

ЗМІСТ \*\*\* CONTENT

\*\*\* БІОХІМІЯ \*\*\* BIOCHEMISTRY \*\*\*

---

<b>Barannik T.V., Ruzin Yu.M.</b> Glutathione redox cycle enzymes as potential targets for heme-mediated oxidation under hemolysis: <i>in silico</i> analysis.....	5
<b>Будняк О.К., Чернадчук С.С., Сорокін А.В., Ожерельєва К.Ю., Петров С.А.</b> Вміст метаболітів вітаміну С в органах щурів в умовах гострої крововтрати.....	14
<b>Охріменко С.М., Ганусова Г.В., Сєдова К.В., Арістова Д.І., Сіренко Т.Є., Гришкова А.Ю., Круговий Д.В., Павлій А.К.</b> Структурно-функціональні показники ізольованих гепатоцитів щурів у присутності наночасток на основі Європію та гадолінію.....	21

\*\*\* ГЕНЕТИКА \*\*\* GENETICS \*\*\*

---

<b>Филипоненко Н.С., Табачная М.Н., Горенская О.В.</b> Анализ частоты эмбриональной смертности у линий <i>Drosophila melanogaster</i> , несущих мутацию <i>radius incompletus</i> , в условиях инбридинга.....	29
--	----

\*\*\* ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ \*\*\* ZOOLOGY AND ECOLOGY \*\*\*

---

<b>Ибрагимова Н.Э., Рзаев Ф.Г.</b> Паразитофауна каспийского лосося ( <i>Salmo trutta caspius</i> Kessler) на рыбопроизводных заводах Азербайджана за период их существования.....	38
--	----

\*\*\* КЛІТИННА БІОЛОГІЯ \*\*\* CELL BIOLOGY \*\*\*

---

<b>Али С.Г., Сидоренко О.С., Божок Г.А.</b> Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят .....	49
<b>Гриценко М.А.</b> Експресія генів деяких цитокінів та кількість їхніх продуктів у культурах фібробластів шкіри та легенів щурів в онтогенезі.....	60
<b>Си У, Харченко Т., Кот Е., Кот Ю., Перский Е.</b> Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс <i>in vitro</i> .....	68

\*\*\* МІКРОБІОЛОГІЯ \*\*\* MICROBIOLOGY \*\*\*

---

<b>Авксентьєва О.О., Віннікова О.І.</b> Мікроміцети ризосфери та філосфери ізогенних за генами <i>VRN</i> ліній пшениці ( <i>Triticum aestivum</i> L.) у зв'язку з темпами розвитку та продуктивністю.....	77
--	----

\*\*\* ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН \*\*\* PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS \*\*\*

---

<b>Амінов Р.Ф.</b> Гемопоетична активність кісткового мозку щура на фоні впливу сольового екстракту <i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820.....	87
---	----

Титкова А.М., Берченко О.Г., Шляхова А.В., Веселовская Е.В., Приходько Е.А. Взаимодействия дофамина, оксида азота и тестостерона в мозговой системе мотивационного подкрепления крыс с алкогольной зависимостью и под влиянием донатора оксида азота.....	95
---	----

\*\*\* ОГЛЯДИ \*\*\* REVIEWS \*\*\*

---

Соколік В.В. Нейрозапалення у біохімічних механізмах амілоїдозу.....	103
--	-----

\*\*\* ІНФОРМАЦІЯ \*\*\* INFORMATION \*\*\*

---

Правила для авторів .....	113
---------------------------	-----

••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

UDC: [577.12+57.044: 577.151.33]

**Ферменти редокс-циклу глутатіону як потенційні мішені  
гем-опосередкованого окислення при гемолізі: аналіз *in silico***  
Т.В.Бараннік, Ю.М.Рузін

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*  
*tbarannik@karazin.ua*

Редокс-гомеостаз глутатіону ( $\gamma$ -глутамілцистеїнілгліцину) в еритроцитах людини залежить від активності глутатіонпероксидази (GPX1, КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктази (GSR, КФ 1.8.1.7), глутаредоксину 1 (GRX1) і NADPH-генеруючих ферментів пентозофосфатного шляху, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PD, КФ 1.1.1.49) і 6-фосфоглюконатдегідрогенази (PGD, КФ 1.1.1.44). Накопичення вільного гему при гемолізі може вплинути на активність протеїнів, у зв'язку з чим був проведений *in silico* аналіз структури ферментів редокс-циклу глутатіону з метою виявлення можливих гем-зв'язуючих сайтів та залишків цистеїну, здатних до окислення. Анотації протеїнів були взяті з UniProt. Докінг гему проведений у PatchDock з RMSD кластерування 1,5 Å і з використанням PDB структур протеїнів та гему. Потенціал окислення цистеїнів оцінювався за допомогою Cy-Preds. Для мономерів GSR (1DNC, 3DJJ, 3DK9, 2GRT) та димерів (3SQP, 2GH5) передбачено зв'язування гему через His81 біля дисульфідного зв'язку між ланцюгами та через Cys59 біля сайтів зв'язування FAD і GSSG. Гем-зв'язуючі сайти у GPX1 (2F8A) і GPX3 (2R37) також виявлені у ділянці між ланцюгами та у активному центрі (His80). Зв'язування гему з GLRX1 (4RQR) передбачено майже виключно поблизу N-кінця, незважаючи на доступність всіх цистеїнів разом з CPYC мотивом у активному центрі. В мономері G6PD (2BH9, 5UKW) гем-зв'язуючі ділянки виявлені у сайті зв'язування NADP<sup>+</sup> та в  $\alpha$ -спиралі 437–447, розташованій у димері 2BHL на поверхні між ланцюгами. Гем стикувався до PGD (4GWG, 4GWK) у ділянці зв'язування субстрату біля His187. Таким чином, активні центри ферментів та ділянки взаємодії ланцюгів були виявлені в більшості варіантів докінгу гему. У кожному протеїні виявлено від одного (у PGD) до трьох (у GSR) схильних до окислення цистеїнів, в тому числі серед потенційних сайтів зв'язування гему. Опосередкований гемом окислювальний ефект на ферменти редокс-циклу глутатіону у еритроцитах і плазмі крові може явитись важливим механізмом посилення гемолізу при стресі та патології.

**Ключові слова:** *редокс-цикл глутатіону, NADPH, зв'язування гему, гемоліз, молекулярний докінг.*

**Glutathione redox cycle enzymes as potential targets for heme-mediated  
oxidation under hemolysis: *in silico* analysis**  
T.V.Barannik, Yu.M.Ruzin

Glutathione ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine) redox homeostasis in human erythrocytes is dependent on the activities of glutathione peroxidase (GPX1, EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GSR, EC 1.8.1.7), glutaredoxin 1 (GRX1) and NADPH-generating enzymes of pentose phosphate pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD, EC 1.1.1.44). Free heme accumulation under hemolysis can affect proteins activity thereby *in silico* analysis of glutathione redox cycle enzymes structure was performed in order to reveal putative heme-binding sites and oxidizable cysteine residues. Protein annotations were taken from UniProt. Heme docking was performed by PatchDock with clustering RMSD 1,5 Å using PDB structures of proteins and heme. Cysteines oxidation potential was estimated by Cy-Preds. Heme binding GSR monomers (1DNC, 3DJJ, 3DK9, 2GRT) and dimers (3SQP, 2GH5) was predicted through His81 close to interchain disulfide bond and through Cys59 near FAD and GSSG binding sites. Heme-binding areas in GPX1 (2F8A) and GPX3 (2R37) also were revealed in the interchain region and in active centre (His80). GLRX1 (4RQR) was predicted to bind heme almost exclusively near the N-end in spite of accessibility of all cysteines including CPYC motif in active centre. G6PD monomer (2BH9, 5UKW) revealed heme-docking areas in NADP<sup>+</sup> binding region and  $\alpha$ -helix 437–447 located in dimer 2BHL at the interchain surface. Heme docking to PGD (4GWG, 4GWK) was in substrate binding region near His187. So enzymes active centres and chain interaction regions were revealed in the most of heme docking variants. From one (in PGD) to three (GSR) cysteines susceptible to oxidation were found in each protein including cysteines that were predicted to bind heme. Heme-mediated oxidative effect on glutathione redox cycle enzymes in erythrocytes and blood plasma could be an important mechanism of hemolysis progression under stress and pathologies.

**Key words:** *glutathione redox cycle, NADPH, heme binding, hemolysis, molecular docking.*

**Ферменты редокс-цикла глутатиона как потенциальные мишени гем-опосредованного окисления при гемолизе: анализ *in silico***

Т.В.Баранник, Ю.М.Ружин

Редокс-гомеостаз глутатиона ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицина) в эритроцитах человека зависит от активности глутатионпероксидазы (GPX1, КФ 1.11.1.9), глутатионредуктазы (GSR, КФ 1.8.1.7), глутаредоксина 1 (GRX1) и NADPH-генерирующих ферментов пентозофосфатного пути, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD, КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (PGD, КФ 1.1.1.44). Накопление свободного гема при гемолизе может повлиять на белковую активность, в связи с чем был проведен *in silico* анализ структуры ферментов редокс-цикла глутатиона с целью выявления возможных гем-связывающих сайтов и остатков цистеина, способных к окислению. Анотации белков были взяты с UniProt. Докинг гема проведен с помощью PatchDock с RMSD кластерирования 1,5 Å и с использованием PDB структур белков и гема. Потенциал окисления цистеинов оценивался с помощью Су-Preds. Для мономеров GSR (1DNC, 3DJJ, 3DK9, 2GRT) и димерных форм (3SQP, 2GH5) предсказано связывание гема через His81 возле дисульфидной связи между цепями и через Cys59 в активном центре возле сайтов связывания FAD и GSSG. GPX1 (2F8A) и GPX3 (2R37) также выявили гем-связывающие сайты преимущественно в участке между цепями и в активном центре (His80). Связывание гема с GLRX1 предсказано практически исключительно вблизи N-конца (4RQR), несмотря на доступность всех цистеинов, включая CPYC мотив в активном центре. В мономере G6PD (2BH9, 5UKW) гем-связывающие участки выявлены преимущественно в сайте связывания NADP<sup>+</sup> и в  $\alpha$ -спирали 437–447, расположенной в димере 2BHL на поверхности между цепями. Гем стыковался к PGD (4GWG, 4GWK) в участке связывания субстрата возле His187. Таким образом, активные центры ферментов и участки взаимодействия цепей были выявлены в большинстве вариантов докинга гема. От одного (у PGD) до трех (у GSR) склонных к окислению цистеинов выявлено в каждом белке, в том числе цистеины, для которых предсказано связывание гема. Опосредованный гемом окислительный эффект на ферменты редокс-цикла глутатиона в эритроцитах и плазме крови может явиться важным механизмом усиления гемолиза при стрессе и патологии.

**Ключевые слова:** редокс-цикл глутатиона, NADPH, связывание гема, гемолиз, молекулярный докинг.

**Introduction**

Glutathione is tripeptide ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine) involved in the oxidative stress response and adaptation as water-soluble antioxidant and co-substrate of glutathione-dependent enzymes. Imbalances of glutathione redox homeostasis followed by the accumulation of glutathione disulfide (GSSG) are observed under cardiovascular and neurological diseases, diabetes and other pathologies (Luschak, 2012).

Defense function of glutathione in blood is mostly linked to reduced glutathione (GSH) oxidation under direct interaction with oxidants or in glutathione peroxidase reaction with consequent reduction by NADPH-dependent glutathione reductase (Andersen et al., 1997). The only source of NADPH in erythrocytes is pentose-phosphate pathway (PPP) thereby the deficiency of PPP key enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase causes hemolytic anemia (OMIM #300908). GSH also may be attached to proteins cysteine residues and be removed by glutaredoxin having a glutathione-disulfide oxidoreductase activity in the presence of NADPH and glutathione reductase. Glutathionylation contributes to thiol groups defense from oxidation and provides the important reserve of red blood cell glutathione under the oxidative stress (Hanschmann et al., 2013). Glutathione redox cycling in human erythrocytes is, therefore, dependent on the activities of glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GSR, EC 1.8.1.7), glutaredoxin 1 (GRX1) and NADPH-generating enzymes of PPP: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD, EC 1.1.1.44).

Hemolysis occurring under various stresses and pathological conditions in mammals leads to hemoglobin release with its further degradation and free heme accumulation in blood plasma (Chiabrando et al., 2014; Immenschuh et al., 2017). Heme can directly damage cell structures through its prooxidant and detergent action (Chiabrando et al., 2014), furthermore, its attachment to heme regulatory motifs (HRM), such as Cys-Pro, described in various proteins, is considered to be a signaling event (Mense, Zhang, 2006). Short-term heme binding to proteins is performed mostly through lipophilic amino acids while stable attachment of heme is provided by its covalent binding predominantly to histidine or cysteine residues (Smith et al., 2010). Under significant free heme accumulation the glutathione redox cycle enzymes could become the targets for heme-mediated modification but their affinity to heme molecule as well as susceptibility of their cysteine residues to oxidation have not been investigated yet.

Taking into account direct and indirect prooxidant effects of heme on protein conformation and activity, *in silico* study of putative heme-binding sites and oxidizable cysteine residues in human proteins

involved in glutathione redox cycling was performed as a part of analysis of the mechanisms of heme action on the redox homeostasis under hemolysis.

### Materials and methods

The amino acid (AA) sequences and annotations of the proteins selected for study (Table 1) were downloaded from UniProt knowledgebase (<http://www.uniprot.org/>).

Table 1.

### Selected UniProt annotations data on the proteins analyzed in the study

Official protein name (gene symbol; UniProt ID)	Length, isoform	Oligomerization	Tissue/organelle specificity
Glutathione reductase, mitochondrial (GSR; P00390)	479 AA, Isoform cytoplasmic	Homodimer disulfide linked (C134)	Cytosol
Glutathione peroxidase 1 (GPX1; P07203)	203 AA, Isoform 1	Homotetramer	Erythrocytes
Glutathione peroxidase 3 (GPX3; P22352)	226 AA	Homotetramer	Secreted in plasma
Glutaredoxin-1 (GLRX1; P35754)	106 AA, Isoform 1	Monomer	Cytosol
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD; P11413)	515 AA, Isoform short	Homotetramer (dimer of dimers)	Cytosol
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (PGD; P52209)	483 AA, Isoform 1	Homodimer	Cytoplasm

Free online tool HemeBIND (<http://mleg.cse.sc.edu/hemeBIND/>) was used to predict amino acids heme-binding propensity by analysis of protein sequences in \*.fasta format. HemeBind performs predictions through comparison with sequences of the known heme-binding complexes (Liu, Hu, 2011).

The experimental data on protein structures (Table 2) was downloaded from Protein Data Bank (PDB) knowledgebase (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Table 2.

### PDB data on the protein structures analyzed in the study (method for all: X-ray diffraction)

PDB ID	Resolution	Chains (Protein)	Sequence region	Ligands and Mutations
3DK9	0.95 Å	A (GSR)	44–522	Ligands: FAD, sulphate
3DJJ	1.10 Å	A (GSR)	45–522	Ligands: phosphate, sulphate; FAD, glycerol, NADP
1DNC	1.70 Å	A (GSR)	45–522	Ligands: FAD, reduced GSH, phosphate
2GRT	2.70 Å	A (GSR)	62–522	Ligands: FAD, oxidized glutathione disulfide. Mutations: E17A, W20R
2GH5	1.70 Å	A/B (GSR)	62–522	Ligands (A,B): FAD, 6-(3-methyl-1,4-dioxo-1,4-dihydro-naphthalen-2-yl)hexanoic acid; phosphate, glycerol
3SQP	2.21 Å	A/B (GSR)	45–522	Ligands (A,B): FAD, sulphate, pyocyanin, glycerol
2F8A	1.50 Å	A/B (GPX1)	14–198	Ligands: Malonic acid. Mutation: G47C
2R37	1.85 Å	A/B (GPX3)	25–223	Ligands: Na, Cl. Mutation: G50C
4RQR	1.08 Å	A (GLRX1)	2–106	Ligand: 1-thioethanesulfonic acid
2BH9	2.50 Å	A (G6PD)	27–515	Ligands: NADP, glycerol. Mutation: V1H
5UKW	2.65 Å	A (G6PD)	29–511	Ligands: $\beta$ -D-glucose-6-phosphate; glycerol. Mutation: C254A
2BHL	2.90 Å	A/B (G6PD)	28–515	Ligands (A,B): $\beta$ -D-glucose-6-phosphate, glycerol
4GWG	1.39 Å	A (PGD)	2–483	Ligand: 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
4GWK	1.53 Å	A (PGD)	2–483	Ligands: 3-phosphoglyceric acid; 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid

Among structures known for this moment for human GSR six ones with highest resolution having coenzymes and substrate (GSSG) or product (GSH) as ligands were selected for analysis. PDB-files with dimeric structures of GPX1 and GPX3 were edited in text redactor for analysis of single protein chains. Structure of tetrameric forms of glutathione peroxidase hasn't been yet experimentally investigated.

Free online tool TM-Align (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) was used for structural alignment which was estimated in Å as RMSD (root mean square deviation) of the distances between  $\alpha$ -carbons of the aligned protein chains (Zang, Scholnik, 2005).

Docking of heme as a ligand to PDB-structures was carried out by free on-line tool PatchDock, Beta 1.3 Version (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) with clustering RMSD 1.5 Å as it was recommended for protein-ligand docking. First 20 docking solutions with the highest scores for each target PDB-structure were analyzed. Scoring was based on both geometric fit and atomic desolvation energy calculation mostly oriented on molecular shape complementarity (Schneidman-Duhovny et al., 2005). PDB-file for heme molecule was downloaded from PubChem (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/HEM>). Visualization of PDB-structures in cartoon view with amino acid side chains was performed by the help of PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC, downloaded from <https://sourceforge.net/projects/pymol/>); analysis of amino acid residues arranged in close proximity to heme iron as well as distances to heme iron was carried out by SwissProtViewer 4.1.0 (SPDBV; <http://spdbv.vital-it.ch>).

Cysteines oxidation prediction was performed by free online tool Cy-Preds (Soylu, Marino, 2016) that provided energy and similarity evaluations and functional characterization of the cysteine reactivity based on the experimental data collected in RedoxDB. Results of both HAL\_C and COPA schemes of Cy-preds algorithm were used for calculations according to the tool documentation.

### Results and discussion

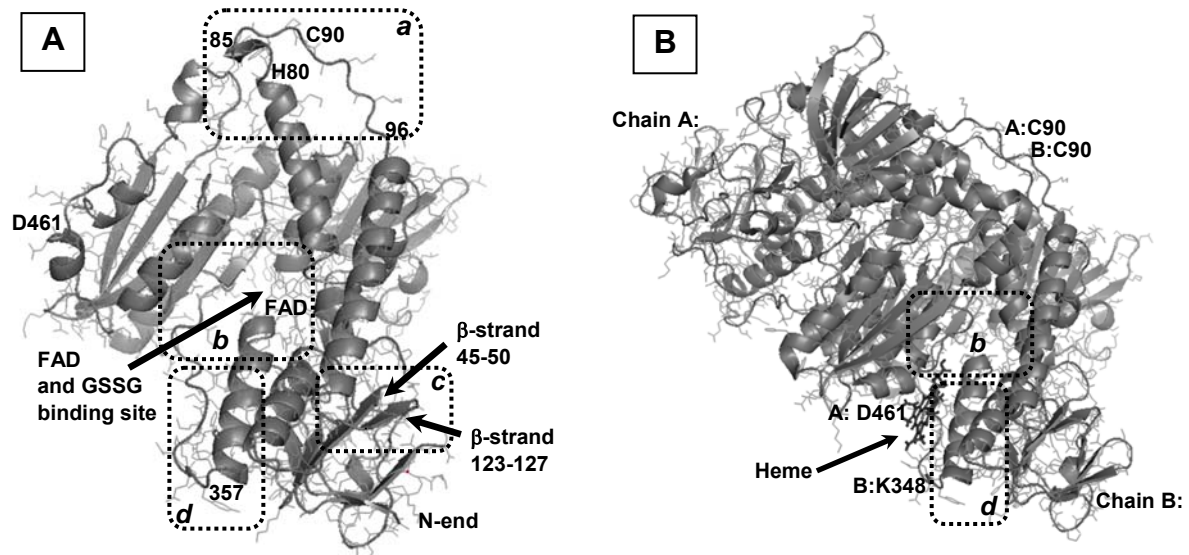
Protein sequence analysis by HemeBind predicted predominantly hydrophobic amino acid residues as potential heme-binding sites: 10 hydrophobic amino acids (AA) of totally 14 AA predicted for GSR sequence; 18 AA of 21 AA for GPX1; 21 of 26 AA for GPX3; all 6 AA for GLRX1; 13 AA of 24 AA for G6PD and 44 AA of 57 AA predicted for PGD. Cys235 of GSR and Cys289 of PGD predicted to bind heme are not located in CP/PC or CXXC motives while Cys170 belongs to PC motif and is neighbor to Cys171 (169PCC) in PGD. Moreover only in this sequence histidines (H453, H466) were scored as putative targets for heme binding. Abovementioned histidines and Cys289 are more accessible than Cys170 or Cys171 according to PDB-files. Proline but not cysteine of PC motif (CP77) was predicted to bind heme in GPX1. Percentage of predicted heme-binding sites (as a ratio to the total number of amino acids in the chain) was the biggest in PGD – 12% against 3% in GSR, 5% in G6PD; 6% in GLRX1 and 10% in GPX1. Summarizing the results of HemeBind analysis it can be concluded that specific heme-binding sites able to covalent heme attachment were predicted only for GSR and PGD sequences.

Structural alignment of PDB structures known for one protein revealed very close conformations. Thus for GSR variants used in the study (including 2GRT with mutation) RMSD range varied from 0.20 Å (3DK9 aligned to 3DJJ) to 0.45 Å (3SQP aligned to 2GH5); for glucose-6-P dehydrogenase RMSD was close to 1.00 Å; for glutathione peroxidase isoforms RMSD=1.10 Å (alignment of 2F8A and 2R37). Two structures known for human 6-P-gluconate dehydrogenase were found almost identical (RMSD=0.1 Å).

Molecular docking of heme molecule to monomeric GSR (1DNC, 3DJJ, 3DK9 and 2GRT) revealed putative heme-binding sites located predominantly in four areas (Fig. 1A): the loop region 80–96 with Cys90 and His80 neighbor to  $\alpha$ -helix (a), the cavity in the centre of the molecule near FAD and glutathione disulfide binding sites close to Cys58 and Cys63 (b), near the hydrophobic regions 45–50 (Arg-Ala-Ala-Val-Val) and 123–127 (His-Ile-Glu-Ile-Ile) organized into two adjacent beta-strands (c) and the region with the loop 354–360 and part of  $\alpha$ -helix with His351 (d).

Chains in the dimers (3SQP and 2GH5, analyzed in SPDBV) revealed rather big contacting areas formed by more than 140 amino acids with about 70 ones from each chain. Some of them were predicted (Table 3) as heme-binding sites in monomeric models, including redox-active Cys58 and Cys63 as well as regions near His80, Thr339, Phe372 and Glu442. Thus heme might interfere dimerization and thereby disturb the formation of the active form of glutathione reductase. In the enzyme dimers (3SQP and 2GH5) the cavity formed by two chains was predicted to become more preferable site for heme binding than other areas (Fig. 1, boxes a–c). Significant portion of these amino acids was also involved in binding of

coenzymes (FAD and NADP) and substrate (GSSG). Among amino acids found in these sites only His351 arranged near the surface could provide long-term specific heme binding.



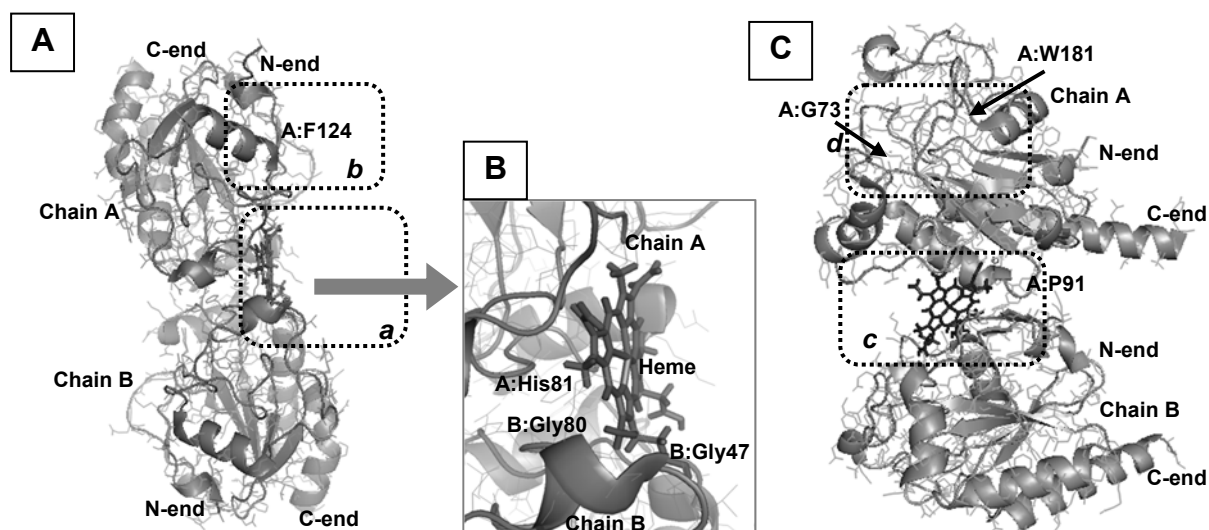
**Fig. 1. Human glutathione reductase (cartoon view in PyMol) with predicted heme-binding areas shown as the boxes with dotted borders.** A: Monomeric GSR (1DNC is taken as an example), box *a* – the loop region 80–96; box *b* – the cavity in the centre of the molecule; box *c* – two beta-strands 45–50 and 123–127; box *d* – area near the loop 354–360 and  $\alpha$ -helix with His351. B: Dimeric GSR docked with heme (3SQP, solution 3), Cys90 form interchain disulfide bridge. Here and hereafter numbers that indicate amino acid residues are taken from pdb-files, A and B parts have different scale

**Table 3.**

**Representative results of heme docking to glutathione reductase (GSR).** Here and hereafter the amino acids (AA) arranged mostly close to heme iron are marked by bold font, distances to Fe are given in brackets (as calculated in SPDBV), amino acids numbers are taken from pdb-files

PDB ID (docking solution)	Total Score	Contact area	Amino acids of GSR predicted to be at 6 Å or less from the heme ring	Location of binding region
3DK9 (solution 2)	5910	696.0	A: Ser76, Glu77, Phe78, Met79, <b>His80</b> (1,35 Å), Asp81, Ala208, Arg413	The loop region 80–96
3DJJ (solution 10)	5566	654.6	A: Ser30, <b>Cys58</b> (4,83 Å), Val59, Cys63, Val64, Tyr106, Leu110, Tyr114, Thr339, Ile343	NADP and GSSG binding sites
2GRT (solution 4)	5816	781.8	A: Lys67, Val370, <b>Phe372</b> (3,91 Å), Asp441, Glu442	GSSG and FAD binding sites
1DNC (solution 13)	5744	671.8	A: Tyr21, Arg45, Val48, Ile123, Glu124, <b>Ile125</b> (4,40 Å), Ile126, Arg127	$\beta$ -strands 45–50 and 123–127
3SQP (dimer, solution 3)	6500	857.5	A: Ala458, <b>Asp461</b> (4.69 Å), Asn462, Thr464 B: Ala344, Arg347, <b>Lys348</b> (3,00 Å), His351, Ser360, Lys361, Leu362	Chain A: N-end, Chain B: loop near K348
2GH5 (dimer, solution 8)	6342	845.5	A: Arg461, Thr463, Ala465, Glu472, Glu473, Val475, <b>Thr476</b> (3,24 Å), Leu477, Arg478 B: Ile343, Ala344, <b>Arg347</b> (3.47 Å)	Chain A: N-end, Chain B: loop near K348

Molecular docking of heme to glutathione peroxidase isozymes revealed different heme-binding areas for dimeric and monomeric forms (Fig. 2, Table 4). In both dimers heme was predicted to bind predominantly in the interchain region (boxes *a* and *c*) thereby interacting with amino acids of both chains. Heme ring was attached to the GPX1 dimer surface just in the region of active centre near Gly47.



**Fig. 2. Human glutathione peroxidase isoforms GPX1 and GPX3 (cartoon view in PyMol) with predicted heme-binding areas shown as the boxes with dotted borders.** A: GPX1 dimer (2F8A), box *a* – heme-binding region predicted for dimeric form, box *b* – heme-binding region predicted for 2F8A monomer. B: enlarged view of docking site *a* in 2F8A (solution 1) with Gly47 inserted by mutation instead of selenocysteine shown in the active site of GPX1. C: GPX3 dimer (2R37) with predicted heme-binding area in the cavity between chains (box *c*, solution 1) and in monomeric model (box *d*). Gly73 inserted by mutation instead of selenocysteine shown in the active site of GPX3.

**Table 4. Representative results of heme docking to human glutathione peroxidase isozymes (GPX1, GPX3) and glutaredoxin 1**

PDB ID (protein, docking solution)	Total Score	Contact area	Amino acids predicted to be at 6 Å or less from the heme ring	Location of binding region
2F8A (GPX1 dimer; solution 1)	6078	751.1	A: <b>Asn77</b> (3,38 Å), Gln78, <b>His81</b> (4,20 Å), Glu83, Asn84, Lys112, Glu144 B: Gly80, Gln82	Dimer contact area, active site
2F8A, chain A (GPX1 monomer; solution 1)	5454	709.6	A: Val115, Gly117, Ala118, Gly119, Ala120, His121, Pro122, Leu123, Phe124, <b>Ala125</b> (2,51 Å), Phe126, Arg128, Glu129	Central part of the molecule
2R37 (GPX3 dimer; solution 2)	5992	707.5	A: Gln86, Glu87, Pro130, <b>Asn131</b> (3,39 Å), Phe132 B: Ala45, <b>Leu46</b> (3,81 Å), Tyr53, Glu136	In the cleft between two chains
2R37, chain A (GPX3 monomer; solution 1)	5660	765.40	A: Leu162, Leu163, Gly164, Thr165, Arg168, Arg180, <b>Trp181</b> (5,44 Å), His199, His200	Active site of enzyme
4RQR (GLRX1; solution 1)	5376	660.2	A: Glu3, <b>Phe4</b> (4,42 Å), <b>Val5</b> (4,71 Å), Asn6, Cys7, Lys8, Thr50	In the N-end region
4RQR (GLRX1; solution 7)	5316	725.7	A: Pro23, <b>Tyr24</b> (1,62 Å), Cys25, Val59, Thr68, Pro70, Gly81, <b>Cys82</b> (4,46 Å), Ser83	Near redox-active disulfide

GPX1 monomer (2F8A:A) was predicted to bind heme predominantly near Phe124 (box *b*) that didn't participate in dimerization. Thus erythrocyte-specific GPX1 in dimer form could be directly inhibited by heme. Lack of information about GPX tetramer structure didn't allow to predict heme action on the assembly of glutathione peroxidase isomers.

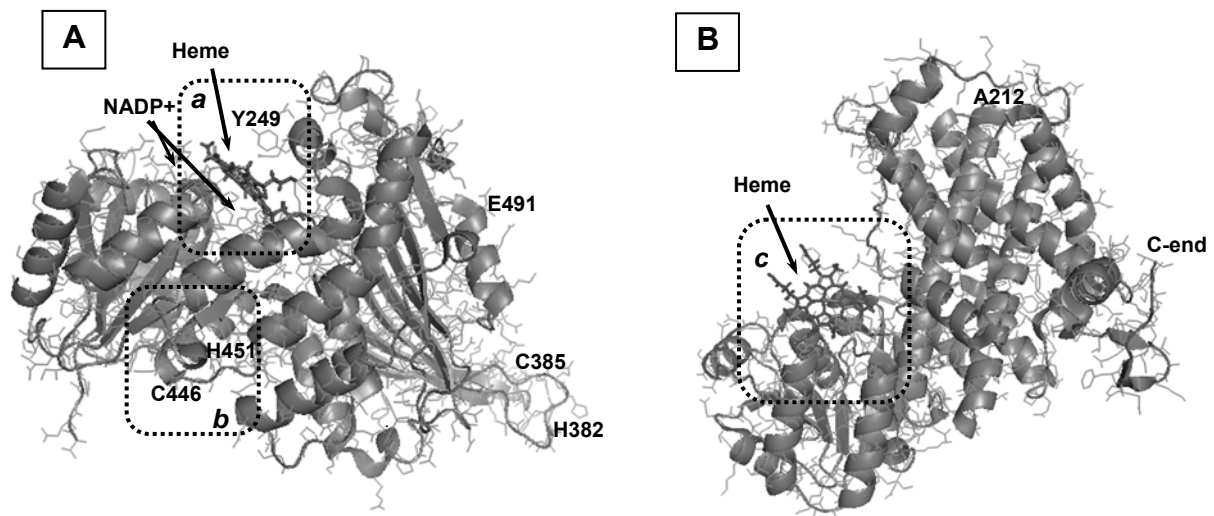
GPX3 dimer (2R37) is not symmetrical thereby protein chains interact by different residues: Lys62 and region 87–93 from the side of chain A and Ile36 together with regions 41–44 and 53–57 from chain B.



Heme could be fitted into the cleft between chains in dimer while GPX3 monomer (2R37:A) more probably could bind heme in the region of active site (Fig. 2, box d).

Glutaredoxin 1 is the smallest protein among ones investigated in this study. Heme was predicted to bind almost exclusively (19 of 20 best solutions) to short  $\alpha$ -helix at the N-end (Table 4). Only one solution predicted heme interaction with Tyr24 just near redox-active disulfide Cys22-Cys25 that is close to the surface. No cavities were found in GLRX1 PDB-structure thereby all cysteines are rather accessible to heme binding including CPYC motif in active site.

Molecular docking of heme molecule to glucose-6-phosphate dehydrogenase revealed two main heme-binding areas (Fig. 3A) for monomer (2BH9): NADP<sup>+</sup> binding region in the active site (box a) and  $\alpha$ -helix 437–447 (box b) found in the dimer 2BHL at the interchain surface. G6PD chains in the dimer are bound symmetrically by the interaction of more than 130 amino acids (equally about 65 from each chain) mostly (more than 50%) hydrophobic. Thus heme binding could more probably directly inhibit activity of G6PD at the active centre than disturb tetramer assembly.



