanapala, D., Thennekoon, T., & Ponnamperuma, S. (2018). Concurrent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* septicemia and pyomyositis in a patient with dengue hemorrhagic fever: A case report. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 99.
- García-Garrote, F., Cercenado, E., Marín, M., Bal, M., Trincado, P., Corredoira, J., Ballesteros, C., Pita, J., Alonso, P., & Vindel, A. (2014). Methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: Emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 45–50.
- Gomes, D., Ward, K., & LaPlante, K. (2015). Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy*, 35(4), 424–432.
- Hamdan-Partida, A., González-García, S., de la Rosa García, E., & Bustos-Martínez, J. (2018). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* can persist in the throat. *International Journal of Medical Microbiology*, in press.
- Hibbitts, A., & O'Leary, C. (2018). Emerging nanomedicine therapies to counter the rise of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Materials*, 11(2), e321.
- Howden, B. (2005). Recognition and management of infections caused by vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous VISA (hVISA). *Internal Medicine Journal*, 35(2), 136–140.
- Howden, B., Peleg, A., & Stinear, T. (2014). The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 575–582.
- Jang, H., Kim, S., Kim, K., Kim, C., Lee, S., Song, K., Jeon, J., Park, W., Kim, H., Park, S., Kim, N., Kim, E., Oh, M., & Choe, K. (2009). Salvage treatment for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: Efficacy of linezolid with or without carbapenem. *Clinical Infectious Diseases*, 49(3), 395–401.
- Khan, A., Wilson, B., & Gould, I. (2018). Current and future treatment options for community-associated MRSA infection. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(5), 457–470.
- Lawes, T., Lopez-Lozano, J., Nebot, C., Macartney, G., Subbarao-Sharma, R., Dare, C., Wares, K., & Gould, I. (2015). Effects of national antibiotic stewardship and infection control strategies on hospital-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections across a region of Scotland: A non-linear time-series study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 15(12), 1438–1449.
- Li, J., Feßler, A., Jiang, N., Fan, R., Wang, Y., Wu, C., Shen, J., & Schwarz, S. (2016). Molecular basis of rifampicin resistance in multiresistant porcine livestock-associated MRSA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 71(11), 3313–3315.
- Marimuthu, K., & Harbarth, S. (2014). Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*... all doors closed? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(4), 356–362.
- Miller, W., Bayer, A., & Arias, C. (2016). Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and enterococci. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(11), a026997.
- Oh, E., Bae, J., Kumar, A., Choi, H., & Jeon, B. (2018). Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, in press.
- Para, R., Fomda, B., Jan, R., Shah, S., & Koul, P. (2018). Microbial etiology in hospitalized North Indian adults with community-acquired pneumonia. *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society*, 35(2), 108–115.
- Pardos de la Gandara, M., Borges, V., Chung, M., Milheiro, C., Gomes, J. P., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (2018). Genetic determinants of high-level oxacillin resistance in MRSA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4), AAC.00206-18.
- Rybak, J., Marx, K., & Martin, C. (2014). Early experience with tedizolid: Clinical efficacy, pharmacodynamics, and resistance. *Pharmacotherapy*, 34(11), 1198–1208.
- Sakoulas, G., Rose, W., Berti, A., Olson, J., Munguia, J., Nonejuie, P., Sakoulas, E., Rybak, M., Pogliano, J., & Nizet, V. (2017). Classical β -lactamase inhibitors potentiate the activity of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and colistin against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), e01745-16.
- Sirichoat, A., Lulitanond, A., Kanlaya, R., Tavichakomtrakool, R., Chanawong, A., Wongthong, S., & Thongboonkerd, V. (2016). Phenotypic characteristics and comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* strains with different vancomycin-resistance levels. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 340–344.
- Skov, R., Christiansen, K., Dancer, S., Daum, R., Dryden, M., Huang, Y., & Lowy, F. (2012). Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(3), 193–200.
- Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., & Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.
- Tran, K., & Rybak, M. (2018). Beta-lactams combinations with vancomycin provide synergy against VSSA, hVISA, and VISA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5), AAC.00157-18.
- Tremblay, S., Lau, T., & Ensom, M. (2013). Addition of rifampin to vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: What is the evidence? *Annals of Pharmacotherapy*, 47(7–8), 1045–1054.
- van Kleef, E., Luangasanatip, N., Bonten, M., & Cooper, B. (2017). Why sensitive bacteria are resistant to hospital infection control. *Wellcome Open Research*, 2, 16.
- Wang, J., Lai, C., Lin, H., Chen, W., Shih, Y., & Hung, C. (2013). High vancomycin minimum inhibitory concentrations with heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in methicillin-resistant *S. aureus* bacteraemia patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(5), 390–394.
- Zhang, S., Sun, X., Chang, W., Dai, Y., & Ma, X. (2015). Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One*, 10(8), e0136082.
- Zheng, X., Berti, A., McCrone, S., Roch, M., Rosato, A., Rose, W., & Chen, B. (2018). Combination antibiotic exposure selectively alters the development of vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(2), e02100-17.



Glutathione s-transferase as a marker of oxidative stress in human ejaculated spermatozoa from patients with pathospermia

M. Z. Vorobets, R. V. Fafula, A. S. Besedina, O. K. Onufrovyh, D. Z. Vorobets

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Article info

Received 16.03.2018

Received in revised form
14.04.2018

Accepted 18.04.2018

Danylo Halytsky Lviv
National Medical University,
Pekarska st. 69,
Lviv, 79010, Ukraine.
Tel.: +38-032-275-49-66.
E-mail: roman_fafula@ukr.net

Vorobets, M. Z., Fafula, R. V., Besedina, A. S., Onufrovyh, O. K., & Vorobets, D. Z. (2018). Glutathione s-transferase as a marker of oxidative stress in human ejaculated spermatozoa from patients with pathospermia. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 287–292. doi:10.15421/021842

It is believed that the most common causes of male infertility are impairment of spermatogenesis and sperm functions. Glutathione S-transferases (EC 2.5.1.18) play an important role in sperm physiology, specifically in antioxidant protection against oxidative damage. The catalase decomposition of lipid hydro-peroxides forms as a result of oxidative stress. We used a model of superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 -induced stress to study the activity of glutathione s transferase in human ejaculated spermatozoa from patients with pathospermia and products of lipid peroxidation (TBARS) as a marker of oxidative stress. In the present study, dose dependent increase in the level of lipid peroxidation was observed for treatment with Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 . The TBARS level was higher for sperm cells incubated with superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate than for H_2O_2 . GSTs activity increased in spermatozoa treated with increasing concentration of superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate and H_2O_2 . We found that both Fe^{3+} /ascorbate and H_2O_2 displayed similar inhibitory effects on sperm GSTs activity, however H_2O_2 at low concentrations activated enzyme activity only in normozoospermic samples, which can be explained as a defence response to oxidative stress. 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. Preincubation of spermatozoa with GSH completely prevented the ROS-induced inhibition on GSTs only in normozoospermic samples. On the other hand, in pathospermic samples protective effect of GSH was observed only against non-radical (H_2O) radical, but not against radical (superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate) species. The results of our study showed higher oxygen-free radical production, evidenced by increased TBARS level in spermatozoa obtained from infertile men than normozoospermic men. The inhibitory effect of the radical (superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate) species on sperm GSTs activity and products of lipid peroxidation in sperm cells of fertile and infertile men were more expressed compared to non-radical (H_2O) species. Our results indicate that estimation of sperm GSTs enzyme assays can be used as a bioindicator for impaired male fertility. The obtained results argue for a biological role of sperm GSTs in susceptibility of spermatozoa to oxidative damage and maintaining sperm antioxidant status.

Keywords: glutathione S-transferase activity; lipid peroxidation; antioxidant protection; sperm cells; pathospermia; male infertility

Introduction

Infertility is one of the most serious medical and sociodemographic problems worldwide. Approximately 30–40% of infertility cases are caused by male factors (Buzadzic et al., 2015; Esteves et al., 2015). Dramatic increase in male infertility over the last decades has been observed. Male infertility is a heterogeneous disorder which is associated with different genetic and environmental factors contributing to impaired spermatogenesis. The pathophysiology of male infertility is related to the cascade of molecular and biochemical processes which are reflected in abnormal semen parameters, for example sperm concentration, motility, morphology etc. (Hesham et al., 2008). Oxidative stress-induced sperm damage is considered as a significant contributing factor in 30–80% of all cases of male infertility (Esteves et al., 2011). It is well recognized that oxidative stress is induced by high levels of reactive oxygen species (ROS). Physiological levels of ROS are required for sperm hyperactivation, capacitation, acrosome reaction etc., however excessive levels of ROS can negatively affect functions of sperm cells. ROS can be

produced by human spermatozoa. The main sources of endogenous ROS in semen are both abnormal spermatozoa and leukocytes (Sakkas et al., 2003). ROS include radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\text{HO}^{\cdot}$) and non-radical species (H_2O_2), with quite different stabilities and reactivities (Halliwell, 2007). These properties will depend on whether they are generated in a soluble or membrane-associated cell fraction and their targets for oxidation and mechanisms may be different (Halliwell et al., 2007; Letelier et al., 2010).

Since spermatozoa have to pass through different reproductive tract fluids in order to reach the oocyte, the exposure to ROS is high because of the presence of immune cells in the reproductive tract (Ball et al., 2005). In comparison to somatic cells, the ejaculated human sperm cells, as aerobic cells are highly sensitive to high levels of ROS or ROS-generated products since they are rich in unsaturated fatty acids on their plasma membrane (Storey, 2008; Aitken et al., 2012). To counteract the damaging effect of ROS, sperm cells have extensive antioxidant defence mechanisms. One of the defence systems against the oxidative stress in spermatozoa is the glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) which detoxify electrophilic com-

pounds. GSTs are the intensely investigated conjugation enzymes. Enzymes are multifunctional proteins ubiquitously expressed in most living organisms which catalyze glutathione (GSH, a tripeptide γ -Glu-Cys-Gly) conjugation with different toxic substrates provided with an electrophilic center (Hayes et al., 2005; Sahoo, 2011). GSTs play an important role not only in detoxifying electrophilic xenobiotics, but also in inactivation of secondary metabolites produced as a result of oxidative stress (Nissar et al., 2017). Since GSTs plays a critical role in defence mechanisms against oxidative stress in all life forms, GSTs activity also has been widely used as a biomarker to detect stress (Farombi et al., 2007). There is evidence that genetic variation in the glutathione S-transferase influences individual susceptibility to disease associated with oxidative stress (Onaran et al., 2001).

We used a model of superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 -induced stress to study the activity of glutathione S-transferase in human ejaculated spermatozoa from patients with pathospermia and products of lipid peroxidation as a marker of oxidative stress.

Materials and methods

Patients. 32 infertile men with pathospermia (oligozoospermia, asthenozoospermia, oligoasthenozoospermia) were involved in this study. Exclusion criteria: azoospermia, genital infection, subjects with infertility lasting over 10 years, chronic illness and serious systemic diseases, smokers and alcoholic men (because of their well-known high seminal ROS levels and decreased antioxidant activity which may affect GSTs). Subjects currently on any medication or antioxidant supplementation were not included in the study. Control group – 10 healthy men with proven fertility (married for 3–10 years and have healthy 1–3 children) and normozoospermia. Semen samples were obtained by masturbation following 3–5 days' abstinence from sexual activity. Samples were collected into sterile containers. After liquefaction (at 37 °C with 5% CO_2 in air), semen samples were examined for spermogram parameters (volume, pH, sperm concentration, morphology and motility according to World Health Organization guidelines, 2010).

Ethical approval. All the men involved read patient information leaflets and gave informed consent to participate in the study. Terms of sample selection meet the requirements of the principles of Convention of Europe Council on Human Rights, the Helsinki Declaration on Protection of Human Rights and Biomedicine and the laws of Ukraine. Approval for study was taken from the ethics committee of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ethical Committee Approval, protocol No 6 from March 29, 2017).

Cell preparation. Spermatozoa were washed from semen plasma by 3 times centrifugation in media (pH 7.4) which contained (mM): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (3,000 g for 10 min). The total protein content in the samples was determined by Lowry method using a kit to determine its concentration (Simko Ltd.). Determination of lipid peroxidation products and GSTs enzyme activity were carried out on permeabilized spermatozoa. The detergent saponin was added to sperm suspension for permeabilization of sperm membranes (final concentration 0.5%) (Vorobets et al., 2008).

The aliquots were subjected to exogenous ROS stimulation with superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 (37 °C, 5% CO_2) at different concentrations (50, 100 and 500 μM) (if nothing else is indicated). Sperm samples without exogenous ROS served as control in the study. Also, when indicated, reduced glutathione (5.0 mM GSH) was present during the ROS-treatment.

GSTs Enzyme Assay. The activity of glutathione S-transferase was determined spectrophotometrically using enzyme-catalysed condensation of glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as an electrophilic substrate. The product formed (2,4-dinitrophenyl-glutathione) absorbs light at 340 nm with an extinction coefficient of 9.6 mM/cm. The reaction mixture in a volume of 3 mL contained 2.5 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5), 0.2 mL of 15 mM CDNB and 0.3 mL of 30 mM GSH, as enzyme source. The reaction was initiated by glutathione.

Lipid peroxidation. Peroxidative damage was estimated spectrophotometrically by the assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and expressed in terms of nmole of malondialdehyde (MDA) formed per mg protein (Timirbulatov et al., 1981).

Statistical analysis. The results are presented as the mean $\pm$ standard error ($M \pm SE$). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the difference in the means between studied groups. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

The present study analyzes the effect of the radical (superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate) and non-radical (H_2O) species on sperm GSTs activities and lipid peroxidation products in sperm cells of fertile and infertile men.

Lipid peroxidation products in response to oxidative stress. Dose dependent increase in the level of lipid peroxidation was observed on treatment with Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 (Fig. 1). For normozoospermic samples, the increase in the TBARS level was significant for the dose of ROS higher than 100 μM used in the experiment compared to untreated sperm cells. However, for pathospermic samples the increase in the TBARS level was significant for all doses of ROS. As can be seen from Figure 1, the TBARS level was higher for sperm cells incubated with superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate than for H_2O_2 .

To establish whether products of lipid peroxidation did affect sperm, normozoospermic and pathospermic sperm samples were incubated with exogenous Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 and GSTs activity of the spermatozoa was recorded (Fig. 2). This experiment shows that the byproducts of lipid peroxidation generated by Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 treatment caused decreases in sperm GSTs activity in dose dependent manner. However, in normozoospermic samples low concentrations of H_2O_2 (50 μM) induced activation of sperm GSTs activity to 144% ($P < 0.01$) in comparison with untreated cells. For similar concentrations of Fe^{3+} /ascorbate a significant decrease in GSTs activity was observed, particularly in pathospermic samples. The residual GSTs activities remained in both normo- and pathospermic samples. Similar results were obtained for sperm cells of patients with oligoasthenozoospermia (data not shown).

Also, sperm cells were incubated with 100 μM anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 at different times and then GSTs activity was determined (Fig. 3). 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 pathospermic men. The residual GSTs activities remained in normo- and pathospermic samples after 15 min of incubation with both anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate and H_2O_2 .

It is known that thiol groups in GSTs enzymes can be protected by pre incubation with its cofactor GSH because the redox-reactive cysteine residues may be located in the region for GSH binding (Cheng et al., 2001). In order to evaluate this protective effect, we investigated whether pre-incubation (20 min) of the spermatozoa with the cofactor GSH affects GSTs activity under oxidative stress. As can be seen from Figure 4, the pre-incubation of spermatozoa with GSH completely prevented the ROS-induced inhibition on GSTs only in normozoospermic samples. On the other hand, in pathospermic samples, the protective effect of GSH was observed only against non-radical (H_2O) radical, but not against radical (superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate) species.

Discussion

It is believed that the most common causes of male infertility are impairment of spermatogenesis and sperm functions. The factors contributing to abnormal sperm functions leading to infertility are not fully understood (Said et al., 2005). Oxidative stress in spermatozoa is one of the factors related to male infertility (Joffe, 2010; Garrido et al., 2004). The purpose of the present study was to evaluate the effects of the radical (superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate) and

non-radical (H_2O) species on TBARS levels and GSTs activity and in spermatozoa of fertile and infertile men. Previously, the increased TBARS level and decreased GSTs activity in spermatozoa obtained from infertile men were reported by our laboratory. We have shown that TBARS level in spermatozoa of men with oligozoospermia, asthenozoospermia, oligoasthenozoospermia and leucocytospermia was sig-

nificantly higher than in normozoospermic samples (Fafula et al., 2017). As a result of the correlation analysis we found an inverse correlation between TBARS content in spermatozoa in infertile men and the number of sperm cells in the ejaculate, their motility, which indicates direct pathogenetic link between the level of lipid peroxidation and decrease in fertility potential (Fafula et al., 2017).