**Fig. 3. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase (cartoon view in PyMol) with predicted heme-binding areas shown as the boxes with dotted borders. A: G6PD monomer (2BH9) docked with heme (solution 4), box a – the cavity with NADP<sup>+</sup> binding site at Lys171; box b – region 440–446 in  $\alpha$ -helix near the loop with His451. B: PGD monomer (4GWK) docked with heme (solution 1), box c – substrate binding region containing Gly131 and His 187 with docked heme**

Heme binding to 6-phosphogluconate dehydrogenase monomer (4GWK) was predicted at only one area (Fig. 3B, box c) known as substrate binding region. This region contains two groups of amino acid residues: S129-G130-G131 and His187-Asn188 (Table 5). No data is available about residues involved in dimerization so only direct inhibition of PGD activity might be suggested as the mechanism of heme action. Almost total identity of two PDB structures available for human PDG (RMSD=0.1 Å) explains coinciding docking results for 4GWK and 4GWG.

Summarizing the results of docking studies performed for human enzymes of glutathione redox cycle it should be concluded that direct heme binding in the active sites areas is highly probable. Regions involved in substrates or/and coenzymes attachment were revealed in the majority of heme docking variants. Heme binding probability was affected by dimerization. Analysis of the first 20 solutions for all variants of PDB structures used in the study revealed approximately 10% higher scores ( $p < 0,001$ ) in the case of dimers compared to monomer forms. GSR dimers 2GH5 and 3SQP had the highest scores ( $6381 \pm 229$  and  $6330 \pm 137$ ) and the largest contact areas ( $840 + 33$  and  $847 + 26$ , correspondently) as well as G6PD dimer 2BHL ( $6226 \pm 171$  score with contact area  $819 + 38$ ). The lowest scores with small contact areas were found for monomeric variants of GPX1 and GPX3 ( $5281 \pm 89$  and  $5338 \pm 108$ , areas  $686 + 33$  and  $686 + 53$ ) as well as for GLRX1 ( $5276 \pm 124$ , areas  $712 + 34$ ).

Table 5.

**Representative results of heme docking to human glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase**

PDB ID (protein, docking solution)	Total Score	Contact area	Amino acids predicted to be at 6 Å or less from the heme ring	Binding area
2BH9 (G6PD monomer; solution 4)	5918	680.2	A: Leu142, Pro143, Pro144, Lys171, Pro172, Arg246, <b>Tyr249</b> (5,33 Å), Phe253	NADP+ binding site
2BHL (G6PD dimer; solution 3)	6490	736.2	A: Lys47, Lys171, Arg246, <b>Asp258</b> (5,82 Å), Glu239, <b>Lys360</b> (5,65 Å)	NADP+ binding site
4GWG (PGD monomer; solution 1)	6464	794.0	A: Val13, Met14, Asn103, Gly130, <b>Gly131</b> (4,49 Å), Glu132, Glu133, Ala135	Active site area

It should be mentioned that PatchDock algorithm didn't take into account the types of interactions but scored mostly geometrical fitting of ligand therefore only the presence of certain amino acid in docking area could be used for type of bond predictions.

Cysteines oxidation potential was estimated by the Cy-Preds online tool (Table 6).

Table 6.

**Potentially oxidized cysteines in human proteins of the glutathione redox cycle predicted by Cy-Preds.** Predictions with total score  $\geq 50$  (max 100) are presented for corresponding PDB structure. Numbers for amino acids are given according to sequence data

Protein isoform	Number of Cys in mature sequence, CP/PC motifs, disulfide bonds	PDB (chains)	Potentially oxidized Cys
GSR, Isoform cytoplasmic	Totally 10 cysteines (C3, C59, C64, C91, C235, C285, C334, C418, C424, C441); no CP/PC; intrachain disulfide C102–C107, C134 in the interchain disulfide	3DJJ (A)	C64(75), C91(50)
		1DNC (A)	C59(75), C91(50)
		2GRT (A)	C91(50)
		2GH5 (A, B)	C59(50)
		3SQP (A, B)	C91(50)
GPX1, Isoform 1	Totally 5 cysteines (C2, C78, C115, C156, C202) and U49 selenocysteine; C78 in PC motif; no information on disulfides	2F8A (A, B)	C78(50), C156(50)
GPX3	Totally 3 cysteines (C32, C101, C156) and U73 – selenocysteine; C156 in CP motif; no information on disulfides	2R37 (A,B)	C101(50), C156(75)
GLRX1, Isoform 1	Totally 5 cysteines (C8, C23, C26, C79, C83); C23 inside of CPYC motif; disulfides C23–C26 (redox-active) and C79–C83.	4RQR (A)	C23(100) in S-S bond, C83(50)
G6PD, Isoform short	Totally 8 cysteines (C13, C158, C232, C269, C294, C358, C385, C446), no CP/PC, no data on disulfides.	2BH9 (A)	C294(50), C446(50)
		5UKW (A)	C277(50), C294(50)
		2BHL (A, B)	C294(50), C385(50)
PGD, Isoform 1	Totally 9 cysteines (C30, C113, C170, C171, C199, C289, C366, C402, C422), 2 PC (C170, C422); no data on disulfides	4GWG (A)	C288(50)
		4GWK (A)	C288(50)

The covalent heme binding to proteins is known to be realized predominantly through cysteine, histidine or tyrosine (Smith et al., 2010). These three types of amino acids were predicted at the distances close enough for iron coordination in several solutions for GSR (His81, Cys59, Table 3), G6PD (Tyr249, Table 5), GPX1 (His80) and GLRX1 (Cys83, Table 4). Moreover, Cy-Preds found at least one cysteine susceptible to oxidation in each protein studied (Table 6). Three oxidizable cysteines were predicted in GSR (Cys59, Cys64, Cys91).

So analysis carried out in this study testifies that glutathione reduction is more likely to be inhibited under hemolysis by heme binding and oxidation of cysteines in glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. These results are in agreement with the experimental data on the increase of GSSG/GSH ratio in the cells and blood plasma under action of agents causing oxidative stress in mammals (Pandey, Rizvi, 2011). Inhibition of glutathione peroxidases by heme might temporally redirect GSH to non-enzymatic reactions including  $\text{Fe}^{3+}$  reduction that might have pro-oxidant effect through acceleration of Fenton reaction. On the other hand, inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase in

erythrocytes could result in glucose utilization predominantly in glycolysis for energy production that is critical for red blood cell survival under stress (Handala et al., 2017).

Taking into account the hemolytic action of various xenobiotics, the heme-mediated oxidation of glutathione redox cycling enzymes in erythrocytes and blood plasma could be considered to be important mechanism of hemolysis progression under stress and pathologies.

### References

- Andersen H.R., Nielsen J.B., Nielsen F., Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes // *Clin. Chem.* – 1997. – Vol. 43, no. 4. – P. 562-568.
- Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V. et al. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes // *Front. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 5. – Article 61 (24 pages).
- Handala L., Domange B., Ouled-Haddou H. et al. DHEA prevents ribavirin-induced anemia via inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Antiviral Res.* – 2017. – Vol. 146. – P. 153–160.
- Hanschmann E.M., Godoy J.R., Berndt C. et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19, no. 13. – P. 1539-1605.
- Immenschuh S., Vijayan V., Janciauskiene S., Gueler F. Heme as a target for therapeutic interventions // *Front Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – Article 146 (15 pages).
- Liu R., Hu J. HemeBIND: a novel method for heme binding residue prediction by combining structural and sequence information // *BMC Bioinformatics.* – 2011. – Vol. 12. – P. 207.
- Lushchak V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions // *J. Amino Acids.* – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 736837 (26 pages).
- Mense S.M., Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases // *Cell Res.* – 2006. – Vol. 16, no. 8. – P. 681–692.
- Pandey K.B., Rizvi S.I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* – 2011. – Vol. 155, no. 2. – P. 131-136.
- Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking // *Nucl. Acids. Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. W363–W367.
- Smith L.J., Kahraman A., Thornton J.M. Heme proteins – diversity in structural characteristics, function, and folding // *Proteins.* – 2010. – Vol. 78, no. 10. – P. 2349-2368.
- Soylu İ., Marino S.M. Cy-preds: An algorithm and a web service for the analysis and prediction of cysteine reactivity // *Proteins* – 2016. – Vol. 84. – P. 278–291.
- Zhang Y., Skolnick J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on TM-score // *Nucleic Acids Research.* – 2005. – Vol. 33. – P. 2302–2309.

**Представлено: О.П.Белозоров / Presented by: O.P.Belozorov**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the authors:** T.V.Barannik – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

Yu.M.Ruzin – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, yuzin2407@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0210-2644>

**Про авторів:** Т.В.Бараннік – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

Ю.М.Рузін – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, yuzin2407@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0210-2644>

**Об авторах:** Т.В.Баранник – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

Ю.М.Рузін – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, yuzin2407@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0210-2644>

УДК: 577.164.2

## Вміст метаболітів вітаміну С в органах щурів в умовах гострої крововтрати

О.К.Будняк, С.С.Чернадчук, А.В.Сорокін, К.Ю.Ожерельєва, С.А.Петров

*Одеський національний університет імені І.І.Мечникова (Одеса, Україна)  
budnyak2005@ukr.net*

Метою даного дослідження було вивчити дію гострої крововтрати, яку моделювали шляхом одноразової втрати 30% циркулюючої крові, на коливання вмісту аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДАК), дикетогулонової (ДКГК) кислоти та їх суми в органах щурів у динаміці на п'яту, дванадцяту, дев'ятнадцяту та двадцять шосту добу після крововтрати. Гостра крововтрата викликала суттєве зменшення вмісту всіх показників системи метаболітів аскорбінової кислоти – їх суми, АК, ДАК та ДКГК – на 10–73 % у порівнянні з контролем. Найбільш істотно зменшувався вміст саме аскорбінової кислоти, який не відновлювався у всіх органах до кінця дослідного періоду. Вміст ДАК у всіх органах збільшувався, починаючи з 12-ї доби, а потім зменшувався протягом дослідження. Вміст ДКГК – збільшувався, починаючи з 19-ої доби дослідження. При цьому було визначено, що на 26-ту добу дослідів у нирках вміст ДАК перебільшував контрольний показник на 42%, а вміст ДКГК у печінці та крові – на 25–60 %. Вміст суми метаболітів аскорбінової кислоти під кінець дослідження майже відновлювався, проте це відновлення відбувалося різним чином: у нирках – за рахунок збільшення вмісту ДАК, в інших органах – за рахунок підвищення концентрації ДКГК. Частка аскорбінової кислоти від суми кислот (у %) після крововтрати суттєво зменшувалась, починаючи з 5-ої доби, а процес її відновлення починав відбуватися тільки після 19-ої доби. Співвідношення суми вітамінної складової кислот системи аскорбінової кислоти до вмісту невітамінної дикетогулонової кислоти підвищувалось у нирках на 12-ту та 26-ту добу дослідів, в інших органах цей показник зменшувався у 2,3–3,1 разів у порівнянні з контролем. Отримані дані можна пояснити підвищеною витратою аскорбінової кислоти на нейтралізацію наслідків окисних процесів під час оксидативного стресу, який відбувався за дії гострої крововтрати, та завдяки її оборотному перетворенню на дегідроаскорбінову, а останньої, необоротно, – на дикетогулонову кислоту.

**Ключові слова:** *аскорбінова кислота, дегідроаскорбінова кислота, дикетогулонова кислота, гостра крововтрата.*

## Content of vitamine C metabolites in rats organs at acute blood loss

O.K.Budnyak, S.S.Chernadchuk, A.V.Sorokin, K.Yu.Ozherelieva, S.A.Petrov

There has been studied the effect of acute blood loss, which was modeled by a single loss of 30% of the circulating blood, on the fluctuations in the content of ascorbic (AA), dehydroascorbic (DAA), diketogulonic (DKGA) acid and their sum in the organs of rats in dynamics for the fifth, twelfth, nineteenth and twenty-sixth days after the blood loss. Acute blood loss caused a significant decrease in the content of all parameters of the system of metabolites of ascorbic acid – their sum, AA, DAA and DKGA – by 10–73 % compared to the control. The most significant decrease was in the content of AA, which was not restored in all organs until the end of the study period. The DAA content in all organs increased from the 12th day, and then decreased during the experiment. The content of the DKGA increased from the 19th day of the experiment. At the same time, it was found that on 26th day in the kidneys, the DAA content exceeded the control value by 42%, and the content of DKGA in the liver and blood – by 25–60 %. The content of the amount of ascorbic acid metabolites at the end of the experiment was almost restored, but this recovery occurred in various ways: in the kidneys – due to an increase in the DAA content, in other organs – by increasing the concentration of DKGA. The parts of AA from the sum of acids (in %) after blood loss significantly decreased, starting from the 5th day, and the process of its recovery began to occur only after the 19th day. The ratio of the amount of the vitamin component of the acids of the ascorbic acid system to the content of the non-vitamin DKGA was increased in the kidneys on the 12th and 26th days of the experiment, in other organs this index decreased 2.3–3.1 times in comparison with the control. The obtained data can be explained by the increased consumption of ascorbic acid to neutralize the effects of the intensification of oxidative processes under oxidative stress, which were activated by the action of acute blood loss, due to its reversible conversion to dehydroascorbic acid, and the latter irreversibly to diketogulonic acid.

**Key words:** *ascorbic acid, dehydroascorbic acid, diketogulonic acid, acute blood loss.*

## Содержание метаболитов витамина С в органах крыс в условиях острой кровопотери

А.К.Будняк, С.С.Чернадчук, А.В.Сорокин, К.Ю.Ожерельева, С.А.Петров

Целью исследования было изучить действие острой кровопотери, которую моделировали путем однократной потери 30% циркулирующей крови, на колебания содержания аскорбиновой (АК), дегидроаскорбиновой (ДАК), дикетогулоновой (ДКГК) кислоты и их суммы в органах крыс в динамике на 5-е, 12-е, 19-е и 26-е сутки после кровопотери. Острая кровопотеря вызывала существенное уменьшение содержания всех показателей системы метаболитов аскорбиновой кислоты – их суммы, АК, ДАК и ДКГК – на 10–73 % по сравнению с контролем. Наиболее существенно уменьшалось содержание именно АК, которое не восстанавливалось во всех органах до конца исследуемого периода. Содержание ДАК во всех органах увеличивалось, начиная с 12-х суток, а затем уменьшалось в течение опыта. Содержание ДКГК – увеличивалось, начиная с 19-х суток опыта. При этом было выявлено, что на 26-е сутки исследований в почках содержание ДАК превышало контрольный показатель на 42%, а содержание ДКГК в печени и крови – на 25–60 %. Содержание суммы метаболитов аскорбиновой кислоты в конце опыта почти восстанавливалось, однако это восстановление происходило различным путем: в почках – за счет увеличения содержания ДАК, в других органах – за счет повышения концентрации ДКГК. Доля АК от суммы кислот (в %) после кровопотери существенно уменьшалась, начиная с 5-х суток, а процесс ее восстановления начинал происходить только после 19-х суток. Соотношение суммы витаминной составляющей кислот системы аскорбиновой кислоты к содержанию невитаминной ДКГК повышалось в почках на 12-е и 26-е сутки опыта, в других органах этот показатель уменьшался в 2,3–3,1 раза по сравнению с контролем. Полученные данные можно объяснить повышенным расходом аскорбиновой кислоты на нейтрализацию последствий усиления окислительных процессов при оксидативном стрессе, которые активировались вследствие действия острой кровопотери, благодаря ее обратимому превращению в дегидроаскорбиновую, а последней, необратимо – в дикетогулоновую кислоту.

**Ключевые слова:** аскорбиновая кислота, дегидроаскорбиновая кислота, дикетогулоновая кислота, острая кровопотеря.

### Вступ

Гостра крововтрата призводить до порушення всіх видів обміну речовин в організмі. Відбувається зниження швидкості тканинного дихання, накопичення недоокиснених метаболітів і збільшення редокс-систем клітини (Чернадчук та ін., 2015). Цей патохімічний комплекс разом із недостатністю макроергів і порушенням механізмів активного транспорту викликає в клітинах незворотні зміни, які найбільш швидко розвиваються в тканинах мозку, печінки, нирок, серця (Смирнов, 1987). Зміна рівноваги окисно-відновних процесів порушує стан компонентів антиокислювальної системи організму, одною з яких є система аскорбінової кислоти (Кудряшов и др., 2005), яка складається із саме аскорбінової кислоти, дегідроаскорбінової та дикетогулонової кислоти. Перші дві сполуки є формами вітаміну С, третя – це вже невітамінна сполука, яка є продуктом необоротного перетворення дегідроаскорбінової кислоти. Їх вміст та співвідношення є одним із важливих показників, які характеризують не тільки окисно-відновний стан клітин, але і метаболічний стан взагалі, тому що щури власно спроможні синтезувати аскорбінову кислоту, яку вони використовують не тільки як вітамін, але і як метаболіт. При цьому динаміка зміни вмісту та співвідношення цих перелічених метаболітів вітаміну С у щурів з даним патологічним впливом вивчена недостатньо. Таким чином, метою роботи було визначення дії фактору гострої крововтрати на вміст і співвідношення дегідроаскорбінової, дикетогулонової та аскорбінової кислот в органах щурів в динаміці на 5-ту, 12-ту, 19-ту та 26-ту добу після крововтрати.

### Об'єкти та методи дослідження

Білих безпородних щурів масою 320–400 г розділили на п'ять груп. Група №1 – контроль. У інших щурів моделювали гостру крововтрату шляхом одноразової втрати 30% циркулюючої крові (Каркищенко, 2010). Визначення вмісту метаболітів аскорбінової кислоти проводили на 5-ту (група №2), 12-ту (група №3), 19-ту (група №4) та 26-ту добу (група №5) після крововтрати. Утримання тварин і проведення експериментів проводили у відповідності з міжнародними правилами «Directive 2010/63/EU ...» (2010). Вміст метаболітів аскорбінової кислоти визначали у гомогенатах печінки, нирок та крові за методом (Соколовский и др., 1974). Обрахування розходжень між декількома групами робили за С.Гланцем, використовуючи метод Ньюмена-Кейсла за допомогою

комп'ютерної програми «БІОСТАТ» (Гланц, 1998).

### Результати та обговорення

Характер дії гострої крововтрати на вміст метаболітів аскорбінової кислоти проілюстровано на рис. 1–3. Згідно з отриманими даними, на 5-ту добу після крововтрати – це термін, коли починає розвиватися залізодефіцитна анемія, у печінці відбувалося зменшення вмісту сумарної концентрації кислот – АК, ДАК, ДКГК до 52% від рівня контрольних тварин (рис. 1). Вміст АК зменшився на 59%, вміст ДАК – на 30%, ДКГК – на 60%. Протягом наступної доби показники почали зростати. Так, вміст суми метаболітів аскорбінової кислоти складав вже 75% контрольного рівня, ДКГК – 50%, проте вміст саме АК ще більше зменшився і складав тільки 18% від початкового рівня, а вміст ДАК, навпаки, суттєво підвищився і перевищив контрольний рівень на 50%. На 19-ту добу істотно підвищувався вміст ДКГК, який у 1,1 разів перевищував контрольне значення, на 26-ту добу відбувалось відновлення показника суми метаболітів аскорбінової кислоти, проте її складові – ДАК і особливо АК відновилися лише частково. Що стосується ДКГК, то її вміст був підвищений у порівнянні з контролем у 1,8 разів. Таким чином відновлення показника суми метаболітів аскорбінової кислоти відбувалось за рахунок ДАК та, особливо, ДКГК.

Динаміка змін концентрації метаболітів аскорбінової кислоти у нирках (рис. 2) була подібною протягом досліду у порівнянні з показниками печінки, проте зміни мали менший діапазон.

Так, на 5-ту добу досліду відбувалось аналогічне зменшення всіх показників, що досліджувались, на 33–41 % у порівнянні з контрольними даними. Проте вміст ДКГК підвищився на 33%. Протягом наступних трьох тижнів відбувалось істотне підвищення вмісту ДАК на 54% від рівня контролю і поступове незначне його зменшення до показника 142% від контрольного значення на 26-ту добу досліджень. Вміст аскорбінової кислоти протягом періоду 12–19 діб складав 43–45 % контрольного рівня, під кінець досліду її вміст відновлювався до рівня 77% від контролю. Вміст ДКГК суттєво коливався і на 26-ту добу складав лише 67% від рівня контролю. Таким чином, відновлення показників на 26-ту добу досліду також не відбувалось.

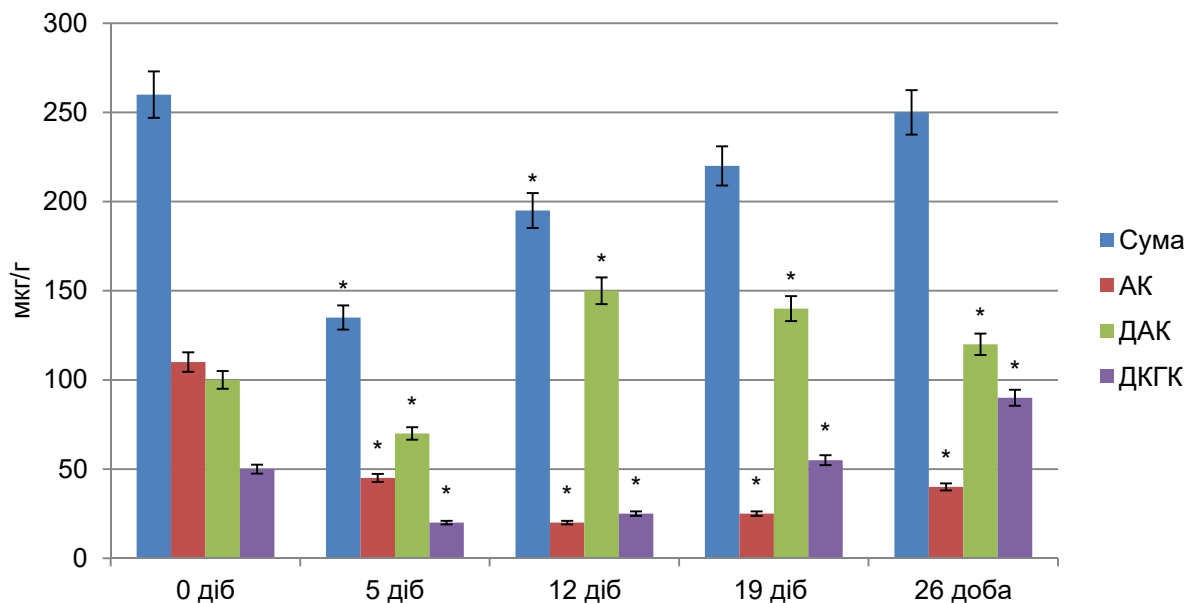


Рис. 1. Вміст аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДАК), дикетоглуконової кислоти (ДКГК) та їх суми (Сума) в печінці щурів при дії гострої крововтрати протягом 26 діб у динаміці, (мкг/г) (n=5)

Примітка. Тут і далі: \*  $p \leq 0,05$  по відношенню до показників у контролі.

Що стосується показників у крові (рис. 3), то їх вміст на 5-ту добу зменшувався таким чином: вміст суми метаболітів аскорбінової кислоти – на 42%, вміст ДКГК – на 20%, а вміст АК – більш

суттєво – майже у чотири рази у порівнянні з контролем. Вміст ДАК зменшувався на 12%.

У подальші терміни дослідження відбувалось поступове часткове відновлення суми аскорбінових кислот до 88% від рівня контролю на 26-ту добу, вміст АК при цьому відновлювався тільки на 2/3, вміст ДАК складав 125% від рівня контролю на 12-ту добу досліджу, проте її рівень також поступово зменшувався і під кінець наших дослідів складав 75% від контрольного рівню. Вміст ДКГК на 19–26-ту добу підвищувався і наприкінці перевищував контрольний рівень на 60%. З даних літератури відомо, що у крові повне відновлення показників системи аскорбінової кислоти після гострої крововтрати відбувається лише на 30-ту добу (Кудряшов и др., 2005).

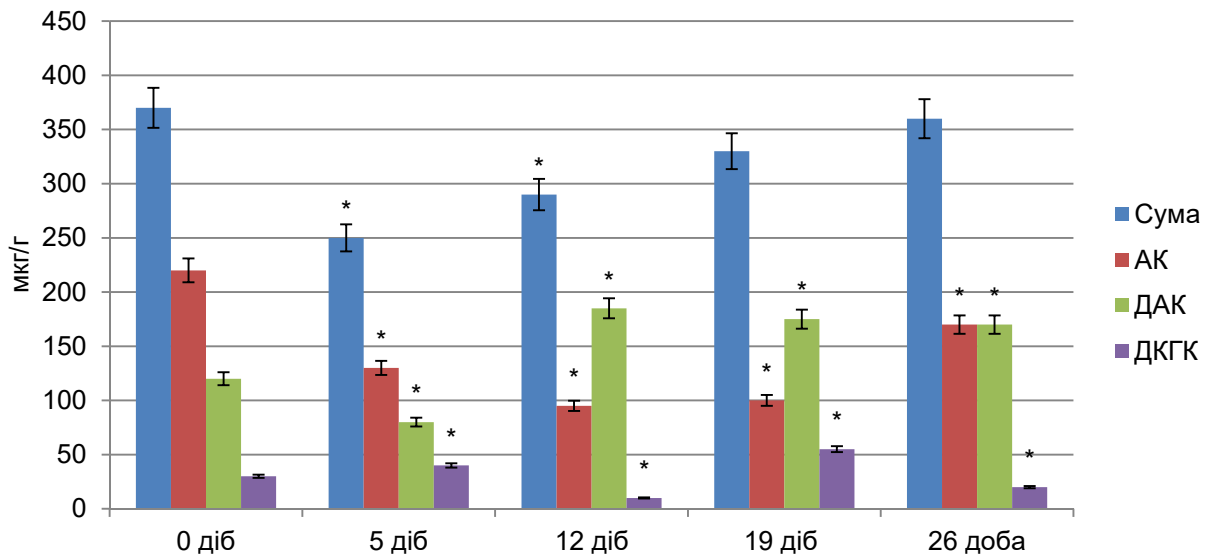


Рис. 2. Вміст аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДАК), дикетогулонової кислоти (ДКГК) та їх суми (Сума) в нирках щурів при дії гострої крововтрати протягом 26 діб у динаміці, (мкг/г) (n=5)

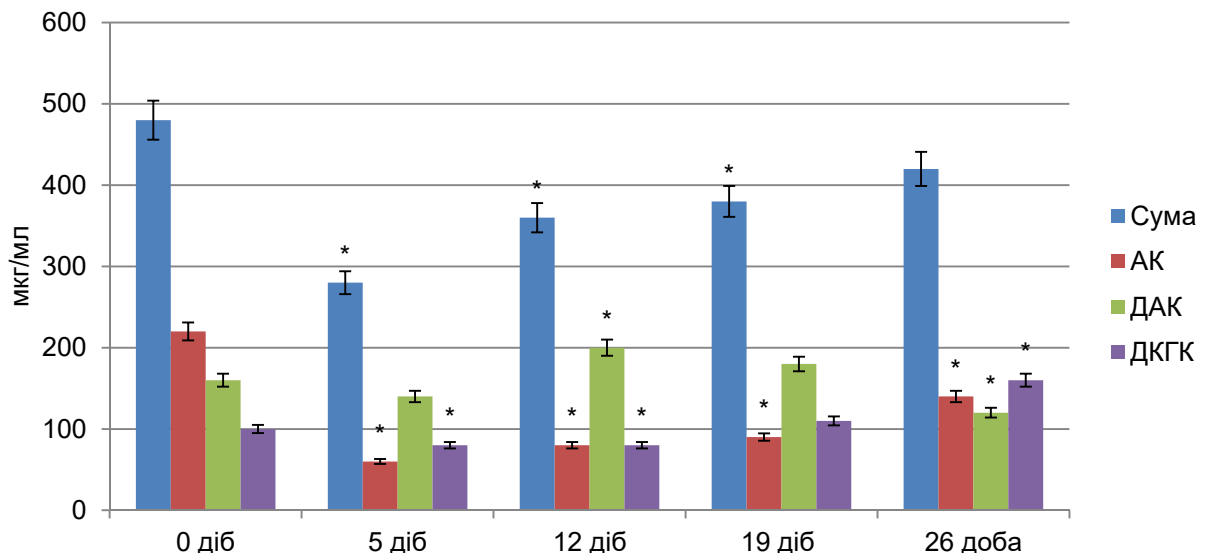
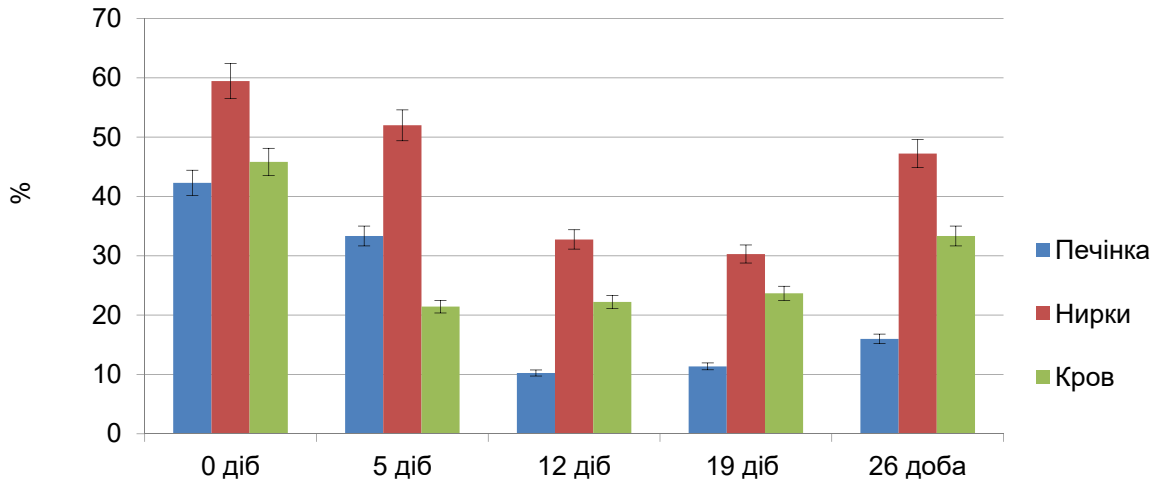


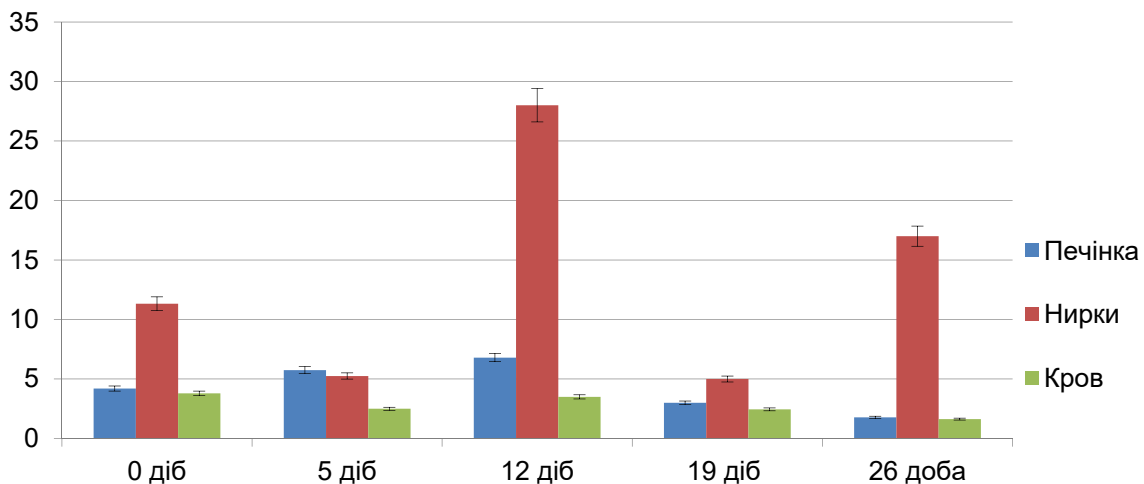
Рис. 3. Вміст аскорбінової (АК), дегідроаскорбінової (ДАК), дикетогулонової кислоти (ДКГК) та їх суми (Сума) в крові щурів при дії гострої крововтрати протягом 26 діб у динаміці, (мкг/мл) (n=5)

Більш наочно коливання рівня метаболітів аскорбінової кислоти показано на наступних рисунках. Так, на рис. 4 відображено коливання частки АК від суми метаболітів (у %). Показано, що після крововтрати частка АК у % суттєво зменшується починаючи з 5 доби, а процес її відновлення починає відбуватися тільки після 19 доби.



**Рис. 4. Частка аскорбінової кислоти від суми метаболітів аскорбінової кислоти в органах щурів під дією гострої крововтрати (%)**

На рис. 5 відображено коливання співвідношень (АК+ДАК)/ДКГК, тобто суми вітамінної частки кислот системи аскорбінової кислоти до вмісту невітамінної ДКГК.



**Рис. 5. Співвідношення (АК+ДАК)/ДКГК у органах щурів під дією гострої крововтрати**

Суттєві коливання показника – у бік його підвищення – відбувалися у нирках на 12-ту та 26-ту добу дослідів, проте в інших органах вітамінна частка поступово зменшувалась у 2,3–3,1 разів у порівнянні з контрольним співвідношенням. Такі зміни є наслідком підвищення вмісту ДКГК у печінці та крові під кінець дослідів, у нирках більш суттєво на цей показник впливав підвищений вміст ДАК.



Отримані дані можна пояснити розвитком оксидативного стресу (Petrov et al., 2017), який підвищує витрати саме аскорбінової кислоти на нейтралізацію наслідків окисних процесів, завдяки чому і підвищується рівень дегідроаскорбінової кислоти, та завдяки її незворотному руйнуванню, і дикетогулонової кислоти. Можна припустити, що надмірне накопичення ДКГК є відповіддю клітин на надмірне накопичення ДАК. Коли її підвищення стає вище порогового рівня, відбувається її компенсаторне, проте необоротне перетворення на дикетогулонову кислоту. Можна також констатувати, що на 26-ту добу досліджень вміст і співвідношення метаболітів вітаміну С не відновився до контрольних показників, що свідчить про те, що метаболічний стан органів цих щурів не повернувся до норми.

#### Висновки

1. Гостра крововтрата викликала суттєве зменшення вмісту всіх показників системи метаболітів аскорбінової кислоти – їх суми, АК, ДАК та ДКГК – на 10–73 % у порівнянні з контролем.
2. Найбільш істотно зменшувався вміст саме АК, який не відновлювався до кінця дослідного періоду.
3. Вміст ДАК починав суттєво збільшуватися з 12-ої доби досліду і на 42% перебільшував контроль у нирках при кінці досліду.
4. Вміст ДКГК суттєво підвищувався протягом досліду, починаючи з 19 доби досліду, до показників, що перевищують рівень контролю на 25–60 %, особливо в печінці та крові.
5. Вміст суми метаболітів аскорбінової кислоти під кінець досліду майже відновлювався, проте це відновлення відбувалося різним чином: у нирках – за рахунок збільшення вмісту ДАК, в інших органах – за рахунок підвищення концентрації ДКГК.

#### Список літератури / References

- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М. : Практика, 1998. – 459с. /Glants S. Biomedical statistics. – Moscow: Praktika, 1998. – 459p./
- Каркищенко Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям биомедицинских технологий. – М., 2010. – 344с. /Karkischenko N.N. Guide to laboratory animals and alternative models of biomedical technologies. – Moscow, 2010. – 344p./
- Кудряшов А.М., Титова Н.М., Савченко А.А., Кудряшова Е.В. Содержание аскорбиновой кислоты и ее окисленных форм при старении эритроцитов, продуцированных в условиях нормального и напряженного эритропоэза // Биомедицинская химия. – 2005. – Т.51, вып. 1. – С. 53–59. /Kudryashov A.M., Titova N.M., Savchenko A.A., Kudryashova Ye.V. The content of ascorbic acid and its oxidized forms at the aging of red blood cells produced in conditions of normal and intense erythropoiesis // Biomeditsinskaya khimiya. – 2005. – Vol. 51(1). – P. 53–59./
- Смирнов В.В. Состояние активности окислительных ферментов при острой смертельной кровопотере // Матер. II-го Всеросс. съезда судебных медиков: тезисы докладов. – Иркутск-М., 1987. – С. 274–276. /Smirnov V.V. The state of activity of oxidative enzymes in acute fatal blood loss // Mater. II-st All-Russian congress of forensic doctors: abstracts of reports. – Irkutsk-M., 1987. – P. 274–276./
- Соколовский В.В., Лебедева Л.В., Лиэлуп Т.В. О методе отдельного определения аскорбиновой, дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот в биологических тканях // Лабораторное дело. – 1974. – №3. – С. 160–162. /Sokolovsky V.V., Lebedeva L.V., Lielup T.V. A method of separate determining of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids in biological tissues // Laboratornoe delo. – 1974. – No. 3. – P. 160–162./
- Чернадчук С.С., Петров С.А., Будняк О.К., Рустамова А.О. Стан процесів вільнорадикального перекісного окиснення у щурів з гострою крововтратою // Scientific Journal «ScienceRise». – 2015. – No. 4/1(9). – С. 16–20. /Chernadchuk S.S., Petrov S.A., Budnyak O.K., Rustamova A.O. State of free-radical peroxidation processes in rats with acute blood loss // ScienceRise. – 2015. – No. 4/1(9). – P. 16–20./
- Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union L276/33. – 86/609/EC.20.10.2010.
- Petrov S., Budnyak O., Ozherelyeva K. et al. Ascorbic acid metabolism in the organism under the lack of oxygen supply to the tissues // Journal of Education, Health and Sport. – 2017. – No. 7(6). – S. 583–590.

Представлено: Б.М.Галкін / Presented by: B.M.Galkin

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 15.03.2018

**About the authors:** O.K.Budnyak – Odessa I.I.Mechnikov National University, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, Ukraine, 65082, budnyak2005@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8256-4664>  
S.S.Chernadchuk – Odessa I.I.Mechnikov National University, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, Ukraine, 65082, snezhana.chuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8008-5099>  
A.V.Sorokin – Odessa I.I.Mechnikov National University, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, Ukraine, 65082, sorokin\_a\_v@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-9151-6488>  
K.Yu.Ozherelieva – Odessa I.I.Mechnikov National University, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, Ukraine, 65082, nekl3@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8810-6373>  
S.A.Petrov – Odessa I.I.Mechnikov National University, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, Ukraine, 65082, serpet2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9390-4006>

**Про авторів:** О.К.Будняк – Одеський національний університет імені І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082, budnyak2005@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8256-4664>  
С.С.Чернадчук – Одеський національний університет імені І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082, snezhana.chuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8008-5099>  
А.В.Сорокін – Одеський національний університет імені І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082, sorokin\_a\_v@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-9151-6488>  
К.Ю.Ожерельєва – Одеський національний університет імені І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082, nekl3@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8810-6373>  
С.А.Петров – Одеський національний університет імені І.І.Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082, serpet2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9390-4006>

**Об авторах:** А.К.Будняк – Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082, budnyak2005@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8256-4664>  
С.С.Чернадчук – Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082, snezhana.chuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8008-5099>  
А.В.Сорокин – Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082, sorokin\_a\_v@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-9151-6488>  
К.Ю.Ожерельева – Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082, nekl3@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8810-6373>  
С.А.Петров – Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082, serpet2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9390-4006>

УДК: 577.1:620.3:546.66:616.36

## Структурно-функціональні показники ізольованих гепатоцитів щурів у присутності наночастинок на основі європію та гадолінію

С.М.Охріменко, Г.В.Ганусова, К.В.Сєдова, Д.І.Арістова, Т.Є.Сіренко, А.Ю.Гришкова,  
Д.В.Круговий, А.К.Павлій

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)  
s.okhrimenko@karazin.ua*

Досліджено вплив наночастинок на основі європію та гадолінію  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  на показники про-антиоксидантного балансу та активність низки ферментів ізольованих гепатоцитів щурів. Актуальність роботи пов'язана з дослідженнями, що спрямовані на вивчення механізмів взаємодії наночастинок з компонентами клітин біологічних об'єктів. Для корекції деяких метаболічних порушень перспективними є редоксактивні наночастки на основі рідкоземельних металів. Одними з них є наночастки на основі європію та гадолінію  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ . Ці наночастки мають сферичну форму, заряд, здатні надходити до клітин, є редоксактивними. Однак, невідомо, з якими молекулами та надмолекулярними комплексами вони можуть взаємодіяти та через це впливати на метаболізм. Метою даної роботи було вивчення показників про-антиоксидантного балансу, активності ферментів обміну глутатіону, а також активності деяких ферментів азотного обміну гепатоцитів щурів у присутності наночастинок на основі європію та гадолінію  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ . Гепатоцити інкубували з наночастками протягом 2 та 14 годин, потім спричинювали їх лізис і в лізатах визначали показники ПОЛ, активність каталази та ферментів обміну глутатіону, вміст SH-груп, активність ферментів азотного обміну – аланін-, аспартат-, тирозинамінотрансфераз та аргінази. У середовищі інкубації визначали активність ЛДГ та амінотрансфераз як маркерів пошкодження мембран. Встановлено, що інкубація з наночастками не спричинювала посилення ПОЛ та пошкодження плазматичних мембран гепатоцитів. Виявлено вплив даних наночастинок на вміст тіолових груп та активність ферментів обміну глутатіону, що може свідчити про їх здатність впливати на стан глутатіонової ланки системи антиоксидантного захисту. Інкубація гепатоцитів з наночастками практично не впливала на активність ферментів азотного метаболізму, що є свідченням локальної дії наночастинок на основі європію та гадолінію  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  у клітинах.

**Ключові слова:** *наночастки, європій, гадоліній, ТБК-реагуючі продукти, тіоли, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, гепатоцити.*

## Structural and functional indices of isolated hepatocytes of rats in the presence of nanoparticles based on europium and gadolinium

S.M.Okhrimenko, G.V.Ganusova, K.V.Sedova, D.I.Aristova, T.E.Sirenko, A.Yu.Grishkova,  
D.V.Krugovoy, A.K.Pavliy

The effect of nanoparticles based on europium and gadolinium  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  on the pro-antioxidant balance and the activity of a number of enzymes of isolated rat hepatocytes was studied. The relevance of the work is connected with research aimed at studying the mechanisms of interaction of nanoparticles with components of cells of biological objects. To correct some metabolic disturbances, redox-active nanoparticles based on rare-earth metals are promising. Some of them are nanoparticles based on europium and gadolinium  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ . These nanoparticles have a spherical shape, a charge, can penetrate into cells, are redoxactive. However, it is not known with which molecules and supramolecular complexes they can interact and through this affect metabolism. The purpose of this study was to study the pro-antioxidant balance, the activity of glutathione metabolism enzymes, as well as the activity of some enzymes of rat hepatocyte nitrogen exchange in the presence of europium-based gadolinium and gadolinium  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ . Hepatocytes were incubated with nanoparticles for 2 and 14 hours, then lysed, and in lysates, LPO parameters, catalase and enzyme metabolism of glutathione, SH group content, activity of nitrogen exchange enzymes – alanine-, aspartate-, tyrosine aminotransferases and arginase were determined. In the incubation medium, the activity of LDH and aminotransferases as markers of membrane damage was determined. It was established that incubation with nanoparticles did not cause LPO enhancement and damage of plasma membranes of hepatocytes. The effect of these nanoparticles on the content of thiol groups and the activity of glutathione metabolism enzymes has been revealed, which may indicate their ability to influence the state of the glutathione unit of the antioxidant defense system. The incubation of hepatocytes with nanoparticles had practically no effect on the activity of the enzymes of nitrogen metabolism, which is evidence of the local action of nanoparticles based on europium and gadolinium  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  in cells.

**Key words:** *nanoparticles, europium, gadolinium, TBA-reacting products, thiols, glutathione transferase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, hepatocytes.*

**Структурно-функціональні показники ізольованих гепатоцитів крис в присутності наночастиць на основі європія та гадолінія****С.М.Охрименко, Г.В.Ганусова, К.В.Седова, Д.И.Аристова, Т.Е.Сиренко, А.Ю.Гришкова, Д.В.Круговой, А.К.Павлій**

Исследовано влияние наночастиц на основе европия и гадолиния  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  на показатели про-антиоксидантного баланса и активность ряда ферментов изолированных гепатоцитов крыс. Актуальность работы связана с исследованиями, направленными на изучение механизмов взаимодействия наночастиц с компонентами клеток биологических объектов. Для коррекции некоторых метаболических нарушений перспективными являются редоксактивные наночастицы на основе редкоземельных металлов. Одними из них являются наночастицы на основе европия и гадолиния  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ . Эти наночастицы имеют сферическую форму, заряд, могут проникать в клетки, являются редоксактивными. Однако, неизвестно, с какими молекулами и надмолекулярными комплексами они могут взаимодействовать и через это влиять на метаболизм. Целью данной работы было изучение показателей про-антиоксидантного баланса, активности ферментов обмена глутатиона, а также активности некоторых ферментов азотного обмена гепатоцитов крыс в присутствии наночастиц на основе европия и гадолиния  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ . Гепатоциты инкубировали с наночастицами в течение 2 и 14 часов, затем лизировали их и в лизатах определяли показатели ПОЛ, активность каталазы и ферментов обмена глутатиона, содержание SH-групп, активность ферментов азотного обмена – аланин-, аспарат-, тирозинаминотрансфераз и аргиназы. В среде инкубации определяли активность ЛДГ и аминотрансфераз как маркеров повреждения мембран. Установлено, что инкубация с наночастицами не вызывала усиления ПОЛ и повреждения плазматических мембран гепатоцитов. Выявлено влияние данных наночастиц на содержание тиоловых групп и активность ферментов обмена глутатиона, что может свидетельствовать об их способности влиять на состояние глутатионового звена системы антиоксидантной защиты. Инкубация гепатоцитов с наночастицами практически не влияла на активность ферментов азотного метаболизма, что является свидетельством локального действия наночастиц на основе европия и гадолиния  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  в клетках.

**Ключевые слова:** наночастицы, европий, гадолиний, ТБК-реагирующие продукты, тиолы, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, гепатоциты.

**Вступ**

В останні роки спостерігається значний зріст досліджень, технологій та продукції наночастинок. В біологічних та медичних дослідженнях активно впроваджують використання нанотехнологій, заснованих на таких властивостях наночастинок, як флуоресценція, люмінесценція, магнітні та інші (Ferrari, 2005; Kaur, Badea, 2013; Ho et al., 2015). Зокрема, розвиток досліджень неорганічних люмінесцентних наночастинок, з їх високою фотостабільністю дає унікальну можливість біологам використовувати їх для експериментів *in vitro* або *in vivo* (Michalet et al., 2005; Klochkov et al. 2013; Goltsev et al., 2013). Однак, є дані літератури, що свідчать про потенційний ризик наночастинок для здоров'я людини (Piao, 2011; Maynard et al., 2006, Nel et al., 2006, El-Ansary, Al-Daihan, 2009; Fadeel, Garsia-Bennett, 2010).

У зв'язку з цим актуальними є дослідження, спрямовані на вивчення механізмів взаємодії наночастинок з компонентами клітин біологічних об'єктів. Перспективними для корекції деяких метаболічних порушень вважають редоксактивні наночастишки на основі рідкоземельних елементів. Одними з них є наночастишки на основі європію та гадолінію  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ , для яких показана здатність надходити у клітини (Аверченко, 2016; Klochkov et al., 2013, 2016; Kavok et al., 2014). Однак, невідомо, з якими молекулами та надмолекулярними комплексами вони можуть взаємодіяти та через це впливати на метаболізм. Дані літератури свідчать, що редоксактивні наночастишки здатні впливати на стан про-антиоксидантної системи клітин та тканин, а також на активність ферментів різних метаболічних шляхів (Unfried et al., 2007; Klochkov et al., 2012; Avarchenko et al., 2015; Klochkov et al., 2010). Однією з важливих частин ензиматичної антиоксидантної системи є ферменти обміну глутатіону. Дані літератури щодо впливу наночастинок на основі європію та гадолінію  $GdVO_4Eu^{3+(-)}$  на глутатіонову ланку антиоксидантного захисту суперечливі та розрізнені.

Виходячи з вищесказаного, метою даної роботи було вивчення показників про-антиоксидантного балансу, активності ферментів обміну глутатіону, а також активності деяких ферментів азотного обміну гепатоцитів щурів у присутності наночастинок на основі європію та гадолінію  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ .

### Об'єкти та методи дослідження

Для дослідження використовували гепатоцити безпородних самок щурів масою 160–180 г. Гепатоцити були ізольовані за допомогою неферментативного диспергування печінки. Печінку виділяли та переносили у стерильну охолоджену до 4°C чашку Петрі, заливали охолодженим середовищем McCoу 5A Medium, подрібнювали на фрагменти 2–3 мм та продавлювали через нейлоновий фільтр фірми BDFalcon з діаметром пор 40  $\mu\text{m}$  у потоці охолодженого середовища McCoу 5A Medium у конічну пробірку об'ємом 50 мл. Отриману суспензію клітин центрифугували на Thermo Scientific Duraforce при 70 g протягом 5 хвилин для того, щоб відділити гепатоцити від фрагментів тканини. Після цього суспензію клітин знову піддавали обробці на центрифугу при 150 g протягом 5 хвилин. Концентрацію клітин та їх життєздатність визначали у автоматичному цитометрі InvitrogenCountess з використанням вітального барвника трипанового синього. Концентрація клітин в отриманій суспензії складала  $(1,5\text{--}2,2)\times 10^6$  клітин/мл. Життєздатність складала 81–89 %, доля еритроцитів була 4–6 %. Гепатоцити інкубували при +37°C в культуральному середовищі McCoу 5A без додавання (контроль) або у присутності наночасток  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}(-)$  (дослідні групи). Дані наночастки мають сферичну форму, їх діаметр – 2–3 нм, за рахунок гадолінію та європію несуть позитивний заряд; зовні вони вкриті цитрат-іонами, що обумовлює їх негативний заряд. Вони виявляють оптичні властивості, комплекс фотофізичних властивостей, мають відносну нетоксичність, здатність знаходитися у колоїдному стані у водних розчинах, редоксактивність (Klochkov et al., 2013; Аверченко, 2016). Розчин наночасток з концентрацією 1 г/л додавався з розрахунку 100 мкл на мільйон клітин. Інкубація контрольних і дослідних проб проводилась протягом 2 та 14 годин, після чого клітини лізували за допомогою 1% розчину Triton X-100, який додавався з розрахунку 1 мл на 100 мл суспензії. Клітини інкубували протягом 20 хвилин при температурі 4°C та центрифугували при 13 тис. обертів за хвилину протягом 3 хвилин. Осад перерозчиняли в культуральному середовищі. У середовищі інкубації визначали активність аланін- та аспартатамінотрансфераз (АлАТ та АсАТ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ) за допомогою стандартних тест-систем для оцінки цілісності плазматичних мембран. У лізаті гепатоцитів визначали вміст ТБК-реагуючих продуктів у реакції з тіобарбітуровою кислотою (Ohkawa et al., 1979), загальних SH-груп за допомогою реактиву Елмана за поглинанням світла 2-нітро-5-тіобензоатом при 412 нм (Северин, Соловьева, 1989), вміст білка спектрофотометрично при 280 нм (Северин, Соловьева, 1989). Активність каталази визначали спектрофотометрично при 240 нм за зменшенням концентрації перекису водню в середовищі (Murclund et al., 1981). Активність ферментів обміну глутатіону визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм: глутатіонпероксидази – за зменшенням рівня NADPH, з додаванням глутатіонредуктази; глутатіонредуктази – за зменшенням рівня NADPH; глутатіонтрансферази – за зростанням рівня 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ) (Нікітченко та ін., 2008), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – за зростанням рівня NADPH (Ганусова, Каліман, 2007). У лізаті гепатоцитів також визначали активність ферментів азотного обміну: аргінази – за накопиченням сечовини за допомогою стандартної тест-системи, тирозинамінотрансферази (ТАТ) – за допомогою кольорової реакції на п-оксифенілпіруват (Schepard, 1969), АлАТ та АсАТ – як було зазначено вище. Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою t-критерію Стьюдента у програмах Past та Excel.

### Результати та обговорення

Через 2 та 14 годин інкубації гепатоцитів з наночастками вміст ТБК-реагуючих продуктів у клітинах не змінювався порівняно з контрольними пробами (табл. 1), що може свідчити про відсутність прооксидантного ефекту наночасток на основі європію та гадолінію  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}(-)$  у застосованій нами концентрації. З цими даними узгоджуються дані про активність каталази у ці терміни – не виявлено достовірних змін активності ферменту при інкубації гепатоцитів з наночастками порівняно з контролем (табл. 1), що підтверджує відсутність накопичення активних форм кисню у присутності наночасток на основі європію та гадолінію.

Відсутність змін вмісту ТБК-реагуючих продуктів у гепатоцитах при застосуванні даних наночасток свідчить про сталість процесів ПОЛ та може відображувати структурно-функціональний стан мембран. У табл. 2 наведено дані про активність деяких ферментів гепатоцитів в інкубаційному середовищі без застосування та із застосуванням наночасток на основі європію та гадолінію  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}(-)$ . Показано, що активність ферментів – маркерів клітинного пошкодження –

амінотрансфераз та ЛДГ не змінюється в обидва досліджувані терміни порівняно з контролем, що може свідчити про відсутність впливу зазначених наночастинок на стабільність мембранних структур та їх функціонування.

Таблиця 1.

**Вміст ТБК-реагуючих продуктів та активність каталази у гепатоцитах щурів у різні терміни інкубації з наночастиками**

Показник	Контроль 2 год.	Дослід 2 год. (GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> )	Контроль 14 год.	Дослід 14 год. (GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> )
ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг білка	0,11 ± 0,04	0,16 ± 0,10	0,57 ± 0,23	0,45 ± 0,14
каталаза, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг білка	19,1 ± 6,7	46,8 ± 30,7	25,2 ± 7,5	19,4 ± 13,0
ТБК-реагуючі продукти, нмоль/10 <sup>6</sup> клітин	0,26 ± 0,12	0,28 ± 0,14	0,33 ± 0,16	0,27 ± 0,15
каталаза, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/10 <sup>6</sup> клітин	61,5 ± 20,4	69,3 ± 24,5	19,7 ± 6,5	17,9 ± 1,1

Таблиця 2.

**Активність ферментів в інкубаційному середовищі в різні терміни інкубації з наночастиками, мкмоль/год /мг білка**

Показник	Контроль 2 год.	Дослід 2 год. (GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> )	Контроль 14 год.	Дослід 14 год. (GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> )
АлАТ	4,25 ± 2,91	3,97 ± 1,98	3,99 ± 1,89	4,61 ± 1,86
АсАТ	2,37 ± 1,87	2,26 ± 1,13	2,38 ± 1,38	2,71 ± 1,45
ЛДГ	0,49 ± 0,27	0,51 ± 0,31	0,71 ± 0,13	0,75 ± 0,47

Хоча дані про вміст ТБК-реагуючих продуктів та активність каталази відображують у цілому збереження про-антиоксидантного балансу у присутності наночастинок на основі європію та гадолінію, результати дослідів свідчать про чутливість тіолових сполук до застосованих наночастинок (табл. 3). Так, встановлено зменшення вмісту загальних SH-груп у гепатоцитах через 14 годин інкубації з наночастиками, що може свідчити про їх участь у окисно-відновлювальних процесах, які як прямо, так і опосередковано можуть бути пов'язаними з редокс-активністю наночастинок GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup>(-).

Таблиця 3.

**Вміст SH-груп у гепатоцитах щурів у різні терміни інкубації з наночастиками**

Показник	Контроль 2 год.	Дослід 2 год. (GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> )	Контроль 14 год.	Дослід 14 год. (GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> )
	мкмоль/мг білка			
загальні SH-групи	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,13 ± 0,03*
	мкмоль/10 <sup>6</sup> клітин			
загальні SH-групи	3,6 ± 0,07	2,9 ± 0,11*	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,6

\*  $p \leq 0,05$  відносно контролю.

Серед небілкових тіолів найпоширенішим є глутатіон, тому дослідження активності ферментів обміну глутатіону у присутності наночастинок є важливим для визначення стану глутатіонової ланки системи антиоксидантного захисту за цих умов. Показано, що інкубація

гепатоцитів щурів з наночастками  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  впродовж 2 годин спричинювала підвищення активності глутатіон-S-трансферази; через 14 годин встановлено підвищення активності глутатіонпероксидази, зниження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, при цьому вона не впливала на активність глутатіонредуктази (табл. 4). Вплив наночасток на обмін глутатіону може бути пов'язаний зі зміною співвідношення GSH/GSSG у гепатоцитах, що призводить насамперед до активації глутатіон-S-трансферази (Averchenko et al., 2015). Глутатіонредуктазу та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу відносять до тілових ферментів і, ймовірно, їх активні центри можуть безпосередньо зв'язувати метаболіти, що мають високу спорідненість до сульфгідрильних груп та негативно впливають на активність цих ферментів.

Одержані нами дані свідчать про часткову активацію глутатіонової ланки антиоксидантної системи, що забезпечує її стабільність у присутності наночасток  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$ .

Таблиця 4.

**Активність ферментів обміну глутатіону у гепатоцитах щурів у різні терміни інкубації з наночастками**

Показник	Контроль 2 год.	Дослід 2 год. ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ )	Контроль 14 год.	Дослід 14 год. ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ )
нмоль NADPH/хв/мг білка				
Глутатіонпероксидаза	8,29 ± 2,4	9,68 ± 2,39	8,1 ± 2,22	11,04 ± 2,46
Глутатіонтрансфераза	15,37 ± 3,49	25,92 ± 8,57*	5,13 ± 1,54	7,96 ± 3,38
Глутатіонредуктаза	10,38 ± 4,57	14,52 ± 3,81	15,42 ± 5,19	15,4 ± 5,02
Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа	1,11 ± 0,57	0,83 ± 0,41	0,50 ± 0,21	0,28 ± 0,14
нмоль NADPH/хв/10 <sup>6</sup> клітин				
Глутатіонпероксидаза	59,5 ± 17,4	77,8 ± 13,1	52,7 ± 13,7	84,3 ± 21,4*
Глутатіонтрансфераза	80,6 ± 10,8	126,5 ± 13,1*	42,8 ± 10,2	29,0 ± 9,34
Глутатіонредуктаза	1,05 ± 0,7	1,2 ± 0,42	2,21 ± 0,77	2,24 ± 0,92
Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа	9,13 ± 4,36	6,98 ± 3,37	3,72 ± 1,05	1,92 ± 0,39*

\*  $p \leq 0,05$  відносно контролю.

Таблиця 5.

**Активність ферментів азотного обміну у гепатоцитах щурів у різні терміни інкубації з наночастками**

Показник	Контроль 2 год.	Дослід 2 год. ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ )	Контроль 14 год.	Дослід 14 год. ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ )
мкмоль/год/мг білка				
АлАТ	0,22 ± 0,12	0,23 ± 0,15	0,24 ± 0,11	0,24 ± 0,14
АсАТ	0,23 ± 0,11	0,24 ± 0,13	0,22 ± 0,12	0,21 ± 0,11
аргіназа	53,6 ± 7,3	38,6 ± 11,2	33,1 ± 16,3	17,7 ± 10,0
ТАТ	0,78 ± 0,15	0,51 ± 0,13*	0,42 ± 0,16	0,33 ± 0,12
мкмоль/год/10 <sup>6</sup> клітин				
АлАТ	0,25 ± 0,11	0,52 ± 0,2	0,28 ± 0,02	0,52 ± 0,18*
АсАТ	0,22 ± 0,10	0,22 ± 0,08	0,25 ± 0,15	0,09 ± 0,04
аргіназа	0,36 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,22 ± 0,11	0,12 ± 0,05
ТАТ	1,02 ± 0,18	0,63 ± 0,14*	0,51 ± 0,14	0,36 ± 0,12

\*  $p \leq 0,05$  відносно контролю.

Здатність наночасток на основі європію та гадолінію надходити у клітини може впливати на метаболічні процеси, що було нами встановлено при дослідженні активності ферментів азотного

обміну. Так, інкубація гепатоцитів з наночастками спричинювала зниження активності ТАТ через 2 години та підвищення активності АЛАТ через 14 годин, в той час як для АсАТ та аргінази змін не встановлено (табл. 5). Оскільки виявлена вибіркова дія наночастинок на активність досліджуваних ферментів, можна припустити, що ця дія не пов'язана із загальними шляхами регуляції активності ферментів, а має індивідуальні особливості. Причиною змін ферментативної активності може бути утворення комплексів наночастинок з ферментними білками. Так, в роботах (Салем, 2014; Салем, Шолхух, 2014) досліджено взаємодію наночастинок з аспартатамінотрансферазою, що спричинює зміни її властивостей.

Таким чином, за умов нашого експерименту наночастки  $GdVO_4:Eu^{3+(-)}$  не впливали на цілісність плазматичних мембран гепатоцитів; відсутній прооксидантний ефект наночастинок, що використовувались. Наночастки на основі європію та гадолінію спричинювали зміни вмісту вільних тиолових груп у клітинах та активність ферментів обміну глутатіону, що свідчить про їх здатність впливати на систему антиоксидантного захисту. Встановлено вплив наночастинок на активність деяких ферментів азотного метаболізму, що, ймовірно, має неспецифічну дію.

Висловлюємо подяку за наданий для дослідів матеріал співробітникам відділу нанокристалічних матеріалів Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України, особисто член-кореспонденту НАНУ, доктору фіз.-мат. наук Ю.В.Малюкіну, канд. хім. наук В.К.Клочкову, а також за консультативну допомогу канд. біол. наук Ю.Г.Коту.

#### Список літератури / References

- Аверченко К.А. Механізми впливу редоксактивних наночастинок ( $ReVO_4:Eu_{3+}$  і  $SeO_{2-x}$ ) на біоенергетичні процеси в мітохондріях. Автореф. дис. ... канд. фіз.-мат. наук. – Харків, 2016. – 22с. /Averchenko K.A. Mechanisms of the influence of redoxactive nanoparticles ( $ReVO_4:Eu_{3+}$  and  $SeO_{2-x}$ ) on bioenergetic processes in mitochondria. Abstract of PhD theses ... phys.-math. sciences. – Kharkiv, 2016. – 22p./
- Ганусова Г.В., Каліман П.А. Активність деяких NADP-залежних дегідрогеназ та вміст цитохромів P-450 і b5 у печінці щурів при введенні хлориду ртуті // Медична хімія. – 2007. – Т.9, №2. – С. 10–13. /Ganusova G.V., Kaliman P.A. Activity of some NADP-dependent dehydrogenases and content of cytochromes P-450 and b5 in liver of rats at introduction of mercury chloride // Medical Chemistry. – 2007. – Vol.9, no. 2. – P. 10–13./
- Нікітченко Ю.В., Падалко В.І., Ткаченко В.М. та ін. Активність глутатіонзалежної антиоксидантної системи печінки і крові щурів залежно від опромінення та раціону харчування // Український біохімічний журнал. – 2008. – Т.80, №6. – С. 66–68. /Nikitchenko Yu.V., Padalko V.I., Tkachenko V.M. et al. Activity of glutathion-dependent antioxidant liver and blood system of rats depending on irradiation and diet // Ukrainian Biochemical Journal. – 2008. – Vol.80, no. 6. – P. 66–68./
- Салем А.Э. Взаимодействие митохондриальной аспартатаминотрансферазы с наночастицами коллоидного золота // Вестник Фонда Фундаментальных исследований. – 2014. – №3. – С. 56–62. /Salem A.E. Interaction of mitochondrial aspartate aminotransferase with nanoparticles of colloidal gold // Vestnik of the Fund for Fundamental Research. – 2014. – No. 3. – P. 56–62./
- Салем А.Э., Шолух М.В. Влияние наночастиц  $TiO_2$  и  $Fe_3O_4$  на термостабильность митохондриальной аспартатаминотрансферазы // Труды Белорусского государственного университета. – 2014. – Т.9, ч.1. – С. 122–128. /Salem A.E., Sholukh M.V. Influence of  $TiO_2$  and  $Fe_3O_4$  nanoparticles on the thermostability of mitochondrial aspartate aminotransferase // Proceedings of the Belarusian State University. – 2014 – Vol.9, part 1. – P. 122–128./
- Северин С.Е., Соловьёва Г.А. Практикум по биохимии. – М.: Изд-во Моск. ун-та. – 1989. – 509с. /Severin S.Ye., Solovyova G.A. Workshop on biochemistry. – Moscow: Publishing house of Moscow University, 1989. – 509 p./
- Averchenko K.A., Kavok N.S., Klochkov V.K. et al. Effect of inorganic nanoparticles and organic complexes on their basis on free-radical processes in some model systems // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol.31, no. 2. – P. 138–145.
- El-Ansary A., Al-Daihan S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview // J. Toxicol. – 2009. – Vol.2009: 754810.
- Fadeel B., Garsia-Bennett A.E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications // Adv. Drug Delivery. – 2010. – Vol.62, no. 3. – P. 362–374.
- Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges // Nat. Rev. Cancer. – 2005. – Vol.5. – P. 161–171.
- Goltsev A.N., Babenko N.N., Gayevskaya Yu.A. et al. Capability of othovanadate-based nanoparticles to in vitro identification and in vivo inhibition of cancer stem cells // Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies. – 2013. – Vol.11, no. 4. – P. 729–739. (In Ukrainian)



- Ho D., Wang C.-H.K., Chow E.K.-H. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine // *Science Advances*. – 2015. – Vol.1, no. 7. – P. 1–14.
- Kaur R., Badea I. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Vol.8. – P. 203–220.
- Kavok N.S., Averchenko K.A., Klochkov V.K. et al. Mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) changes in single rat hepatocytes: The effect of orthovanadate nanoparticles doped with rare-earth elements // *The European Physical Journal E*. – 2014. – Vol.37. – P. 127–139.
- Klochkov V.K., Grygorova A.V., Sedyh O.O. et al. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity // *Colloid and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. – 2012. – Vol.409. – P. 176–182.
- Klochkov V., Kavok N., Grygorova G. et al. Size and shape influence of luminescent orthovanadate nanoparticles on their accumulation in nuclear compartments of rat hepatocytes // *Materials Science and Engineering C*. – 2013. – Vol.33 (5). – P. 2708–2712.
- Klochkov V.K., Kavok N.S., Grigorova A.V. et al. In vivo effects of rare-earth based nanoparticles on oxidative balance in rats // *Materials Science and Engineering C*. – 2016. – Vol.9, no. 6. – P. 72–81.
- Klochkov V.K., Kavok N.S., Malyukin Yu.V. The effect of a specific interaction of nanocrystals  $GdYVO_4: Eu^{3+}$  with cell nuclei // *Rep. Natl. Acad. Sci. Ukr.* – 2010. – Vol.10. – P. 81–86.
- Maynard A.D., Aitken R.J., Butz T. et al. Safe handling of nanotechnology // *Nature*. – 2006. – Vol.444, no. 7117. – P. 267–269.
- Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics // *Science*. – 2005. – Vol.307, no. 5709. – P. 538–544.
- Murclund S., Nordensson J., Back J. Normal Cu, Zn-superoxide dismutase, Mn-Sod, catalase and glutathione peroxidase in Werner's syndrome // *J. Gerontol.* – 1981. – Vol.36, no. 4. – P. 405–409.
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // *Science*. – 2006. – Vol.311. – P. 622–627.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for peroxides in animal tissues by thioparbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol.95, no. 2. – P. 351–358.
- Piao M.J. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis // *Toxicology Letters*. – 2011. – Vol.201, no. 5. – P. 981–990.
- Schepard B. New method for assay of tyrosine transaminase // *Anal. Biochem.* – 1969. – Vol.30. – P. 443–448.
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.O. et al. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms // *Nanotoxicology*. – 2007. – Vol.1. – P. 52–71.