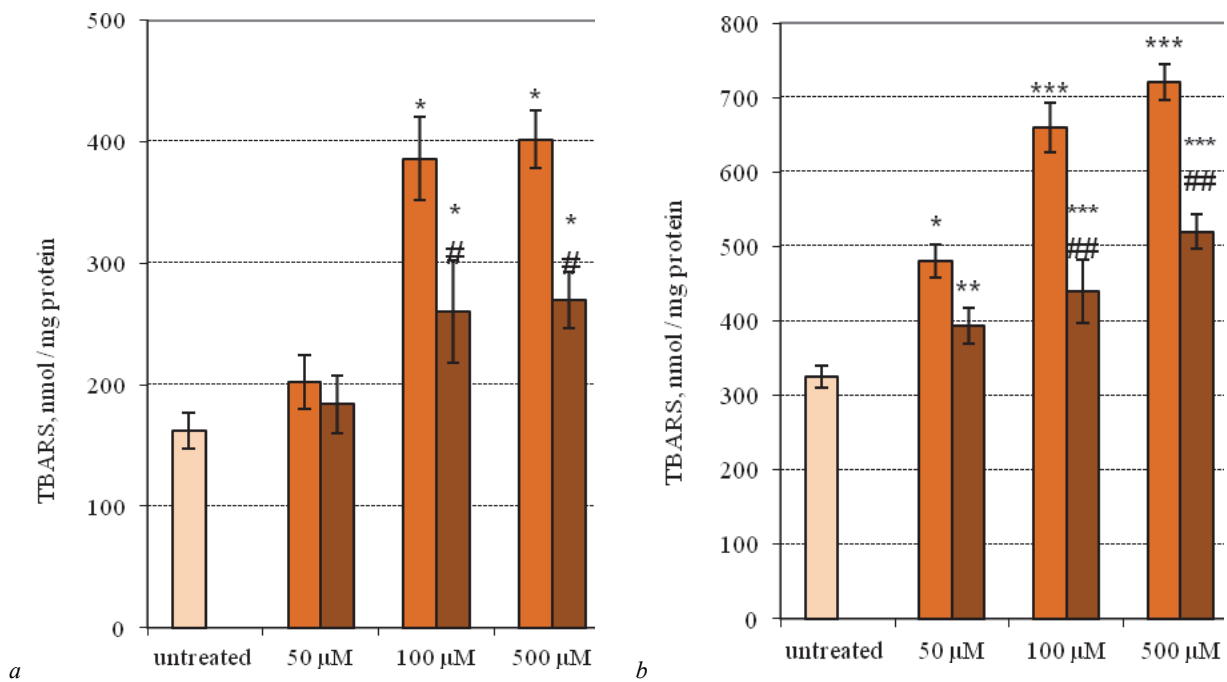


Fig. 1. Effect of superoxide anion-generating system $\text{Fe}^{3+}/\text{ascorbate}$ (■) and H_2O_2 (■) on the TBARS level in spermatozoa of normozoospermic (a) and asthenozoospermic (b) men. Sperm cells were incubated for 5 min at 37 °C as described in “Material and Methods”. Data are presented as $x \pm \text{SE}$. * – $P < 0.05$; *** – $P < 0.001$ compared to untreated cells; # – $P < 0.05$; ## – $P < 0.01$ compared to cells treated with H_2O_2 .
GSTs enzyme activity in response to induced oxidative stress

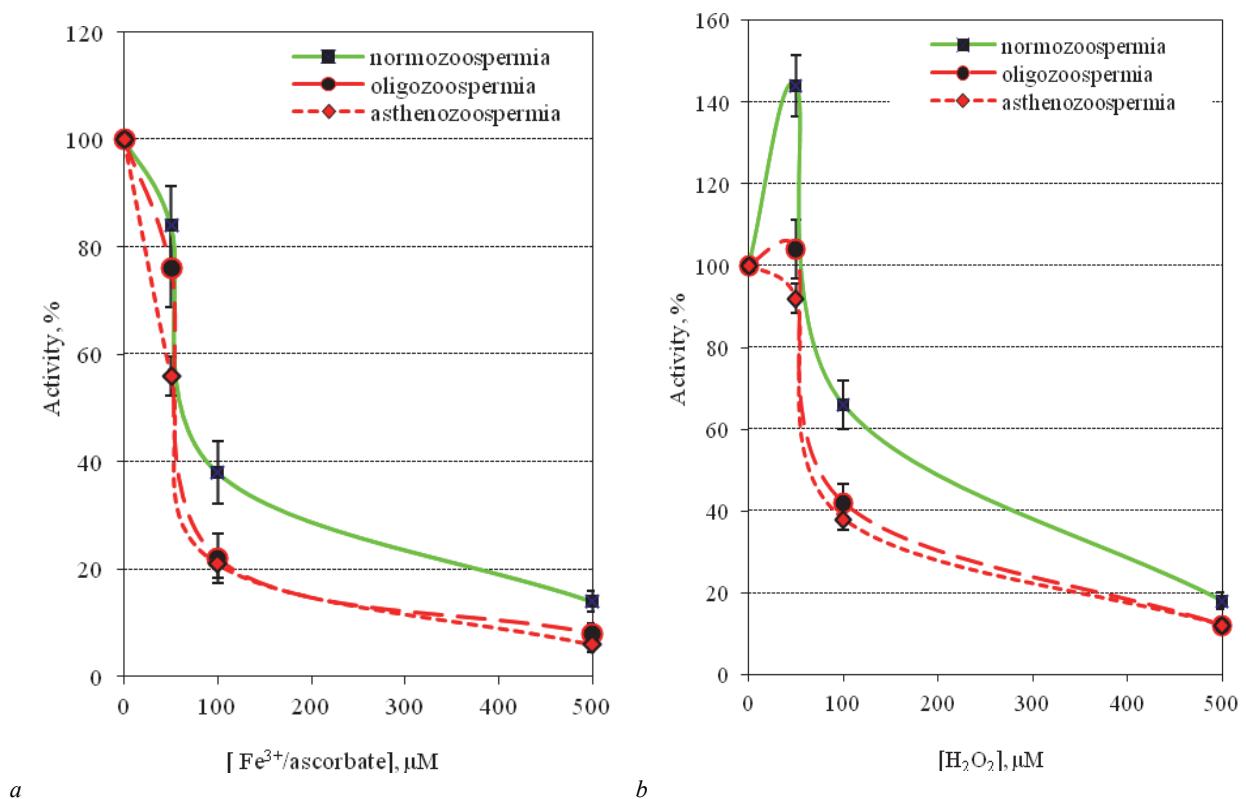


Fig. 2. Effect of superoxide anion-generating system $\text{Fe}^{3+}/\text{ascorbate}$ (a) and H_2O_2 (b) on the GSTs activity of spermatozoa of fertile and infertile men. Sperm cells were incubated for 5 min at 37 °C as described in “Material and Methods”. Data are expressed as the percent residual GSTs activity considering 100% the activity assayed in the absence of ROS. Data are presented as $x \pm \text{SE}$

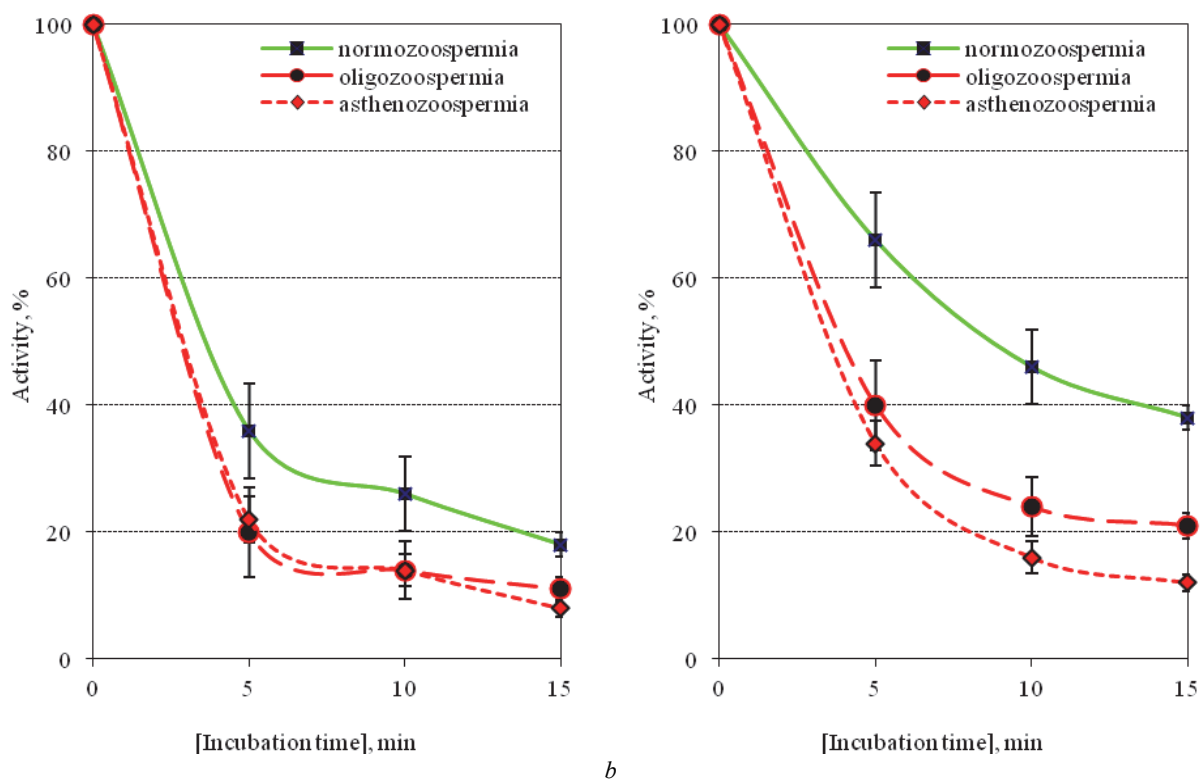


Fig. 3. Time course of GSTs inhibition by anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate (a) and H_2O_2 (b) in spermatozoa of fertile and infertile men. Sperm cells were incubated with $100\mu\text{M Fe}^{3+}/1\text{ mM ascorbate}$ or H_2O_2 as described in “Material and Methods”. Data are expressed as the percent residual GSTs activity considering 100% the activity assayed in the absence of ROS. Data are presented as $x \pm \text{SE}$

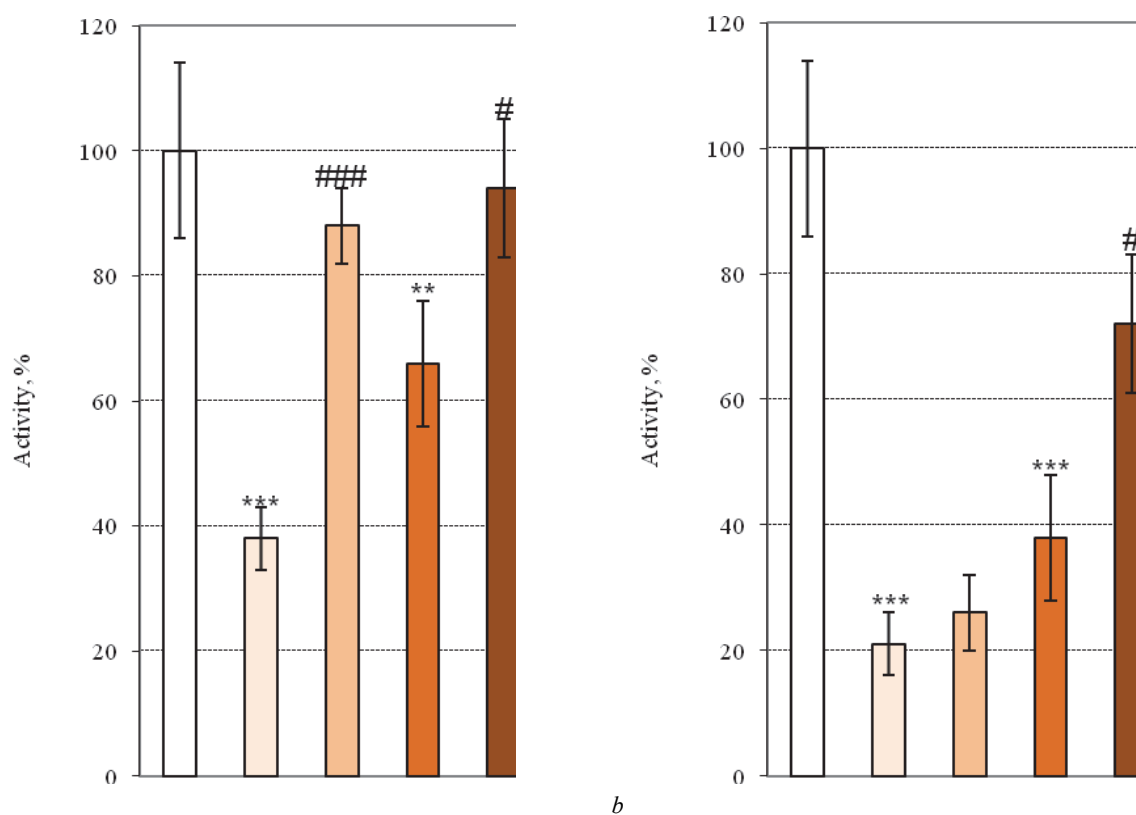


Fig. 4. Effect of superoxide anion-generating system Fe^{3+} /ascorbate, H_2O_2 and GSH on the GSTs activity of spermatozoa of normozoospermic (a) and asthenozoospermic (b) men. Data are expressed as the percent residual GSTs activity considering 100% the activity assayed in the absence of ROS. $\square$ – control, $\square$ – Fe^{3+} /ascorbate, $\square$ – Fe^{3+} /ascorbate + GSH, $\square$ – H_2O_2 , $\square$ – H_2O_2 + GSH. Data are presented as $x \pm \text{SE}$. ** – $P < 0.01$; *** – $P < 0.001$ compared to untreated cells; # – $P < 0.05$; ### – $P < 0.01$ compared to cells treated with Fe^{3+} /ascorbate or H_2O_2 without GSH

- Onaran, I., Guven, G., Ozaydin, A., & Ulutin, T. (2001). The influence of GSTM1 null genotype on susceptibility to *in vitro* oxidative stress. *Toxicology*, 157(3), 195–205.
- Sahoo, D. K. (2011). Effects of thyroid hormone on testicular functions and antioxidant defence status. *Biochemistry: An Indian Journal*, 5(6), 337–334.
- Said, T. M., Agarwal, A., Sharma, R. K., Thomas, A. J., & Sikka, S. C. (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertility and Sterility*, 83, 95–103.
- Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N., & Manicardi, G. C. (2003). Abnormal spermatozoa in the ejaculate: Abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 7, 428–432.
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 427–437.
- Tang, K., Xue, W., Xing, Y., Xu, S., Wu, Q., Liu, R., Wang, X., & Xing, J. (2012). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1, and the assessment of oxidative damage in infertile men with varicoceles from northwestern China. *Journal Andrology*, 33(2), 257–263.
- Timirbulatov, R., & Seleznev, E. (1981). Metody povysheniya intensivnosti svobodno-zadikal'nogo okisleniya lipidosoderzhashhih komponentov krovi i ego diagnosticheskoe znachenie [Method of increasing intensity of free-radical oxidization of lipid components of blood and its diagnostic value]. *Laboratory Business*, 4, 209–211 (in Russian).
- Vorobets, D., & Kocheshkova, N. (2008). Neplidnist' ta erektil'na disfunkcija cholovikiv: Biohimichni ta klinichni aspekty [Infertility and erectile dysfunction men: Biochemical and clinical aspects]. *Ukrmedknyha, Ternopil* (in Ukrainian).



Dynamic of accumulation and redistribution of various carbohydrate forms and nitrogen in organs of tomatoes under treatment with retardants

V. V. Rogach, O. O. Kravets, O. I. Buina, V. G. Kuryata

Vinnitsia Mykhailo Kotsiubynskiy State Pedagogical University, Vinnitsia, Ukraine

Article info

Received 17.02.2018

Received in revised form
26.03.2018

Accepted 30.03.2018

Vinnitsia Mykhailo
Kotsiubynskiy State
Pedagogical University,
Ostrozshkogo st., 32,
Vinnitsa, 21000, Ukraine.
Tel.: +38-098-594-48-32.
E-mail: rogachv@ukr.net

Rogach, V. V., Kravets, O. O., Buina, O. I., & Kuryata, V. G. (2018). Dynamic of accumulation and redistribution of various carbohydrate forms and nitrogen in organs of tomatoes under treatment with retardants. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 293–299. doi:10.15421/021843

The regulation of plant growth and development under application of antigibberellin compounds is accompanied by changes in the donor-acceptor system that in turn affects the accumulation and redistribution of carbohydrates and nitrogen-containing compounds. We studied the influence of tebuconazole 0.025% (EW-250) and 0.05% and 0.07% esphon (2-CEPA) on growth processes, leaf apparatus and content of various carbohydrate forms and total nitrogen content in vegetative organs of tomato hybrids Bobkat and Solerosso. A field-based micro-trial setup was established from 2013 to 2017. The plants were treated via foliar spraying with aqueous solution of retardants at the time of initiation of budding. Phytometric measurements were determined every 10 days, the content of various carbohydrate forms and total nitrogen in organs of plants was determined by using biochemical methods in a fixed dry material (the content of sugars and starch – by iodometric method, and the total nitrogen content – by Kjeldahl). It was found that both retardants reduced the linear growth of tomato plants. The results indicate that 2-CEPA treatment significantly decreased the plant height of both hybrids. Application of drugs increased the number of leaves per plant. The leaf dry matter weight increased, the most significant effect was created by EW-250. The leaf area of the retardant-treated tomatoes hybrid Solerosso increased and decreased in the hybrid Bobcat. Application of antigibberellin compounds intensified the outflow of sugars and remobilization of starch in roots and stems of both tomato hybrids. The content of starch, reducing and non-reducing sugars in leaves of hybrid Solerosso was higher after EW-250 treatment. 2-CEPA increased the content of reducing form of sugars, and EW-250 increased non-reducing form in the hybrid Bobkat. EW-250 intensified the accumulation of carbohydrates in fruits due to reducing sugars in both tomato hybrids, whereas 2-CEPA reduced their content compared with control. Growth inhibitors increased the starch content in fruits at the beginning of vegetation and intensified its reutilization at the end. This process was most intensive in variant of EW-250-treated plants regardless of hybrids. We proved that there was a clear tendency to decrease the ratio of sugar content to starch in almost all organs of both tomato hybrids during the growing season. The most significant was the reduction of this ratio after EW-250 treatment. At the fruitification phase, the proportion of starch in retardant-treated plants increased compared to the control. The increased accumulation of carbohydrates in tomato fruits treated with EW-250 caused an increase in the average weight of the fruit. We have found that the total nitrogen content in vegetative organs decreased in the control and in the experimental variant of both tomato hybrids during vegetation. EW-250 accelerated the outflow of total nitrogen from roots and stems and increased its content in leaves. This drug retarded the accumulation of this element in fruit. Such changes in the dynamics of total nitrogen under the influence of tebuconazole resulted in enhanced formation of fruit on tomato plants. We concluded that the antigibberellin compounds EW-250 and 2-CEPA due the action on growth processes and leaf apparatus of tomato plants, changed the character of donor-acceptor relation through an increase in outflow of plastic substances from vegetative organs to fruits, which optimized the crop production.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; antigibberellin compounds; leaf apparatus; sugar; starch; total nitrogen; productivity

Динаміка накопичення та перерозподілу різних форм вуглеводів та азоту в органах рослин томатів за дії ретардантів

В. В. Рогач, О. О. Кравець, О. І. Буйна, В. Г. Кур'ята

Вінницький державний педагогічний університет імені Михайла Коцюбинського, Вінниця, Україна

Регуляція росту та розвитку рослин за допомогою антигіберелінових препаратів супроводжується змінами у донорно-акцепторній системі, що впливає на накопичення та перерозподіл основних пластичних речовин (вуглеводів і азотумісних сполук). Досліджували вплив 0,025% тебуконазолу (EW-250) та 0,05% і 0,07% есфону (2-ХЕФК) на ростові процеси, листковий апарат та вміст різних форм вуглеводів і загального азоту у вегетативних органах томатів гібридів Бобкат і Солеросо. Польові дрібноділянкові досліді закладали в 2013–2017 роках. Рослини обробляли у фазу бутонізації водними розчинами ретардантів за допомогою ранцевого обприскувача. Фітотетричні показники визначали

кожні 10 діб, вміст різних форм вуглеводів і загального азоту в органах рослин визначали біохімічними методами у фіксованому сухому матеріалі (вміст цукрів і крохмалю визначали йодометричним методом, а вміст загального азоту – методом К'ельдаля). Обидва препарати зменшували лінійні розміри рослин томатів. Найсуттєвіше зменшення висоти в обох гібридів спостерігали після застосування 2-ХЕФК. Препарати збільшували кількість листків на рослині. Маса сухої речовини листків зростала тільки після обробки EW-250. Площа листків за дії ретардантів зростала у гібриду Солеросо та зменшувалася у гібриду Бобкат. Застосування антигіберелінових препаратів посилювало відтік цукрів та реутилізацію крохмалю з коріння та стебел обох гібридів томатів. У листках гібриду Солеросо вміст крохмалю, редукуючих і нередукуючих цукрів став вищим після застосування EW-250. У гібриду Бобкат 2-ХЕФК зумовлювала збільшення вмісту редукуючих форм цукрів, а EW-250 – нередукуючих. EW-250 посилював накопичення цукрів у плодах за рахунок редукуючих форм в обох гібридів томатів, тоді як 2-ХЕФК знижувала їх вміст порівняно з контролем. Інгібітори росту підвищували вміст крохмалю у плодах на початку вегетації та інтенсифікували його реутилізацію наприкінці. Найшвидше це відбувалося після обробки рослин томатів EW-250 незалежно від гібриду. Впродовж вегетації спостерігали тенденцію до зменшення відношення суми цукрів до крохмалю практично в усіх органах обох гібридів томатів. Найсуттєвіше зменшення цього співвідношення зафіксовано після обробки рослин томатів EW-250. Під час появи плодів частка крохмалю у рослин, що зазнали дії ретардантів, була більшою, ніж у контролі. Посилене накопичення вуглеводів плодами рослин томатів, оброблених EW-250, зумовило зростання середньої маси одного плоду. Впродовж вегетації відбувалося зменшення вмісту загального азоту у вегетативних органах як у контролі, так і в досліді в обох гібридів томатів. EW-250 пришвидшував відтік загального азоту з коріння та стебел і збільшував його вміст у листках. За дії триазолового препарату відбувалося уповільнення накопичення цього елемента у плодах. Такі зміни у динаміці загального азоту за впливу тебуконазолу зумовили посилену закладку плодів на рослинах томатів. Антигіберелінові препарати EW-250 та 2-ХЕФК, впливаючи на ростові процеси та листковий апарат рослин томатів, посилювали відтік пластичних речовин від вегетативних органів до плодів, що підвищувало продуктивність культури.