**Представлено: О.А.Наконечна / Presented by: O.A.Nakonechna**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the authors:** S.M.Okhrimenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, s.okhrimenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-7844-618X>  
G.V.Ganusova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, g.ganusova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-6835-468X>  
K.V.Sedova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, kristina.sedova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6053-1100>  
D.I.Aristova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, dar.arist@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2350-2831>  
T.E.Sirenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tamarasirenko27@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0573-5888>  
A.Yu.Grishkova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, ansygry0894@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4074-8369>  
D.V.Krugovoy – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, dekry027@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9590-0965>

A.K.Pavliy – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, akpavliy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5760-0224>

**Про авторів:** С.М.Охріменко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, s.okhrimenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-7844-618X>  
Г.В.Ганусова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, g.ganusova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-6835-468X>  
К.В.Сєдова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, kristina.sedova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6053-1100>  
Д.І.Арістова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, dar.arist@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2350-2831>  
Т.Є.Сиренко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tamarasirenko27@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0573-5888>  
А.Ю.Гришкова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, ansygry0894@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4074-8369>  
Д.В.Круговий – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, dekry027@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9590-0965>  
А.К.Павлій – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, akpavliy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5760-0224>

**Об авторах:** С.М.Охрименко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, s.okhrimenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-7844-618X>  
Г.В.Ганусова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, g.ganusova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-6835-468X>  
К.В.Сєдова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, kristina.sedova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6053-1100>  
Д.И.Аристова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, dar.arist@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2350-2831>  
Т.Е.Сиренко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tamarasirenko27@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0573-5888>  
А.Ю.Гришкова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, ansygry0894@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4074-8369>  
Д.В.Круговой – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, dekry027@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9590-0965>  
А.К.Павлий – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, akpavliy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5760-0224>

## ••• ГЕНЕТИКА ••• GENETICS •••

УДК: 575.2.084

### **Аналіз частоти ембріональної загибелі у лінії *Drosophila melanogaster*, які несуть мутацію *radius incompletus*, в умовах інбридингу** Н.С.Філіпоненко, М.М.Табачна, О.В.Горенська

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)  
olgavg2014@gmail.com

Як відомо, інбридинг призводить до гомозиготизації за алелями більшості генів. Швидкість протікання цього процесу визначається ступенем спорідненості особин, які схрещуються. Крім того, інбредне розведення супроводжується зміною структури і функціонування геному клітин генеративної системи самок: підвищується рівень мутаційного процесу та може порушуватися оогенетична сегрегація. Це призводить до зниження кількості відкладених яєць і зростання рівня ембріональної смертності. Цей процес, відомий як «ефект опору добору», спрямований на адаптацію до зовнішніх умов і пов'язаний з відбором життєздатних нащадків. Характер проявів мутаційної мінливості визначається значною мірою саме напрямком добору. Однак досі наші знання про роль генотипу в контролі рівня ембріональної загибелі у лінії *Drosophila melanogaster* в умовах інбредного розведення недостатньо глибокі. Метою нашої роботи був аналіз частоти домінуючих летальних мутацій у лінії дрозофіли з радіаційно забруднених територій України – Озеро та Полеське, які несуть мутацію *radius incompletus*, в залежності від ступеня інбридингу. Показано, що в умовах жорсткого інбридингу (без добору), зміни сумарної частоти домінуючих летальних мутацій мають циклічний характер, який залежить від генотипу досліджуваних ліній. Так, для лінії *radius incompletus* досліджуваний показник зростає після 10 поколінь добору і зберігається на досить високому рівні протягом 20 поколінь. Ліній з радіаційно забруднених територій України, які несуть мутацію *radius incompletus*, є контрастними за рівнем ембріональної смертності. В умовах інбредного розведення вони характеризуються двома піками зниження (для лінії *ri*(Оз) – після 5 і 65 поколінь інбридингу) і зростання (для лінії *ri*(Пол) – після 5 і 32 поколінь інбридингу) сумарної частоти домінуючих летальних мутацій. Основним фактором, який впливає на зміну рівня смертності на стадії раннього ембріогенезу у лінії дрозофіли, які несуть мутацію *radius incompletus*, є генотип. Його вклад зростає після 10 ( $h^2_{\text{ген}}=44,78$ ), 15 ( $h^2_{\text{ген}}=45,86$ ) і 100 ( $h^2_{\text{ген}}=46,36$ ) поколінь інбридингу. Вплив інбредного розведення відзначено після 32 ( $h^2_{\text{інбр}}=22,61$ ) і 65 ( $h^2_{\text{інбр}}=11,89$ ) поколінь. Спільна дія обох факторів на сумарну частоту домінуючих летальних мутацій показана для кожного з вивчених поколінь. Найбільші значення відзначені після 5 ( $h^2_{\text{сочет.впл}}=53,86$ ) і 65 ( $h^2_{\text{сочет.впл}}=40,63$ ) поколінь інбредного розведення.

**Ключові слова:** інбридинг, домінуючі летальні мутації, дрозофіла, *radius incompletus*.

### **Analysis of embryonic mortality frequency in *Drosophila melanogaster* stocks with *radius incompletus* mutation under inbreeding conditions** N.S.Filiponenko, M.M.Tabachna, O.V.Gorenskaya

It is known that inbreeding leads to homozygotization of alleles of the most genes. The rate of this process is determined by the degree of kinship between crossed individuals. In addition, inbred breeding is accompanied by a change in the structure and functioning of the genome of cells of females' generative system: mutational level increases and oogenetic segregation may be violated. This leads to a decrease in the number of laid eggs and an increase in the level of embryonic mortality. This process, described as "the effect of resistance to selection," is aimed at adapting to external conditions and associated with the selection of viable offspring. The character of manifestations of mutational variability is determined to a large extent by the direction of selection. However, up to now our knowledge of the role of the genotype in controlling the level of embryonic mortality in *Drosophila melanogaster* stocks in conditions of inbred breeding is not deep enough. The purpose of our work was to analyze the frequency of dominant lethal mutations in *Drosophila* stocks from radiation-contaminated regions of Ukraine (*Poleskoe* and *Ozero*), carrying *radius incompletus* mutation, depending on the degree of inbreeding. It is shown that under conditions of severe inbreeding (without selection) changes in the total frequency of dominant lethal mutations have a cyclic character, which depends on the genotype of the stocks. So, in *radius incompletus* stock, the indicator studied increases after 10 generations of selection and remains at enough high level for 20 generations. For the stocks from radiation-contaminated territories of

Ukraine with *radius incompletus* mutation, which are contrasting in the level of embryonic mortality, two decrease peaks are shown (for the stock *ri(Oz)* – after 5 and 65 generations of inbreeding) and an increase (for the line *ri(Pol)* – after 5 and 32 generations of inbreeding) of the total frequency of dominant lethal mutations. The main factor influencing the change in the mortality level at the stage of early embryogenesis in *Drosophila* carrying *radius incompletus* mutation is the genotype of the stocks that are used in the work. It's contribution increases after 10 ( $h^2_{gen}=44.78$ ), 15 ( $h^2_{gen}=45.86$ ) and 100 ( $h^2_{gen}=46.36$ ) generations of inbreeding. The effect of inbred breeding was observed after 32 ( $h^2_{inbr}=22.61$ ) and 65 ( $h^2_{inbr}=11.89$ ) generations. The combined effect of both factors on the total frequency of dominant lethal mutations is shown for each of the generations studied. The highest values were shown after the 5th ( $h^2_{comb}=53.86$ ) and the 65th ( $h^2_{comb}=40.63$ ) generations of inbred breeding.

**Key words:** *inbreeding, dominant lethal mutations, drosophila, radius incompletus.*

## Анализ частоты эмбриональной смертности у линий *Drosophila melanogaster*, несущих мутацию *radius incompletus*, в условиях инбридинга

Н.С.Филипоненко, М.Н.Табачная, О.В.Горенская

Известно, что инбридинг приводит к гомозиготизации по аллелям большинства генов. Скорость протекания этого процесса определяется степенью родства скрещиваемых особей. Кроме того, инбредное разведение сопровождается изменением структуры и функционирования генома клеток генеративной системы самок: повышается уровень мутационного процесса и может нарушаться оогенетическая сегрегация. Это приводит к снижению количества отложенных яиц и возрастанию уровня эмбриональной смертности. Процесс, сопровождающий отбор и инбредное разведение и описанный в литературе как «эффект сопротивления отбору», направлен на адаптацию к внешним условиям и связан с отбором жизнеспособного потомства. Характер проявлений мутационной изменчивости определяется в значительной мере именно направлением отбора. Однако до сих пор наши знания о роли генотипа в контроле уровня эмбриональной смертности у линий *Drosophila melanogaster* в условиях инбредного разведения недостаточно глубоки. Целью нашей работы был анализ частоты доминантных летальных мутаций у линий дрозофилы с радиационно загрязненных территорий Украины и несущих мутацию *radius incompletus* в зависимости от степени инбридинга. Показано, что в условиях жесткого инбридинга (без отбора), изменения суммарной частоты доминантных летальных мутаций имеют циклический характер, который зависит от генотипа исследуемых линий. Так, для линии *radius incompletus* изучаемый показатель возрастает после 10 поколений отбора и сохраняется на достаточно высоком уровне на протяжении 20 поколений. Линии с радиационно загрязненных территорий Украины – *Озеро* и *Полесское*, несущие мутацию *radius incompletus*, являются контрастными по уровню эмбриональной смертности. В условиях инбредного разведения они характеризуются двумя пиками снижения (для линии *ri(Oz)* – после 5 и 65 поколений инбридинга) и возрастания (для линии *ri(Пол)* – после 5 и 32 поколений инбридинга) суммарной частоты доминантных летальных мутаций. Основным фактором, влияющим на изменение уровня смертности на стадии раннего эмбриогенеза у линий дрозофилы, несущих мутацию *radius incompletus*, является генотип. Его вклад возрастает после 10 ( $h^2_{ген}=44,78$ ), 15 ( $h^2_{ген}=45,86$ ) и 100 ( $h^2_{ген}=46,36$ ) поколений инбридинга. Влияние инбредного разведения отмечено после 32 ( $h^2_{инбр}=22,61$ ) и 65 ( $h^2_{инбр}=11,89$ ) поколений. Совместное действие обоих факторов на суммарную частоту доминантных летальных мутаций показано для каждого из изученных поколений. Наибольшие значения отмечены после 5 ( $h^2_{сочет.д-е}=53,86$ ) и 65 ( $h^2_{сочет.д-е}=40,63$ ) поколений инбредного разведения.

**Ключевые слова:** *инбридинг, доминантные летальные мутации, дрозофила, radius incompletus.*

### Введение

Как известно, при инбридинге происходит гомозиготизация по аллелям большинства генов. Скорость протекания этого процесса определяется степенью родства скрещиваемых особей. Однако показано, что при инбредном разведении может повышаться фенотипическая изменчивость по сравнению с аутбредными линиями. Накопление мутаций в ходе селекции и инбредного разведения анализировали Л.З.Кайданов с соавторами (Кайданов и др., 1997). Они предположили, что при инбредном разведении, в процессе адаптации линий к новым условиям, разрушаются старые нормы реагирования и одновременно формируются новые. В основе этого процесса лежит интенсивная генетическая изменчивость и, в первую очередь, мутационный процесс. При этом, если инбридинг сопровождается отбором, благодаря мутациям закрепляются

селектируемые признаки (первый тип мутаций) и, одновременно, «гасятся» их вредные эффекты (второй тип мутаций). Постепенно между указанными типами мутаций может устанавливаться баланс (Иовлева, 2016). Таким образом, особенности проявления инбредной депрессии определяются характером и направлением отбора, который его сопровождает, а также внешними условиями, влияющими на развитие особей в популяции (Bechsgaard et al., 2013). Но даже без отбора по какому-либо признаку, в условиях инбредного разведения происходит резкое повышение мутабельности, которое может сопровождаться сложной структурно-функциональной реорганизацией генома клеток генеративной тканевой системы (Стегний, 2017). Так, у *Calliphora erythrocephala* и *Drosophila melanogaster*, мутантных по гену *otu* (*ovarian tumor*), в условиях инбредного разведения происходят преобразования структуры хромосом от обычных интерфазных до политенных в клетках генеративной системы самок. Эти изменения коррелируют с нарушениями развития ранних эмбрионов (Zhimulev, 1998). Показаны различия в частоте нарушения конъюгации политенных хромосом слюнных желез личинок у селектируемых инбредных линий дрозофилы, коррелирующие с их различной приспособленностью (Таглина, 2006). Установлено, что при жестком инбридинге происходит структурная и функциональная дестабилизация генома генеративной системы, что выражается в изменениях структуры хромосом половых клеток, реорганизации хроматина по локализации и количеству, и появлению-исчезновению хромосомно-мембранных связей (Вассерлауф, 2008, Стегний, 2017). Таким образом, нарушения раннего эмбрионального развития относятся к основным эффектам жесткого инбридинга. Очевидно, что изменения, затрагивающие репродуктивную систему, связаны с отбором жизнеспособного потомства. Однако до сих пор наши знания о роли генотипа в контроле уровня эмбриональной смертности у линий *Drosophila melanogaster* в условиях инбредного разведения недостаточно глубоки. Целью нашей работы был анализ частоты доминантных летальных мутаций у линий дрозофилы с радиационно загрязненных территорий Украины и несущих мутацию *radius incompletus* в зависимости от степени инбридинга.

#### Материалы и методы исследования

В работе использовали линии *Drosophila*, несущие мутацию *radius incompletus* (*ri*). Ген, вызывающий данную мутацию, расположен в локусе 3–47,0 (Lindsley, Grel, 1968). Нормальный аллель этого гена (*ri*<sup>+</sup>) обеспечивает формирование полноценной радиальной жилки крыла, а мутация *ri* прерывает жилку, разделяя её на два фрагмента – проксимальный и дистальный (Ратнер, Васильева, 1987; Васильева, 2005). Ген обладает 100%-ной пенетрантностью (фенотип имаго характеризуется наличием только проксимального участка радиальной жилки крыла) и варьирующей экспрессивностью. Данная мутация была перенесена на генетический фон двух линий дикого типа – *Полесское* (*ri*(*Пол*)) и *Озеро* (*ri*(*Оз*)), путем насыщающих возвратных скрещиваний. Изначально особи, которые составили линии дикого типа *Полесское* и *Озеро*, отловлены из популяций дрозофилы вблизи Чернобыльской АЭС. Для этих линий показано существование обратной зависимости частоты летальных мутаций в половой хромосоме от плотности радиоактивного загрязнения (Козерецкая и др., 2008), для аутбредной линии *Озеро* характерен высокий уровень частоты доминантных летальных мутаций. Все линии взяты из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина, которая является Национальным достоянием Украины.

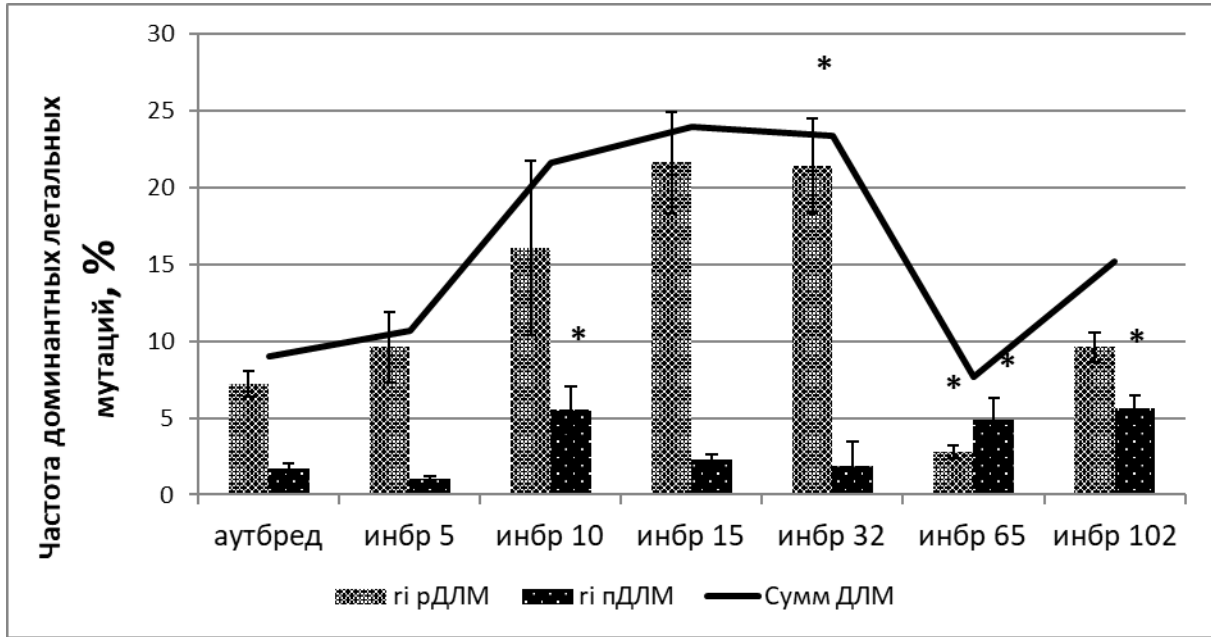
Для учета показателя частоты эмбриональной гибели виргинных имаго разделяли по полу в течение 1-х суток после вылета и выдерживали отдельно до половозрелого возраста (трое суток) на временной среде. Затем самцов и самок помещали вместе на 12 часов для спаривания, после чего по 15 самок переносили на временную среду в чашках Петри для получения кладок яиц. Через 12 часов учитывали количество отложенных яиц и через 48 – доминантных летальных мутаций. При этом белые яйца определялись как ранние летали (первые 6–9 часов эмбрионального развития) (рДЛМ); жёлтые и коричневые – поздние летали – пДЛМ (Тихомирова, 1990; Проблемы генетики..., 1977). Частоту доминантных летальных мутаций определяли как процентное соотношение неразвившихся яиц к общему числу яиц (сумДЛМ). Для каждого варианта эксперимента было выполнено по 10–35 измерений. Подсчет количества яиц проводили при помощи стереоскопического микроскопа МБС-6. Учет частоты эмбриональной гибели проводился у линий *ri*, *ri*(*Пол*) и *ri*(*Оз*) при инбредном разведении, а именно после 5, 10, 15, 32, 65 и 102

поколений інбридинга. В качестве контроля взяты усредненные значения исследований частоты ДЛМ аутбредных линий, которые проводились параллельно инбредному разведению мух.

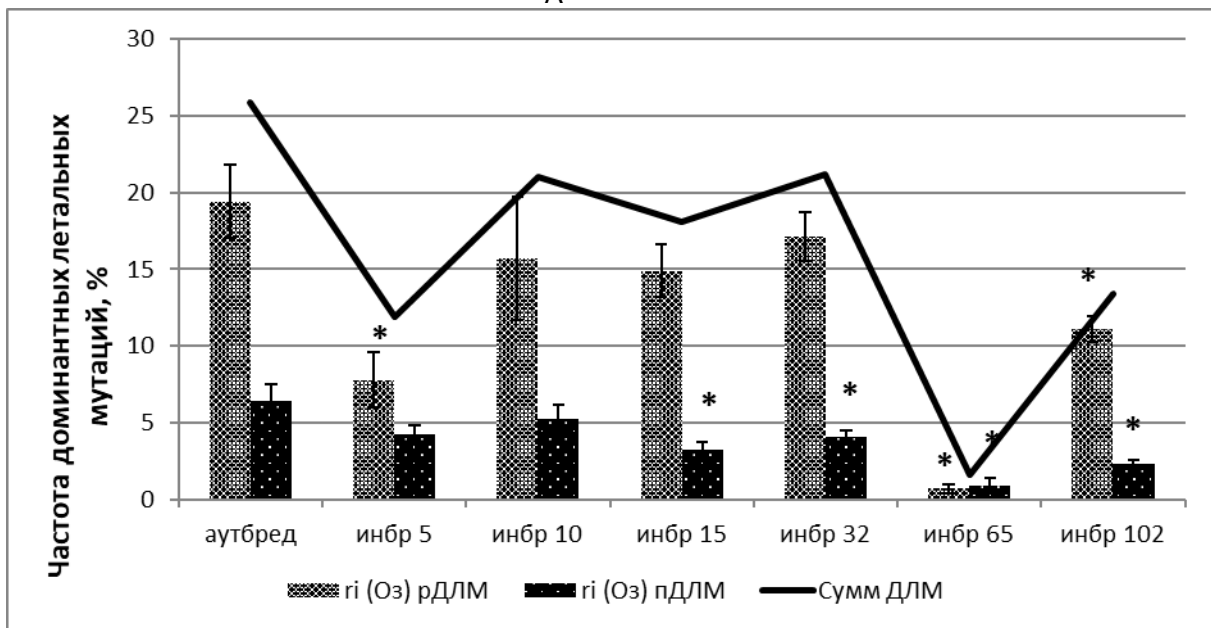
Достоверность различий контрольной и опытной группы оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента. Оценку силы влияния внешнего и генетического фактора на изучаемый показатель проводили при помощи двухфакторного дисперсионного анализа. Вычисления проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и Biostat.

### Результаты и обсуждение

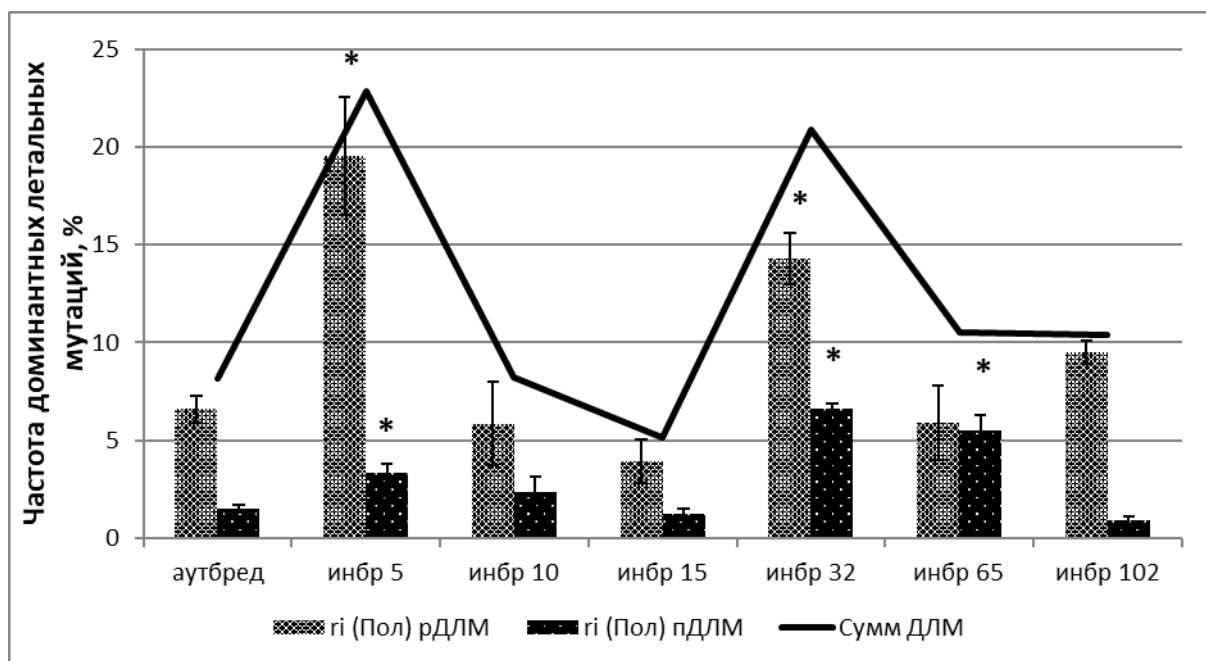
Изменение частоты ранних и поздних ДЛМ линий, несущих мутацію *ri*, в зависимости от степени инбридинга, показаны на рис. 1.



А



В



С

Рис. 1. Изменение частоты ранних и поздних ДЛМ при инбредном разведении мутантных линий  $ri$  (А),  $ri(Оз)$  (В) и  $ri(Пол)$  (С)

\* достоверность отличий от соответствующих значений аутбредной линии  $p < 0,05$ .

Результаты исследований показали, что для мутантной линии  $ri$  (рис. 1А) характерно увеличение частоты как ранних, так и поздних доминантных летальных мутаций после 10 поколений инбридинга в два и три раза соответственно. Тенденция к росту количества ранних леталей сохраняется до 32 поколения инбридинга, затем значения ранней эмбриональной смертности достигают уровня соответствующих значений аутбредной линии. Что касается поздних леталей, то можно наблюдать циклические изменения данного показателя – возрастание показателя происходит после 10, 65 и 102 поколений инбредного разведения. Высокий уровень суммарной частоты доминантных летальных мутаций сохраняется в линии  $ri$  на протяжении порядка 20 поколений, затем общее количество леталей снижается до уровня соответствующего показателя аутбредной линии.

Для аутбредной линии  $ri(Оз)$  характерен высокий уровень эмбриональной смертности. Возможно, это связано с изначально повышенным уровнем частоты доминантных летальных мутаций у линии дикого типа *Озеро*, даже в сравнении с другими линиями, полученными из природных популяций с территорий с различным уровнем радиационного загрязнения (Филипоненко и др., 2008). Соответственно, инбредное разведение линии *Озеро*, несущей мутацию  $ri$ , приводит к снижению частоты как ранних, так и поздних доминантных летальных мутаций (рис. 1В). Количество ранних леталей циклически снижается после 5 и 65 поколений инбридинга, для поздних летальных мутаций характерно их стойкое снижение уже после 15 поколений инбредного разведения. Особенно низкая частота доминантных летальных мутаций показана для данной линии после 65 поколений инбридинга, при этом количество ранних и поздних леталей составило всего 3,6 и 14,1% от уровня соответствующих показателей аутбредной линии.

Для линии *Полесское*, несущей мутацию  $ri$ , также характерны циклические изменения изучаемого показателя (рис. 1С). Увеличение эмбриональной смертности происходит после 5 и 32 поколений инбредного разведения. При этом частота ранних доминантных мутаций возрастает в 3 и 2,2 раза, поздних – в 2,2 и 4,3 раза соответственно для 5 и 32 поколений инбридинга. Эмбриональная смертность не отличается от значений аутбредной линии после 5, 15 и 102 поколений инбредного разведения.

Изменения в уровне эмбриональной смертности, которые происходят при инбредном разведении, происходят за счет ранних летальных мутаций у линий *ri* и *ri(Оз)*, в то время как в линии *ri(Пол)* – за счет поздних летальных мутаций (табл. 1).

Таблица 1.

Оценка вклада ранних и поздних доминантных мутаций в показатель эмбриональной смертности у дрозофилы при инбредном разведении в зависимости от генотипа (при  $p \leq 0,05$ )

Генотип	Тип мутационных изменений	F стат.	F критич.	Значение $h^2$ , %
<i>ri</i>	рДЛМ	15,89	2,202	59,83
	пДЛМ	5,01	2,202	28,62
<i>ri(Оз)</i>	рДЛМ	4,39	1,185	25,33
	пДЛМ	2,93	1,185	16,15
<i>ri(Пол)</i>	рДЛМ	16,99	1,193	61,55
	пДЛМ	27,81	1,193	72,82

Основным фактором, влияющим на изменение уровня смертности на стадии раннего эмбриогенеза у дрозофилы, несущих мутацию *ri*, является генотип использованных в работе линий. Действие этого фактора подчиняется циклической закономерности – его вклад возрастает после 10, 15 и 100 поколений инбридинга (табл. 2) и снижется после 5, 32 и 65 поколений развития при инбредном разведении.

Таблица 2.

Оценка статистической значимости и силы влияния инбридинга и генетического фона на суммарную частоту ДЛМ у *Drosophila melanogaster* (при  $p \leq 0,05$ )

Источник вариации	Количество поколений инбридинга	Значение F		Значение $h^2$ , %
		F статистическое	F критическое	
Фактор 1 (степень инбридинга)	5	3,90	0,52	-
	10	3,91	2,28	-
	15	3,92	0,45	-
	32	3,91	32,11	22,61
	65	3,92	17,75	11,89
	102	3,91	1,00	-
Фактор 2 (генотип)	5	3,06	20,67	22,87
	10	3,06	22,10	44,78
	15	3,07	38,39	45,86
	32	3,07	17,67	15,24
	65	3,07	25,63	26,21
	102	3,06	36,35	46,36
Сочетанное действие факторов	5	3,06	24,16	53,86
	10	3,06	4,02	12,81
	15	3,07	13,08	29,62
	32	3,07	24,99	28,62
	65	3,07	20,09	40,63
	102	3,06	11,45	27,42

Изучение генетических последствий отбора на инбредных линиях дрозофил, различающихся по адаптивно важному признаку (высокая и низкая половая активность самцов – НА (низкоактивная) и ВА (высокоактивная)), показало, что генетическая природа различий между линиями сводится к разному соотношению в них мутаций, влияющих на жизнеспособность. Кроме того, несмотря на длительное инбредное разведение, линии НА присуща большая генотипическая изменчивость, которая поддерживается за счет высокой частоты спонтанного мутирования



(Иовлева, 2016). Такой высокий уровень мутационного процесса, по мнению авторов, является компонентой «генетической защитной реакции», приводящей к формированию сбалансированной системы – компенсаторного комплекса генов, направленного на адаптацию особей к инбредному разведению (Струнников, 1974).

Эффект «сопротивления» отбору наблюдали в генетических системах, имеющих разное происхождение и селективируемых по разным признакам, что свидетельствует о его универсальности (Иовлева, 2016). Связь инбридинга с процессами изменчивости была показана в экспериментах с люцерной при получении высокосамофертильных форм и полной реорганизации цветка. Такие формы были получены в 5–10 инбредных поколениях. Инбредная депрессия наиболее сильно была выражена в первых 5 поколениях, затем стабилизировалась до 15 поколения инбридинга. До 30 поколения инбридинга отмечался резкий всплеск изменчивости по многим морфологическим и репродуктивным признакам, среди них значительную долю составляют разные типы хлорофилльных мутаций. После 30 поколения уровень изменчивости понизился (Шумный, 2004).

Источником повышенной скорости мутирования в селективируемых линиях дрозофилы является перемещение комплексов копий мобильных диспергированных элементов (Гвоздев, Кайданов, 1986; Pasyukova et al., 1986). Данный процесс имеет важное значение в экстремальных ситуациях, при селекции по адаптивно важным признакам, или в естественных условиях в малочисленных популяциях, т.е. в условиях инбридинга (Bolshakov et al., 1994, Vasilyeva et al., 2008). Адаптивный смысл таких перемещений состоит в регуляторном влиянии на экспрессию генов, вблизи которых произошла транспозиция. Чаще всего копии МДГ локализуются в участках интеркалярного гетерохроматина, нередко вблизи генов, контролирующих синтез транспортных РНК, гистонов и других жизненно важных продуктов, *hobo*-элементы накапливаются, в основном, в прицентромерном  $\beta$ -гетерохроматине (Иовлева, 2016).

Инбридинг приводит к изменению ориентации хромосом в пространстве ядер трофоцитов яичников лабораторных линий *Drosophila melanogaster*, а также оказывает влияние на синаптирование хромосом (Вассерлайф, 2008, Таглина, 2006). Показано, что инбредное разведение *Calliphora erythrocephala* и *Drosophila melanogaster*, мутантных по гену *otu* (*ovarian tumor*), вызывает структурные изменения генетического аппарата трофических клеток ооцитов – формированию вторичных политенных хромосом (Zhimulev, 1998). При этом увеличивается количество нарушений развития ранних эмбрионов, что может быть связано с нарушением оогенетической сегрегации. Эмбриональная гибель потомства определяется в большей степени влиянием инбридинга на мать, чем на отца. Так, длительный инбридинг самок *Drosophila littoralis* приводит к значительному сокращению потомства за счет снижения количества отложенных яиц и ранней эмбриональной гибели. Что касается самцов, то длительный инбридинг у особей мужского пола не влияет на плодовитость, однако тоже увеличивает гибель потомства на предимагинальной стадии развития (Ala-Honkola et al., 2015).

Таким образом, изменения структуры и функционирования генома клеток генеративной системы самок, которые происходят при инбредном разведении особей, генерируют разнообразные мутации. Анализ геномов инбредных линий *Drosophila melanogaster* из коллекции *Drosophila Genetic Reference Panel* (DGRP) показал более высокий уровень делеций по сравнению с инсерциями (Huang et al., 2014). Отбор на раннюю репродуктивную способность у дрозофилы, который велся на протяжении 10 поколений, привел к накоплению мутаций, имеющих плейотропный эффект. Он выражался в увеличении продолжительности жизни в пострепродуктивный период жизни имаго (Kimber, Chippindale, 2013).

Результаты проведенного нами исследования показали, что частота доминантных летальных мутаций у линий дрозофилы, несущих мутацию *radius incompletus* в условиях инбредного разведения изменяется циклически, в зависимости от генотипа исследованных линий. Установлено, что различия по показателю эмбриональной смертности определяются, в основном, генетическим фоном линий, несущих мутацию *ri*. Его вклад возрастает после 10 ( $h^2_{\text{ген}}=44,78$ ), 15 ( $h^2_{\text{ген}}=45,86$ ) и 100 ( $h^2_{\text{ген}}=46,36$ ) поколений инбридинга. Влияние инбредного разведения отмечено после 32 ( $h^2_{\text{инбр}}=22,61$ ) и 65 ( $h^2_{\text{инбр}}=11,89$ ) поколений. Совместное действие обоих факторов на суммарную частоту доминантных летальных мутаций показано для каждого из изученных поколений. Наибольшие значения отмечены после 5 ( $h^2_{\text{сочет.д-е}}=53,86$ ) и 65 ( $h^2_{\text{сочет.д-е}}=40,63$ ) поколений инбредного разведения.