Ключові слова: *Solanum lycopersicum*; антигіберелінові препарати; листковий апарат; цукри; крохмаль; загальний азот; продуктивність

Вступ

Вивчення закономірностей функціонування донорно-акцепторної системи рослин і розроблення засобів екзогенної регуляції переміщення потоків асимілятів, спрямування їх до господарсько-важливих тканин і органів – актуальні завдання сучасної фітофізіології. Застосування ретардантів та етиленпродуцентів дає можливість змінювати напруженість донорно-акцепторної системи рослини внаслідок регуляції процесів росту, фотосинтезу та перерозподілу потоків пластичних речовин із вегетативних органів на потреби карпогенезу (формування та ріст плодів), що в кінцевій меті оптимізує продукційний процес у сільсько-господарських культур (Singh et al., 2017).

У рослин батату обробка триазолопохідним ретардантом паклобутразолом зумовлювала зростання площі листової поверхні та підвищувала вміст редукуючих і нередукуючих цукрів у листках на 3,8%. За дії препарату також зростав вміст деяких амінокислот і підвищувалася продуктивність культури (Yoon-gwech et al., 2017). Обробка паклобутразолом рослин манго збільшувала вміст усіх форм цукрів у плодах і підвищувала врожайність культури (Sarker et al., 2016). Цей же препарат підвищував вміст вуглеводів у рослин рису (Xiang et al., 2017). Застосування паклобутразолу на рослинах каноли у фазу бутонізації гальмувало ростові процеси та посилювало накопичення розчинних цукрів, сахарози та крохмалю у стеблах і плодах з одночасним зменшенням їх вмісту в корінні. Ретардант підвищував ефективність утилізації вуглеводів рослинами, що позитивно вплинуло на урожайність культури (Hua et al., 2014). Іншим триазолопохідним препаратом – уніконазолом – обробляли насіння соєвих бобів. Спостерігали зменшення площі листової поверхні та підвищення продуктивності культури (Yan et al., 2015). За дії цього ж ретарданту відбувалося збільшення вмісту крохмалю у рослин *Landoltia punctata* (Liu et al., 2014).

Застосування суміші паклобутразолу та хлормекватхлориду на рослинах пажитниці багаторічної зменшувало лінійні розміри рослин, збільшувало масу сирої та сухої речовини рослини. За впливу суміші ретардантів зростав вміст суми цукрів та зменшувалася вміст крохмалю (Kasem & Abd El-Baset, 2015). Ретарданти хлормекватхлорид і паклобутразол підвищували вміст сахарози в листках лилії (Zheng et al., 2012). Wang et al. (2016) встановили, що хлормекватхлорид пришвидшував відтік розчинних цукрів від листків до плодів у рослин кукурудзи та збільшував вміст білків у їх листках. Цей же ретардант збільшував вміст редукуючих цукрів і крохмалю у бульбах картоплі (Koteswara Rao et al., 2017). Зростання вмісту розчинних цукрів і амінокислот за дії хлормекватхлориду спостерігали також у саджанців гінго дволопатевого (Zhang et al., 2013). Застосування препарату цикоцель на рослинах коноплі зумовлювало збільшення вмісту редукуючих цукрів у листках чоловічих рослин порівняно з контролем

(Sardoei et al., 2014). Цикоцель також збільшував загальний вміст цукрів за рахунок редукуючих форм у рослин винограду (Kumbar et al., 2017).

Вплив антигіберелінових препаратів пов'язаний із двома фізіологічними ефектами. Вони або інгібують синтез гібереліну – триазолопохідні та онієві препарати (Rademacher, 2016), або ж блокують утворення гормон-рецепторного комплексу, тобто нівелюють вплив уже синтезованого гібереліну, – етиленпродуценти та гідразинпохідні сполуки (Zemlyanskaya et al., 2016).

Дія похідних триазолу на ріст осових органів рослин пов'язана з пригніченням активності ент-кауренсинтетази та інгібуванням біосинтезу гіберелінів у трьох ланках цього процесу: на стадії перетворення геранілгераніолдифосфату в копаліпірофосфат і надалі в ент-каурен, як і деякі четвертинні амонієві солі (Rademacher, 2016). Крім цього, триазолопохідні препарати пригнічують перетворення ент-каурену в ент-кауренол, ент-кауренолу через ент-кауреналь в кауренову кислоту, що забезпечує надзвичайно високу та стабільну ретардантну активність стосовно росту стебла та проростання насіння багатьох рослин за рахунок пригнічення активності α -амілази (Rademacher, 2016).

Дія етиленпродуцентів пов'язана з блокуванням утворення гормон-рецепторного комплексу. Тобто етилен запобігає сполученню гормону з рецептором, чим інгібує дію гіберелінової кислоти, і, як результат, пригнічує ростові процеси. Але, на відміну від онієвих препаратів, триазолів та дихлорізобутиратів, етиленпродуценти швидко розкладаються та мають короткий час дії (Rademacher, 2016).

Фотосинтетична продуктивність рослин упродовж вегетації вважається основою функціонування донорно-акцепторних відносин у системі «депо асимілятів – ріст». У рослин концепція донорно-акцепторних відносин визначається системою прямих і зворотних зв'язків (Yu et al., 2015), де процеси фотосинтезу слугують основним донором, а процеси росту та відкладання речовин у запас – акцепторами асимілятів (Kiriziy et al., 2014).

Під асимілятами мають на увазі різні сполуки асимільованого рослиною у процесі фотосинтезу вуглецю, у першу чергу транспортні та запасуючі форми вуглеводів, які вважають основою енергетичних і метаболічних процесів, а також «будівельним матеріалом» у процесах росту та розвитку на всіх рівнях організації рослинного організму (Kiriziy et al., 2014). Відомо також, що запасні речовини різних типів відіграють важливу роль буфера між фотосинтезом (як «джерелом» асимілятів) і ростом структурної речовини вегетативних, запасуючих і репродуктивних органів (як «стоком» асимілятів, що визначає певною мірою незалежність ростових процесів від фотосинтезу) (Singh et al., 2017).

Потужним «атрагувальним» центром в онтогенезі рослин виступає карпогенез – процес росту та формування плодів. При цьому використовують не лише новоутворені завдяки фотосинтезу вуглеводи, а і тимчасово депоновані у вегетативних органах

цукри та крохмаль. Аналіз літературних даних свідчить, що під час застосування ретардантів у листках дослідних рослин утворюється більша кількість вуглеводів, які накопичуються та утворюють потужний резерв пластичних сполук, що використовуються для формування міцного стебла, закладання більшого числа плодів і поліпшення врожайності культури. Зростання продуктивності сільськогосподарських культур за впливу інгібіторів гібереліну відмічали на овочевих (Pavlista, 2013; Yooyongwech et al., 2017), плодкових (Sarker et al., 2016), олійних (Hua et al., 2014; Sardoei et al., 2014) і зернобобових (Yan et al., 2015) культурах.

У літературі практично відсутні дані про порівняння впливу антигіберелінових препаратів із різним механізмом дії на депонувальну активність вегетативних органів. Тому мета цього дослідження – оцінити особливості накопичення та перерозподілу різних форм вуглеводів та азоту упродовж вегетації в рослинах, районуваних для Лісостепу гібридах томатів Бобкат і Солероссо за дії тебуконазолу та есфону.

Матеріал і методи досліджень

Для вивчення впливу антигіберелінових препаратів тебуконазолу (EW-250) та есфону (2-ХЕФК) на морфогенез і продуктивність середньораннього детермінантного гібриду томатів голландської селекції Бобкат польові дрібноділянкові досліді заклали на землях СФГ «Бержан П.Г.» с. Горбанівка Вінницького району Вінницької області у вегетаційні періоди 2013–2015 років. Насіння томатів на розсаду висівали у парники 03.03.2013, 05.03.2014 і 10.03.2015 р. Розсаду висаджували 08.05.2013, 10.05.2014 та 15.05.2015 р. стрічковим способом за формулою $80 + 50 + 50 \times 50$. Внесення мінеральних добрив $N_{50}P_{40}K_{30}$. Площа ділянок – 33 м², повторність – п'ятикратна.

Вплив ретардантів на ріст, розвиток і урожайність гібриду томатів Солероссо вивчали польовим дрібноділянковим методом на землях СФГ «Сольський», с. Вінницькі Хутори Вінницького району Вінницької області у вегетаційні періоди 2015–2017 ро-

Таблиця 1

Вплив есфону та тебуконазолу на листковий апарат рослин томатів гібридів Бобкат і Солероссо (фаза початку дозрівання плодів, середні дані за 2013–2015 роки у гібриду Бобкат і за 2015–2017 роки – у гібриду Солероссо; n = 30, $\bar{x} \pm SE$)

Показник	Гібрид Бобкат			Гібрид Солероссо		
	контроль	0,07% есфон	0,025% тебуконазол	контроль	0,05% есфон	0,025% тебуконазол
Висота рослини, см	67,5 ± 1,82	38,6 ± 1,57**	58,5 ± 1,74**	44,9 ± 1,17	39,1 ± 1,09**	42,8 ± 1,14
Кількість листків на рослині, шт.	66,5 ± 2,12	53,2 ± 1,75**	73,3 ± 2,47*	81,8 ± 2,16	97,9 ± 2,23***	93,4 ± 2,86**
Маса сухої речовини листків, г	54,3 ± 2,66	31,2 ± 1,32**	59,1 ± 2,81	37,3 ± 1,03	32,5 ± 0,86**	43,3 ± 1,25**
Площа листків, см ²	11 115 ± 431	6 037 ± 288**	9 878 ± 407*	6 975 ± 162	7 605 ± 189*	10 226 ± 291**

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

Листок – основний донор асимілятів, який постачає їх до всіх інших органів і прямо впливає на вміст вуглеводів у вегетативних і генеративних органах рослин. Аналіз кількісних показників, які характеризують листковий апарат, вказує на те, що тебуконазол зумовлює їх зростання. У гібриду Бобкат препарат збільшував кількість листків на рослині на 10,3%, а масу сухої речовини листків – на 8,9%. У гібриду Солероссо вказані показники зростали, відповідно, на 15,5% і 16,2% (табл. 1). Есфон достовірно зменшував у гібриду Бобкат як кількість листків, так і масу їх сухої речовини, тоді як у гібриду Солероссо кількість листків на рослині зростала, але маса їх сухої речовини достовірно зменшувалася. У томатів гібриду Бобкат обидва антигіберелінові препарати зменшували площу листової поверхні, тоді як у гібриду Солероссо – збільшували, що можна пояснити сортовими особливостями цих рослин.

Зважаючи на зміни листового апарату рослин томатів після обробки регуляторами росту, доцільно вивчити особливості накопичення та перерозподілу різних форм вуглеводів між органами рослин томатів в онтогенезі. Упродовж вегетаційного періоду спостерігали зменшення вмісту вуглеводів у вегетативних органах гібридів Бобкат і Солероссо як у контролі, так і у дослідних варіантах. Кількість цукрів зменшувалася за рахунок редуруючих форм. Одночасно відбувалося накопичення цукрів у

ків. Насіння томатів ультрараннього детермінантного гібриду томатів голландської селекції Солероссо на розсаду висівали у парники 02.03.2015, 05.03.2016 і 12.03.2017 р. Розсаду висаджували 18.05.2015, 22.05.2016 і 27.05.2017 р. стрічковим способом за формулою $50 + 50 + 50 \times 50$. Внесення мінеральних добрив $N_{50}P_{40}K_{30}$. Площа ділянок – 33 м², повторність – п'ятикратна.

Рослини обробляли вранці за допомогою ранцевого оприскувача ОП-2 до повного змочування листків 0,025% розчином тебуконазолу та 0,07% розчином есфону у фазу бутонізації 14.06.2013, 17.06.2014 та 19.06.2015 р. у рослин гібриду Бобкат та 0,025% розчином тебуконазолу та 0,05% розчином есфону у фазу бутонізації 06.06.2015, 16.06.2016 та 29.06.2017 р. у рослин гібриду Солероссо. Контрольні рослини обприскували водою.

Фітометричні показники (висоту рослин, масу сухої речовини окремих органів та цілої рослини) визначали на 30 рослинах. Вміст цукрів і крохмалю визначали йодометричним методом, а вміст загального азоту – методом К'ельдаля. Повторюваність біохімічних досліджень – 15-кратна (AOAC, 2010). У тексті, таблицях і на графіках наведено середньоарифметичні значення та їх стандартні похибки (SE). Результати обробляли статистично за допомогою програми Statistica 6.0. Застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (відмінності між середніми значеннями обчислювали методом ANOVA, їх вважали вірогідними за $P < 0,05$) (Van Emden, 2008).

Результати

Ретардант тебуконазол і етиленпродуцент есфон зумовлювали зміни анатомо-морфологічних та біохімічних показників гібридів томатів Бобкат і Солероссо. Препарати гальмували лінійний ріст дослідних рослин. Найсуттєвіше зменшення висоти в обох гібридів спостерігали після застосування есфону (табл. 1). У гібриду Бобкат висота рослин була меншою, ніж у контролі, на 42,8%, а у гібриду Солероссо – на 12,9%. За дії тебуконазолу лінійні розміри рослин зменшувалися, відповідно, на 13,3% і 4,7%.

плодах як у контролі, так і за обробки антигібереліновими препаратами. Вміст крохмалю при цьому постійно знижувався як у вегетативних, так і у генеративних органах (рис. 1).

У цілому, загальний вміст цукрів у корінні та стеблах став вищим у гібриду Солероссо, а у листках і плодах – у гібриду Бобкат. Гібрид Солероссо відзначався підвищеним вмістом сахарози в органах. У корінні гібриду Солероссо за дії есфону та тебуконазолу відбувалося накопичення цукрів і крохмалю в першій половині вегетації та посилений, порівняно з контролем, їх відтік – у другій. У гібриду Бобкат вміст цукрів на початку вегетації зменшувався, а наприкінці – практично не відрізнявся від контролю. Вміст крохмалю в корінні томатів гібриду Бобкат під час застосування обох препаратів суттєво перевищував контроль. Вищий вміст полісахариду зафіксований за обробки тебуконазолом.

Аналіз вмісту цукрів у стеблах гібриду Солероссо свідчить, що застосування антигіберелінових препаратів посилювало накопичення цукрів за рахунок переважно редуруючих форм у першій половині вегетації та інтенсифікувало їх відтік до плодів – у другій. Найпоказовіше це відбувалося після обробки рослин тебуконазолом. Динаміка вмісту крохмалю у цього гібриду як у контролі, так і у варіантах із ретардантами не відзначалася стабільністю упродовж вегетації.

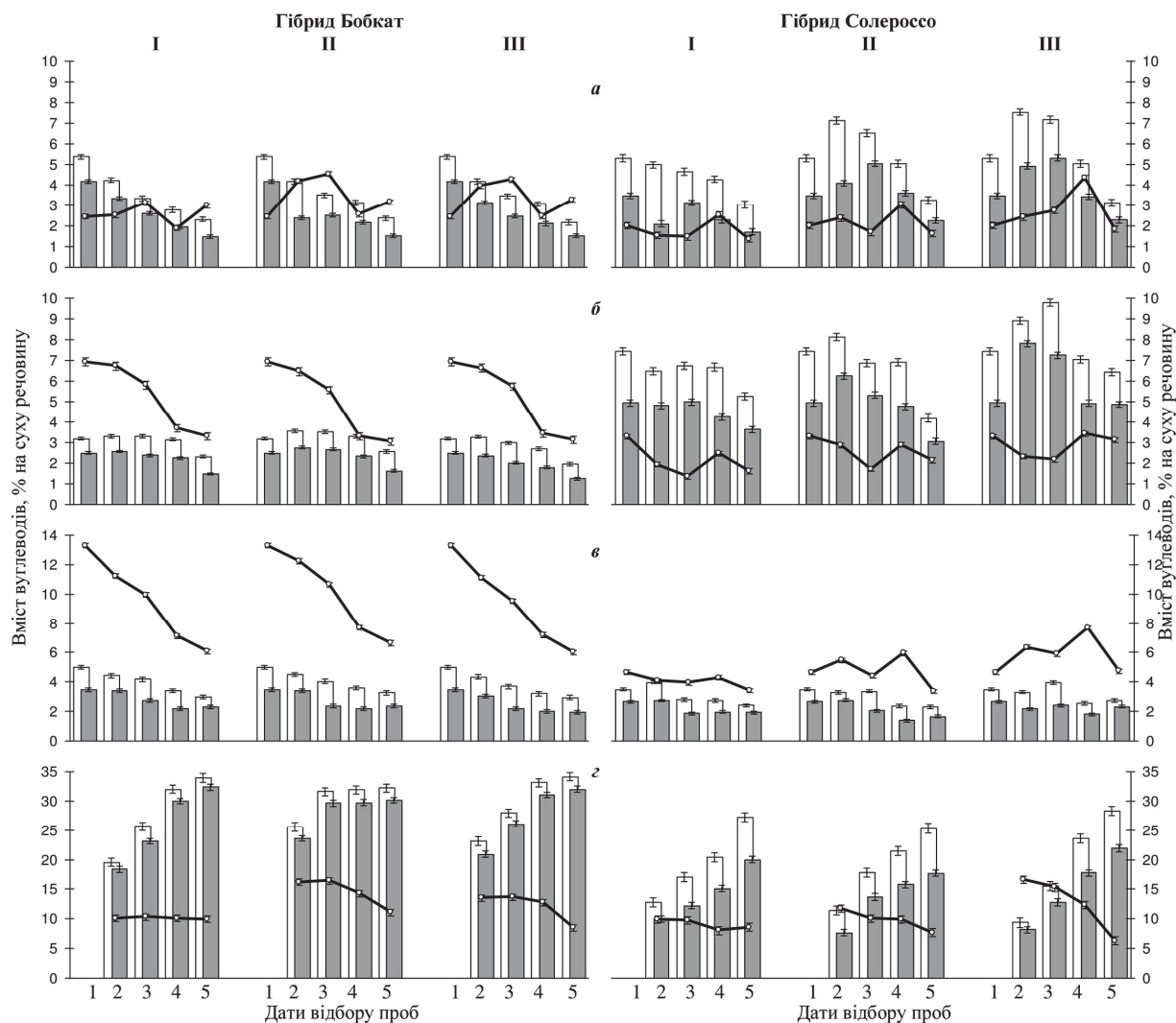


Рис. 1. Вплив антигіберелінових препаратів на вміст різних форм вуглеводів в органах рослин томатів гібридів Бобкат і Солеросо: середні трирічні дані за 2013–2015 роки у гібриду Бобкат і за 2015–2017 роки – у гібриду Солеросо; $n = 15$, $x \pm SE$; а – коріння, б – стебла, в – листя, г – плоди; I – контроль, II – есфон, III – тебуконазол; 1 – дата обробки, 2 – 10-та, 3 – 20-та, 4 – 30-та, 5 – 40-ва доба після обробки; □ – сума цукрів, ■ – редукуючі цукри, ● – крохмаль

У гібриду Бобкат есфон сприяв накопиченню цукрів у стеблах, а тебуконазол посилював їх відтік від осьового вегетативного органа до органів запасу. Вміст крохмалю у стеблах став меншим, ніж у контролі, а інгібітори росту посилювали його реутилізацію зі стебел.

Інгібітори гібереліну зменшували вміст цукрів у листках томатів гібриду Солеросо у фазу цвітіння та сприяли їх накопиченню у фазу закладання плодів. Під час формування плодів вміст цукрів у листках знову знижувався нижче контрольного за впливу як етиленпродуцента, так і триазолпохідного препарату. У цілому зафіксовано вищий вміст редукуючих цукрів та сахарози в листках після застосування тебуконазолу порівняно з есфоном і контролем. Антигіберелінові препарати посилювали накопичення крохмалю в листках на початку вегетаційного періоду та сповільнювали його відтік наприкінці. Найвищий уміст полісахариду зафіксовано в листках після застосування тебуконазолу.

Ми встановили зменшення вмісту цукрів у листках у досліді та контролі упродовж вегетації в гібриду Бобкат. На початку вегетації темпи реутилізації редукуючих цукрів із листків гібриду Бобкат були швидшими, а у другій половині уповільнилися, і навіть спостерігалось накопичення продуктів асиміляції за рахунок редукуючих форм цукрів після застосування есфону та за рахунок сахарози після обробки тебуконазолом. Під час вегетації відбувалася реутилізація крохмалю в листках. Есфон

уповільнював цей процес у рослин томатів (на відміну від тебуконазолу та контролю, між якими за темпами гідролізу полісахариду достовірної різниці не зафіксовано).

Для розуміння процесів формування врожаю рослин томатів необхідно з'ясувати особливості накопичення та перерозподілу різних форм вуглеводів у плодах. Результати наших досліджень свідчать, що за дії тебуконазолу в обох гібридів томатів інтенсифікувався процес накопичення цукрів переважно за рахунок редукуючих форм. Після застосування есфону вміст цукрів і темпи їх накопичення стали нижчими за контрольні.

Інгібітори росту підвищували вміст крохмалю у плодах на початку вегетації та інтенсифікували його реутилізацію наприкінці. Найшвидше це відбувалося після обробки рослин томатів тебуконазолом незалежно від гібриду.

Упродовж вегетації прослідковувалася тенденція до зменшення відношення суми цукрів до крохмалю практично в усіх вегетативних органах обох гібридів томатів. Найсуттєвіше зменшення цього співвідношення зафіксоване після обробки томатів тебуконазолом. За впливу есфону показники не відзначалися стабільністю. Також у плодах дослідних рослин практично упродовж усього періоду вегетації спостерігали зниження співвідношення суми цукрів / крохмаль. У фазу появи зрілих плодів частка крохмалю в рослин, які зазнали дії ретардантів, була більшою, ніж у контролі (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив есфону та тебуконазолу на динаміку накопичення цукрів і крохмалю в органах томатів гібридів Бобкат і Солероссо (% на суху речовину, середні дані за 2013–2015 роки у гібриду Бобкат і за 2015–2017 роки – у гібриду Солероссо, $n = 15$, $x \pm SE$)

Дата відбору проб	Гібрид Бобкат									Гібрид Солероссо								
	контроль			0,07% есфон			0,025% тебуконазол			контроль			0,05% есфон			0,025% тебуконазол		
	сума цукрів	крохм.	СЦ/Кр	сума цукрів	крохм.	СЦ/Кр	сума цукрів	крохм.	СЦ/Кр	сума цукрів	крохм.	СЦ/Кр	сума цукрів	крохм.	СЦ/Кр	сума цукрів	крохм.	СЦ/Кр
Коріння																		
1	4,23 ± 0,106	2,52 ± 0,067	1,68	4,18 ± 0,105	4,18 ± 0,207**	1,00	4,17 ± 0,106	3,95 ± 0,169**	1,06	4,98 ± 0,125	1,53 ± 0,039	3,25	7,14 ± 0,279**	2,37 ± 0,105**	3,01	7,54 ± 0,289**	2,43 ± 0,164*	3,10
2	3,34 ± 0,084	3,11 ± 0,078	1,07	3,51 ± 0,088	4,54 ± 0,136**	0,77	3,46 ± 0,089	4,25 ± 0,109*	0,81	4,67 ± 0,119	1,47 ± 0,037	3,18	6,52 ± 0,268**	1,69 ± 0,064*	3,86	7,18 ± 0,283**	2,75 ± 0,169*	2,61
3	2,78 ± 0,071	1,89 ± 0,048	1,47	3,13 ± 0,079*	2,56 ± 0,068	1,22	3,07 ± 0,077*	2,46 ± 0,068*	1,25	4,28 ± 0,109	2,53 ± 0,065	1,69	5,04 ± 0,128*	3,03 ± 0,128*	1,66	5,03 ± 0,129*	4,35 ± 0,210**	1,16
4	2,32 ± 0,058	2,99 ± 0,074	0,78	2,38 ± 0,063	3,17 ± 0,079**	0,75	2,17 ± 0,054	3,28 ± 0,082	0,66	3,03 ± 0,079	1,36 ± 0,037	2,23	3,26 ± 0,087	1,63 ± 0,043**	2,00	3,12 ± 0,079	1,83 ± 0,049**	1,70
Стебла																		
1	3,31 ± 0,085	6,72 ± 0,169	0,49	3,56 ± 0,089	6,46 ± 0,166	0,55	3,28 ± 0,083	6,63 ± 0,168	0,49	6,49 ± 0,167	1,92 ± 0,048	3,38	8,14 ± 0,208**	2,85 ± 0,107**	2,86	8,91 ± 0,322**	2,31 ± 0,059*	3,86
2	3,29 ± 0,083	5,81 ± 0,145	0,57	3,51 ± 0,088	5,58 ± 0,144	0,63	2,98 ± 0,077	5,74 ± 0,147	0,52	6,73 ± 0,169	1,34 ± 0,036	5,02	6,88 ± 0,177	1,71 ± 0,045**	4,02	9,79 ± 0,344**	2,16 ± 0,097*	4,53
3	3,15 ± 0,079	3,69 ± 0,099	0,85	3,30 ± 0,085	3,31 ± 0,089*	1,00	2,70 ± 0,069*	3,43 ± 0,089	0,79	6,67 ± 0,168	2,46 ± 0,066	2,71	6,91 ± 0,179	2,89 ± 0,074*	2,39	7,05 ± 0,179	3,42 ± 0,109*	2,06
4	2,32 ± 0,058	3,31 ± 0,087	0,70	2,57 ± 0,067*	3,04 ± 0,109	0,85	1,95 ± 0,049*	3,13 ± 0,078	0,62	5,27 ± 0,132	1,61 ± 0,062	3,27	4,19 ± 0,109*	2,13 ± 0,055**	1,97	6,42 ± 0,167*	3,11 ± 0,148*	2,06
Листя																		
1	4,43 ± 0,111	11,2 ± 0,28	0,40	4,51 ± 0,115	12,2 ± 0,31	0,37	4,35 ± 0,109	11,1 ± 0,28	0,39	3,98 ± 0,101	4,06 ± 0,106	0,98	3,27 ± 0,086*	5,46 ± 0,139**	0,60	3,31 ± 0,087**	6,36 ± 0,259*	0,52
2	4,18 ± 0,108	9,93 ± 0,248	0,42	4,03 ± 0,101	10,6 ± 0,27	0,38	3,70 ± 0,096*	9,52 ± 0,239	0,39	2,79 ± 0,073	3,95 ± 0,101	0,71	3,37 ± 0,081**	4,41 ± 0,112*	0,76	3,95 ± 0,179*	5,89 ± 0,247*	0,67
3	3,42 ± 0,086	7,10 ± 0,179	0,48	3,59 ± 0,095	7,68 ± 0,199	0,47	3,21 ± 0,082	7,19 ± 0,187	0,45	2,73 ± 0,069	4,28 ± 0,209	0,64	2,37 ± 0,059*	5,95 ± 0,249*	0,40	2,57 ± 0,067	7,67 ± 0,359*	0,34
4	2,99 ± 0,0751	6,07 ± 0,159	0,49	3,26 ± 0,082	6,64 ± 0,169	0,49	2,95 ± 0,074	6,01 ± 0,155	0,49	2,41 ± 0,064	3,41 ± 0,156	0,71	2,33 ± 0,059	3,35 ± 0,086	0,70	2,74 ± 0,069*	4,73 ± 0,219*	0,58
Плоди																		
1	19,5 ± 0,491	10,1 ± 0,26	1,93	25,6 ± 0,641**	16,2 ± 0,421**	1,58	23,1 ± 0,781*	13,5 ± 0,35**	1,71	12,8 ± 0,321	9,87 ± 0,349	1,30	11,4 ± 0,291*	11,7 ± 0,391*	0,97	9,36 ± 0,337*	16,6 ± 0,737*	0,56
2	25,7 ± 0,641	10,3 ± 0,392	2,49	31,6 ± 0,791**	16,4 ± 0,721**	1,93	27,9 ± 0,69	13,6 ± 0,35**	2,05	17,0 ± 0,441	9,74 ± 0,248	1,75	17,8 ± 0,461	10,0 ± 0,271	1,78	15,6 ± 0,392	15,3 ± 0,638*	1,02
3	32,0 ± 0,810	10,1 ± 0,426	3,18	31,9 ± 0,792	14,3 ± 0,637**	2,24	33,1 ± 0,83	12,7 ± 0,32**	2,61	20,4 ± 0,532	8,02 ± 0,209	2,54	21,5 ± 0,552	9,87 ± 0,349*	2,18	23,6 ± 0,611*	12,3 ± 0,532*	1,91
4	33,9 ± 0,852	9,92 ± 0,249	3,42	32,2 ± 0,822	11,1 ± 0,279*	2,90	34,1 ± 0,86	8,52 ± 0,213*	4,00	27,2 ± 0,691	8,59 ± 0,217	3,16	25,3 ± 0,672	7,64 ± 0,194*	3,32	28,3 ± 0,732	6,31 ± 0,259*	4,48

Примітки: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ порівняно з контролем; 1 – 10-та, 2 – 20-та, 3 – 30-та, 4 – 40-ва доба після обробки; СЦ/Кр – відношення суми цукрів (редукуючі цукри + нередукуючі цукри) до крохмалю.

Посилене накопичення вуглеводів плодами рослин томатів, що зазнали дії тебуконазолу, позитивно вплинуло на продуктивність культури. У гібриду Бобкат сира маса одного плоду після обробки триазолопіридинним препаратом на кінець досліджуваного періоду перевищувала контрольний показник ($153 \pm 3,3$ г) на 5,6% ($161 \pm 4,0$ г). У гібриду Солероссо тебуконазол зумовив зростання середньої маси одного плоду на 23,1% ($51,2 \pm 1,2$ г) порівняно з контролем ($41,5 \pm 1,1$ г). За дії есфону показники практично не відрізнялися від контролю. Результати свідчать, що упродовж вегетації відбувалося зменшення вмісту загального азоту у вегетативних органах як у контролі, так і в досліді в обох гібридів томатів (рис. 2). Лише у корінні контрольного варіанта відбувалося накопичення цього елемента або ж його вміст у першій половині вегетації суттєво не змінювався.

Обробка тебуконазолом посилювала відтік азоту від коріння та стебел. Інтенсивніше азот виносився з осевих органів у гібриду Бобкат. У фазу формування плодів цей показник став нижчим контрольного на 19,4% у корінні та 18,0% у стеблах, тоді як у гібриду Солероссо у цю ж фазу вегетації він відповідно знижувався на 10,7% та 11,1%. Препарат уповільнював відтік азоту з листків порівняно з контролем. У даному випадку повільніше це відбувалося в гібриду Солероссо. Під час фази активного формування плодів у листках гібриду Солероссо вміст азоту перевищував контроль на 12,9%, тоді як у гібриду Бобкат – на 9,2%.

Етиленпродуцент есфон по-різному впливав на динаміку загального азоту в осевих органах гібридів Бобкат і Солероссо.

За його дії у гібриду Бобкат відбувався відтік елемента з коріння та накопичення його у стеблі. У гібриду Солероссо, навпаки, спостерігалось накопичення азоту в корінні та інтенсивний його відтік від стебел, особливо у другій половині вегетації. В обох гібридів томатів есфон сповільнював відтік азоту з листків. На кінець періоду досліджень вміст загального азоту в гібриду Солероссо перевищував контроль на 14,5%, а у гібриду Бобкат – на 8,9%.

Аналіз динаміки азоту у плодах свідчить, що у томатів гібриду Бобкат відбувалося накопичення цього елемента упродовж вегетаційного періоду. Ретарданти уповільнювали процес накопичення азоту плодами. Зокрема, на кінець досліджуваного періоду вміст загального азоту за обробки есфоном знижувався на 19,9%, а після застосування тебуконазолу – на 5,2%. У гібриду Солероссо відбувалося постійне зниження вмісту азоту у плодах як у досліді, так і в контролі. Тебуконазол уповільнював процес реутилізації азоту. На кінець досліджень його вміст став більшим на 5,5%, ніж у контролі. За дії есфону показник практично не відрізнявся від контролю. Посилення відтоку азоту від вегетативних органів до плодів за дії тебуконазолу збільшило кількість плодів на рослині. У гібриду Бобкат за дії триазолопіридинного препарату показник зріс на 21,3% ($12,6 \pm 0,33$ шт.) порівняно з контролем ($10,0 \pm 0,18$ шт.). У гібриду Солероссо кількість плодів на рослині зроста порівняно з контролем ($35,4 \pm 1,07$ шт.) на 2,8% ($36,4 \pm 1,29$ шт.).

Зміна швидкості ростових процесів за впливу антигіберелінових препаратів суттєво вплинула на листковий апарат дослід-

них рослин. Зміни морфометричних характеристик листків як донорів асимілятів зумовили зміни накопичення та перерозподіл різних форм вуглеводів і загального азоту. Обробка регуляторами росту пришвидшувала процеси реутилізації різних форм цукрів і азоту.

Обговорення

Регуляція донорно-акцепторних відносин у системі цілої рослини здійснюється через координацію фотосинтезу та ростової функції, причому будь-які природні або експериментальні зміни швидкості ростових процесів супроводжуються адекватною перебудовою фотосинтетичного апарату. Застосування інгібіторів

гібереліну дозволяє змінювати темпи росту тих або інших органів рослини, внаслідок чого можливий перерозподіл потоків асимілятів до господарсько-важливих тканин і органів.

Зменшення запиту на асиміляти після застосування ретардантів і етиленпродуцентів створює ефект їх надлишку у рослині, який спрямовується на посилений ріст бічних органів і органів запасання. Зафіксоване нами явище пригнічення ростових процесів в осевих органах томатів супроводжувалося зростанням кількісних показників листового апарату. Схожі ефекти за впливу паклобутразолу зафіксовано на рослинах батату (Yooyongwech et al., 2017), за дії уніконазолу на рослинах соєвих бобів (Yan et al., 2015), після обробки хлормекватхлоридом у рослин пажитниці багаторічної (Kasem & Abd El-Baset, 2015).

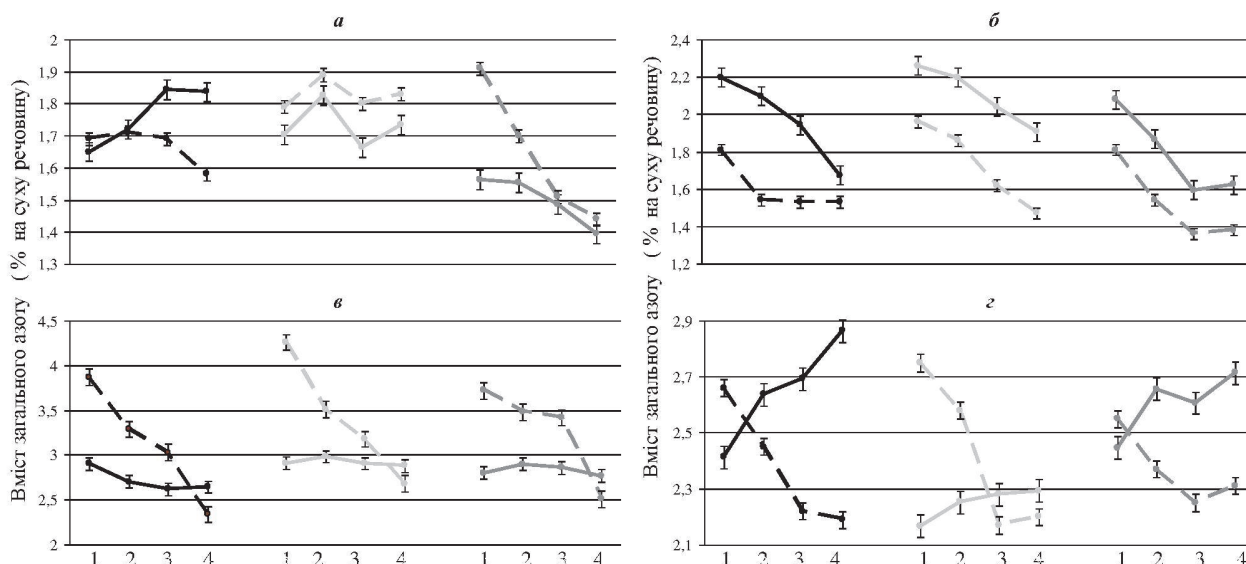


Рис. 2. Вплив антигіберелінових препаратів на вміст загального азоту в органах томатів гібридів Бобкат і Солероссо (середні дані за 2013–2015 роки у гібриду Бобкат і за 2015–2017 роки у гібриду Солероссо, $n = 15$, $x \pm SE$): а – коріння, б – стебла; в – листя; з – плоди; 1 – 10-та, 2 – 20-та, 3 – 30-та, 4 – 40-ва доба після обробки; — — — — гібрид Бобкат, — — — — гібрид Солероссо; ■ — контроль, □ — есфен, ■ — тебуконазол

Зростання кількості листків, маси їх сухої речовини та площі листової поверхні сприяє підвищенню фотосинтетичної продуктивності рослини, що одночасно посилюється зменшенням їх витрат на ростові процеси з наступним перерозподілом до інших тканин і органів рослини. У зв'язку із цим, важливо встановити напрямки переміщення пластичних речовин у рослині. Як свідчать результати наших досліджень, упродовж вегетації вміст цукрів і крохмалю у вегетативних органах томатів постійно зменшувався, а у плодах зростав за рахунок цукрів, а саме редуруючих форм. Такі зміни динаміки цілком узгоджуються із загальною концепцією функціонування рослинного організму «джерело – стік».

Гальмування лінійного росту ретардантами зумовило зростання вмісту вуглеводів у вегетативних органах рослин томатів порівняно з контролем. Надлишок пластичних речовин, що накопичився у першій половині вегетації за впливу препаратів, активніше транспортується до плодів. Саме із цим можна пов'язати посилення реутилізації крохмалю як у вегетативних, так і у генеративних органах упродовж усього вегетаційного періоду в обох гібридів томатів. Підтвердженням цього явища вважаємо постійне зменшення співвідношення вмісту цукрів до крохмалю в усіх органах рослин. Аналогічне посилення відтоку цукрів із листків до плодів відбувалося за дії хлормекватхлориду у рослин кукурудзи (Wang et al., 2016). Зростання вмісту вуглеводів у вегетативних і генеративних органах рослин за дії ретардантів відмічали й інші дослідники. Паклобутразол збільшував уміст суми цукрів у батату (Yooyongwech et al., 2017), манго (Sarker et al., 2016), рису (Xiang et al., 2017), канолі (Hua et al., 2014). Хлормекватхлорид зумовлював зростання загального вмісту цукрів у пажитниці багаторічної (Kasem & Abd El-Baset, 2015), вміст са-

харози – у лилії (Zheng et al., 2012), вміст цукрів і крохмалю – у бульбах картоплі (Koteswara Rao et al., 2017).