## Список литературы / References

- Васильева Л.А. Изменение системы жилкования крыла *Drosophila melanogaster* под действием температурного шока и селекции // Журнал общей биологии. – 2005. – Т.66, №1. – С. 68–74. /Vasilyeva L. A. Change in the system of wing venation of *Drosophila melanogaster* // Biology Bulletin Reviews. – 2005. – Vol.66, no. 1. – P. 68–74./
- Вассерлауф И.Э. Изменение организации хромосом в ядрах трофоцитов яичников *Drosophila melanogaster* при инбридинге и гибридном дисгенезе // Вестник Томского государственного университета. – 2008. – №316. – С. 178–187. /Wasserlauf I.E. Change in the organization of the nuclei chromosomes of trophocytes in the ovaries *Drosophila melanogaster* in inbreeding and hybrid dysgenesis // Tomsk State University Journal of Biology. – 2008. – No. 316. – P. 178–187./
- Гвоздев В.А., Кайданов Л.З. Геномная изменчивость, обусловленная транспозициями мобильных генетических элементов, и приспособленность особей *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. – 1986. – Т.47. – С. 51–63. /Gvozdev V.A., Kaidanov L.Z. Genomic variability, caused by transposition of mobile genetic elements, and fitness of individuals of *Drosophila melanogaster* // Biology Bulletin Reviews. – 1986. – Vol.47. – P. 51–63./
- Иовлева О.В. Эксперимент длиною в полвека // Историко-биологические исследования. – 2016. – Т.8, №3. – С. 59–77. /Iovleva O.V. A Half-century-long experiment // Studies in the history of biology. – 2016. – Vol.8, no. 3. – P. 59–77./
- Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Галкин А.П. и др. Генетические эффекты дестабилизирующего отбора при селекции по адаптивно важным признакам в линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1997. – Т.33. – С. 1102–1109. /Kaidanov L.Z., Mylnikov S.V., Galkin A.P. et al. Genetic effects of destabilizing selection for adaptive important traits of *Drosophila melanogaster* // Russian Journal of Genetics. – 1997. – Vol.33. – P. 1102–1109./
- Козерецкая И.А., Проценко А.В., Афанасьева Е.С. и др. Мутационные процессы в природных популяциях *Drosophila* и *Hirundo rustica* с радиационно загрязненных территорий Украины // Цитология и генетика. – 2008. – Т.42, №4. – С. 63–68. /Kozeretcka I.A., Protsenko A.V., Afanasieva E.S. et al. Mutation processes in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Hirundo rustica* from radiation-contaminated regions of Ukraine // Cytology and Genetics. – 2008. – Vol.42, no. 4. – P. 267–271./
- Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле / Под ред. В.В.Хвостовой, Л.И.Корочкина, М.Д.Голубовского. – Новосибирск: Наука, 1977. – 277с. /Genetics problems in *Drosophila* studies / Edited by V.V.Khlostova, L.I.Korochkin, M.D.Golubovsky. – Novosibirsk: Nauka, 1977. – 277p./
- Ратнер В.А., Васильева Л.А. Количественный признак у дрозофилы: генетические, онтогенетические, цитогенетические и популяционные аспекты // Генетика. – 1987. – Т.23, №6. – С. 1070–1081. /Ratner V.A., Vasilyeva L.A. Quantitative trait in *Drosophila*: genetic, ontogenetic, cytogenetic and population aspects // Russian Journal of Genetics. – 1987. – Vol.23, no. 6. – P. 1070–1081./
- Стегний В.Н. Жесткий инбридинг при экстремальных режимах внешней среды – важнейший фактор микроэволюции и видообразования / Генетика. – 2017. – Т.53, №7. – С. 785–795. /Stegny V.N. Hard inbreeding under extreme environmental conditions is the most important factor of microevolution and speciation // Russian Journal of Genetics. – 2017. – Vol.33, no. 7. – P. 785–795./
- Струнников В.А. Возникновение компенсаторного комплекса генов – одна из причин гетерозиса // Журнал общей биологии. – 1974. – Т.35. – С. 666–677. /Strunnikov V.A. The occurrence of compensatory gene complex – one of the reasons of heterosis // Biology Bulletin Reviews – 1974. – Vol.35. – P. 666–677./
- Таглина О.В. Изучение спонтанного асинопсиса политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* у высокоинбредных линий, комбинированных линий и их гибридов // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип.3, №729. – С.136–140. /Taglina O.V. Investigation of spontaneous asynapsis of salivary gland polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* in highly inbred lines, combined lines and their hybrids // Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: Biology. – 2006. – Vol.3, no. 729. – P. 136–140./
- Тихомирова М. М. Генетический анализ. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280с. /Tikhomirova M. M. Genetic analysis. – Leningrad: Leningrad State University Publ., 1990. – 280p./
- Филипоненко Н.С., Волкова Н.Е., Костенко В.В. и др. Исследование компонентов приспособленности линий *Drosophila melanogaster*, полученных из природных популяций с территорий с различным уровнем радиационного загрязнения // Дрозофіла у експериментальній генетиці та біології. Зб. наук. праць. – Х.: ХНУ, 2008. – С. 98–101. /Filiponenko N.S., Volkova N.E., Kostenko V.V. et al. Investigation of the fitness components of *Drosophila melanogaster* stocks obtained from natural populations from territories with different levels of radiation contamination // *Drosophila* in the experimental genetics and biology. Collected papers. – Kharkiv: KhNU, 2008. – P. 98–101./
- Шумный В.К. Проблемы генетики растений // Вестник ВОГиС. – 2004. – Т.8, №2. – С. 32–39. /Shumny V.K. Problems of plant genetics // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2004. – Vol.8, no. 2. – P. 32–39./

- Ala-Honkola O., Laine L., Pekkala N. et al. Males benefit from mating with outbred females in *Drosophila littoralis*: male choice for female genetic quality? // *Ethology*. – 2015. – Vol.121. – P. 577–585.
- Bechsgaard J.S., Hoffmann A.A., Sgroi C. et al. A comparison of inbreeding depression in tropical and widespread *Drosophila* species // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol.8, no. 2. – e51176.
- Bolshakov V.N., Galkin A.P., Kaidanov L.Z. et al. Closely related *Drosophila melanogaster* strains with altered fitness also depict changes in their hobo element properties // *Genetics Selection Evolution*. – 1994. – Vol.26. – P. 205–216.
- Huang W., Massouras A., Inoue Y. et al. Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines // *Genome Res*. – 2014. – Vol.24. – P. 1193–1208.
- Kimber C.M., Chippindale A.K. Mutation, condition, and the maintenance of extended lifespan in *Drosophila*. *Current Biology*. – 2013. – Vol.23. – P. 2283–2287.
- Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. – Carnegie Inst. Wah. Publ., 1968. – 627p.
- Pasyukova E.G., Belyaeva E.S., Kogan G.L. et al. Concerted transpositions of mobile genetic elements coupled with fitness changes in *D. melanogaster* // *Molecular Biology and Evolution*. – 1986. – Vol.3 (4). – P. 299–312.
- Vasilyeva L.A., Antonenko O.V., Vykhristyuk O.V., Zakharov I.K. Selection changes the pattern of mobile genetic elements in genome of *Drosophila melanogaster* // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2008. – Vol.12, no. 3. – P. 412–425.
- Zhimulev I.F. Genetic organization of polytene chromosomes // *Advances in Genetics*. – 1998. – Vol.39. – P. 1–599.

**Представлено: Т.О.Єлецька / Presented by: T.O.Yeletska**

**Рецензент: Ю.Г.Шкорбатов / Reviewer: Y.G.Shckorbatov**

*Подано до редакції / Received: 28.02.2018*

**About the authors:** N.S.Filiponenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, filiponenkon@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8116-9101>  
M.M.Tabachna – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tabachna95@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3405-8019>  
O.V.Gorenskaya – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, olgavg2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522>

**Про авторів:** Н.С.Філіпоненко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, filiponenkon@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8116-9101>  
М.М.Табачна – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tabachna95@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3405-8019>  
О.В.Горенська – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, olgavg2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522>

**Об авторах:** Н.С.Филипоненко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, filiponenkon@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8116-9101>  
М.Н.Табачная – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tabachna95@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3405-8019>  
О.В.Горенская – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, olgavg2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522>

## ••• ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ••• ZOOLOGY AND ECOLOGY •••

УДК: 576.895.122

**Паразитофауна каспійського лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) на риборозвідних заводах Азербайджану за період їх існування****Н.Е.Ібрагімова, Ф.Г.Рзаяєв***Інститут зоології НАН Азербайджану (Баку, Азербайджан)  
fuad.zi@mail.ru*

Каспійський лосось включено до Червоної книги Азербайджану з міжнародним статусом CR (Critically Endangered) – знаходиться під загрозою зникнення. У статті наведено дані порівняльного аналізу паразитофауни каспійського лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) на риборозвідних заводах Азербайджану (Чайкендський та Чухур-Габалінський лососеві риборозвідні заводи) за період їх існування (1955–2015 рр.). Порівняння кількісних показників паразитофауни за перші роки після створення лососевих риборозвідних заводів (9 видів паразитів) та досліджень, які були проведені авторами (7 видів паразитів), свідчать про те, що кількісні зміни паразитофауни невеликі. Однак встановлено значну зміну видового складу паразитофауни каспійського лосося: паразити *Chilodonella piscicola*, *Trichodina truttae*, *Eubothrium crassum*, *Rhabdochona gnedini*, *Cystidicoloides tenuissima*, *Piscicola geometra*, знайдені в перші роки дослідження, не були відмічені авторами, а *Bunodera luciopercae*, *Metechinorhynchus baeri*, *Pomphorhynchus laevis*, *Glochidium* sp., зазначені при останніх дослідженнях, не відзначені в перші роки. Виявлені домінуючі групи паразитів каспійського лосося. Приведено систематичний огляд усіх паразитів лососів, знайдених за даний період. Вказуються 3 види паразитів, відмічених вперше в межах Азербайджану для каспійського лосося на лососевих риборозвідних заводах (трематода *Bunodera luciopercae*, скреблик *Pomphorhynchus laevis*, а також моллюск *Glochidium* sp.). Авторами особливо відзначені виявлені з 2005 до 2015 рр. паразити, які є умовно-патогенними для каспійського лосося та здатні завдати відчутної шкоди лососевим риборозвідним заводам: *Costia necatrix*, *Ichthyophthyrus multifiliis*, *Gyrodactylus derjavini*, *Metechinorhynchus baeri*, *Pomphorhynchus laevis*, *Bunodera luciopercae*. Автори відзначають, що за період проведення паразитологічних досліджень каспійського лосося на лососевих риборозвідних заводах Азербайджану паразити, патогенні для людини, не були виявлені.

**Ключові слова:** *Salmo trutta caspius* Kessler, паразитофауна, систематика, лососеві риборозвідні заводи Азербайджану.

**Parasitofauna of the Caspian salmon (*Salmo trutta caspius* Kessler) at the salmon fish hatcheries of Azerbaijan for the period of their existence****N.E.Ibrahimova, F.H.Rzayev**

The Caspian salmon is included in the Red List of Azerbaijan with the international status CR (Critically Endangered). The article presents the comparative analysis of the parasitofauna of the Caspian salmon (*Salmo trutta caspius* Kessler) during the period of its existence (1955–2015) at the hatcheries of Azerbaijan (Chaykend and Chukhur-Gabala salmon fish hatcheries). When comparing the quantitative index of parasitofauna for the first years after the creation of the salmon fish hatcheries (9 species of parasites) and studies carried out by the authors (7 species of parasites), it was revealed that the change was insignificant. However, significant changes in the species composition of the parasitofauna of the Caspian salmon were found. The parasites *Chilodonella piscicola*, *Trichodina truttae*, *Eubothrium crassum*, *Rhabdochona gnedini*, *Cystidicoloides tenuissima*, *Piscicola geometra* found in the first years of the salmon fish hatcheries were not recorded by the authors, and *Bunodera luciopercae*, *Metechinorhynchus baeri*, *Pomphorhynchus laevis*, *Glochidium* sp. revealed in recent studies were not observed in the early years. The dominant groups of parasites of the Caspian salmon were revealed. A systematic review of all parasites of salmonids found during this period is presented. Three species of parasites were noted for the first time in the territory of Azerbaijan for the Caspian salmon in the salmon fish hatcheries (trematode *Bunodera luciopercae*, acanthocephala *Pomphorhynchus laevis* and mollusk *Glochidium* sp.). The authors specifically noted parasites identified from 2005 to 2015 that are conditionally pathogenic for the Caspian salmon and capable to cause significant damage to the salmon hatcheries: *Costia necatrix*, *Ichthyophthyrus multifiliis*, *Gyrodactylus derjavini*, *Metechinorhynchus baeri*, *Pomphorhynchus laevis*, *Bunodera luciopercae*. The authors note that during the

period of parasitological studies of the Caspian salmon in salmon hatcheries in Azerbaijan, pathogenic parasites for humans have not been found.

**Key words:** *Salmo trutta caspius* Kessler, parasitofauna, taxonomy, Azerbaijan salmon fish hatcheries.

## Паразитофауна каспийского лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) на рыборазводных заводах Азербайджана за период их существования Н.Э.Ибрагімова, Ф.Г.Рзаєв

Каспийский лосось включен в Красную книгу Азербайджана с международным статусом CR (Critically Endangered) – находящийся под угрозой исчезновения. В статье приводятся данные сравнительного анализа паразитофауны каспийского лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) на рыбозаводных заводах Азербайджана (Чайкендский и Чухур-Габалинский лососевые рыбозаводные заводы) за период их существования (1955–2015 гг.). Сравнения количественных показателей паразитофауны за первые годы после создания лососевых рыбозаводных заводов (9 видов паразитов) и исследований, которые были проведены авторами (7 видов паразитов), свидетельствуют о том, что количественные изменения паразитофауны невелики. Однако установлено значительное изменение видового состава паразитофауны каспийского лосося: паразиты *Chilodonella piscicola*, *Trichodina truttae*, *Eubothrium crassum*, *Rhabdochona gnedini*, *Cystidicolidia tenuissima*, *Piscicola geometra*, найденные в первые годы исследований, не были отмечены авторами, а *Bunodera luciopercae*, *Metechinorhynchus baeri*, *Pomphorhynchus laevis*, *Glochidium* sp., указанные при последних исследованиях, не отмечались в первые годы. Выявлены доминирующие группы паразитов каспийского лосося. Приведен систематический обзор всех паразитов лососевых, найденных за данный период. Указано 3 вида паразитов, отмеченных впервые на территории Азербайджана для каспийского лосося на лососевых рыбозаводных заводах (трематоды *Bunodera luciopercae*, скребень *Pomphorhynchus laevis*, а также моллюск *Glochidium* sp.). Авторами особо отмечены выявленные с 2005 по 2015 гг. паразиты, которые являются условно-патогенными для каспийского лосося и способны принести ощутимый вред лососевым рыбозаводным заводам: *Costia necatrix*, *Ichthyophthyrus multifiliis*, *Gyrodactylus derjavini*, *Metechinorhynchus baeri*, *Pomphorhynchus laevis*, *Bunodera luciopercae*. Авторы отмечают, что за период проведения паразитологических исследований каспийского лосося на лососевых рыбозаводных заводах Азербайджана паразиты, патогенные для человека, не были обнаружены.

**Ключевые слова:** *Salmo trutta caspius* Kessler, паразитофауна, систематика, лососевые рыбозаводные заводы Азербайджана.

### Введение

Каспийский лосось включен в Красную Книгу Азербайджана с международным статусом CR (Critically Endangered) – находящийся под угрозой исчезновения.

Лососеобразные рыбы известны с мелового периода мезозойской эры (140–65 млн лет назад). Они считаются одними из первых предков современных костных рыб. По современным представлениям, лососеобразные близки к сельдеобразным (Ибрагимов, 2012). В некоторых классификациях они объединяются в один отряд (Прохоров, 1974).

Более 60 лет назад в Азербайджане были созданы лососеразводные заводы (ЛРЗ) для разведения и выпуска лососей в водоемы с целью поддержания численности естественных популяций и для их реализации, учитывая товарную ценность этой рыбы. В 1954 г. в Ханларском районе в поселке Чайкенд (Агсу) был сооружен Чайкендский ЛРЗ, в 1956 г. в Габалинском районе в деревне Чухургабала был создан Габалинский ЛРЗ. Маточное поголовье для разведения рыб на заводах поставляется Гарадагским Азербайджанским опытным морским рыбозаводным заводом – АОМРЗ (поселок Сахиль). Вода для содержания рыб на Чайкендский ЛРЗ поступает напрямую из реки Кюряк, а Габалинский ЛРЗ получает родниковую воду. Рыбы в зависимости от возраста вскармливаются гранулированной пищей «Старт» и «Продуктивный».

Разработка научно обоснованных мероприятий по борьбе с болезнями рыб позволяет осуществлять плановое воспроизводство Каспийского лосося, товарная ценность которого выделяется среди продуктов каспийского рыболовства, уступая только осетровой икре, и представляет предмет экспорта.

Известно, что лососевые рыбы являются представителями фауны северного происхождения (Северный Ледовитый океан и Балтийское море). Найденные у них паразиты являются также

«реликтовими» животними, сохранившимися в данном ареале, вероятно, с весьма давних времен, несмотря на изменения окружающей среды (Ибрагимов, 2012).

Начиная с 50-х годов и до наших дней на территории Азербайджана проводились паразитологические исследования каспийского лосося в Каспийском море (Ибрагимов, 2012), в пресных водоемах (Микаилов, 1975) а также на ЛРЗ (Гончаров, 1956; Нечаева, 1959; Гейдаров, 1969; Абдуллаева, 2014). На сегодняшний день, имея на руках данные исследований за столь длительный период, мы можем провести сравнительный анализ паразитофауны каспийского лосося на лососевых рыборазводных заводах Азербайджана. За это время произошли большие изменения в экологии и повысилось влияние антропогенного фактора на паразитофауну рыб. Учитывая вышеуказанное научное и практическое значение работы, мы поставили цель обработать литературные данные и данные собственных исследований и провести сравнительный анализ паразитофауны каспийского лосося и некоторых экологических аспектов за период его изучения на территории Азербайджана в рыборазводных заводах за весь период их существования.

### Материал и методика

Наши исследования проводились в период 2005–2015 гг. на лососевых рыборазводных заводах (Габала, Чайкенд, Гарадаг) на территории Азербайджана (рис. 1). Всего было исследовано 754 экземпляра каспийского лосося разного возраста (от 0,5 месяца до года и выше года до половозрелого возраста) (табл. 1).

Материал доставлялся в лабораторию зафиксированным в 4% формалине и в 70% спирте. Рыбы исследовались методом полного паразитологического вскрытия (Быховская-Павловская, 1952). Моногени фиксировались по методике В.А.Гусева (1983). С целью камерального изучения паразитов моногенетические сосальщики заключались в глицерин-желатин. Остальные паразиты фиксировались в 70% спирте. Затем изготавливались постоянные препараты для исследования под микроскопом (Promo Star – Zeiss) для определения видов.



Рис. 1. Участки проведения исследований: 1 – Чайкендский ЛРЗ; 2 – Габалинский ЛРЗ; 3 – Гарадагский Азербайджанский опытный морской рыборазводный завод

Таблица 1.

Количество исследованных рыб (2005–2015 гг.)

Год	Чайкендский ЛРЗ (экземпляры)	Габалинский ЛРЗ (экземпляры)	АОМРЗ (экземпляры)	Всего (экземпляры)
2005	12	39	-	51
2006	42	40	-	82
2007	12	35	-	47
2008	26	36	-	62
2009	16	37	-	53
2010	23	38	-	61
2011	25	33	-	58
2012	23	32	-	55
2013	12	69	-	81
2014	26	48	47	121
2015	20	31	32	83
ВСЕГО	237	438	79	754

**Результаты и обсуждение**

В результате изучения литературных данных (1955–2009) и на основании наших исследований (2005–2015) в Азербайджане на ЛРЗ у каспийского лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) было отмечено 15 видов паразитов. Классификация паразитов приведена по «Определителю паразитов пресноводных рыб» под редакцией О.Н.Бауера (1984, 1985, 1987) с уточнениями, внесенными в последние годы.

Подцарство: Одноклеточные – Protozoa  
Тип: Саркомастигофоры – Sarcostomata  
Подтип: Жгутиконосцы – Mastigophora  
Класс: Животные жгутиконосцы – Zoomastigophorea  
Отряд: Кинетопластиды – Kinetoplastomonada Honigberg, 1963  
Семейство: Bodonidae Stein, 1878

Вид: *Costia necatrix* Henneguay, 1884 (Syn: *Ichtiobodo necatrix* Henneguay, 1884)

В проведенных нами в период 2005–2015 гг. исследованиях каспийского лосося из Чайкендского и Чухур-Габалинского заводов этот паразит отмечался очень часто. Зараженность изменялась в зависимости от возраста рыб и от сезонов года. Высокая зараженность этим паразитом (до 100%) наблюдается, начиная с поздней осени и до начала весны (с октября по апрель). Летом встречается с очень небольшой экстенсивностью (около 15%). В основном интенсивная зараженность наблюдается у рыб, начиная с 10–11 месяцев (Микаилов и др., 2012, 2013, 2015).

В Азербайджане паразит впервые отмечен в 1956 г. на коже молоди лосося, выращиваемого в Чайкендском ЛРЗ (Гончаров, 1956). Затем он неоднократно был зарегистрирован на жабрах и коже того же хозяина в Чайкендском и Чухур-Габалинском ЛРЗ (Нечаева, 1959, 1960; Микаилов, 1958, 1962; Кандилов, 1964; Гейдаров, 1969; Мамедов и др., 1993; Абдуллаева, 2005, 2014). По данным Х.Г.Абдуллаевой (2005), экстенсивность инвазии на заводах – 11–53 %, а интенсивность составила 7–21 экземпляров. Самая высокая зараженность была отмечена в Габалинском рыбопроизводном заводе – 21–64 %).

Тип: Инфузории или Ресничные – Infusoria or Ciliophora Doflein, 1901

Класс: Циртостомата – Cyrtostomata Jankowski, 1978

Отряд: Hypostomatida Schewiakoff, 1970

Семейство: Chilodonellidae Derolux, 1970

Вид: *Chilodonella piscicola* (Zacharias, 1894) Jankowski, 1980

Syn: *Chilodon piscicola* Zacharias, 1894; *Chilodonella cyprini* Moroff, 1902; *Chilodonella cyprini* (Moroff, 1902) Kahl, 1934

В пределах Азербайджана этот вид был отмечен на молоди лосося в Чайкендском и Чухур-Габалинском рыбзаводах (Нечаева, 1959, 1960; Гончаров 1956; Микаилов, 1958; Кандилов, 1964; Мамедов и др., 1993; Абдуллаева, 2014). По данным Х.Г.Абдуллаевой (2014), этот паразит за весь период исследований встречался только лишь в конце осени и в зимние месяцы с экстенсивностью инвазии до 20% (интенсивность инвазии 7–11 экземпляров).

Класс: Пленчаторотые – Hymenostomata Delage et Herouard, 1896

Отряд: Tetrahymenida Faure-Fremiet, 1956

Семейство: Ophryoglenidae Kent, 1882

Вид: *Ichthyophthyrus multifiliis* Fouquet, 1876

Во время проведения нами ихтиопаразитологических исследований в период с 2005 по 2015 г. данный паразит был отмечен в Чайкенде в апреле (57,1%), в октябре (70%), в Чухур-Габале в апреле (15,4%), в июле (13,3%), в августе (15,4%), в октябре (100%) (Микаилов и др., 2012, 2013, 2015). В результате исследований годовиков каспийского лосося, привезенных из Габалинского и Чайкендского ЛРЗ в 2014–2015 гг., в Опытный морской рыбозаводный завод Азербайджана, прошедших период адаптации к морской воде (в первые 15 дней), у рыб был найден именно этот вид паразита. В первые 15 дней адаптации под воздействием морской воды рыбы потеряли всех остальных паразитов, а после этого срока, потеряв и *Ich. multifiliis*, были выпущены в море полностью стерильными.

Первые сведения о наличии этого паразита у каспийского лосося были в работах Гончарова (1956) и Нечаевой (1959) в Чайкендском и Чухур-Габалинском (массовая гибель) рыбзаводах. А.А.Гейдаровым (1969) были получены те же данные в обоих рыбзаводах. Паразит встречался во всех возрастных группах молоди (личинки, сеголетки, годовики, покотники, карликовые самцы) (Мамедов и др., 1993; Абдуллаева, 2014).

Класс: Кругоресничные – Peritricha F.Stein, 1859

Отряд: Peritrichida F.Stein, 1859

Семейство: Trichodinidae Claus, 1874

Вид: *Trichodina truttae* Mueller, 1937

Единичные экземпляры этого паразита отмечены А.А.Гейдаровым (1969) на коже сеголеток в Чухур-Габалинском и Чайкендском рыбзаводах. В Чайкендском рыбзаводе паразит встречается только в летние месяцы года (май-август), в Чухур-Габалинском рыбзаводе паразит встречается круглый год, однако экстенсивность и интенсивность заражения несколько повышается с марта по сентябрь.

Подцарство: Многоклеточные – Metazoa

Тип: Плоские черви – Plathelminthes

Класс: Моногенетические сосальщики – Monogenea (Van Beneden, 1858) Burchowsky, 1937

Отряд: Gyrodactylidea Burchowsky, 1937

Семейство: Gyrodactylidae Beneden et Hesse, 1863

Вид: *Gyrodactylus derjavini* Mikailov, 1975

Этот вид является обычным паразитом молоди лосося, выращиваемого в Чухур-Габалинском и Чайкендском рыбзаводах. Паразит встречается на всех возрастных группах рыб, но особенно сильно заражены сеголетки и годовики. Источником заражения молоди рыб этим паразитом является форель, встречающаяся в реках, используемых в рыбзаводах.

В проведенных за последнее время исследованиях было выявлено, что эта моногенея встречается на обоих заводах и во все сезоны с высокой интенсивностью инвазии: Чайкендский рыбозаводный завод – январь (Э.И. 84,2%, И.И. 1–49 экземпляров), апрель (Э.И. 100%, И.И. 94–158 экземпляров), июль (Э.И. 100%, И.И. 56–76 экземпляров), октябрь Э.И. 100%, И.И. 42–67 экземпляров); Чухур-Габалинский рыбозаводный завод – январь (Э.И. 100%, И.И. 1–21 экземпляров), апрель (Э.И. 40%, И.И. 1–12 экземпляров), июль (Э.И. 31%, И.И. 3–5 экземпляров), август (Э.И. 76,9%, И.И. 1–7 экземпляров) (Микаилов и др., 2013).

Некоторые авторы (Нечаева, 1960; Микаилов, 1958, 1962, 1965, 1975; Гейдаров, 1969; Абдуллаева, 2012с) отмечают, что гиродактилез ежегодно причиняет ощутимый ущерб молоди лосося, выращиваемого в Чухур-Габалинском и Чайкендском рыбзаводах.

Подробное изучение червей, собранных А.А.Гейдаровым (1969) и другими исследователями, (*Gyrodactylus* sp.) показало, что по некоторым весьма важным признакам они очень сильно



отличаются от *G. elegans* и *G. salaris*. В результате сравнительного изучения, Т.К.Микаилов (1975) пришел к заключению о том, что эти виды являются разными, что получило подтверждение со стороны Р.Эргенса, специалиста, разрабатывающего систематику представителей рода *Gyrodactylus* Европы (Ergens, 1973). Эти могогении являются самостоятельным видом – *Gyrodactylus derjavini* (Микаилов, 1975).

Класс: Ленточные черви – Cestoda Rudolphi, 1808

Отряд: Лентецы – Pseudophyllidea Carus, 1863

Семейство: Amphicotylidae Ariola, 1899

Вид: *Eubothrium crassum* Bloch, 1779

Син: *Taenia crassa* Bloch, 1779

Этот вид впервые в Азербайджане был обнаружен В.А.Догелем и Б.Е.Быховским (1939) в южной части Каспийского моря в районе острова Сара в кишечнике всех исследованных ими лососей. Паразит А.А.Гейдаровым (1969) встречен в кишечнике всех взрослых лососей, исследованных как в южной части Каспийского моря, так и в реке Кура и в садках Чайкендского рыбзавода. Во всех случаях интенсивность заражения рыб этим паразитом очень высокая и количество паразитов колеблется в пределах от 50 до 300 и более экземпляров. Заражение рыб этим паразитом, безусловно, происходит в акватории Каспийского моря, ибо известно, что лососи, мигрирующие из моря в реку, в течение всего нерестового периода не питаются. Х.Г.Абдуллаева (2014) обнаружила этих ленточных червей на Чайкендском и Габалинском ЛРЗ у самок-производителей каспийского лосося.

Класс: Трематоды – Trematoda Rudolphi, 1808

Отряд: Plagiorchida La Rue, 1957

Семейство: Bunoderidae Nicoll, 1914

Вид: *Bunodera luciopercae* Mueller, 1776

Син: *Distomum nodulosa* Mueller, 1776; *B. nodulosa* Looss, 1899

Впервые на территории Азербайджана эта трематода была обнаружена нами у 8-месячных мальков каспийского лосося на обоих ЛРЗ (Э.И. – 2,86%, И.И. – 3–7 экземпляров). Данный гельминт считается специфическим паразитом хищных рыб.

Отряд: Strigeidida (La Rue, 1926) Sudarikov, 1950

Семейство: Diplostomidae Poirier, 1886

Вид: *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819)

Син: *D. macrostomum* Shigin, 1965; *D. paracaudum* Shigin, 1977

На территории Азербайджана этот паразит был отмечен на Чайкендском и Габалинском ЛРЗ (Мамедов и др., 1993; Абдуллаева, 2011; Микаилов, 1958, 1975).

Тип: Круглые черви – Nematelminthes

Класс: Нематоды – Nematoda Rudolphi, 1808

Отряд: Spirurida Chitwood, 1933

Семейство: Rhabdochonidae Skrjabin, 1946

Вид: *Rhabdochona gnedini* Skryabin, 1946

Син: *Rh. latifilamentosa* Chiaberashvili, 1952; *Rh. sulaki* Saidov, 1953

Является характерным паразитом рыбы усач и нередко встречается в кишечнике форели (Микаилов, 1958). А.А.Гейдаровым (1969) этот паразит был обнаружен в кишечнике карликовых самцов каспийского лосося, выдерживаемого в форелевых каналах.

Семейство: Ascarophididae Trofimenko, 1967

Вид: *Cystidicoloides tenuissima* Zeder, 1800

Син: *Ascarophis tenuissima* Chandler, 1931; *C. salvelini* Fujita, 1920

А.А.Гейдаровым (1969) этот паразит был обнаружен в кишечнике карликовых самцов каспийского лосося, выдерживаемого в форелевых каналах. Из 500 исследованных рыб паразит встречался только у 20 экз. (4%), при интенсивности заражения 1–5 экз.

Тип: Скребни – Acanthocephales

Класс: Скребни – Acanthocephala Rudolphi, 1808

Отряд: Palaeacanthocephala Meyer, 1931

Семейство: Echinorhynchidae Cobbold, 1876

Вид: *Metechinorhynchus baeri* Kostylew, 1928

Син: *Echinorhynchus baeri* Kostylew, 1928

Редко встречающийся гельминт. Зараженность была отмечена на Чайкендском и Габалинском ЛРЗ.

Этот паразит нами был отмечен на Чухур-Габалинском ЛРЗ в мае (Э.И. – 23%, И.И. – 1–4 экземпляра) и в апреле 2011 года (Э.И. – 32%, И.И. – 1–3 экземпляра) у 1,5–2-летних каспийских лососей (Микаилов и др., 2012, 2013, 2015).

Гельминт был отмечен летом и в начале осени 2007 г. у 2-летних рыб (каспийский лосось и радужная форель) на Чайкендском ЛРЗ (Э.И. – 100%, И.И. – 21–35 экземпляров) (Абдуллаева, 2012а, 2012б; Абдуллаева, Пашаев, 1991).

Семейство: Pomphorhynchidae Yamaguti, 1905

Вид: *Pomphorhynchus laevis* Muller, 1776

Суп: *Echinorhynchus laevis* Muller, 1776

Впервые на территории Азербайджана этот паразит был обнаружен нами на Чухур-Габалинском ЛРЗ в январе 2011 года (Э.И. – 20%, И.И. – 1–2 экземпляра) у 2-летних рыб. Данный гельминт считается специфическим паразитом хищных рыб (Микаилов и др., 2013).

Тип: Кольчатые черви – Annelida

Класс: Пиявки – Hirudinea Lamarck, 1818

Отряд: Rhynchobdellida Blanchard, 1894

Семейство: Piscicolidae Johnston, 1865

Вид: *Piscicola geometra* L., 1761

Паразит был встречен как у сеголеток, годовиков каспийского лосося в круглых бассейнах, так и покатников и карликового лосося, содержащегося в Чухур-Габалинском и Чайкендском рыбзаводах (Гейдаров, 1969). В Чайкендском рыбзаводе паразит встречается вообще очень редко, а в Чухур-Габалинском, где зараженность молоди лосося достигает до 2% при интенсивности до 4 и более экз., заметно чаще.

Тип: Моллюски – Mollusca

Класс: Двустворчатые моллюски – Bivalvia Linne, 1758

Отряд: Unionoidea

Семейство: Unionidae

Вид: *Glochidium* sp.

Впервые на территории Азербайджана этот паразит был обнаружен нами на Чайкендском ЛРЗ в апреле 2007 года у 14-месячных рыб. Определение моллюска было возможно только до уровня рода (Микаилов и др., 2013).

Тип: Членистоногие – Arthropoda

Подтип: Жабродышащие – Branchiata

Класс: Ракообразные – Crustacea Lamarck, 1801

Семейство: Argulidae Muller, 1785

Вид: *Argulus foliaceus* Linnaeus, 1758

Это ракообразное было отмечено на Чайкендском и Габалинском ЛРЗ, а также в форелевых хозяйствах Шеки и Закаталах (Э.И. – 2,5%, И.И. – 2–12 экземпляров) (Мамедов и др., 1993).

Для проведения сравнительного анализа паразитофауны каспийского лосося на рыборазводных заводах Азербайджана нами были взяты данные исследований 1955–1975 гг. (Гончаров, Нечаева, Микаилов, Гейдаров), 1971–2009 гг. (Абдуллаева), 2005–2015 гг. (Микаилов, Ибрагимова, Рзаев) и составлена табл. 2.

В период исследований 1955–1975 гг. было выявлено 9 видов паразитов: 4 простейших – *C. necatrix*, *Ch. piscicola*, *T. truttae*, *Ich. multifiliis*, 1 моногенея – *Gyrodactylus* sp., 1 цестода – *E. crassum*, 2 нематоды – *Rh. gnedini*, *Cys. tenuissima*, 1 пиявка – *P. geometra*.

В 1971–2009 гг. было выявлено 8 видов паразитов: 3 простейших – *C. necatrix*, *Ch. piscicola*, *Ich. multifiliis*, 1 моногенея – *G. derjavini*, 1 трематода – *D. spathaceum*, 1 цестода – *E. crassum*, 1 скребень – *M. baeri*, 1 ракообразное – *A. foliaceus*.

В наших исследованиях в 2005–2015 гг. было отмечено 7 видов паразитов: 2 простейших – *C. necatrix*, *Ich. multifiliis*; 1 моногенея – *G. derjavini*; 1 трематода – *B. luciopercae*; 2 скребня – *M. baeri*, *P. laevis*; 1 моллюск – *Glochidium* sp.