Результати наших досліджень свідчать, що блокування утворення гормон-рецепторного комплексу в рослин томатів за впливу етиленпродуценту есфону мало сильніший рістальмічний ефект, ніж переривання синтезу гібереліну у трьох ланках за дії ретарданту тебуконазолу. На нашу думку, надмірне гальмування ростових процесів за дії есфону спричинило також пригнічення процесів транспортування речовин по рослині, що в кінцевому підсумку спричинило зменшення вмісту цукрів у плодах і негативно вплинуло на продуктивність культури. Це пов'язано з тим, що достатнє забезпечення зони плодів цукрами сприятиме їх перетворенню на структурні полісахариди, які беруть участь у карпогенезі.

У той же час за впливу тебуконазолу відбувалося помірне гальмування лінійного росту та процесів транспорту речовин по рослині, що створило надлишок пластичних речовин, які активно надходили до плодів і брали участь у процесах карпогенезу. Формування надлишку цукрів забезпечувалося не лише фотосинтетичними процесами та меншим їх використанням на ростові процеси, а й унаслідок посилення гідролізу крохмалю у вегетативних органах томатів за впливу тебуконазолу.

У науковій літературі міститься інформація про підвищення продуктивності сільськогосподарських культур за впливу інших триазолохідних препаратів. Зокрема, застосування паклобутразолу підвищувало продуктивність батату (Yooyongwech et al., 2017), манго (Sarker et al., 2016), канолі (Hua et al., 2014), а уніконазол сприяло зростанню урожайності соєвих бобів (Yan et al., 2015).

Під час вегетації відбувається зменшення вмісту азоту у вегетативних органах внаслідок його відтоку до квітів, плодів і на-

сіння, а також використання на ростові процеси в рослині в цілому. Результати дозволяють констатувати, що закладання та формування більшої кількості плодів за впливу тебуконазолу викликало посилення відтоку цього елемента з коріння та стебел до генеративних органів. Зростання вмісту загального азоту в листках, на нашу думку, вважається підтвердженням кращого забезпечення донора асимілятів ферментативним апаратом, що вважаємо додатковим фактором активізації фотосинтетичних процесів за впливу ретарданту. Зменшення вмісту азоту у плодах рослин томатів гібриду Солероссо упродовж вегетаційного періоду за впливу ретардантів пов'язане, очевидно, з біорозбавленням елемента внаслідок закладання та формування значної кількості плодів, у той час коли в гібриді Бобкат плодів закладалося практично втричі менше, що стало причиною накопичення азоту.

Застосування тебуконазолу сприяло формуванню донорної сфери рослин томатів, посиленню їх асиміляційного потенціалу, тимчасовому депонуванню фотоасимілятів і азотумісних сполук у вегетативних органах рослини з наступною активною реутилізацією цих сполук на потреби закладання, формування та росту плодів. Наслідком такої перебудови донорно-акцепторної системи рослини вважаємо підвищення врожаю культури томатів за дії цього препарату. Надмірне гальмування ростових і обмінних процесів у рослин томатів за впливу есфону зумовило зниження продуктивності культури, незважаючи на цілу низку позитивних морфометричних, фізіологічних та біохімічних ефектів, які проявилися після застосування препарату.

Висновки

Антигіберелінові препарати з різним механізмом дії, тебуконазол і есфон, викликали зміни ростових процесів листковому апарату, накопиченні та перерозподілі різних форм вуглеводів і загального азоту у вегетативних і генеративних органах гібридів томатів Бобкат і Солероссо. Обидва препарати зменшували лінійні розміри рослин томатів та збільшували кількість листків на рослинах. Суха речовина листків зростала лише після застосування тебуконазолу, а площа листків за дії інгібіторів гібереліну збільшувалася в гібриді Солероссо та зменшувалася у гібриді Бобкат.

У процесі вегетації відбувалося зменшення вмісту вуглеводів у вегетативних органах обох гібридів томатів як у контролі, так і в досліді з одночасним накопиченням цукрів у плодах. Вміст цукрів змінювався переважно за рахунок редуруючих форм. Гібрид Солероссо відзначався вищим умістом сахарози в органах.

Інгібітори росту посилювали відтік цукрів та знижували вміст крохмалю в корінні та стеблах обох гібридів томатів. У листках гібриду Солероссо вміст крохмалю, редуруючих і нередукуючих цукрів став вищим після застосування тебуконазолу. У гібриді Бобкат есфон зумовлював збільшення вмісту редуруючих форм цукрів, а тебуконазол – нередукуючих.

Тебуконазол посилював накопичення цукрів у плодах за рахунок редукуючих форм в обох гібридів томатів, тоді як есфон знижував їх вміст порівняно з контролем. Інгібітори росту підвищували вміст крохмалю у плодах на початку вегетації та інтенсифікували його реутилізацію наприкінці. Найшвидше це відбувалося після обробки рослин томатів тебуконазолом незалежно від гібриду. Упродовж вегетації спостерігали чітку тенденцію до зменшення відношення суми цукрів до крохмалю практично в усіх органах обох гібридів томатів. Найсуттєвіше зменшення цього співвідношення зафіксоване після обробки рослин тебуконазолом, що свідчить про посилене накопичення вуглеводів плодами за дії ретарданту. Це сприяло у подальшому зростанню середньої маси одного плоду. Під час вегетації відбувалося зменшення вмісту загального азоту у вегетативних органах як у контролі, так і в досліді в обох гібридів томатів. Тебуконазол пришвидшував відтік загального азоту з коріння та стебел і збільшував його вміст у листках. За дії триазолового препарату відбувалося уповільнення накопичення цього елемента у плодах. Такі зміни у динаміці загального азоту за впливу тебуконазолу зумовили посилену закладку плодів на рослинах томатів.

References

- AOAC (2010). Official methods of analysis of association of analytical chemist international. 18th ed. Association of Analytical Chemist. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Hegde, S., Adiga, J. D., Honnabyraiah, M. K., Guruprasad, T. R., Shivanna, M., & Halesh, G. K. (2018). Influence of paclobutrazol on growth and yield of jamun cv. Chintamani. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 1590–1599.
- Kasem, M. M., & Abd El-Baset, M. M. (2015). Studying the influence of some growth retardants as a chemical mower on ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Plant Sciences*, 3(5), 255–258.
- Kiriziy, D. A., Stasyk, O. O., Pryadkina, G. A., & Shadchyna, T. M. (2014). Photosynthesis. T.2. Assimilation of CO₂ and mechanisms of its regulation. Logos, Kyiv (in Russian).
- Koteswara Rao, G., Surendra Babu, M., Nagaraju, M. M., Thomson, T., Ranganna, G., & Siva, M. (2017). A critical review on effect of plant growth regulators on root vegetables. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 1243–1247.
- Kumbar, S., Patil, D. R., Das, K. K., Swamy, G. S. K., Thammaiah, N., Jayappa, J., & Gandolkar, K. (2017). Studies on the influence of growth regulators and chemicals on the quality parameters of grape cv. 2A Clone. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 2585–2592.
- Liu, L., Fang, Y., Huang, M., Jin, Y., Sun, J., Tao, X., Zhang, G., He, K., Zhao, Y., & Zhao, H. (2014). Uniconazole-induced starch accumulation in the bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) II: transcriptome alterations of pathways involved in carbohydrate metabolism and endogenous hormone crosstalk. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 64.
- Pavlista, A. D. (2013). Influence of foliar-applied growth retardants on russet burbank potato tuber production. *American Journal of Potato Research*, 90, 395–401.
- Rademacher, W. (2016). Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production. *Annual Plant Reviews*, 49, 359–403.
- Sardoei, A. S., Yazdi, M. R., & Shshdadneghad, M. (2014). Effect of cycocel on growth retardant cycocel on reducing sugar, malondialdehyde and other aldehydes of *Cannabis sativa* L. *International Journal of Biosciences*, 4(6), 127–133.
- Sarker, B. C., Rahim, M. A., & Archbold, D. D. (2016). Combined effects of fertilizer, irrigation, and paclobutrazol on yield and fruit quality of mango. *Horticulturae*, 2, 14.
- Singh, S. K., Nath, V., Marboh, E. S., & Sharma, S. (2017). Source-sink relationship in litchi verses mango: A concept. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 500–509.
- Van Emden, H. F. (2008). Statistics for terified biologists. Blackwell, Oxford.
- Wang, Y., Gu, W., Xie, T., Li, L., Sun, Y., Zhang, H., Li, J., & Wei, S. (2016). Mixed compound of DCPTA and CCC increases maize yield by improving plant morphology and upregulating photosynthetic capacity and antioxidants. *PLoS One*, 11(2), e0149404.
- Xiang, J., Wu, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Li, Z., Lin, H., Chen, H., Zhang, J., & Zhu, D. (2017). Transcriptomic analysis of gibberellin- and paclobutrazol-treated rice seedlings under submergence. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2225.
- Yan, Y., Wan, Y., Liu, W., Wang, X., Yong, T., & Yang, W. (2015). Influence of seed treatment with uniconazole powder on soybean growth, photosynthesis, dry matter accumulation after flowering and yield in relay strip intercropping system. *Plant Production Science*, 18(3), 295–301.
- Yooyongweh, S., Samphumphuang, T., Tisarum, R., Theerawitaya, C., & Cha-um S. (2017). Water-deficit tolerance in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by foliar application of paclobutrazol: Role of soluble sugar and free proline. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1400.
- Yu, S. M., Lo, S. F., & Ho, T. D. (2015). Source-sink communication: Regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. *Trends in Plant Science*, 20(12), 844–857.
- Zemlyanskaya, E. V., Omelyanchuk, N. A., Ermakov, A. A., & Mironova V. V. (2016). Mekhanizmy rehulatsyi peredachi etylenovoho signala u rastenii [Regulatory mechanisms tuning ethylene signaling in plants]. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii*, 20(3), 386–395 (in Russian).
- Zhang, W., Xu, F., Hua, C., & Cheng, S. (2013). Effect of chlorocholine chloride on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 97–103.
- Zheng, R., Wu, Y., & Xia, Y. (2012). Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* Oriental hybrids "Sorbonne". *Journal of Zhejiang University. Science B (Biomedicine and Biotechnology)*, 13(2), 136–144.



Cytoprotective processes induced by the effect of L-arginin-L-glutamate in rats with experimental pathology of the gastroduodenal zone

Y. M. Stepanov*, L. A. Ponomarenko**, O. A. Lykholat***,
T. M. Shevchenko****, O. M. Khomenko****, A. A. Ponomarenko*****

**Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Dnipro, Ukraine*

***Dnipropetrovsk Regional Children's Clinical Hospital, Dnipro, Ukraine*

****University of Customs Business and Finance, Dnipro, Ukraine*

*****Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine*

******Kam 'yanke' City Hospital No 9, Kam 'yanke, Ukraine*

Article info

Received 25.03.2018

Received in revised form

30.04.2018

Accepted 01.05.2018

*Institute of Gastroenterology
of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine,
Slobozhansky Ave., 96,
Dnipro, 49000, Ukraine.
Tel.: +38-050-056-78-42
E-mail: gastrodnepr@gmail.com*

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

*Dnipropetrovsk Regional
Children's Clinical Hospital,
Kosmicheskaya st., 13,
Dnipro, 49100, Ukraine.
Tel.: +38-056-713-71-00
E-mail: kdl17lud@gmail.com*

*University of Customs and
Finance, V. Vernadsky st., 2/4,
Dnipro, 49000, Ukraine.
Tel.: +38-066-038-68-92
E-mail: Lykholat2010@ukr.net*

*Kam 'yanke' City Hospital No 9,
Anoshkin st., 72,
Kam 'yanke, 51900, Ukraine.
Tel.: +38-056-776-56-66
E-mail: oncoll@i.ua*

Stepanov, Y. M., & Ponomarenko, L. A., Lykholat, O. A., Shevchenko, T. M., Khomenko, O. M., & Ponomarenko, A. A. (2018). Cytoprotective processes induced by the effect of L-arginin-L-glutamate in rats with experimental pathology of the gastroduodenal zone. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), 300–307. doi:10.15421/021844

The processes of effect of L-arginine-L-glutamate on peroxidation and slime-forming function of the stomach cells, the system of antioxidant defense in the blood, liver and brain tissues of rats with experimental pathology of the gastroduodenal zone have been investigated. The animals were divided into four groups. Group I – control group were rats injected intragastrically through a probe physiological solution. Group II included animals with erosive ulcerative lesions of the gastroduodenal zone. Modeling of the erosive ulcerative lesions was carried out by intragastric administration of medical bile (1 ml/100 g) in combination with immobilization-cold stress for 1 hour at + 4 °C for a period of seven days. Rats of group III simultaneously received an intra-abdominal 4% solution of L-arginine-L-glutamate in a dose of 20 mg per 100 g of body weight at the same time as the erosive ulcerative lesions modeling. To clarify the role of NO-ergic mechanism of L-arginine-L-glutamate influence on the quantitative composition of mucins and free radical processes rats in group IV with erosive ulcerative lesions were injected with non-selective NO-synthase inhibitor, L-NAME (L-NG-nitroarginine methyl ester), at a dose of 1 mg per 100 g at the same time as injections of 4% solution of L-arginine-L-glutamate. The simulation of erosive-ulcerative lesions of the gastroduodenal zone in the experimental animals was accompanied by the intensification of lipid peroxidation processes, the imbalance of the antioxidant defense systems and the development of oxidative stress in the blood, tissues of the stomach, liver and brain, which has tissue-specific features. In the blood of the animals, the activation of the enzymatic link of antioxidant defense did not compensate for free radical processes, as a result, the exhaustion of the reduced glutathione pool occurred, and the level of TBA-active products increased both in plasma and in erythrocytes. There was a depression of the enzymes of the antioxidant defense and a decrease in the level of recovered glutathione, indicating decompensating of the liver antioxidant protection systems in the liver tissue of the rats. In the experimental animals, formation of erosive ulcerative lesions was accompanied by destabilization of the oxidation-reducing processes in the brain, which led to the intensification of the lipoperoxidation. In the mucous membrane of the stomach of the experimental animals, the total number of protection factors – secretory mucins with a simultaneous structural change – decreased. The use of L-arginine-L-glutamate reduced the manifestations of oxidative stress in the stomach tissue of animals with experimental pathology and normalized the quantitative and qualitative composition of mucins. In the blood, liver tissues and brain of the rats, L-arginine-L-glutamate injections activated the enzymes of the first anti-radical linkage – superoxide dismutase and catalase contributed to the increase of the pool of reduced glutathione and the deceleration of free radical reactions. Investigation of reactions to the action of the inhibitor provides the basis for the hypothesis of the NO-mediated action of L-arginine-L-glutamate on the formation of S-nitrosothiols, as evidenced by the high level of reduced glutathione when the inhibitor is used.

Keywords: erosive and ulcerative pathology; mucosal protection factors; antioxidant system; nitric oxide

Цитозахисні процеси, індуковані впливом L-аргініну-L-глутамату, у щурів з експериментальною патологією гастродуоденальної зони

Ю. М. Степанов*, Л. А. Пономаренко**, О. А. Лихолат***,
Т. М. Шевченко****, О. М. Хоменко****, О. А. Пономаренко*****

*Державна установа «Інститут гастроентерології НАМН України», Дніпро, Україна

**Комунальний заклад «Дніпропетровська обласна дитяча клінічна лікарня ДОР», Дніпро, Україна

***Університет митної справи та фінансів, Дніпро, Україна

****Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

*****Комунальний заклад «Кам'янська міська лікарня № 9 ДОР», Кам'янське, Україна

Досліджували механізми впливу L-аргініну-L-глутамату на пероксидацію та слизовітвірну функцію клітин шлунка, систему антиоксидантного захисту у крові, тканинах печінки та мозку щурів з експериментальною патологією гастродуоденальної зони. Тварин розділили на чотири групи. Група I – контрольна, якій вводили внутрішньошлунковим шляхом через зонд фізіологічний розчин. Група II включала тварин з ерозивно-виразковими ураженнями гастродуоденальної зони. Моделювання патології проводили шляхом внутрішньошлункового введення медичної жовчі (1 мл/100 г) у поєднанні з іммобілізаційним холодним стресом протягом однієї години за температури +4 °C упродовж сьоми діб. Щури групи III одержували внутрішньочеревні ін'єкції 4% розчину L-аргініну-L-глутамату у дозі 20 мг/100 г маси тіла одночасно з моделюванням ерозивно-виразкового ураження. Для уточнення ролі NO-ергічного механізму впливу L-аргініну-L-глутамату на кількісний склад муцинів та вільнорадикальні процеси щурам групи IV з ерозивно-виразковим ураженням вводили неселективний інгібітор NO-синтази L-NAME (L-NG-Nitroarginine methyl ester) у дозі 1 мг/100 г одночасно з ін'єкціями 4% розчину L-аргініну-L-глутамату. Моделювання цієї патології в експериментальних тварин супроводжується інтенсифікацією процесів перекисного окиснення ліпідів, дисбалансом антиоксидантних систем захисту та розвитком окисного стресу в крові, тканинах шлунку, печінки, мозку, що має специфічні тканинні властивості. У крові тварин активація ферментативної ланки антиоксидантної системи не компенсувала вільнорадикальні процеси, внаслідок чого відбувалося вичерпання пулу відновленого глутатіону, а рівень ТБК-активних продуктів збільшувався як у плазмі, так і в еритроцитах. Депресія ферментів антиоксидантного захисту та зниження рівня відновленого глутатіону свідчили про декомпенсацію печінкових антиоксидантних захисних механізмів у щурів. Формування ерозивно-виразкового ураження гастродуоденальної зони супроводжувалося дестабілізацією окисно-відновних процесів у мозку, що спричиняло інтенсифікацію ліпопероксидації. У слизовій оболонці шлунка експериментальних тварин зменшується загальна кількість факторів захисту – секреторних муцинів. Використання L-аргініну-L-глутамату зменшує прояви окисного стресу у тканині шлунка тварин з експериментальною патологією, нормалізує кількісний та якісний склад муцинів. У крові, тканинах печінки, мозку щурів, ін'єкції L-аргініну-L-глутамату активізують ферменти першої антирадикальної ланки (супероксиддисмутаза та каталаза), сприяють збільшенню пулу відновленого глутатіону та уповільненню вільнорадикальних реакцій. Дослідження реакцій на дію інгібітору дає підставу для гіпотези NO-опосередкованої дії L-аргініну-L-глутамату з утворенням S-нітрозотіолів, про що свідчить високий рівень зниженого глутатіону за даних умов.

Ключові слова: ерозивно-виразкова патологія; фактори захисту слизової оболонки; антиоксидантна система; оксид азоту

Вступ

Структурні та функціональні ураження слизової оболонки (СО) верхніх відділів гастродуоденальної зони відбуваються під час порушення рівноваги між багатокomпонентною системою захисту СО та агресивними ендогенними та екзогенними патогенетичними чинниками. Авангардом захисту СО шлунка та дванадцятипалої кишки виступає слизово-бікарбонатний буфер, утворений товстою плівкою слизового гелю на поверхні покривного епітелію. Шар слизу захищає клітини від протеолізу та пошкодження іонами водню (Barinov et al., 2013; Hlynov & Chikunova, 2016). Основний компонент слизового гелю, що визначає його фізико-хімічні властивості, – муцин. Молекула муцину складається з центрально розташованої поліпептидної ланки – апомуцину, що має специфічну область тандемних повторів, у складі яких превалюють пролін, треонін і серин, та прикріплених до них О-глікозидним зв'язком олігосахаридів. Саме склад олігосахаридних структур визначає характерні риси та функціональні особливості муцинів. Він специфічний для різних клітин і тканин. Нині ідентифіковано склад понад 20 муцинів (MUC) і генів, що їх кодують. До секреторних муцинів, здатних утворювати гель, що експресуються в гастроінтестинальному тракті, належать MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 (Zolotova, 2014). Основні муцини шлунка – MUC5AC, MUC5B, MUC6. Вони мають у складі термінальні епітопи в основному з нейтральними гліканами, тоді як у MUC2, що експресується келихоподібними клітинами кишечника, периферійні ланцюги значно сіалізовані (Larsson et al., 2013).

Структурна цілісність СО залежить від координованої дії багатьох фізіологічних факторів та мікроциркуляторної ланки, що підтримує необхідний мікроклімат для клітинного відновлення. Безперервний мікросудинний кровотік забезпечує доставку кисню та поживних речовин у СО. Ендотеліальні клітини капілярів генерують захисні медіатори – регулятори інтенсивності кровотоку (Yandrapu & Sarosiek, 2015). Основний медіатор, який опосередковує судинорозширювальні ефекти ендотеліальних вазодилаторів, – оксид азоту (NO). Це вільнорадикальна молекула, що продукується *in vivo* у регульованому ферментативному процесі з L-аргініну за допомогою родини NO-синтаз (NOS). NO модулює широкий спектр сигнальних шляхів практично в усіх органах і системах організму, включаючи вазодилатацію, нейрональну трансмісію, імунomodulaцію, серцеве скорочення, інгібування агрега-

ції тромбоцитів, диференціювання та проліферацію стовбурових клітин (Lei, 2013; Cossenza & Socodato, 2014; Kumar, 2017). У гастродуоденальній зоні NO стимулює секрецію слизу за допомогою активації гуанілатциклази в епітеліальних клітинах (Lundberg & Weitzberg, 2012; Tkach et al., 2013). У відповідь на зворотню дифузії H^+ -іонів NO опосередковано (через генерацію простагландинів) впливає на посилення бікарбонатної секреції (Wallace et al., 2017). Беззаперечна роль NO у відновленні мікроциркуляції у СО гастродуоденальної зони, що має вирішальне значення для її захисту. Ендотеліальні клітини капілярів здатні відчувати зміни кров'яного тиску, рівень кисню у крові, гіпоксію. Нестимульований судинний ендотелій зазвичай діє як вибірково бар'єр між просвітом судин і навколишніми тканинами, регулює обмін поживних речовин і метаболітів, запобігаючи при цьому потраплянню патогенів або шкідливих речовин у тканини (Kirichuk et al., 2008). У відповідь на локальні стимули ендотеліальні клітини СО гастродуоденальної зони продукують низку захисних ендотеліальних медіаторів, дія яких опосередкована через біосинтез NO, простаглантину, простагландину, активатора плазміногену, судино-епітеліального фактору росту. У результаті синтезу цих речовин у судинному ендотелії зменшується активація лейкоцитів і тромбоцитів, відбувається стимулювання тромболілізу, запобігання утворенню тромбів, підтримується перфузія тканин і захист мікросудин від ураження (Tamawski et al., 2012).

Розпізнавання шкідливих чинників відбувається завдяки аферентним сенсорним нейронам і нервам, що утворюють щільне сплетіння в основі СО та іннервують підслизові судини. Останніми десятиліттями отримано нові дані щодо ролі у забезпеченні цілісності СО гастродуоденальної зони центральної нервової системи. Досліджено механізми комунікації між центральною та енте-ральною нервовою системою, що відбуваються через аферентні чутливі волокна вагуса, які передають інформацію про зміну структурного та функціонального гомеостазу шлунково-кишкового тракту у відповідні центральні структури. Оброблення отриманих сигналів супроводжується передачею імпульсів по еферентним волокнам вагуса та адренергічним волокнам симпатичних нервів до периферії та модулюється нейрогуморальною секрецією гастроінтестинальних гормонів і пептидів (Sulaeva, 2015). На локальному рівні роль кінцевих ефекторів захисту СО шлунка та дванадцятипалої кишки належить NO, простагландинам і кальцитонін-ген-зв'язаному пептиду (Taché, 2012; Gyires et al., 2015;

Sgambato et al., 2016). Одночасна генерація таких локальних посередників, як NO та простагландини, наводить дослідників на думку про множинні рівні взаємодії між шляхами синтезу цих речовин (Zolotarev et al., 2017). Вивчаються механізми, через які може відбуватись взаємне регулювання активності ензимів синтезу простагландинів – циклооксигеназ і NOS. Інгібування циклооксигеназ аспірином та індометацином значно послаблювало активність NOS, а їх активація, у свою чергу, модулює шлях L-аргінін-NO. Але взаємодія між NO та простагландинами не односпрямована, що пов'язане з радикальною природою NO та мікрооточенням. За окисного стресу та ішемії спостерігається інгібування циклооксигеназ, арахідонова кислота метаболізується ліпоксигеназним шляхом з утворенням лейкотрієнів, що посилюють запалення. Припускають, що підвищене продукування пероксинітриду спричиняє нитрування залишків тирозину в циклооксигеназах із генерацією нітротирозинів, внаслідок чого відбувається інактивація ензиму. У той же час існує думка, що пероксинітрид може виступати і як активатор циклооксигеназ унаслідок взаємодії із залізом у їх гемовій групі з утворенням проміжного радикального продукту, що впливає на каталітичний процес (Kim, 2014).

Реакції за участю вільнорадикальних молекул – складові нормального метаболізму біологічних систем. Фізіологічні рівні кисневих і азотних інтермедіатів виконують різні важливі функції, серед яких антимікробні, сигнальні, антиапоптотичні (Lykholat et al., 2016a; Pérez et al., 2017). Надмірна генерація активних форм кисню (АФК), для якої недостатня природна захисна антиоксидантна буферна ємність, викликає окисне пошкодження тканин. Гастроінтестинальний тракт – ключове джерело АФК, оскільки постійно контактує з кишковою мікрофлорою, дієтичними факторами та має найвищу концентрацію ксантиноксидази в організмі, що разом із фагоцитарними клітинами генерують значну кількість супероксид аніонів (Bhattacharya et al., 2014). За відсутності патологічного процесу в СО гастродуоденальної зони відмічається збалансована активність ферментативних систем, що генерують АФК, і систем антиоксидантного захисту (АОЗ). Порушення балансу між утворенням АФК та їх утилізацією, що викликають надмірне накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), характеризується як окисний стрес (Lykholat et al., 2016b; Yermishev et al., 2017). Дія факторів агресії у СО супроводжується пошкодженням її клітинних структур (насамперед, мітохондрій), що викликає порушення мітохондріального трансмембранного потенціалу та виток мітохондріального супероксиду. Це, у свою чергу, індукує розвиток окисного стресу та апоптоз клітин СО (Matsui et al., 2011; Kwiecien et al., 2014).

Існує значна кількість досліджень щодо захисного впливу амінокислот під час ураження СО гастродуоденальної зони. У статті (Kunio et al., 2013) показано, що дієтичний глутамат здатний активувати шлункові аферентні вагусні волокна з наступною продукцією NO та стимуляцією синтезу муцинів. Застосування глутамату натрію у тварин з індометацин-індукованим ураженням СО супроводжувалось посиленням експресії фактору росту судинного ендотелію та ангіогенезом (Amagase et al., 2015). Амінокислота L-аргінін реалізує свої захисні властивості в СО гастродуоденальної зони через антиоксидантні механізми та NO-систему (Jiménez et al., 2004; El-Demerdash et al., 2010). Фармакологічний препарат L-аргінін-L-глутамату, відомий своєю гіпоаммоніємічною, гепатопротекторною дією (Babak et al., 2005), досліджується як донатор NO за патології серцево-судинної системи (Semenchuk et al., 2017), в експериментальних моделях – як прокінетик під час лікування симптомів функціональної диспепсії (Ishibashi-Shiraishi et al., 2016).

Мета статті – встановити вплив L-аргінін-L-глутамату на процеси пероксидації та слизовітвірну функцію клітин шлунка, систему антиоксидантного захисту в крові та тканинах печінки та головного мозку щурів з експериментальною патологією гастродуоденальної зони.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 220–250 г (n = 24). Дослідження проводили згідно з вимога-

ми Європейської комісії нагляду за проведенням лабораторних та інших досліджень за участю експериментальних тварин. Методика проаналізована та схвалена локальним комітетом із біоетики Державної установи «Інститут гастроентерології НАМН України». Тварин розподілили на чотири групи. Група I – контрольна (n = 6); щурам внутрішньошлунково (через зонд) вводили фізіологічний розчин. До групи II (n = 6) увійшли тварини з ерозивно-виразковими ураженнями (ЕВУ) гастродуоденальної зони. Моделювання ЕВУ здійснювали за схемою, наведеною Tarasenko et al. (2001), шляхом інтрагастрального введення медичної жовчі (1 мл/100 г) в поєднанні з імобілізаційно-холодовим стресуванням протягом однієї години за +4 °C терміном 7 діб. Щури групи III (n = 6) одночасно з моделюванням ЕВУ отримували внутрішньочеревно 4% розчин L-аргінін-L-глутамату (20 мг/100 г маси тіла). Для уточнення ролі NO-ергічного механізму дії L-аргінін-L-глутамату на кількісний склад муцинів та вільнорадикальні процеси, щурам з ЕВУ групи IV (n = 6) одночасно із ін'єкціями 4% розчину L-аргінін-L-глутамату вводили неселективний інгібітор NO-синтази – L-NAME (L-NG-nitroarginine methyl ester, 1 мг/100 г). По завершенні експерименту евтаназію проводили під кетаміновим наркозом у дозі 1 мг/100 г шляхом декапітації.

Досліджували кров, тканини шлунка, печінки, головного мозку щурів. У СО шлунка вміст загальних глікопротеїнів визначали методом І. І. Шелекетіної та співавт. (Rudenko et al., 2004). Рівень сіалових кислот вивчали за методом І. Вагпен у реакції з тіобарбітуровою кислотою, вміст фукози – за допомогою реакції із солянокислим цистеїном методом L. Dische, концентрацію гексозамінів – у реакції з ацетилацетоном у лужному середовищі методом R. Palmer (Prohorova, 1982). У крові, гомогенатах тканин шлунка, печінки, головного мозку, активність ПОЛ визначали за вмістом ТБК-активних продуктів у реакції з тіобарбітуровою кислотою (Ovsjannikova et al., 1999). У дослідних тканинах стан антиоксидантної системи визначали за рівнем відновленого глутатіону, що детермінували за реакцією Елмана та показниками активності ферментів антиоксидантного захисту. Активність каталази (Кат) (КФ 1.11.1.6) оцінювали реакцією з молібдатом аммонію, глутатіонредуктази (ГР) (КФ 1.8.1.7) – за швидкістю окиснення НАДРН, глутатіонпероксидази (ГПЮ) (КФ 1.11.1.9) – методом, в основі якого лежить реакція взаємодії реактиву Елмана з SH-групами (Barkovskij et al., 2013), супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) – за інгібуванням відновлення нітросинього тетразолію (Pereslegina, 1989).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Обчислювали середнє арифметичне ($\bar{x}$) та стандартну похибку середнього арифметичного (SE). Достовірність відмінностей контрольної та дослідної груп оцінювали методом ANOVA. Вірогідним вважали відмінності на рівні $P < 0,05$.

Результати

Аналіз отриманих результатів свідчить, що моделювання ЕВУ у щурів II групи супроводжувалось зменшенням кількості загальних глікопротеїнів в 1,4 раза ($P < 0,05$) з одночасною зміною якісного складу шлункового слизу. Рівень сіалових кислот збільшився в 2,1 раза ($P < 0,05$), а вміст фукози та гексозамінів зменшився в 1,3 і 1,9 раза, відповідно ($P < 0,05$). Зазначені зміни СО шлунка відбувались за одночасної активації процесів ПОЛ у його тканині, про що свідчить збільшення кількості ТБК-активних продуктів у 2,0 раза ($P < 0,05$) відносно показників контрольної групи (табл. 1).

У крові тварин групи II дія патогенних чинників інтенсифікувала вільнорадикальні реакції та дисбалансувала роботу антиоксидантної системи. Рівень ТБК-активних продуктів плазми крові збільшився на 56% ($P < 0,05$), в еритроцитах – на 30% ($P < 0,05$) відносно контрольних індексів. Під час активації СОД на 32% ($P < 0,05$) одночасно збільшилась активність антиперекисних ензимів: каталази – на 18% ($P < 0,05$), ГПЮ – на 66% ($P < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками групи контролю. Пул відновленого глутатіону виснажився в 1,3 раза ($P < 0,05$), активність ензиму ГР, що має відновлювати окиснений глутатіон, залишалась без змін

відносно до даних щурів групи I (табл. 2). У тканині печінки тварин групи II відбулась інактивація СОД на 22% ($P < 0,05$) за одночасного зменшення активності ГПО на 20% ($P < 0,05$) та виснаження пулу відновленого глутатіону на 62% ($P < 0,05$), у результаті чого відбулось посилення процесів ПОЛ і зростання кількості ТБК-активних продуктів на 19% ($P < 0,05$) відносно відповідних контрольних показників (табл. 3). У тканині ГМ щурів групи II

формування ЕВУ гастродуоденальної зони супроводжувалось зменшенням рівня відновленого глутатіону та активацією каталази в 1,5 раза ($P < 0,05$) при тому, що активність інших ензимів антиоксидантного захисту не змінювалась, що спричинило значне накопичення продуктів ПОЛ. На це вказує зростання рівня ТБК-активних продуктів у 3,5 раза ($P < 0,05$) порівняно з відповідними контрольними показниками (табл. 4).

Таблиця 1

Склад муцинів і ПОЛ у шлунку тварин з ерозивно-виразковими ураженнями ($x \pm SE$, $n = 6$)

Показники	Група I	Група II	Група III	Група IV
Загальні глікопротеїни, мг/мл	$0,81 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,03^*$	$0,77 \pm 0,04^{**}$	$0,61 \pm 0,06^{***}$
Фукоза, ммоль/л	$8,59 \pm 0,49$	$6,80 \pm 0,47^*$	$8,88 \pm 0,25^{**}$	$7,59 \pm 0,55$
Сіалові кислоти, ммоль/л	$1,10 \pm 0,05$	$2,33 \pm 0,19^*$	$1,48 \pm 0,14^{**}$	$1,18 \pm 0,08$
Гексозаміни, ммоль/л	$10,79 \pm 0,76$	$5,68 \pm 0,35^*$	$6,93 \pm 0,39^{**}$	$3,16 \pm 0,35^{***}$
ТБК-активні продукти, нмоль/г тканини	$4,46 \pm 0,39$	$8,96 \pm 0,96^*$	$6,39 \pm 0,67^{**}$	$8,75 \pm 0,47^{***}$

Примітки: * – $P < 0,05$ між контрольною (I) та дослідними групами; ** – $P < 0,05$ між показниками груп II та III; *** – $P < 0,05$ між групами III та IV.

Таблиця 2

Показники ПОЛ і антиоксидантної системи крові щурів з ерозивно-виразковими ураженнями ($x \pm SE$, $n = 6$)

Показники	Група I	Група II	Група III	Група IV
ТБК-активні продукти, плазма	$2,62 \pm 0,12$	$4,19 \pm 0,42^*$	$2,92 \pm 0,11^{**}$	$3,07 \pm 0,12^*$
нМоль/мл крові еритроцити	$14,37 \pm 0,99$	$18,61 \pm 1,15^*$	$15,35 \pm 0,84$	$18,32 \pm 0,98^*$
СОД, ум. од.	$0,037 \pm 0,003$	$0,049 \pm 0,003^*$	$0,072 \pm 0,004^{**}$	$0,022 \pm 0,003^{***}$
Каталаза, мМоль H_2O_2 /гНв•хв	$3,58 \pm 0,13$	$4,24 \pm 0,06^*$	$3,63 \pm 0,12^{**}$	$2,89 \pm 0,08^{***}$
Відновлений глутатіон, мМоль/л	$2,37 \pm 0,04$	$1,81 \pm 0,04^*$	$1,99 \pm 0,05^{**}$	$2,91 \pm 0,10^{***}$
ГПО, мМоль H_2O_2 /гНв•хв	$0,096 \pm 0,004$	$0,160 \pm 0,003^*$	$0,158 \pm 0,004^*$	$0,091 \pm 0,005^{***}$
ГР, нМольНаДРН/гНв•хв	$0,39 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02^{**}$	$0,23 \pm 0,01^{***}$

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 3

Показники ПОЛ і антиоксидантної системи тканини печінки у дослідних тварин з ерозивно-виразковими ураженнями ($x \pm SE$, $n = 6$)

Показники	Група I	Група II	Група III	Група IV
ТБК-активні продукти, нМоль/г	$4,00 \pm 0,27$	$4,78 \pm 0,11^*$	$4,34 \pm 0,08^{**}$	$6,40 \pm 0,52^{***}$
СОД, ум. од.	$0,80 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,04^*$	$0,75 \pm 0,04^{**}$	$0,46 \pm 0,03^{***}$
Каталаза, мМоль H_2O_2 /г•хв	$574,2 \pm 8,7$	$572,1 \pm 9,5$	$634,3 \pm 10,0^{**}$	$466,2 \pm 13,1^{***}$
Відновлений глутатіон, мМоль/л	$2,58 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,05^*$	$1,26 \pm 0,08^{**}$	$1,56 \pm 0,09^*$
ГПО, мМоль H_2O_2 /г•хв	$19,70 \pm 0,81$	$15,89 \pm 0,44^*$	$17,19 \pm 0,89^*$	$14,75 \pm 0,89^*$
ГР, мкМольНаДРН/г•хв	$0,048 \pm 0,001$	$0,046 \pm 0,001$	$0,047 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,001^{***}$

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 4

Показники ПОЛ і антиоксидантної системи тканини головного мозку щурів з ерозивно-виразковими ураженнями ($x \pm SE$, $n = 6$)

Показники	Група I	Група II	Група III	Група IV
ТБК-активні продукти, нМоль/г	$1,64 \pm 0,07$	$5,69 \pm 0,14^*$	$5,15 \pm 0,19^*$	$5,84 \pm 0,39^*$
СОД, ум. од.	$0,47 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,04^{**}$	$0,50 \pm 0,06^{***}$
Каталаза, мМоль H_2O_2 /г•хв	$89,0 \pm 6,1$	$133,9 \pm 6,1^*$	$190,7 \pm 9,5^{**}$	$73,1 \pm 3,5^{***}$
Відновлений глутатіон, мМоль/л	$1,14 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,03^*$	$0,80 \pm 0,03^{**}$	$1,26 \pm 0,07^{***}$
ГПО, мМоль H_2O_2 /г•хв	$11,05 \pm 0,65$	$10,54 \pm 0,45$	$15,39 \pm 0,88^{***}$	$8,28 \pm 0,79^{***}$
ГР, мкМольНаДРН/г•хв	$0,050 \pm 0,001$	$0,050 \pm 0,001$	$0,065 \pm 0,002^{**}$	$0,028 \pm 0,001^{***}$

Примітки: див. табл. 1.