Таблица 2.  
Сравнительный анализ паразитофауны каспийского лосося (1955–2015 гг.).

№	Вид паразита	1955–1975 гг.	1971–2009 гг.	2005–2015 гг.
	Простейшие	4	3	2
1	<i>Costia necatrix</i>	+	+	+
2	<i>Chilodonella piscicola</i>	+	+	-
3	<i>Trichodina truttae</i>	+	-	-
4	<i>Ichthyophthyrus multifiliis</i>	+	+	+
	Моногенеи	1	1	1
5	<i>Gyrodactylus derjavini</i>	+	+	+
	Цестоды	1	1	0
6	<i>Eubothrium crassum</i>	+	+	-
	Трематоды	0	1	1
7	<i>Bunodera luciopercae</i>	-	-	+
8	<i>Diplostomum spathaceum</i>	-	+	-
	Нематоды	2	0	0
9	<i>Rhabdochona gnedini</i>	+	-	-
10	<i>Cystidicoloides tenuissima</i>	+	-	-
	Акантоцефалы	0	1	2
11	<i>Metechinorhynchus baeri</i>	-	+	+
12	<i>Pomphorhynchus laevis</i>	-	-	+
	Пиявки	1	0	0
13	<i>Piscicola geometra</i>	+	-	-
	Моллюски	0	0	1
14	<i>Glochidium</i> sp.	-	-	+
	Ракообразные	0	1	0
15	<i>Argulus foliaceus</i>	-	+	-
	Всего	9	8	7

Всего в паразитофауне каспийского лосося отмечено 15 паразитов. Из них 8 эктопаразитов и 7 эндопаразитов. В каждый из трех периодов исследования эктопаразиты представляли большинство.

Как видно из табл. 1, в паразитофауне каспийского лосося произошло незначительное уменьшение количественного состава видов паразитов. Этот факт можно объяснить модернизацией заводов, появлением новых технологий по выращиванию лососевых и использованием более качественного корма для рыб.

По литературным данным, доминирующими в паразитофауне являются простейшие и нематоды, а по нашим данным – простейшие и скребни. В совокупности за весь период существования заводов неизменно доминирующей фауной являются простейшие. Это можно объяснить их малыми размерами, которые позволяют беспрепятственно преодолевать любые фильтры. Помимо этого, они являются паразитами с прямым циклом развития, что тоже облегчает возможность наибольшего инвазирования рыб. И тот факт, что простейшие особо чувствительны к увеличению температурного фактора, который служит для них стимулом к размножению в неограниченном количестве, также повышает шансы простейших быть доминантами.

Изменения качественного состава представлены следующим образом: паразиты, которые присутствовали в предыдущих исследованиях, но не отмечены нами – 1 цестода (*E. crassum*), 2 нематоды (*Rh. gnedini*, *Cys. tenuissima*), 1 пиявка (*P. geometra*), 1 ракообразное (*A. foliaceus*); паразиты, которые были отмечены нами, но отсутствовали в предыдущих исследованиях – 1 моллюск (*Glochidium* sp.). Исчезновение из состава паразитофауны представителей цестод, нематод и ракообразных можно объяснить тем, что эти паразиты имеют сложный цикл развития с участием промежуточных хозяев. Этот факт усложняет заражение рыб данными паразитами в условиях ЛРЗ.

Паразиты, которые были отмечены во всех трех исследованиях: простейшие – *C. necatrix*, *Ich. multifiliis*, моногенея – *G. derjavini*. Объяснить такое постоянство в нахождении данных простейших можно их широкой специфичностью ко всем пресноводным рыбам. Лидирующее положение моногенеи обусловлено узкой специфичностью этого вида по отношению к лососевым.

Большое влияние на зараженность рыб *G. derjavini* оказывает плотность популяции. Следует отметить, что эктопаразитарные заболевания происходят намного быстрее при высокой плотности посадки рыб.

Впервые на территории Азербайджана в паразитофауне каспийского лосося нами были отмечены трематода *B. luciopercae*, скребень *P. laevis*, моллюск *Glochidium* sp. *B. luciopercae* и *P. laevis* были выявлены на обоих ЛРЗ и в различные сезоны года с разной экстенсивностью и интенсивностью инвазии и являются специфичными паразитами хищных рыб. *Glochidium* sp. был обнаружен единожды на Чайкендском ЛРЗ.

Все найденные паразиты являются условно-патогенными для молоди и взрослых особей каспийского лосося, и вызываемые ими болезни могут нанести ощутимый ущерб лососевым рыборазводным заводам. В ходе исследований паразитов, патогенных для человека, не было выявлено.

### Выводы

За период с 1955 по 2015 гг. на лососевых рыборазводных заводах Азербайджана у каспийского лосося всего выявлено 15 видов паразитов (*C. necatrix*, *Ch. piscicola*, *T. truttae*, *Ich. multifiliis*, *G. derjavini*, *D. spathaceum*, *B. luciopercae*, *E. crassum*, *Rh. gnedini*, *Cys. tenuissima*, *M. baeri*, *P. laevis*, *A. foliaceus*, *P. geometra*, *Glochidium* sp.).

В первые годы после создания ЛРЗ было отмечено 9, а в наших исследованиях было выявлено 7 видов паразитов, таким образом изменение количественного состава неощутимо. Отмечено, что значительно изменился качественный состав паразитофауны каспийского лосося: паразиты *Ch. piscicola*, *T. truttae*, *E. crassum*, *Rh. gnedini*, *Cys. tenuissima*, *P. geometra*, найденные в первые годы исследований, не были отмечены у нас, а *B. luciopercae*, *M. baeri*, *P. laevis*, *Glochidium* sp., выявленные в наших исследованиях, не отмечались в первые годы.

Впервые в Азербайджане на ЛРЗ в паразитофауне каспийского лосося нами были отмечены два специфичных для хищных рыб паразита – трематода *B. luciopercae* и скребень *P. laevis*, а также моллюск *Glochidium* sp.

Паразиты *C. necatrix*, *Ich. multifiliis*, *G. derjavini*, *M. baeri*, *P. laevis*, *B. luciopercae*, отмеченные в период с 2005 по 2015 гг., являются условно-патогенными для каспийского лосося и способны принести ощутимый вред лососевым рыборазводным заводам.

В ходе исследований паразитофауны каспийского лосося, являющегося частью пищевого рациона населения страны, паразитов, патогенных для человека, не обнаружено.

### Список литературы / References

- Абдуллаева Х.Г. Паразитарные болезни рыб / Ветеринарная медицина. Справочник. – Баку, 2005. – С. 341–359. (на азерб. языке) /Abdullayeva Kh.G. Parasitic diseases of fishes / Veterinary medicine. Reference book. – Baku, 2005. – P. 341–359. (in Azerbaijan)/
- Абдуллаева Х.Г. К изучению распространения диплостомоза среди рыб в рыбоводческих хозяйствах Азербайджана // Вестник Харьковского национального университета. Серия «Биология». – 2011. – Вып.14, №971. – С. 98–102. /Abdullayeva Kh.G. To the study of the distribution of diplostomosis among fish in Azerbaijan hatcheries // Bulletin of the Kharkov National University. Series "Biology". – 2011. – Issue 14, no. 971. – P. 98–102./
- Абдуллаева Х.Г. Эпизоотологическое состояние в рыборазводных заводах и форелевых хозяйствах по паразитозам рыб // Известия НАНА. Нахичеванское отделение. – 2012а. – Т.8, №2. – С. 212–217. (на азерб. языке) /Abdullayeva Kh.G. Epizootic state in fish hatcheries and trout farms for fish parasitoses // News of ANAS of Nakhchivan Department. – 2012a. – Vol.8, no. 2. – P. 212–217. (in Azerbaijan)/
- Абдуллаева Х.Г. Сравнительное исследование распространения паразитозов в лососевых и карповых хозяйствах // Аграрная наука Азербайджана. – 2012b. – №3. – С. 81–83. (на азерб. языке) /Abdullayeva Kh.G. Comparative study of parasitoses distribution in salmon and carp farms // Agrarian Science of Azerbaijan. – 2012b. – No. 3. – P. 81–83. (in Azerbaijan)/
- Абдуллаева Х.Г. Дактилогироз и гиродактилез рыб и меры борьбы с ними // Экологический вестник. – 2012с. – №1 (19). – С. 11–16. /Abdullayeva Kh.G. Dactylogyrosis and gyro-dactylosis of fish and their control measures // Ecological Bulletin. – 2012. – No. 1 (19). – P. 11–16./

- Абдуллаева Х.Г. Главнейшие паразитарные заболевания рыб и меры борьбы с ними в рыбоводных хозяйствах Азербайджана. Дисс. ... док. биол. наук. – Баку, 2014. – 286с. /Abdullayeva Kh.G. The main parasitic diseases of fish and measures to combat them in fish farms of Azerbaijan. Dr Thesis. – Baku, 2014. – 286p./
- Абдуллаева Х.Г., Пашаев Г.А. Первые данные о паразитах Загатальского форелевого хозяйства / Календарь сельского хозяйства. – 1991. – С. 26–29. (на азерб. языке) /Abdullayeva Kh.G., Pashayev G.A. . The first data on parasites of Zagatala trout farm / Agriculture calendar. – 1991. – P. 26–29. (in Azerbaijan)
- Бауер О.Н. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.1. Простейшие. – Л.: Наука, 1984. – 431с. /Bauer O.N. Determinant of parasites of freshwater fish fauna of the USSR. T.1. Protozoa. – L.: Nauka, 1984. – 431p./
- Бауер О.Н. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.2. Паразитические многоклеточные (Первая часть). – Л.: Наука, 1985. – 428с. /Bauer O.N. Determinant of parasites of freshwater fish fauna of the USSR. T.2. Parasitic multicellular (First part). – L.: Nauka, 1985. – 428p./
- Бауер О.Н. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3. Паразитические многоклеточные (Вторая часть). – Л.: Наука, 1987. – 587с. /Bauer O.N. Determinant of parasites of freshwater fish fauna of the USSR. T.3. Parasitic multicellular (Second part). – L.: Nauka, 1987. – 587p./
- Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. – М.-Л.: АН СССР, 1952. – С.63. /Bykhovskaya-Pavlovskaya I.E. Parasitological study of fishes. – M.-L.: AS USSR, 1952. – P.63./
- Гейдаров А.А. Паразиты и болезни молоди Каспийского лосося на рыбоводных заводах Азербайджана и меры борьбы с ними. Дисс. ... канд. биол. наук. – Баку, 1969. – 154с. /Geydarov A.A. Parasites and diseases of the Caspian salmon in hatcheries of Azerbaijan and measures to combat them. PhD Thesis. – Baku, 1969. – 154p./
- Гончаров Г.Д. Борьба с заболеваниями икры и молоди лососевых рыб на рыбоводных заводах. – М.: Рыбная промышленность СССР, 1956. – С. 17–20. /Goncharov G.D. Fighting diseases of eggs and juveniles of salmonids in hatcheries. – M.: Fishery industry of the USSR, 1956. – P. 17–20./
- Гусев А.В. Методика сбора и обработка материалов по моногенам, паразитирующим у рыб. – Л.: Наука, 1983. – 47с. /Gusev A.V. Method of collection and processing of materials on monogenes parasites of fishes. – L.: Nauka, 1983. – 47p./
- Догель В.А., Быховский Б.Е. Паразиты рыб Каспийского моря // Труды по комплексному изучению Каспийского моря. – М.: АН СССР, 1939. – В.4. – С. 1–27. /Dogel V.A., Bykhovskiy B.E. Fish parasites of the Caspian Sea // Proceedings on the comprehensive study of the Caspian Sea. – M.: AS USSR, 1939. – Vol.4. – P. 1–27./
- Ибрагимов Ш.Р. Паразиты и болезни рыб Каспийского моря (Эколого-географический анализ, эпизоотологическая и эпидемиологическая оценка). – Баку: Элм, 2012. – 400с. /Ibragimov Sh.R. Parasites and fish diseases of the Caspian Sea (Ecological-geographical analysis, epizootological and epidemiological assessment). – Baku: Elm, 2012. – 400p./
- Кандилов Н.К. Паразитические простейшие рыб бассейна р. Куры. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Баку, 1964. – 14с. /Kandilov N.K. Parasitic protozoans of fish of the river Kura basin. Abstract of PhD Thesis. – Baku, 1964. – 14p./
- Мамедов А.Г., Абдуллаева Х.Г., Пашаев Г.А. Картограмма распределения основных паразитарных заболеваний рыб в рыбоводных бассейнах Азербайджана и способы борьбы с ними. – Баку, 1993. – 62с. (на азерб. языке) /Mamedov A.G., Abdullayeva Kh.G., Pashayev G.A. Cartogram of the distribution of the main parasitic diseases of fish in the fish basins of Azerbaijan and ways to combat them. – Baku, 1993. – 62s. (in Azerbaijan)
- Микаилов Т.К. Паразитофауна промысловых рыб р. Куры. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Баку, 1958. – 23с. /Mikailov T.K. Parasitofauna of commercial fish of Kura river. Abstract of PhD Thesis. – Baku, 1958. – 23p./
- Микаилов Т.К. Паразитофауна мальков и методы борьбы с ними в Чухур-Габалинском и Чайкендском рыбзаводных заводах // Гельминтологические исследования в Азербайджане. – Баку, 1962. – С. 93–95. (на азерб. языке) /Mikailov T.K. Parasitofauna of fry and methods to combat them in Chukhur-Gabala and Chaikend fish hatcheries // Helminthological research in Azerbaijan. – Baku, 1962. – P. 93–95. (in Azerbaijan)
- Микаилов Т.К. Основные паразиты рыб рыбоводческих хозяйствах Азербайджана и методы борьбы // Известия НАНА. – Баку, 1965. – С.48. (на азерб. языке) /Mikailov T.K. The main fish parasites of Azerbaijan fish farms and methods to combat them // Proceedings of NASA. – Baku, 1965. – P.48. (in Azerbaijan)
- Микаилов Т.К. Паразиты рыб водоемов Азербайджана. – Баку: Элм, 1975. – 297с. /Mikailov T.K. Parasites of fishes of reservoirs of Azerbaijan. – Baku: Elm, 1975. – 297p./
- Микаилов Т.К., Ибрагимова Н.Э., Рзаев Ф.Г. Сезонная динамика паразитофауны молоди Каспийского лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) и радужной форели (*Salmo gairdneri* Rich.) в Чайкендском лососевом рыбообразном заводе // Вестник Инновационного Евразийского Университета. – 2012. – №3 (47). – С. 210–215. /Mikailov T.K., Ibragimova N.E., Rzayev F.H. Seasonal dynamics of the parasitofauna of juveniles of the Caspian salmon (*Salmo trutta caspius* Kessler) and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) in the Chaikend salmon fowling plant // Bulletin of the Innovative Eurasian University. – 2012. – No. 3 (47). – P. 210–215./

- Микайлов Т.К., Ибрагимова Н.Э., Рзаев Ф.Г. Сравнительный анализ сезонной и возрастной динамики паразитофауны молоди каспийского лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) на Габалинском и Чайкендском лососевом рыбозаводном заводах // Экологический вестник. Минск. – 2013. – №4 (26). – С. 109–116. /Mikailov T.K., Ibragimova N.E., Rzayev F.H. Comparative analysis of seasonal and age dynamics of the parasitofauna of juveniles of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius* Kessler) at the Gabala and Chaikend salmon fish farms // Ecological Bullitin. – Minsk, 2013. – No. 4 (26). – P. 109–116./
- Микайлов Т.К., Ибрагимова Н.Э., Рзаев Ф.Г. Сезонная и возрастная динамика паразитофауны молоди каспийского лосося (*Salmo trutta caspius* Kessler) и радужной форели (*Salmo gairdneri* Rich.) на Габалинском лососевом рыбозаводном заводе // Экологический вестник. – 2015. – №4 (34). – С. 103–110. /Mikailov T.K., Ibragimova N.E., Rzayev F.H. Seasonal and age dynamics of the parasitofauna of juveniles of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius* Kessler) and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) at the Gabala salmon fish farm // Ecological Bullitin. – 2015. – No. 4 (34). – P. 103–110./
- Нечаева Н.Л. Паразитарные болезни молоди Куринского лосося на рыбозаводах и меры борьбы с ними // Труды ихтиологической комиссии. – М.-Л.: АН СССР, 1959. – В.9. – С. 91–93. /Nechayeva N.L. Parasitic diseases of juveniles of the Kura salmon in hatcheries and measures to combat them // Proceedings of the Ichthyological Commission. – M.-L.: AS USSR, 1959. – Vol.9. – P. 91–93./
- Нечаева Н.Л. Борьба с костииозом и гиродактилезом на лососевых заводах // Рыбное хозяйство. – 1960. – №2. – С. 24–26. /Nechayeva N.L. The fight against costiosis and gyroductylosis at salmon plants // Fish industry. – 1960. – No. 2. – P. 24–26./
- Прохоров А.М. Лососи // Большая Советская Энциклопедия (3-е изд.). – М.: Советская Энциклопедия, 1974. – Т.15. – 632с. /Prokhorov A.M. Salmon // Great Soviet Encyclopedia (3rd ed.). – Moscow: Soviet Encyclopedia, 1974. – Vol.15. – 632p./
- Ergens R. Gyrodactylus from Eurasian freshwater Salmonidae and Thymallidae // Folia Parasitologica. – 1973. – Vol.30. – P.15–26.

Представлено: Х.Г.Абдуллаева / Presented by: Kh.G.Abdullayeva

Рецензент: С.Ю.Утевський / Reviewer: S.Yu.Utevsky

Подано до редакції / Received: 20.12.2017

**About the authors:** N.E.Ibrahimova – Institute of Zoology, Azerbaijan National Academy of Sciences, A.Abbas-zadeh Str., passage 128, block 504, Baku, Azerbaijan, AZ1004, ibragimova.n.e@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4531-3823>

F.H.Rzayev, Institute of Zoology, Azerbaijan National Academy of Sciences, A.Abbas-zadeh Str., passage 128, block 504, Baku, Azerbaijan, AZ1004, fuad.zi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8128-1101>

**Про авторів:** Н.Е.Ібрагімова – Інститут зоології НАН Азербайджану, вул. А.Аббасзаде, 1128 пров., 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, ibragimova.n.e@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4531-3823>

Ф.Г.Рзаєв – Інститут зоології НАН Азербайджану, вул. А.Аббасзаде, 1128, пров. 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, fuad.zi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8128-1101>

**Об авторах:** Н.Э.Ибрагимова – Институт зоологии НАН Азербайджана, ул. А.Аббасзаде, 1128 пер., 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, ibragimova.n.e@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4531-3823>

Ф.Г.Рзаев – Институт зоологии НАН Азербайджана, ул. А.Аббасзаде, 1128, пер. 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, fuad.zi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8128-1101>

## ... КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ... CELL BIOLOGY ...

УДК: 612.811.3.085.2:576.31

### **Вплив складу живильного середовища на морфологічні характеристики культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят** С.Г.Алі, О.С.Сидоренко, Г.А.Божок

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)  
bozhokgaru@gmail.com*

Спінальні ганглії (СГ) є потенційним джерелом нейральних стовбурових клітин, оскільки містять клітини-похідні нервового гребеню, здатні до диференціювання в нейрони та клітини глії. Адекватною сучасною моделлю для досліджень *in vitro* можна вважати культури клітин, отримані від тварин, близьких за фізіологічними характеристиками до людини. В цьому відношенні зручним модельним об'єктом є культури клітин, отримані зі СГ свині домашньої (*Sus scrofa domesticus*). Метою роботи було отримання первинної культури клітин зі СГ неонатальних поросят і вивчення їх морфологічних і проліферативних властивостей в залежності від складу середовища культивування. Склад середовищ, приготованих на основі  $\alpha$ -MEM, варіювався залежно від наявності фетальної телячої сироватки (ФТС) або її сучасних замінників В-27 та НейроМакс. Встановлено морфологічні відмінності первинних культур клітин СГ неонатальних поросят в залежності від складу живильного середовища. При культивуванні в присутності 10% ФТС спостерігається прикріплення клітин та формування моношару з мантійних гліоцитів (МГ) і фібробластоподібних клітин. На моношарі присутні невеликі колонії нейронів, які продукують довгі відростки. При культивуванні в присутності НейроМакс та В-27 основна маса клітин не прикріплюється, але організується у флотуючі мультиклітинні сфероїди (МС). При пересіві культури, отриманої в присутності 10% ФТС, спостерігається швидке прикріплення та проліферація клітин. При пересіві МС, отриманих в присутності НейроМакс та В-27, в середовище з 10% ФТС спостерігається прикріплення МС до субстрату та міграція з них клітин. Ці клітини зберігають здатність до активної проліферації, оскільки на 5–7 добу субкультивування моношар досягає конфлюентності. Незалежно від складу середовища первинного культивування у всіх субкультурах морфологічно розрізняються 3 типи клітин: МГ, нейроноподібні та фібробластоподібні клітини. Тип клітин, що превалює в субкультурі, залежить від складу живильного середовища. При пересіві МС з середовища, яке містило В-27, спостерігається значне зростання фібробластоподібних клітин, тоді як при пересіві МС з середовища, яке містило НейроМакс, були присутні в основному МГ та нейроноподібні клітини.

**Ключові слова:** культура клітин спінальних гангліїв, неонатальні поросята, мантійні гліоцити, мультиклітинні сфероїди, нейрони.

### **Influence of nutrient medium composition on the morphological characteristics of culture of dorsal root ganglion cells of neonatal piglets** S.G.Ali, O.S.Sidorenko, G.A.Bozhok

Dorsal root ganglion (DRG) is a potential source of neural stem cells because it contains neural crest derived cells that are capable to differentiate into neurons and glial cells. Cell cultures obtained from animals that are close to humans by physiological characteristics can be regarded as an adequate modern model for *in vitro* studies. In this respect, DRG cell culture obtained from the domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) is a convenient model. The aim of the work was to obtain a primary cell culture of DRG of neonatal piglets and to study its morphological and proliferative properties depending on culture medium composition. The composition of the media prepared on the basis of  $\alpha$ -MEM varied depending on the presence of fetal calf serum (FCS) or its modern supplements B-27 and NeuroMax. It is established that morphological differences of primary DRG cell cultures of neonatal pigs depend on the composition of the nutrient medium. When cultured in the presence of 10% FCS, the formation of monolayer which includes satellite glial cells (SGC) and fibroblast-like cells was observed. Small colonies of neurons producing long processes were on the monolayer. When cultured in the presence of NeuroMax and B-27 supplements, the bulk of the cells is not attached, but organized into floating multicellular spheroids (MS). With the passage of culture obtained in the presence of 10% FCS, rapid attachment and proliferation of cells was observed. When MS obtained in the presence of NeuroMax and B-27 were transferred to the medium with 10% FCS, the attachment of MS to the substrate and cell migration were observed. The cells retain the ability to actively proliferate, because the

monolayer achieves confluence by 5–7 days of subculture. Regardless of the composition of the primary culture medium, there were 3 morphologically different types of cells in the subcultures: SGC, neuron-like and fibroblast-like cells. The type of cells prevailing in the subculture depends on the composition of the nutrient medium. When MS is transferred from a B-27-containing medium, a significant growth of fibroblast-like cells is observed, whereas when MS is transferred from NeuroMax-containing medium MG and neuron-like cells were abundant.

**Key words:** culture of dorsal root ganglion cells, neonatal pigs, satellite glial cells, multicellular spheroids, neurons.

## Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят

С.Г.Али, О.С.Сидоренко, Г.А.Божок

Спинальные ганглии (СГ) являются потенциальным источником нейральных стволовых клеток, поскольку содержат клетки-производные нервного гребня, способные к дифференцировке в нейроны и глиальные клетки. Адекватной современной моделью для исследований *in vitro* можно считать культуры клеток, полученные от животных, близких по физиологическим характеристикам к человеку. В этом отношении удобным модельным объектом являются культуры клеток, полученные из СГ свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*). Целью работы было получение первичной культуры клеток из СГ неонатальных поросят и изучение ее морфологических и пролиферативных свойств в зависимости от состава среды культивирования. Состав сред, приготовленных на основе  $\alpha$ -MEM, варьировался в зависимости от наличия фетальной телячьей сыворотки (ФТС) или ее современных заменителей B-27 и НейроМакс. Установлены морфологические различия первичных культур клеток СГ неонатальных поросят в зависимости от состава питательной среды. При культивировании в присутствии 10% ФТС наблюдается прикрепление клеток и формирование монослоя из мантийных глиоцитов (МГ) и фибробластоподобных клеток. На монослое присутствуют небольшие колонии нейронов, продуцирующих длинные отростки. При культивировании в присутствии НейроМакс и B-27 основная масса клеток не прикрепляется, а организовывается во флотирующие мультиклеточные сфероиды (МС). При пересеве культуры, полученной в присутствии 10% ФТС, наблюдается быстрое прикрепление и пролиферация клеток. При пересеве МС, полученных в присутствии НейроМакс и B-27, в среду с 10% ФТС наблюдается прикрепление МС к подложке и миграция из них клеток. Данные клетки сохраняют способность к активной пролиферации, поскольку к 5–7 суткам субкультивирования монослой достигает конfluence. Независимо от состава среды первичного культивирования во всех субкультурах морфологически различаются 3 типа клеток: МГ, нейроноподобные и фибробластоподобные клетки. Тип клеток, преобладающий в субкультуре, зависит от состава питательной среды. При пересеве МС из B-27-содержащей среды наблюдается значительный рост фибробластоподобных клеток, тогда как при пересеве МС из НейроМакс-содержащей среды в основном присутствовали МГ и нейроноподобные клетки.

**Ключевые слова:** культура клеток спинальных ганглиев, неонатальные поросята, мантийные глиоциты, мультиклеточные сфероиды, нейроны.

### Введение

Спинальные ганглии (СГ) являются потенциальным источником нейральных стволовых клеток, поскольку было показано, что они содержат клетки-производные нервного гребня (КПНГ), которые способны дифференцироваться в нейроны и различные субпопуляции глиальных клеток (Ciaroni et al., 2000; Lagares et al., 2007; Li et al., 2007; Singh et al., 2009). Эксперименты показывают, что нейрогенез в СГ поддерживается на протяжении всей жизни за счет этой популяции покоящихся стволовых/прогениторных клеток (Farel, 2003).

Отдельный интерес представляют собой мантийные глиоциты (МГ), в англоязычной литературе известные как «satellite glial cells». Они представляют собой специализированные клетки, окружающие нейроны в ганглиях периферической нервной системы. Считается, что МГ участвуют в регуляции химического микроокружения нейронов, осуществляют структурную и трофическую поддержку нейронов, выделяют глиотрансммиттеры и облегчают передачу сигнала (Hanani, 2005, 2010; Gu et al., 2010). Установлена важная роль МГ в патогенезе некоторых неврологических расстройств и, особенно, в состояниях, сопровождающихся хроническим болевым синдромом (Caruano et al., 2009; Hanani, 2012; Warwick, Hanani, 2013).



Технологии культивирования, разработанные за прошедшие годы, позволили получить несколько типов культур из СГ: обогащенные нейронами, МГ или шванновскими клетками, а также культуры, содержащие стволовые КПНГ (Backström et al., 2000; Svehngisen et al., 2004; Li et al., 2007; de Luca et al., 2015; Tongtako et al., 2017).

Нужно отметить, что основной пул работ по культивированию МГ и изучению влияния различных физико-химических и фармакологических факторов проведен на СГ, полученных от крыс или мышей. Однако при интерпретации такого рода данных и попытке переноса их в область практической медицины или фармакологии нужно учитывать значительные эволюционные различия, наблюдаемые между организмами лабораторных грызунов и человека. В связи с этим существует задача по получению культуры клеток МГ от вида животных, который является более близким по физиологическим характеристикам к человеку.

В этом отношении удобным модельным объектом является свинья домашняя (*Sus scrofa domestica*) из-за физиологического сходства с человеком, а также наличия геномных, транскриптомных и протеомных инструментов анализа, уже разработанных для данного вида. Кроме того, в настоящее время существует широкий спектр линейных и трансгенных пород свиней, что делает удобным их применение в качестве биомедицинских моделей (Bassols et al., 2014). Однако до сих пор не было предпринято попытки получения первичной культуры клеток из СГ свиньи и характеристики ее морфофункциональных свойств.

Цель работы – получить первичную культуру клеток из спинальных ганглиев неонатальных поросят и изучить влияние состава питательной среды на ее морфологические и пролиферативные характеристики.

#### **Материалы и методы исследования**

Для получения суспензии клеток использовали СГ поросят возраста P0–P1. После извлечения СГ помещали в охлажденную среду  $\alpha$ -MEM (Биолот, Россия), содержащую 100 мкг/мл гентамицина (НПП «ПанЭко», Россия), 100 мкг/мл цефотаксима (Биосинтез, Россия), 2,5 мкг/мл амфотерицина В (Biowest, Франция). СГ подвергали ферментативной дезагрегации в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 1,25 мг/мл коллагеназы типа IA (НПП «ПанЭко») с последующей обработкой 0,25% раствором трипсина-ЭДТА с солями Хенкса (НПП «ПанЭко») по методу de Luca и соавт. (de Luca et al., 2015). Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Сохранность полученных клеток, которую контролировали с помощью окрашивания 0,4% раствором трипанового синего, во всех опытах составляла  $80 \pm 10$  %.

Клетки высевали в концентрации  $5 \times 10^5$  кл/мл и культивировали в пластиковых чашках Петри с поверхностью, обработанной поли-D-лизином (Orange Scientific, Бельгия) при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

В работе были использованы среды следующего состава:

Среда 1 –  $\alpha$ -MEM, 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, BioSera, Франция), по 100 мкг/мл гентамицина/цефотаксима, 2,5 мкг/мл амфотерицина В;

Среда 2 –  $\alpha$ -MEM, 2% В-27 (Thermo Fisher Scientific, США), по 100 мкг/мл гентамицина/цефотаксима, 2,5 мкг/мл амфотерицина В;

Среда 3 –  $\alpha$ -MEM, 2% НейроМакс (НПП «ПанЭко»), по 100 мкг/мл гентамицина/цефотаксима, 2,5 мкг/мл амфотерицина В.

Для субкультивирования клетки первичной монослойной культуры открепляли от подложки 0,25% раствором трипсина-ЭДТА с солями Хенкса (НПП «ПанЭко»).

Флотирующие мультиклеточные сфероиды (МС), полученные при культивировании в средах 2 и 3, на 5-е сутки переносили в 24-луночные планшеты (SPL LifeSciences, Корея) и продолжали культивировать в среде 1 в течение 10 суток. Замену среды (или половины среды в случае культивирования МС) осуществляли каждые 3–4 суток.

Для морфологического и морфометрического анализа клеточный монослой фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma, США) в течение 15 минут, затем отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH=7,4, Biowest) и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Микрофотосъемку осуществлял с помощью инвертированного микроскопа Биомед-4И (Россия) с видеоокулярном TourCam 9 Мпкс (Китай). Морфометрический анализ проводили по микрофотографиям с использованием программы TourView 3.7 (Китай).

Количественные данные экспериментов представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение. Статистический анализ данных осуществляли с помощью стандартных пакетов компьютерных программ Excel и Past. Вид распределения определяли с помощью W-критерия Шапиро-Уилка, достоверность различий между группами данных рассчитывали с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента (для групп с нормальным распределением данных) и непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (для групп с ненормальным распределением данных). Расхождение считали статистически значимым, если  $p < 0,05$ .

### Результаты

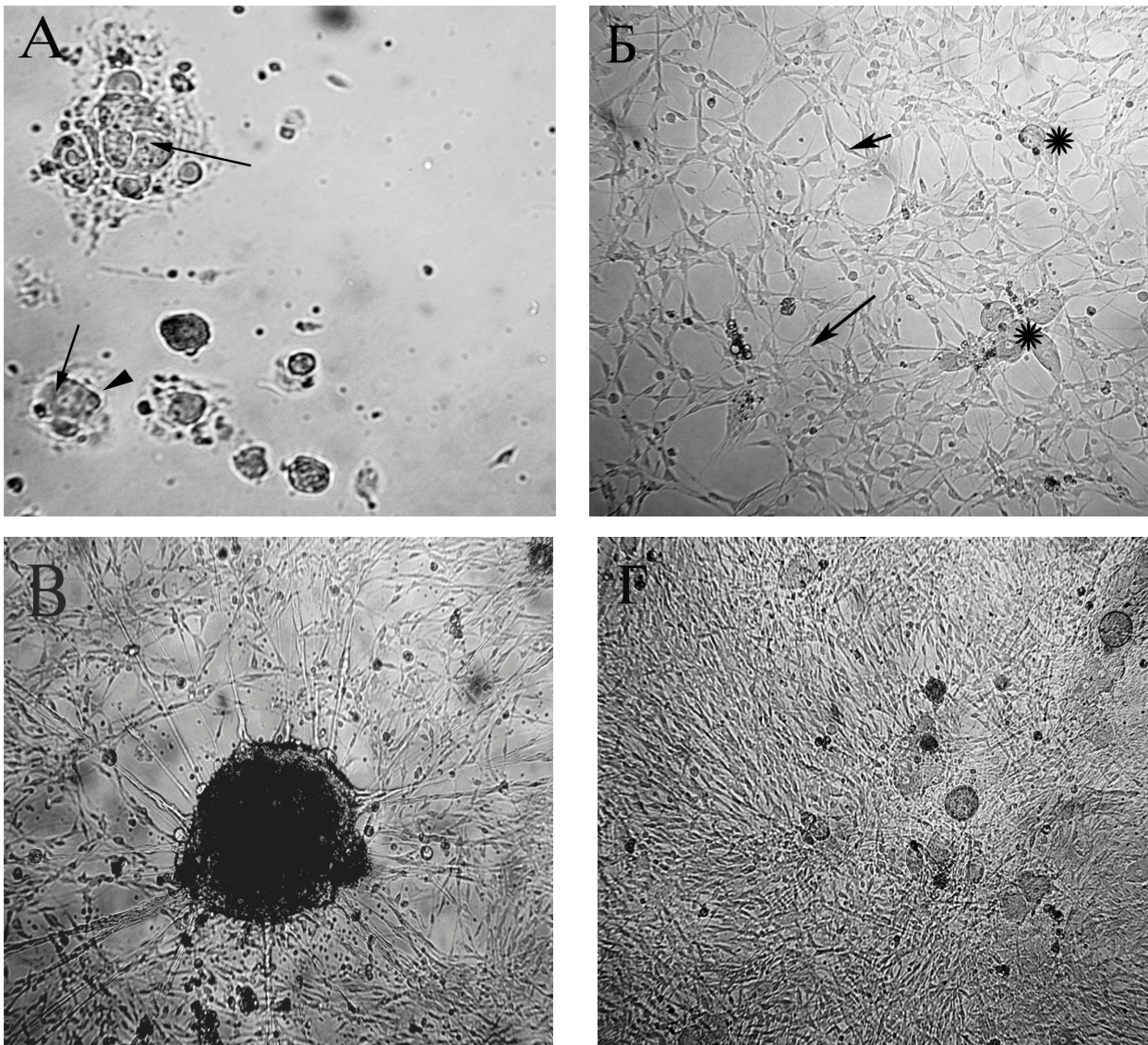
В работах предыдущих авторов было установлено, что использование питательных сред, обогащенных сывороткой, является необходимым условием для долгосрочного поддержания и пролиферации МГ в культуре *in vitro* (Hayden, Seeds, 1996; Belzer et al., 2010; Tongtako et al., 2017), тогда как для обогащения культуры нейронами необходимо использование специальных ростовых добавок и сред (Neurobasal medium, N2, фактор роста нервов, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста). В нашей работе был сделан выбор в пользу получения культуры, обогащенной МГ, поэтому одной из сред, в которой производили культивирование, была питательная среда с 10% ФТС (среда 1).