Ін'єкції L-аргінін-L-глутамату у тварин з ЕВУ сприяли збільшенню кількості загальних глікопротеїнів відносно показників щурів групи II – в 1,3 раза ($P < 0,05$). Рівні фукози та сіалових кислот у тварин групи III відновились до контрольних значень, але вміст гексозамінів залишився нижчим за контрольні індекси, хоча і зростає відносно відповідних даних щурів групи II на 22% ($P < 0,05$). Процеси ПОЛ у тканині шлунка тварин групи III уповільнювались за дії L-аргінін-L-глутамату, кількість ТБК-активних продуктів знижувалась на 29% ($P < 0,05$) відносно індексів щурів групи II (табл. 1).

У крові тварин групи III спостерігали подальшу активацію ензиму першої ланки АОЗ – СОД на 47% ($P < 0,05$) порівняно з даними щурів групи II. Активність каталази зменшилась до контрольних значень, тоді як активність іншого антиперекисного ензиму – ГПО залишився значно вищим за рівні аналогічного індексу щурів групи II. Активація ГР на 19% ($P < 0,05$) сприяла поповненню пулу відновленого глутатіону на 10% ($P < 0,05$). Зазначені зміни в системі АОЗ у крові щурів групи III супроводжувались зниженням інтенсивності вільнорадикальних процесів, про що

свідчить зменшення кількості ТБК-активних продуктів у плазмі на 31% ($P < 0,05$) відповідно до показника щурів групи II (табл. 2).

У тканині печінки щурів групи III за впливу L-аргінін-L-глутамату відбулась достовірна активація ферментативної антиоксидантної ланки: СОД – на 20% ($P < 0,05$), каталази – на 11% ($P < 0,05$) відносно відповідних даних тварин групи II. Кількість відновленого глутатіону зросла на 27% ($P < 0,05$), рівень ТБК-активних продуктів знизився на 9% ($P < 0,05$) порівняно з аналогічними індексами групи II (табл. 3).

У тканині головного мозку введення L-аргінін-L-глутамату у щурів групи III активувало ензими першої ланки захисту – СОД на 66% ($P < 0,05$), каталази – на 42% ($P < 0,05$), ГПО – на 46% ($P < 0,05$). Активація ГР на 30% ($P < 0,05$) сприяла підвищенню пулу відновленого глутатіону в 2,2 раза ($P < 0,05$) відносно відповідних показників тварин групи II. Проте, активація систем АОЗ у мозку щурів групи III не сприяла зменшенню інтенсивності процесів ПОЛ, про що свідчить відсутність кількісних змін ТБК-активних продуктів у тканині головного мозку щурів групи III (табл. 4). Одноразові ін'єкції L-аргінін-L-глутамату та L-NAME у щурів групи

IV в СО шлунка нівелювали ефекти ізолюваного впливу L-аргінін-L-глутамату, про що свідчить зниження кількості загальних глікопротеїнів на 21% ($P < 0,05$) зі зміною якісного складу слизу: мали місце тенденції до зменшення кількості фукози та достовірне зниження гексозамінів у 2,2 раза ($P < 0,05$), відносно відповідних індексів тварин групи III. Уведення неселективного інгібітору сприяло різкому накопиченню продуктів ПОЛ у тканині шлунка: рівень ТБК-активних продуктів зростає на 37% ($P < 0,05$) відносно показників тварин групи III (табл. 1).

У крові шурів групи IV спостерігали інактивацію ферментативної ланки АОЗ – СОД у 3,2 раза ($P < 0,05$), каталази – на 21% ($P < 0,05$), ГПО – на 43% ($P < 0,05$), ГР – на 48% ($P < 0,05$). Одночасно зростає рівень відновленого глутатіону – на 46% ($P < 0,05$), відносно аналогічних даних тварин групи III (табл. 2).

У печінці тварин групи IV активація ПОЛ відбулась зі збільшенням ТБК-активних продуктів на 47% ($P < 0,05$) на тлі інактивації СОД на 39% ($P < 0,05$), каталази – на 27% ($P < 0,05$), та ГР – на 37% ($P < 0,05$) відповідно до показників тварин групи III (табл. 3).

У тканині мозку шурів групи IV також мала місце достовірна інактивація антиоксидантних ензимів: СОД – на 40% ($P < 0,05$), каталази – у 2,6 раза ($P < 0,05$), ГПО – на 46% ($P < 0,05$), ГР – на 56% ($P < 0,05$) за збільшення пулу відновленого глутатіону на 57% ($P < 0,05$) відносно відповідних індексів тварин групи III (табл. 4).

Обговорення

Моделювання ЕВУ гастродуоденальної зони шляхом інтра-гастрального введення медичної жовчі за поєднаної дії імобілізаційно-холодового стресування в експериментальних тварин викликало посилення вільнорадикальних процесів у всіх дослідних тканинах. При цьому високий рівень ТБК-активних продуктів у крові, тканинах шлунка, печінки та головному мозку свідчить про розвиток у них оксидативного стресу. Патогенний вплив жовчі на СО шлунка реалізується завдяки детергентним властивостям жовчних кислот, основною мішенню для яких виступають ліпідні компоненти слизу – фосфоліпіди, що забезпечують гідрофобність слизового шару (Yandrapu & Sarosiek, 2015). Фосфоліпіди значно підвищують в'язкість і проникність слизу, впливають на якість захисних муцинів. Плівка поверхнево-активних фосфоліпідів на поверхні СО захищає структурні компоненти шлунка від зворотної дифузії H^+ -іонів із його просвіту. Дія H^+ -іонів викликає структурні порушення СО та її мікроциркуляторної ланки. В результаті мають місце гіпоксичні явища, що надалі супроводжуються розвитком оксидативного стресу. Імобілізаційно-холодове стресування дослідних шурів через механізми норадренергічної стимуляції додатково посилює ПОЛ. Дія пошкоджувальних факторів на СО шлунка експериментальних тварин порушувала синтез і якісний склад секреторних муцинів. Зниження кількості загальних глікопротеїнів супроводжувалося кількісними змінами їх вуглеводних компонентів. Олігосахариди муцинів можуть складати до 90% загальної молекулярної маси зрілого глікопротеїну. Біохімічні властивості та функції муцинів, насамперед, залежать від складу О-гліканів. Процес глікозилювання муцинів відбувається за дії родини ензимів глікозилтрансфераз, що мають свій власний набір кінетичних властивостей і субстратну специфічність, контролюють і жорстко регулюють вуглеводний профіль на апомуцині. Саме зміни активності глікозилтрансфераз за патологічних процесів викликають утворення нехарактерних глікопротеїдів (Duarte et al., 2016). Гексозаміни та фукоза – основні компоненти у складі муцинів шлунка, які виконують захисну роль проти інфекційних патогенів. Запалення СО супроводжується зсувом профілю глікозилювання з превалюванням негативно заряджених гліканових фрагментів, насамперед, сілових кислот. Існують дослідження, що свідчать про роль медіаторів запалення у регуляції транскрипції генів муцинів, що утворюють гель (Zolotova, 2014).

За аналізу отриманих даних розвиток оксидативного стресу у дослідних тваринах має тканиноспецифічні особливості. У крові тварин з ЕВУ активація ферментативної ланки АОЗ не компенсувала вільнорадикальних процесів, у результаті відбувалось висна-

ження пулу відновленого глутатіону, а рівень ТБК-активних продуктів зростає як у плазмі, так і в еритроцитах. Еритроцити – високо спеціалізовані клітини, що відповідають за транспорт кисню з легень у тканини. Наявність високих концентрацій молекулярного кисню та заліза в гемовій групі еритроцитів становить потенційну загрозу утворення високо реакційних кисневих метаболітів. Генерація АФК в еритроцитах, насамперед, пов'язана з аутоокисненням гемоглобіну (Hb) в метгемоглобін (MetHb), в результаті чого продукується супероксидний аніон ($O_2^{\cdot-}$), який за участі СОД дисмутує у перекис водню (H_2O_2), що може вступати в реакцію з іншим $O_2^{\cdot-}$ або реагувати із залізом у формі Fe^{2+} (реакції Фентон). Продукт обох реакцій – токсичний гідроксильний радикал, здатний пошкоджувати клітинні білки та поліненасичені мембранні ліпіди, що, у свою чергу, викликає функціональні та структурні порушення еритроцитів (van Zwieten et al., 2014). Вільнорадикальні продукти аутоокиснення Hb, що утворюються саме на еритроцитарній мембрані, відносно недоступні для переважно цитозольної антиоксидантної системи еритроцитів. Каталаза не може конкурувати з Hb за взаємодії з H_2O_2 , який утворюється на еритроцитарній мембрані, тоді як вирішальну роль у нейтралізації АФК, генерованих на мембрані еритроцитів, відіграє ГПО. На ефективність капілярного кровообігу та постачання кисню до тканин впливає функціональна повноцінність еритроцитів, яка визначається механічними властивостями мембрани, достатнім рівнем АТФ і кисневотransпортною функцією гемоглобіну. Підтримання кровотоку в капілярах залежить від здатності еритроцитів до деформації. За дії оксидативного стресу відбувається ушкодження мембранних білків, у тому числі мембран цитоскелету, які відповідають за деформованість червоних кров'яних тілець (Mohanty et al., 2014). Перебудова метаболізму еритроцитів – одна з причин розвитку гіпоксичних змін у СО шлунка.

У тканині печінки тварин з ЕВУ гастродуоденальної зони спостерігали депресію ензимів антиоксидантної ланки та зменшення рівня відновленого глутатіону, що свідчить про декомпенсацію печінкових систем АОЗ. Печінка – орган, який виконує метаболічну функцію та бере участь в обміні білків, вуглеводів, жирів, гормонів, вітамінів, у процесах знешкодження та детоксикації ендогенних і екзогенних речовин. Висока активність метаболічних процесів у печінці робить її клітини основними мішенями для АФК. Мітохондрії, мікросоми та пероксисоми в паренхіматозних клітинах печінки – потенційні генератори вільних радикалів і АФК. Порушення редокс-гомеостазу у печінці індукують незворотні зміни клітинних ліпідів, білків, ДНК, та, що важливо, модулюють шляхи, які контролюють нормальні біологічні функції (Li et al., 2015). Найважливіший неферментативний гідрофільний антиоксидант у печінці – глутатіон, трипептид, γ -L-глутаміл-L-цистеїнілглутіон, найпоширеніший небілковий тіол. Глутатіон представлений у клітинах у тіол-відновлений (відновлений глутатіон) і дисульфід-окислений формах. Відновлений глутатіон синтезується тільки в цитоплазмі всіх клітин ссавців. Проте центральний орган його синтезу – печінка. Відновлений глутатіон синтезується *in vivo* у дві стадії шляхом послідовної дії двох АТФ-залежних ензимів із амінокислот-попередників цистеїна, глутамата та гліцину. Перша реакція синтезу відновленого глутатіону – утворення γ -глутаміл-L-цистеїну за допомогою ферменту γ -глутамілцистеїнілази – гетеродимеру, який складається з двох субодиниць – важкої каталітичної (GCLC) та легкої модуляторної (GCLM), що кодуються різними генами, у складі яких є антиоксидант-електрофіл-респонсивний елемент (ARE), що забезпечує їх редокс-регуляцію. GCLC демонструє всю каталітичну активність холодензиму та інгібується за типом зворотнього зв'язку відновленого глутатіоном, що зв'язується з глутаматним сайтом ферменту. GCLM значно знижує K_m для глутамата та інгібувального ефекту відновленого глутатіону. За фізіологічних умов регуляція γ -глутамілцистеїнілази здійснюється неалостеричним зворотнім зв'язком із відновленим глутатіоном і біодоступністю L-цистеїну, який у високих концентраціях токсичний. Друга реакція синтезу відновленого глутатіону відбувається за впливу глутатіонсинтази, що каталізує взаємодію γ -глутаміл-L-цистеїну з L-гліцином. Слід відмітити, що γ -глу-

тамілцистеїніліаза лімітує швидкість синтезу відновленого глутатіону. Центральна роль печінки у цьому синтезі, насамперед, пов'язана з доступністю цистеїну. Саме у печінці метаболізуються амінокислоти, отримані з раціону, та відбувається транссульфутування метіоніну з утворенням цистеїну (Chen et al., 2013; Shelly & Lu, 2013). Після синтезу в цитоплазмі глутатіон за допомогою мембранних транспортерів проникає в інші компартменти клітин (мітохондрії, ядро та ендоплазматичний ретикулум, де, за винятком останнього, знаходиться у відновленій формі). В ендоплазматичному ретикулумі окиснена форма глутатіону необхідна для правильного складання та секреторного шляху білків. Крім того, можливий міжклітинний та міжорганний транспорт глутатіону. Синтезований у печінці глутатіон вивільняється у плазму крові через синусоїдну мембрану. В нормі експорт глутатіону переважає його метаболізм у печінці. 20% синтезованого у печінці глутатіону в окисненій формі вивільняється через каналікулярну мембрану в жовч, де його концентрація значно вища, ніж у печінці.

Печінка – основне, але не єдине джерело відновленого глутатіону. У крові глутатіон не метаболізується. Це відбувається після його надходження в клітини (Kulinskiy & Kolesnichenko, 2009). На відміну від синтезу, катаболізм відновленого глутатіону та його аддуктів відбувається винятково у позаклітинному просторі на поверхні клітинних мембран, які експресують ензим γ -глутамілтрансферазу. Даний ензим гідролізує відновлений глутатіон до глутамінової кислоти та дипептида цистеїнілглутаміна, що, у свою чергу, гідролізується дипептидазами до складових амінокислот, які далі поглинаються клітинами для подальшого метаболізму або ресинтезу. Можна констатувати, що рівень внутрішньоклітинного та позаклітинного відновленого глутатіону визначається балансом між його виробництвом, споживанням і транспортуванням. У зв'язку з важливістю його фізіологічних функцій ці процеси жорстко регулюються. Активність ензимів, що беруть участь у метаболізмі відновленого глутатіону, контролюється на транскрипційних, трансляційних і посттрансляційних рівнях. У нашому експерименті падіння рівня відновленого глутатіону у клітинах печінки щурів з ЕВУ гастродуоденальної зони за незміненої активності ГР, вірогідно, може відбуватися як за збільшення синусоїдного відтоку та міжорганного перерозподілу, так і за інгібування синтезу.

Розвиток цієї патології в експериментальних тварин супроводжується дестабілізацією окисно-відновних процесів у тканині головного мозку, що інтенсифікувало ПОЛ. Зазначені зміни, насамперед, пов'язані з дією пошкоджувальних патогенних чинників, що викликали надмірне подразнення вісцерорецепторів шлунка та супроводжувались зміною активності центральних регуляторних структур, пов'язаних із прийняттям і переробкою цих сигналів. Окисний стрес може викликати пряме пошкодження клітин головного мозку. За нормальних фізіологічних умов мозок ссавців споживає близько 20% загальної кількості кисню в організмі. Головний мозок значно збагачений поліненасиченими жирними кислотами, важливими для нейронних функцій та чутливими до атаки АФК. Системи ж АОЗ у головному мозку доволі нечисленні (Ren et al., 2017). У нашому експерименті під час моделювання ЕВУ гастродуоденальної зони в його тканині відбувалась лише активація каталази (присутня лише в пероксисомах), що свідчить про високу концентрацію H_2O_2 . Але основне джерело у клітинах головного мозку – мітохондрії, де каталаза відсутня, а основний захисний ензим – ГПО. Вірогідно, активація ГПО лімітувалась низькою концентрацією в головному мозку відновленого глутатіону.

Ін'єкції L-аргінін-L-глутамату, які отримували експериментальні щури одночасно з моделюванням ЕВУ, нормалізували кількість загальних глікопротеїнів у СО шлунка з одночасним відновленням складових вуглеводних компонентів муцинів і зменшенням процесів ліпопероксидації. Зазначені зміни, на нашу думку, насамперед пов'язані з роботою системи L-аргінін-NO. Для підтвердження цієї гіпотези використано неселективний блокатор NO-синтази – L-NAME, який уводили одночасно з L-аргінін-L-глутаматом. Уведення блокатору нівелювало отриманий результат впливу L-аргінін-L-глутамату в СО: рівень ТБК-активних продуктів і загальних глікопротеїнів незначно відрізнявся від показни-

ків тварин з ЕВУ, які не отримували L-аргінін-L-глутамат; кількість основних вуглеводних структурних компонентів муцинів – гексозамінів, була значно меншою порівняно зі щурами з ЕВУ.

Вплив L-аргінін-L-глутамату у щурів з ЕВУ викликав ідентичні зміни системи АОЗ у дослідних тканинах, що виражалось збалансованою активацією антирадикального ензиму СОД і антиперекисного ГПО. Одночасно спостерігали поповнення пулу ВГ і уповільнення процесів ПОЛ у крові та тканині печінки, тоді як у тканині головного мозку активація систем АОЗ не сприяла інгібуванню процесів ПОЛ, що, вірогідно, пов'язане із занадто інтенсивними стресорами, які застосовували під час моделювання ЕВУ. Зростання рівня відновленого глутатіону за впливу L-аргінін-L-глутамату в крові та тканині головного мозку відбувалось за участі ГР, про що свідчить її активація, а у тканині печінки основним механізмом поповнення пулу відновленого глутатіону, на нашу думку, був синтез *de novo*. Застосування L-NAME інгібувало всі ферменти АОЗ, що свідчить про взаємні регуляторні механізми антиоксидантної системи та NO.

Відома роль NO як поглинач O_2^- з утворенням пероксинітриту ($ONOO^-$), причому константа взаємодії даної реакції більша, ніж за дисмутації O_2^- , що каталізується СОД. Окрім відомої пошкоджувальної дії, $ONOO^-$ може впливати на метаболізм відновленого глутатіону, з утворенням нітрозоглутатіону (GSNO), що признаний як ендogenous резервуар NO. GSNO здатний до експорту з клітин через мембранні транспортери відновленого глутатіону. Припускають, що в реакціях утворення GSNO саме концентрація відновленого глутатіону критична під час взаємодії з NO-системою (Keszler et al., 2010; Broniowska et al., 2013). Вивчаються механізми вивільнення NO з GSNO. Існує гіпотеза, що розкладання GSNO відбувається за присутності відновленого глутатіону та каталізується Zn/Cu-СОД (Kolesnik et al., 2013).

Застосування неселективного інгібітору NO у тварин з ЕВУ дозволяє зробити припущення, що під час блокування NO-системи відбувається вивільнення NO з GSNO, про що свідчить стабільний рівень відновленого глутатіону у тканинах печінки та головному мозку, і його зростання у крові на тлі загальної депресії АОЗ і активації ПОЛ. Припускаємо, що поповнення пулу відновленого глутатіону в умовах інгібування ГР відбувалось за рахунок синтезу *de novo* з використанням уведеного L-глутамату. Wu (1998) повідомляє, що саме люмінальний глутамат, а не глутамат, отриманий із глутаміну, – пріоритетне джерело для синтезу відновленого глутатіону.

Одна з основних функцій відновленого глутатіону та GSNO – модульований вплив на процеси оксигенації, деоксигенації крові в капілярах і на спорідненість гемоглобіну до кисню. Циркулюючий у крові NO зв'язується з гемоглобіном у формі S-нітрозотіолу, а саме S-нітрозогемоглобіну (SNO-Hb). S-нітрузування Hb полегшує від'єднання NO з гему, регулюється алостерично та функціонально пов'язане з приєднанням O_2 . Під час зв'язування Hb з O_2 у легень його спорідненість для S-нітрозотіолу зростає, а під час віддачі – знижується, в результаті чого NO вивільняється у тканини. Припускають, що за реакції SNO-Hb із відновленим глутатіоном відбувається модифікація спорідненості гемоглобіну до кисню, зсув кривої дисоціації оксигемоглобіну вправо, вивільнення кисню. Вплив SNO-Hb на транспорт NO до тканин досить істотний, оскільки вивільнення NO з комплексу з Hb суттєво залежить від наявності або відсутності кисню. Саме в гіпоксичних умовах Hb переходить із R- в T-конформацію, в якій він не може міцно утримувати NO (Robaczewska et al., 2016).

Підсумовуючи, можна констатувати, що L-аргінін-L-глутамат через NO-залежні механізми під час поєднаного впливу на АОЗ, зокрема, на систему відновленого глутатіону, може модулювати стан мікроциркуляторної системи у слизовій оболонці шлунка, що викликає відновлення факторів її захисту.

Висновки

Моделювання ерозивно-виразкових уражень гастродуоденальної зони в експериментальних тварин супроводжується інтен-

сифікацією процесів ПОЛ, дисбалансом роботи систем антиоксидантного захисту та розвитком оксидативного стресу в крові, тканинах шлунка, печінки, головного мозку. У слизовій оболонці шлунка експериментальних тварин зменшується загальна кількість факторів захисту – секреторних муцинів з одночасною їх структурною зміною. Застосування L-аргінін-L-глутамату зменшує прояву оксидативного стресу у тканині шлунка тварин з експериментальною патологією та нормалізує кількісний і якісний склад муцинів. У крові, тканинах печінки, головного мозку шурів ін'єкції L-аргініну-L-глутамату сприяли активації ензимів першої антирадикальної ланки – супероксиддисмутази та каталази, збільшенню пулу відновленого глутатіону та уповільненню вільнорадикальних реакцій. Дослідження реакцій на дію інгібітору дає підстави для гіпотези про NO-опосередкований механізм впливу L-аргінін-L-глутамату з утворенням S-нітрозотіолів, про що свідчить високий рівень відновленого глутатіону під час його застосування.

References

- Amagase, K., Nakamura, E., Kato, S., & Takeuchi, K. (2015). Glutamate as a potential protective drug in the gastrointestinal mucosa. *Yakugaku Zasshi*, 135(6), 779–782.
- Babak, O. J., Frolov, V. M., & Harchenko, N. V. (2005). Glutargin – farmakologicheskoe dejstvie i klinicheskoe primeneniye [Glutargin – pharmacological action and clinical application]. *Jelton-2, Kharkov* (in Russian).
- Barinov, E. F., Kondratenko, P. G., Sulaeva, O. N., Jarikov, S. O., & Delyy, V. Y. (2013). Gastrointestinal'nyy bar'yer: Strukturnyye i molekulyarnyye determinanty v norme i pri ul'tserogeneze [Gastrointestinal barrier: Structural and molecular determinants in norm and in ulcerogenesis]. *Ukrayinsky Zhurnal Khirurhiyi*, 23(4), 96–104 (in Russian).
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329–354.
- Broniowska, K. A., Diers, A. R., & Hogg, N. (2013). S-nitrosoglutathione. *Biochimica Biophysica Acta*, 1830(5), 3173–3181.
- Chen, Y., Dong, H., Thompson, D. C., Shertzer, H. G., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2013). Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 38–44.
- Cossenza, M., Socodato, R. C., Portugal, C. C., Domith, I. C., Gladulich, L. F., Encarnação, T. G., Calaza, K. C., Mendonça, H. R., Campello-Costa, P., & Paes-de-Carvalho, R. (2014). Nitric oxide in the nervous system: Biochemical, developmental, and neurobiological aspects. *Vitamins and Hormones*, 96, 79–125.
- Duarte, H. O., Freitas, D., Gomes, C., Gomes, J., Magalhães, A., & Reis, C. (2016). Mucin-type O-glycosylation in gastric carcinogenesis. *Biomolecules*, 6(3), 33.
- El-Demerdash, E., El-Mesallamy, H. O., Abu-Zaid, N. M., & Gad, M. Z. (2010). The potential therapeutic effect of nitric oxide modulators in experimentally-induced gastric ulcers. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 4(4), 276–284.
- Gyires, K., Toth, V. E., & Zadori, Z. S. (2015). Gastric mucosal protection: From the periphery to the central nervous system. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(3), 319–329.
- Hlynov, I. B., & Chikunova, M. V. (2016). Znachenije slizisto-bikarbonatnogo bar'yera zheludka pri kislotozavisimyykh zabolevaniyakh [The role of gastric mucus-bicarbonate barrier in acid diseases]. *Russkij Medicinskij Zhurnal*, 17, 1125–1129 (in Russian).
- Ishibashi-Shiraishi, I., Shiraishi, S., Fujita, S., Ogawa, S., Kaneko, M., Suzuki, M., & Tanaka, T. (2016). L-arginine L-glutamate enhances gastric motor function in rats and dogs and improves delayed gastric emptying in dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 359(2), 238–246.
- Jiménez, M. D., Martín, M. J., Alarcón de la Lastra, C., Bruseghini, L., Esteras, A., Herrerías, J. M., & Motilva, V. (2004). Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa. *Free Radical Research*, 38(9), 903–911.
- Keszler, A., Zhang, Y., & Hogg, N. (2010). Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed? *Free Radical Biology and Medicine*, 48(1), 55–64.
- Kim, S. F. (2014). The nitric oxide-mediated regulation of prostaglandin signaling in medicine. *Vitamins and Hormones*, 96, 211–245.
- Kirichuk, V. F., Andronov, E. V., Ivanov, A. N., & Mamontova, N. V. (2008). Oksid azota i mikrocirkuljatornoe zveno sistemy gemostaza (obzor literatury) [Nitric oxide and microcirculatory unit of the hemostasis system (literature review)]. *Uspehi Fiziologicheskikh Nauk*, 39(4), 83–91 (in Russian).
- Kolesnik, B., Palten, K., Schrammel, A., Stessel, H., Schmidt, K., Mayer, B., & Gorren, A. C. (2013). Efficient nitrosation of glutathione by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 51–64.
- Kulinskij, V. I., & Kolesnichenko, L. S. (2009). Sistema glutatona. I. Sintez, transport, glutatonttransferazy, glutatontperoksidazy [Glutathione system. I. Synthesis, transport, glutathione transferase, glutathione peroxidase]. *Biomedicinskaja Himija*, 55(3), 255–277 (in Russian).
- Kumar, S., Singh, R. K., & Bhardwaj, T. R. (2017). Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 85(1), 182–201.
- Kunio, T., Hisayuki, U., & Eiji, N. (2013). Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. *Journal of Gastroenterology*, 48(4), 442–451.
- Kwiecien, S., Jasnos, K., Magierowski, M., Sliwowski, Z., Pajdo, R., Brzozowski, B., Mach, T., Wojcik, D., & Brzozowski, T. (2014). Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(5), 613–622.
- Larsson, J. M., Thomsson, K. A., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Karlsson, H., & Hansson, G. C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(5), 357–363.
- Lei, J., Vodovotz, Y., Tzeng, E., & Billiar, T. R. (2013). Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*, 35, 175–185.
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087–26124.
- Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2012). Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*, 62(4), 616–629.
- Lykholat, T., Lykholat, O., & Antonyuk, S. (2016). Immunohistochemical and biochemical analysis of mammary gland tumours of different age patients. *Cytology and Genetic*, 50(1), 32–41.
- Lykholat, O. A., Grigoryuk, I. P., & Lykholat, T. Y. (2016). Metabolic effects of alimentary estrogen in different age animals. *Annals of Agrarian Science*, 14(4), 335–339.
- Magierowski, M., Magierowska, K., Sławomir Kwiecien, S., & Brzozowski, T. (2015). Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. *Molecules*, 20(5), 9099–9123.
- Matsui, H., Nagano, Y., Shimokawa, O., Kaneko, T., Rai, K., Udo, J., Hirayama, A., Nakamura, Y., Indo, H. P., Majima, H. J., & Hyodo, I. (2011). Gastric acid induces mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation in gastric epithelial cells. *Journal of Gastroenterology*, 46(10), 1167–1176.
- Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, 28(5), 84.
- Ovsjannikova, M. M., Al'ohina, S. M., & Drobins'ka, O. V. (1999). Biohimichni ta biofizichni metody ocinki porushen' oksyljuval'nogo homeostazu v osib, shho zaznali radiacijnogo vplivu vnaslidok avarii na ChAES [Biochemical and biophysical methods for evaluating the disturbances of oxidative homeostasis in persons who have undergone radiation influence as a result of the Chernobyl accident]. *Kyiv* (in Russian).
- Pen, X., Zou, L., Zhang, X., Branco, V., Wang, J., Carvalho, C., Holmgren, A., & Lu, J. (2017). Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 27(13), 989–1010.
- Pereslegina, I. A. (1989). Aktivnost' antioksidantnykh fermentov sljny u zdorovykh detej [Activity of antioxidant saliva enzymes in healthy children]. *Laboratornoe Delo*, 11, 20–23 (in Russian).
- Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., & Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 75–103.
- Robaczewska, J., Kedziora-Komatowska, K., Kozakiewicz, M., Zary-Sikorska, E., Pawluk, H., Pawliszak, W., & Kedziora, J. (2016). Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(3), 331–337.
- Prohorova, M. I. (Ed.). (1982). *Metody biohimicheskikh issledovanij (lipidnyj i jenergeticheskij obmen)* [Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism)]. Leningradskij Universitet, Leningrad (in Russian).
- Rudenko, A. I., Majkova, T. V., Mosijchuk, L. M., Ponomarenko, O. A., Tolstikova, T. M., & Sirotenko, A. S. (2004). Kliniko-laboratoma ocinka funkcional'nogo stanu sekretornih zaloz shlunka [Clinical and laboratory evaluation of functional state of the secretory glands of the stomach]. *Kyiv* (in Russian).
- Semenchuk, S. A., Jakovleva, O. A., & Stockaja, T. V. (2017). Jefferektivnost' primeneniya L-arginina-L-glutamata kak metabolicheskogo korektora u bol'nyh s postinfarktym kardiosklerozom [The efficacy of L-arginine-L-glutamate as a metabolic corrector in patients with postinfarction cardiosclerosis]. *Bukovynskij Medychynyj Visnyk*, 21(1), 132–135 (in Russian).
- Sgambato, D., Capuano, A., Sullo, M. G., Miranda, A., Federico, A., & Romano, M. (2016). Gut-brain axis in gastric mucosal damage and protection. *Current Neuropharmacology*, 14(8), 959–966.

- Sulaeva, O. N. (2015). Strukturnaja organizacija i fiziologicheskie jeffekty bluzhdajushhego nerva v ZhK [Structural organization and physiological effects of the vagus nerve in the GIT]. *Svit Medycyny ta Biologiyi*, 53(4), 164–171 (in Russian).
- Shelly, C., & Lu, M. D. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3143–3153.
- Taché, Y. (2012). Brainstem neuropeptides and vagal protection of the gastric mucosal against injury: Role of prostaglandins, nitric oxide and calcitonin-gene related peptide in capsaicin afferents. *Current Medicinal Chemistry*, 19(1), 35–42.
- Tarasenko, L. M., Neporada, K. S., Skrypnik, I. N., & Volozhin, A. I. (2001). Jeksperimental'naja model' pepticheskoy jazvy zheludka [Experimental model of peptic ulcer of the stomach]. *Patologicheskaja Fiziologija i Jeksperimental'naja Medicina*, 1, 27–28 (in Russian).
- Tamawski, A. S., Ahluwalia, A., & Jones, M. K. (2012). The mechanisms of gastric mucosal injury: Focus on microvascular endothelium as a key target. *Current Medicinal Chemistry*, 19(1), 4–15.
- Tkach, S. M., Puchkov, K. S., & Kuzenko, Y. G. (2013). Biologicheskiye effekty oksidov azota v zheludочно kischechnom trakte [Biological effects of nitric oxide in the gastrointestinal tract]. *Suchasna Gastroyenterologiya*, 72(4), 118–128 (in Russian).
- van Zwieten, R., Verhoeven, A. J., & Roos, D. (2014). Inborn defects in the anti-oxidant systems of human red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 67(2), 377–386.
- Wallace, J. L., Ianaro, A., & de Nucci, G. (2017). Gaseous mediators in gastrointestinal mucosal defense and injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 62(9), 2223–2230.
- Wu, G. (1998). Intestinal mucosal amino acid catabolism. *Jornal of Nutrition*, 128(8), 1249–1252.
- Yandrapu, H., & Sarosiek, J. (2015). Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: An overview. *Current Gastroenterology Reports*, 17(6), 24.
- Yermishev, O., Lykholat, T., & Lykholat, O. (2017). Effect of alimentary synthetic estrogen on cell compensatory mechanisms in rats of different ages. *Biologija*, 63(2), 152–159.
- Zolotarev, V. A., Andreeva, Y. V., Vershinina, E., & Khropycheva, R. P. (2017). Interaction of constitutive nitric oxide synthases with cyclooxygenases in regulation of bicarbonate secretion in the gastric mucosa. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(1), 6–9.
- Zolotova, N. A. (2014). Strukturnaya i funktsional'naya kharakteristika mutsinov [Structural and functional characteristics of mucins]. *Klinicheskaya i funktsional'naya Morfologiya*, 1, 66–72 (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 9(2)

Table of Contents

Bulyk, R. Y., Abramov, A. V., Bulyk, T. S., Kryvchanska, M. I., & Vlasova, K. V. The effects of melatonin on the activity of the <i>c-fos</i> gene in the structures of the hypothalamic paraventricular nucleus under prolonged lighting	131
Pesnya, D. S., Romanovsky, A. V., Klimova, Y. S., Fedorov, R. A., & Ivanova, E. S. Effect of sodium chloride on oxidative stress biomarkers of the freshwater bivalve <i>Anodonta cygnea</i>	135
Galkin, O. Y., Gorshunov, Y. V., Besarab, O. B., & Shchurska, K. O. Biotechnology for obtaining hybrid positive control samples for immunoassay for detecting antibodies against <i>Chlamydia trachomatis</i>	141
Kots, S. Y., Mamenko, T. P., & Pavlyshche, A. V. Activity of nitrogen fixation and antioxidant enzymes in symbiotic systems <i>Glycine max</i> – <i>Bradyrhizobium japonicum</i> for complex treatment with lectin and fungicides	148
Vozhehova, R. A., Fedorchuk, M. I., Lavrynenko, Y. O., Kokovikhin, S. V., Lykhovyd, P. V., Biliaieva, I. M., & Nesterchuk, V. V. Effect of agrotechnological elements on milk thistle (<i>Silynum marianum</i>) productivity	156
Lykholat, Y., Khromykh, N., Didur, O., Alexeyeva, A., Lykholat, T., & Davydov, V. Modeling the invasiveness of <i>Ulmus pumila</i> in urban ecosystems in conditions of climate change	161
Sokolenko, V. L., Sokolenko, S. V., Sheiko, V. I., & Kovalenko, O. V. Interconnection of the immune system and the intensity of the oxidative processes under conditions of prolonged exposure to small doses of radiation	167
Kramarenko, S. S., Lugovoy, S. I., Kharzinova, V. R., Lykhach, V. Y., Kramarenko, A. S., & Lykhach, A. V. Genetic diversity of Ukrainian local pig breeds based on microsatellite markers	177
Korzhyyk, O. V., Pavlovych, O. S., Dmytrotsa, O. R., & Morenko, A. H. Cortex electrical activity during switching of motor programs among men and women	183
Yakymchuk, R. A. Cytogenetic activity of radionuclide contamination of water reservoirs of the alienation zone of Chornobyl NPP	189
Kunakh, O. N., Kramarenko, S. S., Zhukov, A. V., Kramarenko, A. S., & Yorkina, N. V. Fitting competing models and evaluation of model parameters of the abundance distribution of the land snail <i>Vallonia pulchella</i> (Pulmonata, Valloniidae)	198
Alrawashdeh, M. S. M. Determination of antimicrobial activity of some 1,2,4-triazole derivatives	203
Lytkin, D. V., Zagayko, A. L., & Briukhanova, T. O. The effect of third-generation aromatase inhibitors on aromatase activity in visceral adipose tissue	209
Galyk, G. V., Fedorovych, Z. Y., Lychkovsky, E. I., & Sanagursky, D. I. Analysis of the transmembrane potential of embryos exposed to action of nickel, cobalt, tin and zinc	216
Knysh, O. V., Isayenko, O. Y., Falko, O. V., Babysh, Y. M., Prokopyuk, V. Y., Prokopyuk, O. S., & Pogorila, M. S. Cellular metabolic activity as a marker of cytotoxicity and immunotropicity of probiotics' derivatives	223
Yevstafiyeva, V. A., Melnychuk, V. V., Nikiforova, O. V., Suprunenko, K. V., Korchan, L. N., Lokes-Krupka, T. P., Nehrebetskyi, I. S., & Korchan, N. I. Comparative morphology and biology of nematodes of genus <i>Heterakis</i> (Nematoda, Heterakidae), parasites of the domestic goose (<i>Anser anser</i>) in Ukraine	229
Lapirov, A. G., Belyakov, E. A., & Lebedeva, O. A. Ontogeny of <i>Lobelia dortmanna</i> genets in lake ecosystems	237
Bogdanova, A. A., & Flerova, E. A. Biochemical and hematological composition of blood of cattle fed with <i>Chlorella</i>	244
Babenko, L. M., Hospodarenko, H. M., Rozhkov, R. V., Pariy, Y. F., Pariy, M. F., Babenko, A. V., & Kosakivska, I. V. <i>Triticum spelta</i> : Origin, biological characteristics and perspectives for use in breeding and agriculture	250
Hrytsak, L. R., Herts, A. I., Nuzhyna, N. V., Cryk, M. M., Shevchenko, V. V., & Drobyk, N. M. The influence of light regime on the growth data and pigment composition of the plant <i>Gentiana lutea</i> cultured <i>in vitro</i>	258
Bodnar, O. I., Kovalska, H. B., & Grubinko, V. V. Regulation of biosynthesis of lipids in <i>Chlorella vulgaris</i> by compounds of zinc, chromium and selenium	267
Berhilevych, O. M., Kasianchuk, V. V., Deriabin, O. M., & Kukhtyn, M. D. Isolation of Shiga toxin-producing strains of <i>Escherichia coli</i> from beef and swine carcasses and the characterization of their genes	275
Sklyar, T. V., Lavrentieva, K. V., Gavriyuk, V. G., Kurahina, N. V., Vereshchaha, M. O., & Lykholat, O. A. Monitoring of multiresistant community-associated MRSA strains from patients with pathological processes of different localization	281
Vorobets, M. Z., Fafula, R. V., Besedina, A. S., Onufrovych, O. K., & Vorobets, D. Z. Glutathione s-transferase as a marker of oxidative stress in human ejaculated spermatozoa from patients with pathospermia	287
Rogach, V. V., Kravets, O. O., Buina, O. I., & Kuryata, V. G. Dynamic of accumulation and redistribution of various carbohydrate forms and nitrogen in organs of tomatoes under treatment with retardants	293
Stepanov, Y. M., & Ponomarenko, L. A., Lykholat, O. A., Shevchenko, T. M., Khomenko, O. M., & Ponomarenko, A. A. Cytoprotective processes induced by the effect of L-arginin-L-glutamate in rats with experimental pathology of the gastroduodenal zone	300