ФТС представляет собой наиболее популярную добавку к среде культивирования, поскольку содержит жизненно важные питательные вещества, белки-переносчики и факторы роста, необходимые для поддержания клеток млекопитающих *in vitro*. Однако большим минусом при использовании данного компонента питательной среды является недостижимость одинакового состава сывороток разных партий, риск микробной контаминации и возможная цитотоксичность, поэтому в последнее время появилась тенденция к использованию заменителей сыворотки, например, таких как В-27 и НейроМакс. В связи с этим в нашей работе при культивировании клеток СГ неонатальных поросят нами были использованы среды с заменителями ФТС (среды 2 и 3).

На рис. 1 представлены микрофотографии, позволяющие охарактеризовать морфологические особенности культур клеток СГ, полученных в питательных средах разного состава.

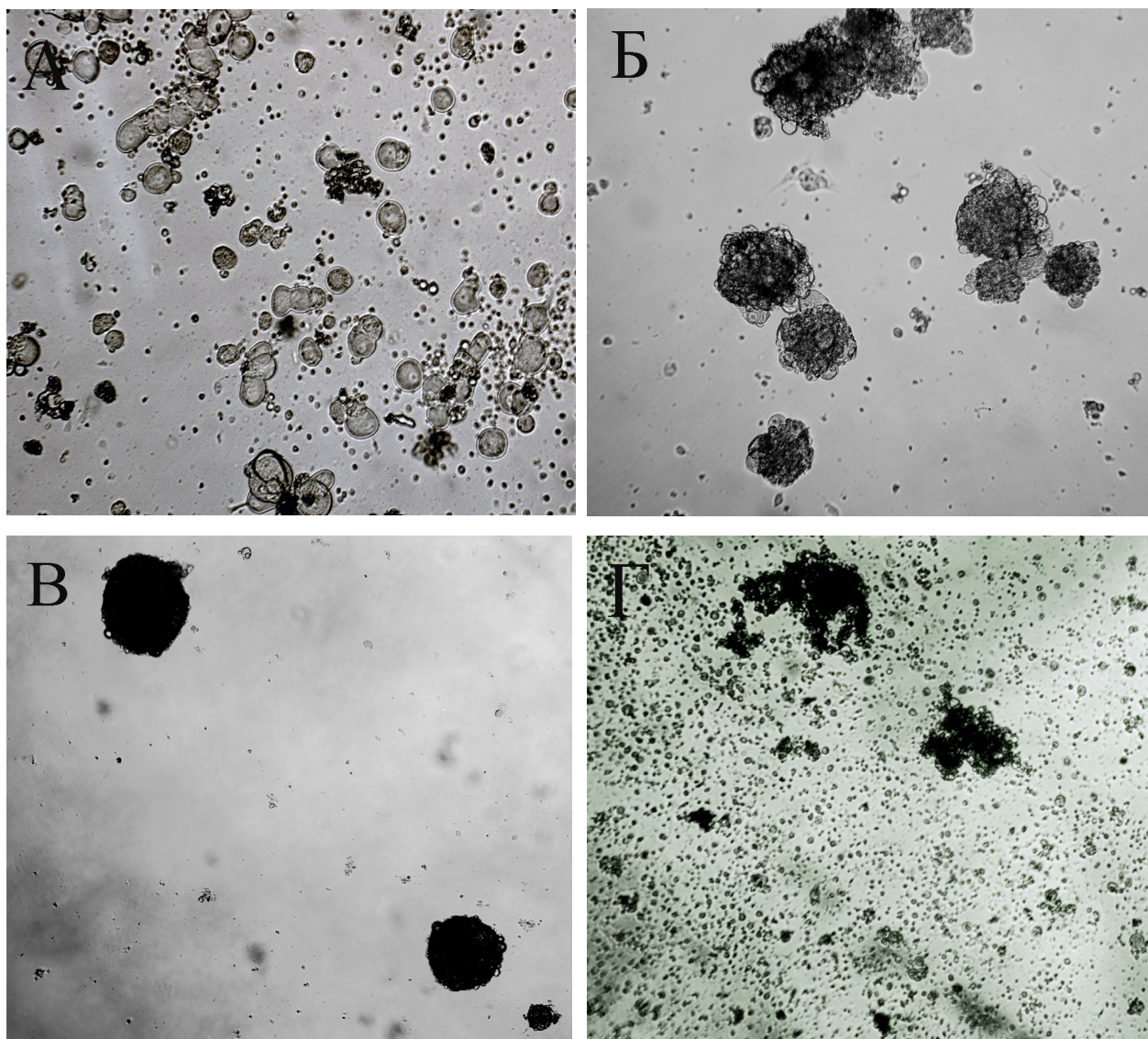
Так, при культивировании клеток в присутствии 10% ФТС, клетки прикреплялись к поверхности в течение первых суток. В это время в культуре можно наблюдать светлые крупные клетки, представляющие собой тела чувствительных нейронов, окруженные группами мелких округлых МГ (рис. 1, А). На 3 сутки морфологические особенности полученной культуры клеток изменялись. Вокруг скоплений, состоящих из тел чувствительных нейронов, наблюдалось расселение и пролиферация 2 типов клеток: полигональных клеток с крупными уплощенными отростками и веретеновидных клеток с двумя тонкими отростками, которые в работах других авторов были идентифицированы как МГ (рис 1, Б).

К 5 суткам образовывался монослой, преимущественно состоящий из МГ. Кроме того, в культуре наблюдались крупные распластаные фибробластоподобные клетки. В некоторых местах сохранялись кластеры нейронов, формировавших длинные радиальные тяжи (рис. 1, В). На 15 сутки культивирования заметно, что крупные одиночные нейроны и клеточные кластеры располагаются на подложке, образованной разросшимися в несколько слоев МГ и спорадически расположенными фибробластоподобными клетками (рис. 1, Г). Наши результаты совпадают с данными других авторов, которые наблюдали подобную морфологическую картину при культивировании в питательной среде с добавлением сыворотки клеток СГ собак (Tongtako et al., 2017), куриных (Mudge, 1981) и мышиных (Backström et al., 2000) эмбрионов, ганглиев тройничного нерва взрослых крыс (Poulsen et al., 2014) и мышей (Belzer et al., 2010).



**Рис. 1. Первичная культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в среде 1 (10% ФТС):** А – 1-е сутки (длинные стрелки – тела чувствительных нейронов, одиночные или собранные в кластеры, короткая стрелка – МГ, окружающие чувствительные нейроны), об. 20, ок. 10; Б – 3-и сутки (звездочки – тела чувствительных нейронов, длинная стрелка – полигональная клетка, короткая стрелка – веретеновидная клетка с двумя тонкими отростками), В – 5-е сутки, об. 10, ок. 10; Г – 15-е сутки, об. 10, ок. 10

При использовании сред 2 и 3 на 1-е сутки в культуре наблюдались крупные круглые клетки – тела чувствительных нейронов (рис. 2, А). На 3-и сутки в культуре наблюдались флотирующие агрегаты, преимущественно состоящие из небольшого количества клеток, а также одиночные клетки и клеточный дебрис. На 5–7-е сутки в обеих средах формировались флотирующие МС, более темные в центре и с округлыми крупными и мелкими клетками по краям. (рис. 2, Б). К 15-м суткам культивирования МС увеличивались в размерах, уплотнялись, приобретали ровные очертания (рис. 2, В). Некоторые МС имели тенденцию к слиянию между собой.



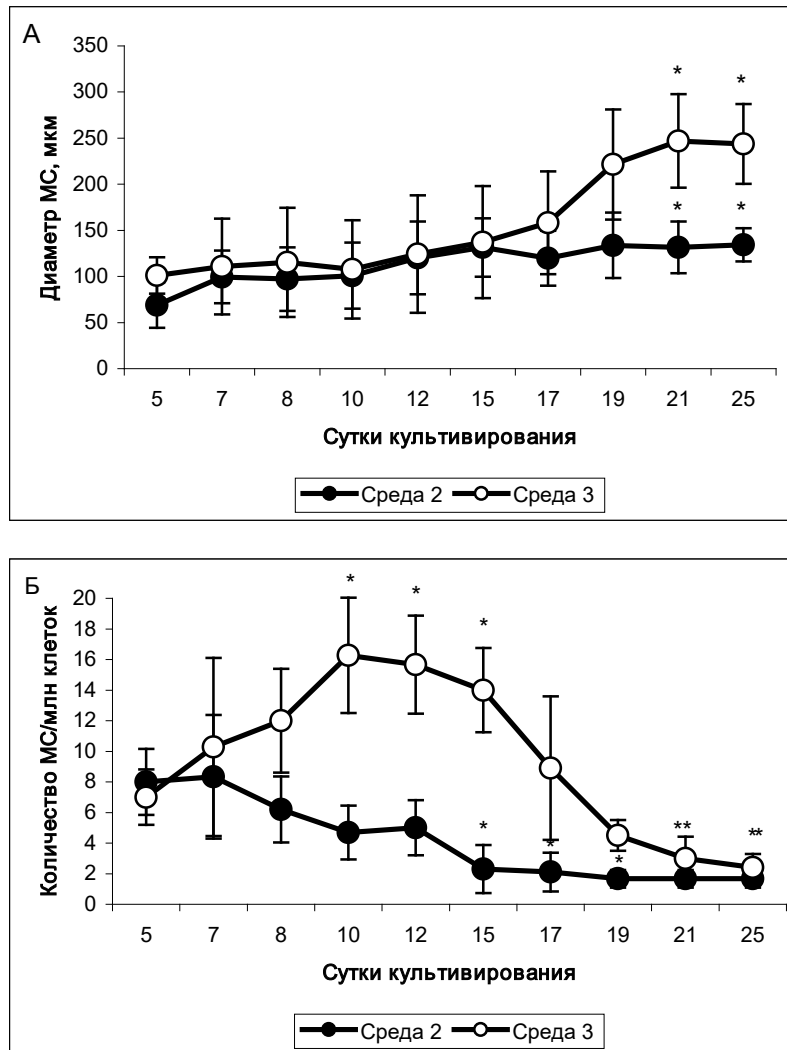
**Рис. 2.** Первичная культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в средах 2 и 3 (В-27 и Нейромакс): А – 1-е сутки; Б – 5-е сутки; В – 15-е сутки, Г – 25-е сутки. Об. 10, ок. 10

На 21–25-е сутки культивирования количество МС уменьшалось (рис. 2, Г). В культуре присутствовали небольшие клеточные агрегаты, неприкрепленные одиночные клетки и клеточный дебрис. Дегенерация культуры указывала на нехватку ростовых факторов, необходимых для роста и поддержания в культуре уже сформировавшихся МС.

На рис. 3 представлены данные, свидетельствующие об изменении размера и количества МС, образованных в результате культивирования в средах 2 и 3. Значимое увеличение размера МС происходит к 25 суткам культивирования в обеих средах (Рис. 3, А). Однако эти изменения более выражены при культивировании в среде 3, поскольку максимальный диаметр МС на среде 3 был  $243 \pm 43$  мкм по сравнению с  $134 \pm 18$  мкм на среде 2.

В то же время, в процессе культивирования количество сфероидов начинает постепенно снижаться (рис. 3, Б). В терминальные сроки культивирования (25 сутки) количество МС значимо

меньше по сравнению с 5-ми сутками. Это дополнительно указывает на то, что в средах 2 и 3 не создается достаточных условий для долгосрочного поддержания МС.



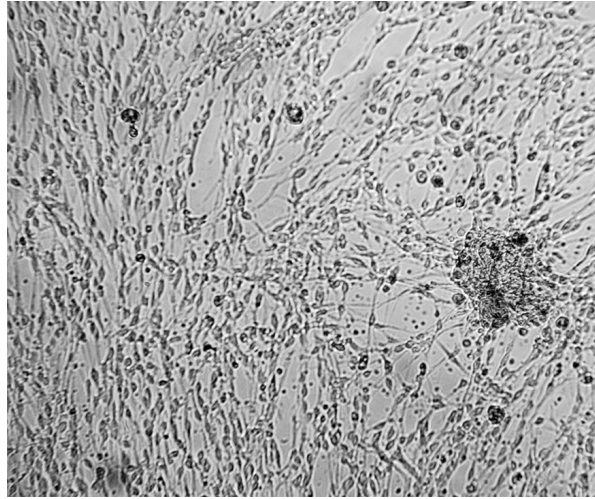
**Рис. 3. Изменение диаметра (А) и количества (Б) МС, которые культивировались в течение 25 суток на средах 2 и 3**

\* различия достоверны по сравнению в 5-ми сутками культивирования ( $p \leq 0,05$ )

При пересеве культуры клеток СГ, полученных на среде 1 (содержащей 10% ФТС), крупные тела нейронов исчезают, при этом культура становится более однородной (рис. 4). Основная ее часть представлена МГ. Кое-где сохраняются прикрепленные кластеры клеток, от которых отходят длинные тяжи.

При пересеве МС, сформированных в средах 2 и 3 (В-27 и НейроМакс), в среду 1 (10% ФТС) наблюдалось их прикрепление к поверхности культуральной посуды в течение первых суток. Из МС выселялись клетки, которые быстро пролиферировали и заполняли практически всю поверхность к 10-м суткам. При пересеве МС, сформированных в обеих средах, выявлены клетки трех морфологических типов: крупные фибробластоподобные (ФБ) клетки, нейроноподобные клетки с пирамидальным телом и длинными ветвящимися отростками, а также МГ – веретеновидные мелкие темные клетки с двумя тонкими отростками (рис. 5). Отростчатые клетки образовывали сеть, которая частично располагалась на подложке из ФБ клеток. Подсчет клеток показал, что при пересеве МС из среды 2 нейроноподобные клетки составляют около 15%, МГ –

27%, а ФБ клетки – 58%, а при пересеве МС из среды 3 ФБ клеток было значительно меньше, а нейроноподобные клетки и МГ присутствовали в одинаковом количестве и составляли около 90% всех клеток.



**Рис. 4.** Культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в присутствии 10% ФТС, на 3-и сутки после пересева. Об. 10, ок. 10

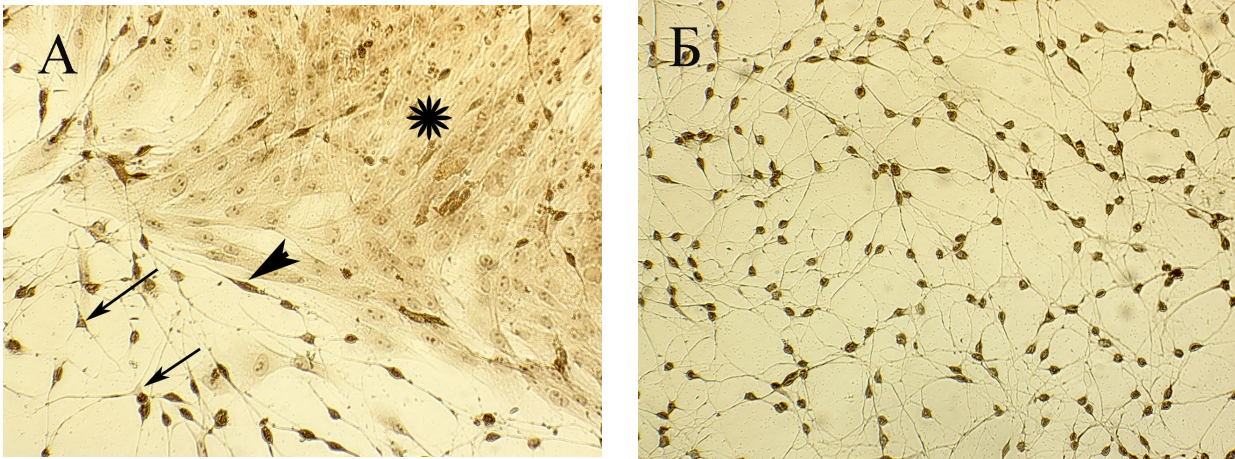
#### Обсуждение

СГ содержит тела афферентных (чувствительных) нейронов, передающих сенсорную информацию с периферии в центральную нервную систему. Морфологически в СГ различаются два типа сенсорных нейронов: большие светлые и малые темные (Lawson, 1992). Тела нейронов окружены МГ, которые являются представителями глии периферической нервной системы, как и шванновские клетки, создающие миелинизацию аксонов. СГ окружены соединительнотканной капсулой, между нервными волокнами также находятся прослойки соединительнотканых компонентов (эндонервия) с проходящими по ним кровеносными сосудами. Таким образом, первичная культура клеток, полученная из СГ, может содержать разные типы клеток (тела нейронов, фибробласты, глиальные и эндотелиальные клетки). Долгосрочное выживание того или иного типа клеток *in vitro* зависит от условий культивирования (состава питательной среды, специальной подложки, наличия ростовых факторов).

Культуры клеток из СГ активно изучались, начиная с середины 20 века, и до сих пор они являются удобным объектом, благодаря простоте получения. Однако в культуре *in vitro* в основном исследовали функциональные свойства сенсорных нейронов, в то время как глиальные клетки оставались на периферии интереса широкого круга исследователей вплоть до последнего времени.

Учитывая роль МГ в формировании структурного и функционального микроокружения нейрона (механическая и трофическая поддержка, регуляция состава внеклеточного пространства, создание барьера между нейронами и фенестрированными кровеносными капиллярами, получение и передача химических сигналов), большинство исследователей соотносят МГ периферической нервной системы с астроцитами центральной нервной системы. Но, несмотря на определенное сходство, МГ имеют набор собственных уникальных свойств.

Например, было установлено, что МГ как производные нервного гребня (Le Douarin et al., 1991) могут дифференцироваться в шванновские клетки, астроциты и олигодендроциты (Svnenigsen et al., 2004). Кроме того, Н.У.Ли и соавт. (Li et al., 2007) показали, что из эксплантатов СГ выселяются прогениторные клетки, морфологически сходные с МГ, которые при определенной стимуляции дифференцируются в нейроны. В связи с этим авторы предположили, что МГ могут участвовать в регенеративном нейрогенезе при повреждениях периферической нервной системы.



**Рис. 5.** Культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в средах 2 (А) и 3 (Б), на 10-е сутки культивирования после пересева на среду 1. Окраска гематоксилином и эозином. Звездочка – монослой из ФБ клеток, тонкие стрелки – нейроноподобные клетки, толстая стрелка – МГ. Об. 20, ок. 10

Известно, что не только при культивировании, но и в условиях *in vivo* МГ обладают высоким пролиферативным потенциалом. Например, после аксотомии значительно возрастает соотношение МГ/нейрон (Hanani, 2005).

Как правило, культуры СГ получали от эмбриональных, неонатальных или взрослых мышей и крыс, некоторых других видов животных (цыпленка, обезьяны, собаки, быка). В представленной работе мы впервые получили первичную культуру из СГ неонатальных поросят.

Известно, что МГ способны быстро разрастаться в условиях поддержания культуры в присутствии 10% ФТС. Снижение концентрации ФТС до 1–2 % приводит к торможению пролиферации МГ (de Luca et al., 2015). Результаты морфологического анализа, полученные нами на СГ неонатальных поросят, подтверждают наблюдения, сделанные на культурах клеток СГ от других видов животных. В среде с 10% ФТС (среда 1) мы наблюдали активный рост МГ в течение 14 суток. Конфлюентный монослой формировался уже на 3–5 сутки, а в дальнейшем клетки росли в несколько слоев.

Однако при использовании заменителей сыворотки В-27 и НейроМакс (среды 2 и 3) в культуре не наблюдалось активной пролиферации клеток и формирования монослоя. Это означало, что в питательных средах данного состава отсутствовали компоненты, необходимые для стимуляции прикрепления и пролиферации МГ. Интересно, что при этом наблюдалось формирование МС, которые при пересеве на среду с 10% ФТС способны были продуцировать не только МГ, но и нейроноподобные и фибробластоподобные клетки. При пересеве МС из среды, содержащей В-27, наблюдается значительный рост ФБ клеток, тогда как при пересеве МС из среды, содержащей НейроМакс, культура была практически очищена от ФБ клеток и содержала преимущественно нейроноподобные клетки и МГ.

В некоторых предыдущих работах также была показана возможность образования флотирующих МС в культурах СГ или ганглия тройничного нерва (Lagares et al., 2007; Li et al., 2007; Singh et al., 2009; Ogawa et al., 2017). Однако для этого в состав базовой питательной среды вводили различные комбинации ростовых факторов (EGF/FGF, LIF/BMP2/FGF2). В нашей работе МС образовывались при культивировании без специальных ростовых добавок, что, возможно, свидетельствует о сохранности субпопуляции КПНГ в СГ неонатальных поросят.

Возможно, что для образования МС в культуре СГ неонатальных поросят достаточно базовой среды и отсутствия ФТС для уменьшения прикрепления и пролиферации МГ и фибробластов (замена на В-27 или НейроМакс). Однако тот факт, что в нашей работе МС дегенерировали к 25 суткам культивирования, говорит о том, что на определенном этапе для поддержания и развития МС необходимо вводить в состав среды ростовые добавки. Этот вывод подтверждают данные работы R.Огавы и соавт. (Ogawa et al., 2017), в которой было установлено

уменьшение диаметра МС при культивировании в отсутствии ростовых факторов и увеличение – при комбинации факторов LIF/BMP2/FGF2.

Таким образом, первичная культура клеток СГ неонатальных поросят, впервые полученная в результате нашей работы, является перспективным источником нервных клеток. В зависимости от условий ее поддержания (сывороткосодежащая или бессывороточная среды) возможно получать культуры с превалированием определенного типа клеток (нейронов, МГ и ФБ).

#### Выводы

1. Первичные культуры, полученные из клеток СГ неонатальных поросят, сильно различаются морфологически в зависимости от наличия ФТС в питательной среде. При культивировании в присутствии 10% ФТС наблюдается прикрепление клеток и формирование монослоя, состоящего из МГ, нейроноподобных и фибробластоподобных клеток. При культивировании в присутствии заменителей сыворотки НейроМакс и В-27 основная масса клеток не прикрепляется, а организовывается во флотирующие МС.

2. При пересеве как монослойной культуры, так и МС в среду, содержащую 10% ФТС, наблюдается быстрое прикрепление и пролиферация клеток. При этом независимо от состава среды первичного культивирования во всех субкультурах морфологически различаются 3 типа клеток – МГ, нейроноподобные и фибробластоподобные клетки. Тип клеток, превалирующий в субкультуре, зависит от состава питательной среды. При пересеве МС из В-27-содержащей среды наблюдается значительный рост ФБ клеток, тогда как при пересеве МС из НейроМакс-содержащей среды культура состоит преимущественно из МГ и нейроноподобных клеток.

Авторы выражают благодарность А.А.Лаврику и компании ООО «НовиСтем» за помощь в проведении экспериментов.

#### Список литературы / References

- Backström E., Chambers B.J., Kristensson K., Ljunggren H.G. Direct NK cell-mediated lysis of syngenic dorsal root ganglia neurons in vitro // *J. Immunol.* – 2000. – Vol.165, no. 9. – P. 4895–4900.
- Bassols A., Costa C., Eckersall P.D. et al. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective // *Proteomics Clin. Appl.* – 2014. – Vol.8, no. 9. – P. 715–731.
- Belzer V., Shraer N., Hanani M. Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia // *Neuron Glia Biology.* – 2010. – Vol.6, no. 4. – P. 1–7.
- Capuano A., De Corato A., Lisi L. et al. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology // *Mol. Pain.* – 2009. – Vol.5. – P.43.
- Ciaroni S., Cecchini T., Cuppini R. et al. Are there proliferating neuronal precursors in adult rat dorsal root ganglia? // *Neurosci. Lett.* – 2000. – Vol.281, no. 1. – P. 69–71.
- de Luca A.C., Faroni A., Reid A.J. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration // *J. Vis. Exp.* – 2015. – Vol.96. – e52543.
- Farel P.B. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat // *Brain Res. Dev. Brain. Res.* – 2003. – Vol.144, no. 1. – P. 91–98.
- Gu Y., Chen Y., Zhang X. et al. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors // *Neuron Glia Biol.* – 2010. – Vol.6. – P. 53–62.
- Hanani M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: implications for chronic pain // *Brain Res.* – 2012. – Vol.1487. – P. 183–191.
- Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function // *Brain Res. Dev. Brain. Res.* – 2005. – Vol.48, no. 3. – P. 457–476.
- Hanani M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function // *Brain Res. Rev.* – 2010. – Vol.64, no. 2. – P. 304–327.
- Hayden S.M., Seeds N.W. Modulated expression of plasminogen activator system components in cultured cells from dissociated mouse dorsal root ganglia // *J. Neurosci.* – 1996. – Vol.16, no. 7. – P. 2307–2317.
- Lagares A., Li H.Y., Zhou X.F., Avendano C. Primary sensory neuron addition in the adult rat trigeminal ganglion: Evidence for neural crest glio-neuronal precursor maturation // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol.27, no. 30. – P. 7939–7953.



- Lawson S.N. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons / S.A.Scott (Ed.) Sensory neurons, diversity, development and plasticity. – Oxford University Press, New York, 1992. – P. 27–59.
- Le Douarin N., Dulac C., Dupin E., Cameron-Curry P. Glial cell lineages in the neural crest // *Glia*. – 1991. – Vol.4, no. 2. – P. 175–184.
- Li H.Y., Say E.H., Zhou X.F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia // *Stem Cells*. – 2007. – Vol.25, no. 8. – P. 2053–2206.
- Mudge A.W. Effect of non-neuronal cells on peptide content of cultured sensory neurones // *J. Exp. Biol.* – 1981. – Vol.95. – P. 195–203.
- Ogawa R., Fujita K., Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells // *Biol. Open*. – 2017. – Vol.6, no. 5. – P. 602–618.
- Poulsen J.N., Larsen F., Duroux M., Gazerani P. Primary culture of trigeminal satellite glial cells: a cell-based platform to study morphology and function of peripheral glia // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2014. – Vol.6, no. 1. – P. 1–12.
- Singh R.P., Cheng Y.-H., Nelson P., Zhou F.C. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells // *Cell Transplant.* – 2009. – Vol.18, no. 1. – P. 55–68.
- Svennigsen A.F., Colman D.R., Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors // *Neuron Glia Biol.* – 2004. – Vol.1, no. 1. – P. 85–93.
- Tongtako W., Lehmbecker A., Wang Y. et al. Canine dorsal root ganglia satellite glial cells represent an exceptional cell population with astrocytic and oligodendrocytic properties // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol.7, no. 1. – P.13915.
- Warwick R.A., Hanani M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain // *Eur. J. Pain.* – 2013. – Vol.17, no. 4. – P. 571–580.

---

**Представлено: Н.С.Кавок / Presented by: N.S.Kavok**

**Рецензент: Ю.Г.Кот / Reviewer: Yu.G.Kot**

*Подано до редакції / Received: 14.03.2018*

**About the authors:** S.G.Ali – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, ali.s@novistem.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0528-671X>

O.S.Sidorenko – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, lesunec@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1340-7235>

G.A.Bozhok – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

**Про авторів:** С.Г.Алі – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, ali.s@novistem.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0528-671X>

О.С.Сидоренко – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, lesunec@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1340-7235>

Г.А.Божок – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

**Об авторах:** С.Г.Али – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, ali.s@novistem.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0528-671X>

О.С.Сидоренко – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, lesunec@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1340-7235>

Г.А.Божок – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

УДК: 577.12.577.112.577.2

**Експресія генів деяких цитокінів та кількість їхніх продуктів у культурах фібробластів шкіри та легенів щурів в онтогенезі**  
**М.А.Гриценко***Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*  
*gricenkomarija@gmail.com*

Вивчено експресію генів інтерлейкінів (ІЛ 1, 2, 6, 8, 10–13, 15,18), факторів росту фібробластів 1, 2, 8 та трансформуючих факторів росту  $\alpha$  та  $\beta 1$  в культурах фібробластів шкіри та легенів білих щурів у віці 0,5, 1, 3 та 24 місяці. Відомо, що саме ці молекули регулюють розвиток та відновлення сполучної тканини в постнатальному онтогенезі, разом з тим різні види сполучної тканини, в зв'язку з їхніми функціональними особливостями, розвиваються в неоднакових умовах та під впливом різних внутрішніх і зовнішніх факторів, але досі не досліджували вікову специфіку продукції даних молекул в клітинах сполучних тканин різних типів. Саме цьому в даній роботі порівняно вікову динаміку вказаних показників в культурах фібробластів, вилучених з різних органів – шкіри та легенів. Також визначений вміст продуктів генів цих цитокінів в культурах, з метою порівняння відношення продукції про- та протизапальних інтерлейкінів у культурах фібробластів шкіри та легенів. Обговорена вікова динаміка вказаних показників та її особливості в зв'язку з функціями досліджених цитокінів. Для генів всіх досліджених типів цитокінів – інтерлейкінів, факторів росту фібробластів та трансформуючих факторів росту – було зафіксовано зміну інтенсивності експресії та накопичення їх продуктів в постнатальному онтогенезі. Динаміка як інтенсивності експресії досліджуваних генів, так і накопичення їх продуктів якісно подібна в культурах клітин обох типів тканин, але для фібробластів шкіри вікові та кількісні коливання даних показників виражені сильніше. При цьому максимума експресії та концентрацій всіх трьох типів вивчених цитокінів знаходяться в інтервалі між 0,5 і 3 місяцями з істотними кількісними відмінностями як між цитокінінами різних типів, так і між культурами фібробластів легенів і шкіри. Значення відношення як експресії, так і накопичення продуктів генів протизапальних інтерлейкінів до прозапальних в онтогенезі зростає в культурах клітин обох типів фібробластів, що може відображати як особливості розвитку організму, так і зниження здатності до регенерації сполучної тканини з віком.

**Ключові слова:** *культура фібробластів, інтерлейкіни, фактори росту, вік.*

**Expression of some cytokine genes and amount of their products in fibroblast cultures from skin and lung of rats in ontogenesis**  
**M.A.Gritsenko**

The expression of interleukin (IL 1, 2, 6, 8, 10–13, 15, 18), fibroblast growth factors 1, 2, 8, and transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta 1$  genes in skin and lung fibroblast cultures (donors – white rats at the age of 0.5, 1, 3 and 24 months) was studied. It is known that these molecules regulate the development and restoration of connective tissue in postnatal ontogenesis, at the same time, different types of connective tissue, in connection with their functional characteristics, develop under unequal conditions and under the influence of various internal and external factors, but not yet investigated the age specificity of the production of these molecules in the cells of connective tissue of various types. That is why, in this paper, the age dynamics of these indicators was compared in cultures of fibroblasts taken from various organs – skin and lungs. The content of the products of these cytokine genes in cultures was also determined, in order to compare the ratio of production of pro- and anti-inflammatory interleukins in cultures of skin and lung fibroblasts. The age dynamics of these indices and its features in connection with the functions of the cytokines studied are discussed. For the genes of all investigated types of cytokines – interleukins, fibroblast growth factors and transforming growth factors – a change in the intensity of expression and accumulation of their products in postnatal ontogenesis was recorded. Dynamics of both the expression intensity of the studied genes and the accumulation of their products is qualitatively similar in cell cultures of both types of tissues, but for skin fibroblasts the age and quantitative variations of these parameters are more pronounced. The maxima of expression and concentrations of all three types of cytokines studied are between 0.5 and 3 months with significant quantitative differences both between cytokinins of different types and between cultures of fibroblasts of the lungs and skin. The significance of the ratio of both expression and accumulation of the products of the anti-inflammatory interleukin genes to pro-inflammatory genes in ontogeny increases in cell cultures of both types of fibroblasts, it can reflect both the developmental features of the organism and the decrease in the ability to regenerate connective tissue with age.

**Key words:** *fibroblast culture, interleukins, growth factors, age.*

## Экспрессия генов некоторых цитокинов и количество их продуктов в культурах фибробластов кожи и лёгких крыс в постнатальном онтогенезе

М.А.Гриценко

Изучена экспрессия генов интерлейкинов (ИЛ 1, 2, 6, 8, 10–13, 15, 18), факторов роста фибробластов 1, 2, 8 и трансформирующих факторов роста  $\alpha$  и  $\beta$ 1 в культурах фибробластов кожи и легких белых крыс в возрасте 0,5, 1, 3 и 24 месяца. Известно, что именно эти молекулы регулируют развитие и восстановление соединительной ткани в постнатальном онтогенезе, вместе с тем различные виды соединительной ткани, в связи с их функциональными особенностями, развиваются в неодинаковых условиях и под влиянием различных внутренних и внешних факторов, но до сих пор не исследовали возрастную специфику продукции данных молекул в клетках соединительной ткани различных типов. Именно поэтому в данной работе сравнивали возрастную динамику указанных показателей в культурах фибробластов, взятых из различных органов – кожи и легких. Также определено содержание продуктов генов этих цитокинов в культурах, с целью сравнения отношения продукции про- и противовоспалительных интерлейкинов в культурах фибробластов кожи и легких. Обсуждена возрастная динамика указанных показателей и ее особенности в связи с функциями исследованных цитокинов. Для генов всех исследованных типов цитокинов – интерлейкинов, факторов роста фибробластов и трансформирующих факторов роста – было зафиксировано изменение интенсивности экспрессии и накопления их продуктов в постнатальном онтогенезе. Динамика как интенсивности экспрессии исследуемых генов, так и накопления их продуктов качественно подобна в культурах клеток обоих типов тканей, но для фибробластов кожи возрастные и количественные колебания данных показателей выражены сильнее. При этом максимумы экспрессии и концентраций всех трех типов изученных цитокинов находятся в интервале между 0,5 и 3 месяцами с существенными количественными различиями как между цитокинами различных типов, так и между культурами фибробластов легких и кожи. Значение отношения как экспрессии, так и накопления продуктов генов противовоспалительных интерлейкинов к провоспалительным в онтогенезе возрастает в культурах клеток обоих типов фибробластов, что может отражать как особенности развития организма, так и снижение способности к регенерации соединительной ткани с возрастом.

**Ключевые слова:** культура фибробластов, интерлейкины, факторы роста, возраст.

### Вступ

В онтогенезі сполучної тканини важливу роль відіграють молекули, що регулюють її розвиток, зокрема важливі регулятори функціонування фібробластів – цитокіни (Кетлінський, Симбирцев, 2008; Coumoul, Deng, 2003 та ін.). Але досі не було робіт, в яких би досліджувалися вікові особливості продукції цих регуляторних молекул протягом постнатального онтогенезу. При цьому різні види сполучної тканини, в зв'язку з їхніми функціональними особливостями, розвиваються в неоднакових умовах та під впливом різних внутрішніх і зовнішніх факторів.

Тому метою даної роботи було порівняти вікову динаміку експресії генів трьох типів цитокинів – інтерлейкінів (ІЛ), факторів росту фібробластів (ФРФ) і трансформуючих факторів росту (ТФР) та накопичення їх продуктів в культурах фібробластів функціонально відмінних типів сполучної тканини – легенів та шкіри, а також відношення продукції про- та протизапальних інтерлейкінів в цих культурах.

### Матеріали та методи

Донори фібробластів – безпородні білі щури 4-х вікових груп (0,5, 1, 3 і 24 місяці). Тканини, що вивчались, подрібнювали в середовищі DMEM, що містить 1% трипсину. Після 30-хвилинної інкубації при 37°C клітини збирали і сіяли в вентильовані культуральні флакони в живильне середовище DMEM, що містить 10% FBS, та проводили їх культивування при 37°C і вологості 95% в присутності 5% CO<sub>2</sub> (Nuair 4500, США). За прикріпленням клітин і щільністю клітинної культури стежили за допомогою інвертованого мікроскопа Carl Zeiss Telaval. У роботі використовували фібробласти 3-го пасажу. Аналіз експресії генів проводили на ДНК-мікрочіпах виробництва Arrayit (США). РНК з клітин виділяли на спін-колонках набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Синтез кДНК зворотньою транскрипцією проводили наборами QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, США). У роботі використовували ген-специфічні праймери і Су3-мічені нуклеотиди виробництва Arrayit і Life Technologies (США) відповідно. Ампліфікації проводили з використанням термоциклера BIO-RAD iCycler. Кінцеву кількість виробленого білкового продукту вимірювали імунохімічно на

антитіло-кон'югованих ELISA-мікрочіпах з використанням наборів реактивів Antibody Array Assay Kit (KAS20, Full Moon BioSystems, Inc., США). Отримані результати виражали в одиницях флуоресценції – rFLU в розрахунку на 1 клітину. Результати обробляли статистично за допомогою непараметричного методу Wilcoxon-Mann-Whitney. Відмінності вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

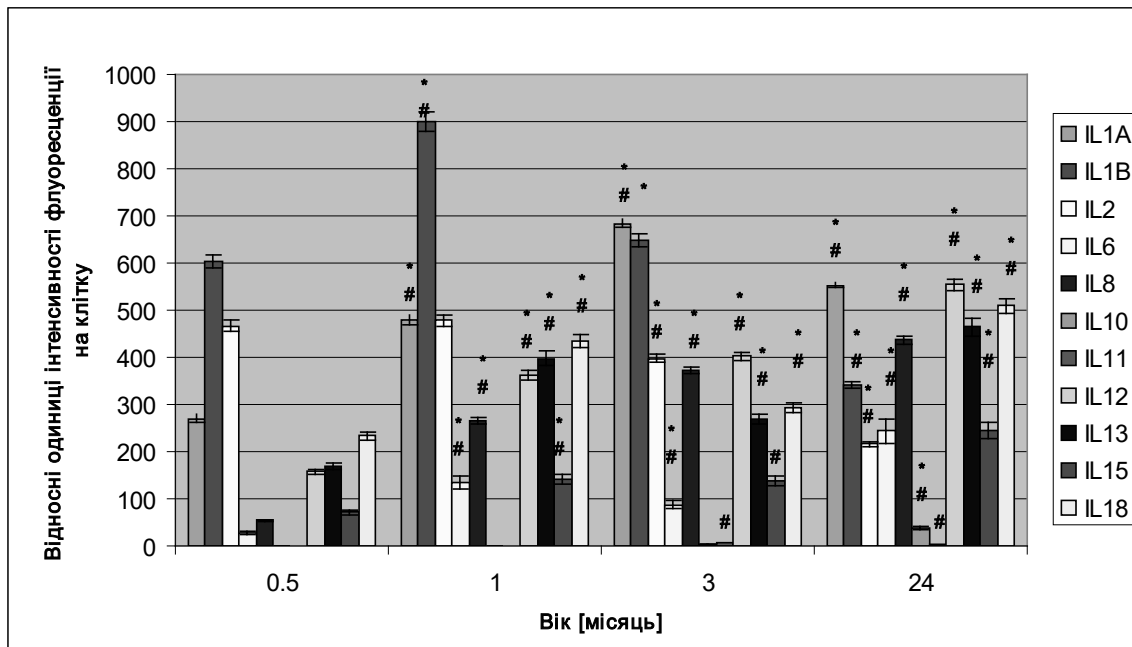
Результати дослідження експресії генів інтерлейкінів і накопичення їх продуктів фібробластами шкіри і легенів представлені на рис. 1–8.

Ген інтерлейкіну (ІЛ) 1 $\alpha$ , одного з найбільш сильних прозапальних факторів з множинною дією (Кетлинский, Симбирцев, 2008; Jun-Ming Zhang, Jianxiong, 2007), активно експресується у фібробластах шкіри молодих тварин, у старості активність експресії знижується на 61% по відношенню до максимального рівня (3 міс.), що зображено на рис. 1.

Кількість його продукту також висока в фібробластах молодих тварин і різко падає у старості, складаючи близько 25% по відношенню до молодих донорів (рис. 2).

Вікова картина експресії ІЛ 1 $\beta$  має подібні риси з такою для ІЛ 1 $\alpha$ .

ІЛ 2 – також потужний прозапальний цитокін з різноманітними ефектами. Зокрема, він стимулює вироблення  $\gamma$ -інтерферону і фактора некрозу пухлин.



**Рис. 1. Динаміка експресії генів інтерлейкінів в культурі фібробластів шкіри**

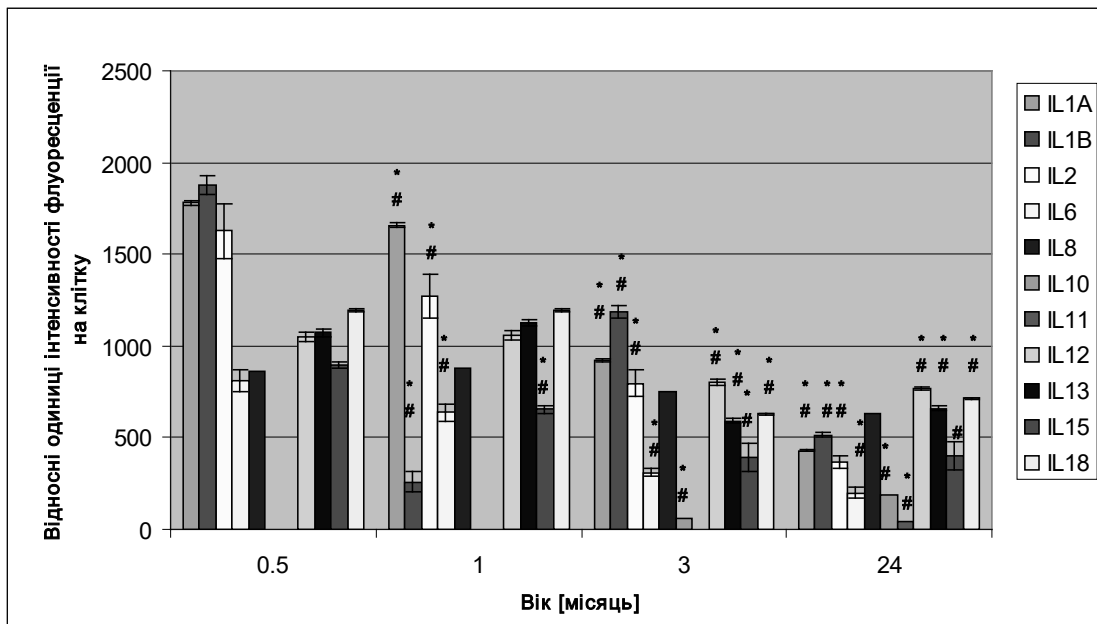
\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Експресія гена ІЛ 2 трохи нижча, ніж ІЛ 1 (особливо порівняно з ІЛ1  $\beta$ ) та істотно знижується з віком, складаючи у віці 3 місяці приблизно 50% від рівня 2-тижневих тварин, а у віці 24 місяців падає приблизно в 5 разів у порівнянні з рівнем у 2-тижневих щурів. Кількість продукту ІЛ-2 підвищується до віку 3-х місяців і далі залишається практично незмінною.

Таким чином, розглянуті прозапальні цитокіни фібробластів шкіри мають в основному подібну динаміку експресії їх генів і накопичення продуктів в онтогенезі.

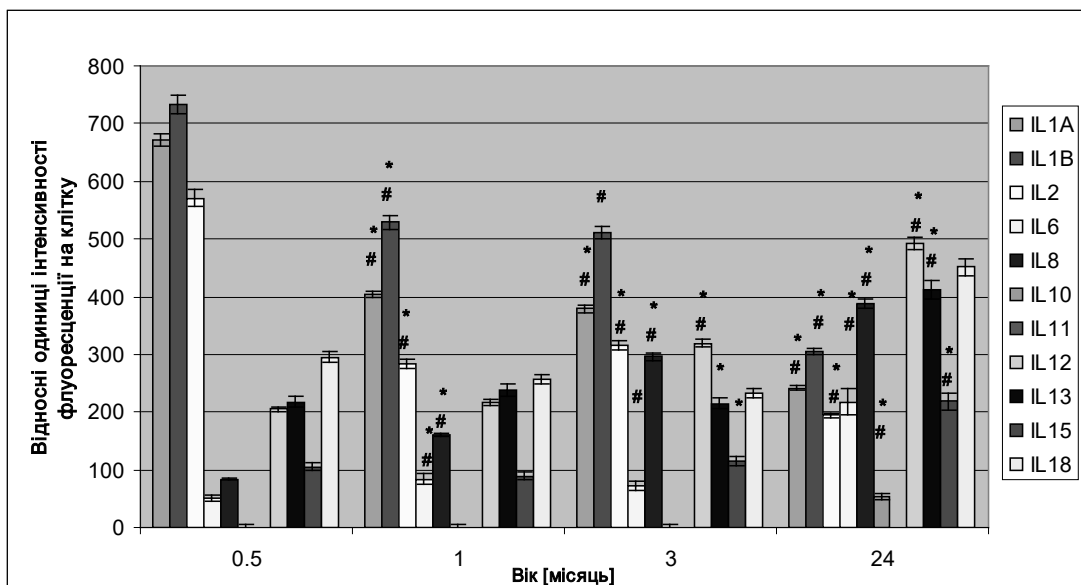
Спрямованість вікових змін експресії генів ІЛ 1 і ІЛ 2 в легенях (рис. 3) не відрізняється від такої в шкірі. Кількість продуктів ІЛ 1 і ІЛ 2 в легенях істотно нижча (рис. 4), ніж у шкірі, і не настільки помітно змінюється з віком.



**Рис. 2. Динаміка накопичення продуктів генів інтерлейкінів в культурі фібробластів шкіри**

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

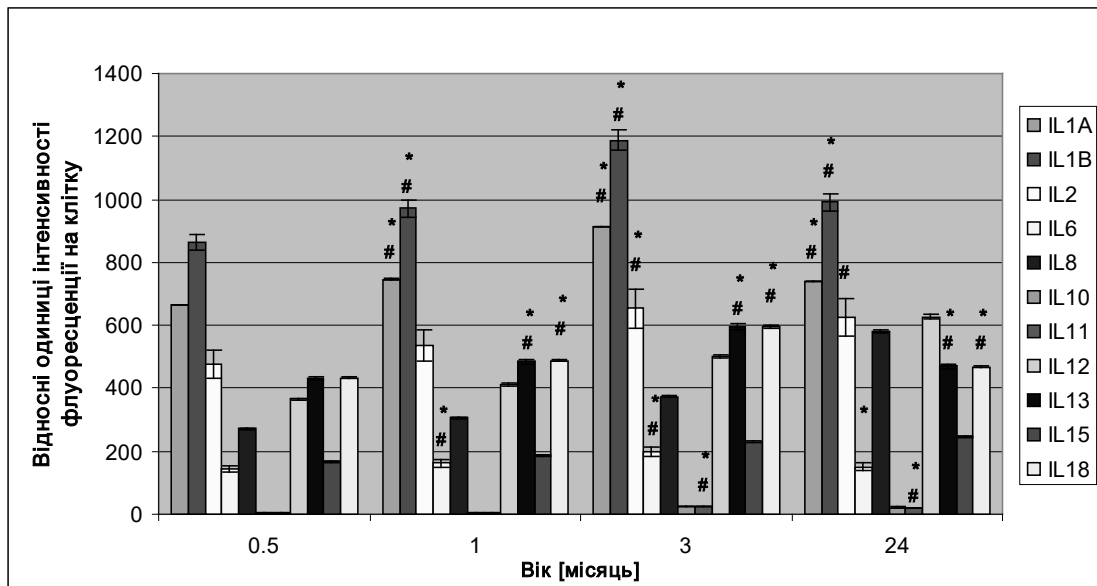


**Рис. 3. Інтенсивність експресії генів інтерлейкінів в культурі фібробластів легенів**

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Знижена кількість цих прозапальних білків в легенях може бути пов'язана з особливостями функціонування досліджених тканин: і шкіра, і легені контактують із зовнішнім повітряним середовищем, що містить безліч патогенів, але легені відокремлені верхніми дихальними шляхами і бронхами, а також захисним шаром сурфактанту, що робить їх більш захищеними.



**Рис. 4. Динаміка накопичення продуктів генів інтерлейкінів в культурі фібробластів легенів**

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

ІЛ 6 та ІЛ 8 – також прозапальні цитокіни (Bickel, 2003; Brocker et al., 2010), причому ІЛ 6 сильно активує синтез білків гострої фази, може діяти як про-, так і як протизапальний, ІЛ 8 – активний хемокин. Обидва вони – характерні продукти генів фібробластів. Їх експресія в шкірі нижча, ніж ІЛ 1 і 2. Найбільш низькою вона є у 2-тижневих тварин, зростає в онтогенезі, перевищуючи рівень в фібробластах 2-тижневих щурів у 8 разів (ІЛ 8) і у 9 разів (ІЛ 6). Динаміка накопичення продукту в онтогенезі інша, ніж для ІЛ 1 і 2. Для ІЛ 6 характерно зниження кількості продукту з віком – у 4 рази у віці 24 місяців, а для ІЛ 8 – всього у 1,4 разів. Експресія генів ІЛ 6 і 8 у фібробластах легенів нижча в усі досліджені періоди онтогенезу та істотно підвищується у старості, як і в клітинах шкіри.

Гени ІЛ 10 та 11 практично не експресувалися, продукти їх знаходяться в невеликій кількості або відсутні в фібробластах як шкіри, так і легенів.

Експресія прозапальних генів ІЛ 12, 15 і 18 (Кетлинский, Симбирцев, 2008; Coumoul, Deng, 2003) в онтогенезі підвищується. Максимум досягається в різні періоди онтогенезу. Кількість продуктів зазначених генів залишається приблизно на одному рівні після 3-місячного віку. Схожа картина спостерігається і у фібробластах легенів. У легенях вікові зміни експресії цих генів і кількості їх продуктів виражені в меншій мірі, ніж в шкірі.

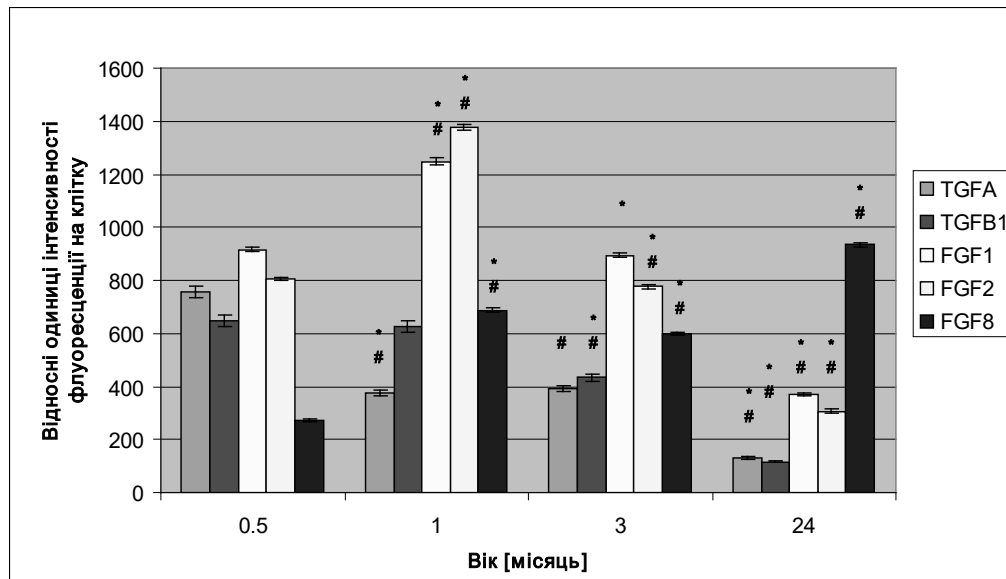
На відміну від розглянутих цитокінів, ІЛ 13 є протизапальним. Експресія його гена і в шкірі, і в легенях підвищується, з деякими коливаннями, до 24 місяців. Кількість продукту цього гена досить висока у 2-тижневих і 1-місячних щурів, але у віці 3-х місяців знижується приблизно в 2 рази і залишається значно нижчою, ніж у молодому віці. Очевидно, це відповідає повільнішому протіканню запальних процесів у старому віці. У легенях коливання кількості ІЛ 13 не настільки значні (максимум знайдений у 3 місяці).

Зупинимося на представлених цитокінах, які є факторами росту.

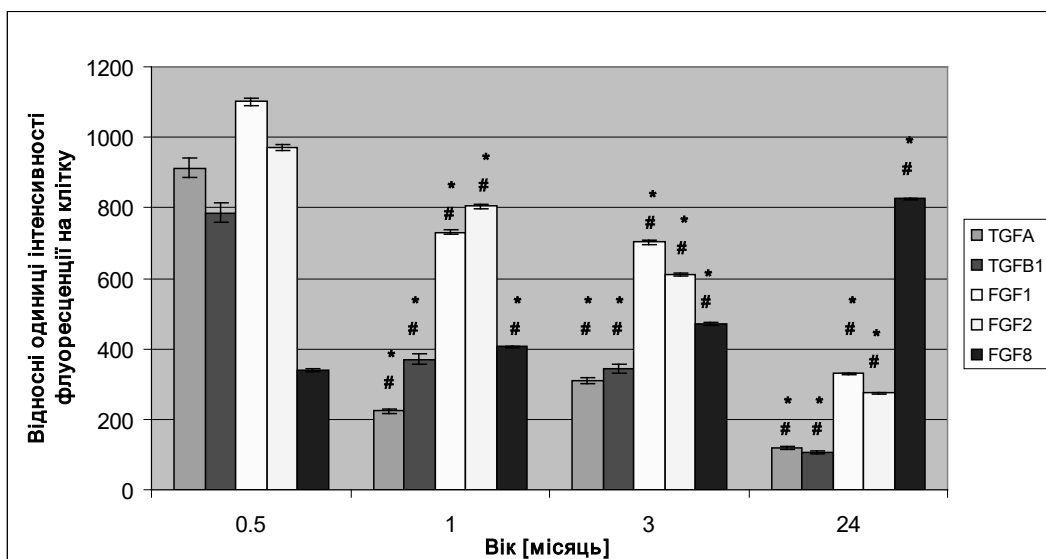
Одна з важливих функцій факторів росту фібробластів (ФРФ) 1 і 2 – стимуляція росту ендотеліальних клітин і організація їх в трубчасту структуру. Вони прискорюють як ріст нових кровоносних судин в ході розвитку організму, так і відновлення судин при регенерації тканин (Ornitz, Itoh, 2001; Böttcher, Niehrs, 2005).

Експресія генів ФРФ в шкірі має різні вихідні значення (рис. 5) – у 2-тижневих тварин вона максимальна для ФРФ 1 і мінімальна для ФРФ 8. Експресія гена ФРФ 8 продовжує зростати аж до

24 місяців. У легенях експресія зазначених генів (рис. 6) носить подібний характер, з деякими відмінностями для ФРФ 8.



**Рис. 5. Динаміка експресії генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів шкіри**  
 \* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )  
 # достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )



**Рис. 6. Інтенсивність експресії генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів легенів**  
 \* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )  
 # достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Кількість продуктів – ФРФ (рис. 7, 8) – висока для всіх трьох ФРФ з досягненням максимуму ФРФ 1 і 2 в 3 місяці; ФРФ 8 продовжує зростати і у старості, що, можливо, компенсує біологічний ефект від падіння ФРФ 1 і 2 у старому організмі.

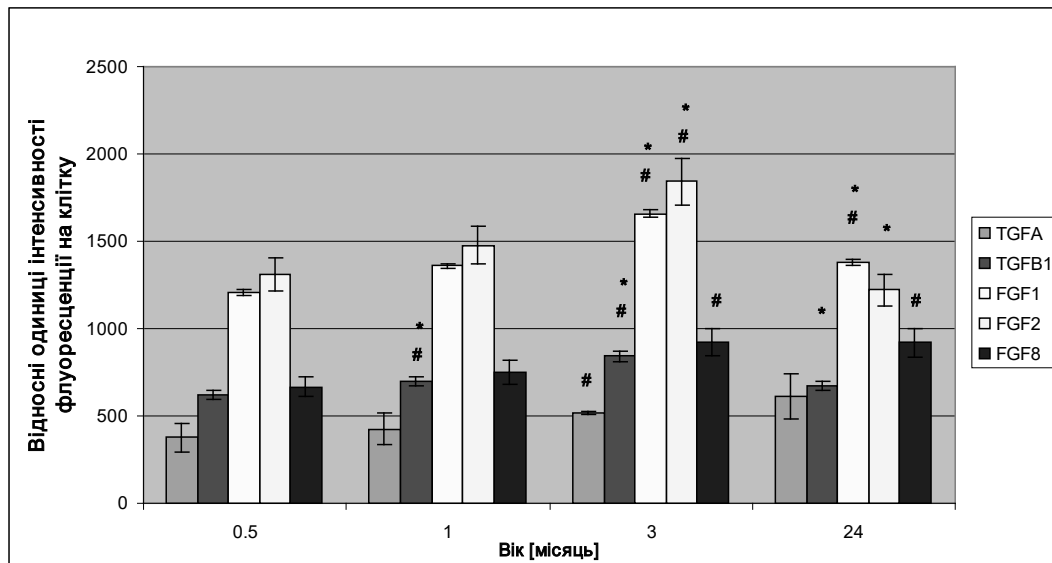


Рис. 7. Динаміка накопичення продуктів генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів легенів

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

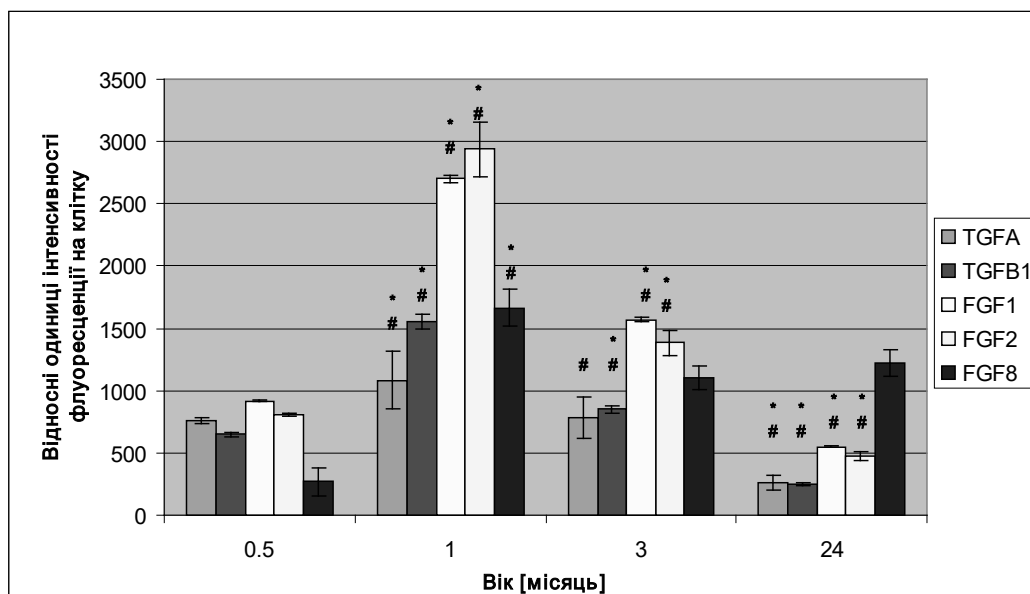


Рис. 8. Динаміка накопичення продуктів генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів шкіри

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Досліджені нами трансформуючі фактори росту (ТФР  $\alpha$  і  $\beta 1$ ) лімітують запальні процеси, діючи на прозапальні цитокіни ІЛ 1 і 6, і прискорюють загоєння ран, стимулюючи поділ фібробластів і синтез білків міжклітинного матриксу (Derynck et al., 1985). TGF  $\beta$  ініціює апоптоз у більшості типів клітин і пригнічує дію ІЛ 1 (Wahl et al., 1988; Martellosi Cebinelli et al., 2016).

Експресія генів ТФР  $\alpha$  і  $\beta 1$  і в шкірі, і в легенях з віком достовірно знижується, як і кількість їх продуктів.



Таким чином, нами виявлено риси як подібності, так і відмінності експресії генів цитокінів і кількості їх продуктів в фібробластах шкіри і легенів щурів різного віку.

#### Висновки

1. Для генів всіх досліджених типів цитокінів – ІЛ, ФРФ та ТФР було зафіксовано зміну інтенсивності експресії та накопичення їх продуктів у постнатальному онтогенезі.
2. Динаміка як інтенсивності експресії досліджуваних генів, так і накопичення їх продуктів якісно подібна в культурах клітин обох тканин, але для фібробластів шкіри вікові та кількісні коливання даних показників виражені сильніше.
3. При цьому максимумами експресії і концентрацій всіх трьох типів вивчених цитокінів знаходяться в інтервалі між 0,5 і 3 місяцями з істотними кількісними відмінностями як між цитокінінами різних типів, так і між культурами фібробластів легенів і шкіри.
4. Значення відношення як експресії, так і накопичення продуктів генів протизапальних інтерлейкінів до прозапальних в онтогенезі зростає, що може відображати особливості як розвитку, так і зниження здатності до регенерації сполучної тканини з віком.

#### Список літератури / References

- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – Спб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – С. 369–378. //Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. – Spb: ООО "Publishing House Foliant", 2008. – P. 369–378./
- Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation // J. Periodontol. – 1993. – Vol.64 (5 Suppl). –P. 456–460.
- Böttcher R.T., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development // Endocr. Rev. – 2005. – Vol.26 (1). – P. 63-77.
- Brocker C., Thompson D., Matsumoto A. et al. Evolutionary divergence and functions of human interleukin (IL) gene family // Human Genomics. – 2010. – Vol.5 (1). – P. 30–55.
- Coumoul X., Deng C.X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases // Birth Defects Res. C. Embryo Today. – 2003. – Vol.89 (4). – P. 286–304.
- Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y. et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells // Nature. – 1985. – Vol.316 (6030). – P. 701–705.
- Jun-Ming Zhang, Jianxiong A.N. Cytokines, inflammation and pain // Int. Anesthesiol. Clin. – 2007. – Vol.45 (2). – P. 27–37.
- Martelossi C.G.C., Paiva T.K., Badaró G.S., Brajão de Oliveira K. TGF- $\beta$ 1 functional polymorphisms: a review // Eur. Cytokine Netw. – 2016. – Vol.27 (4). – P. 81–89.
- Ornitz D.M., Itoh N. Fibroblast growth factor // Genome Biology. – 2001. – Vol.2 (3). – REVIEWS3005.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wong H.L. et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation // J. Immunol. – 1988. – Vol.140 (9). – P. 3026–3032.

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the authors:** M.A.Gritsenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, gricenkomarija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8766-7032>

**Про авторів:** М.А.Гриценко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, gricenkomarija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8766-7032>

**Об авторах:** М.А.Гриценко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, gricenkomarija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8766-7032>

УДК: 577.12:577.112:577.24

**Оцінка цитотоксичності малих концентрацій іонів кадмію на клітини кісткового мозку щурів *in vitro***  
**У Сі, Т.Харченко, К.Кот, Ю.Кот, Є.Перський***Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*  
*wu.si.biochem2018@gmail.com*

Відомо, що іони кадмію накопичуються в клітинах, призводячи до порушень їх метаболізму. В даній роботі було вивчено вплив малих концентрацій іонів кадмію на культуру клітин кісткового мозку щурів, отриманих з *os femoris*, та оцінено прояви їх цитотоксичності. Для дослідження був обраний діапазон концентрацій іонів кадмію у культуральному середовищі 0,1–10 мкМ/л. Цитотоксичність кадмію оцінювали за ступенем адгезії клітин, їх морфології, щільністю культури, цілісністю мембран клітин, кількістю апоптотичних клітин. Ступінь ушкодження ДНК оцінювали за кількістю клітин з мікроядрами та фрагментацією ядерної ДНК. Показано, що довготривалий вплив іонів кадмію в концентраціях 0,1; 0,5; 1,0 та 10,0 мкМ/л на клітини кісткового мозку *in vitro* несе чіткий цитотоксичний ефект, при цьому ступінь проявів залежить від часу експозиції та концентрації токсиканту. Експозиція з кадмієм у концентраціях 0,1 та 0,5 мкМ/л призводить до невисокого зниження адгезії клітин, не призводить до змін середнього розміру і серйозного пошкодження клітинної мембрани, при цьому збільшується лише кількість клітин, що перебувають на ранній стадії апоптозу (на 11% і 15% при культивуванні клітин у присутності Cd<sup>2+</sup> у концентрації 0,1 і 0,5 мкМ/л відповідно), яка є оборотною і не призводить до фрагментації ядерної ДНК. Експозиція з кадмієм у концентраціях 1,0 та 10,0 мкМ/л призводить до значного зниження адгезії клітин, зменшення середнього розміру клітин у 1,3 і 1,8 разів відповідно, сильного пошкодження клітинної мембрани. Із зростанням концентрації Cd<sup>2+</sup> до 1,0 і 10,0 мкМ/л відбувається зниження кількості клітин з непошкодженою мембраною на 27 і 50% відповідно. При експозиції з Cd<sup>2+</sup> у концентрації 1,0 і 10,0 мкМ/л на 10 і 4 добу спостереження відповідно зростає частка клітин, що перебувають як на ранній, так і на пізній стадіях апоптозу. Вплив іонів кадмію у концентрації 1,0 і 10,0 мкМ/л призводить до суттєвого зростання кількості клітин, що перебувають на необоротній стадії пізнього апоптозу, на 30 добу спостереження. Показано, що довготривалий вплив іонів кадмію в концентраціях 0,5; 1,0 та 10,0 мкМ/л на клітини кісткового мозку *in vitro* має чіткий генотоксичний ефект: зростає кількість мікроядер та ступінь фрагментації ДНК.

**Ключові слова:** кадмій, кістковий мозок, цитотоксичність, генотоксичність, мікроядра, апоптоз, адгезія клітин.

**The cytotoxicity of cadmium ions small doses in culture of rats bone marrow cells****Wu Si, T.Kharchenko, K.Kot, Y.Kot, Ye.Perskyi**

It is known that cadmium ions have the property of accumulating in cells, leading to disturbances in their metabolism. The purpose of this work was to assess the cytotoxicity effects and degree of DNA damage in bone marrow cell culture from the femur of rats during prolonged cultivation in a medium containing small doses of cadmium ions – 0.1; 0.5; 1.0; 10 μM/liter of culture medium. The extent of cell adhesion and their morphology, culture density, cell membrane integrity, and the number of apoptotic cells were analyzed. The extent of DNA damage was assessed by the number of micronuclei, fragmentation of nuclear DNA in cells. It has been shown that prolonged exposure to cadmium ions in concentrations of 0.1; 0.5; 1.0 and 10 μM/L on bone marrow cells *in vitro* has a pronounced cytotoxic effect, and the degree of damage depends on the exposure time and the concentration of the toxicant. Exposure to cadmium for 30 days at a concentration of 0.1 and 0.5 μM/L leads to a low decrease in cell adhesion, does not lead to their average size change and serious damage to the plasma membrane. Exposure to cadmium for 30 days at a concentration of 0.1 and 0.5 μM/L leads to an increase in the number of cells in the early apoptosis stage (by 11% and 15% respectively), which is reversible and does not affect the fragmentation of nuclear DNA. Exposure to cadmium in concentrations of 1.0 and 10.0 μM leads to a significant reduction in cell adhesion, a decrease in the average cell size by 1.3 and 1.8 times, respectively, to severe damage of the cell membrane. With an increase in the concentration of Cd<sup>2+</sup> to 1.0 and 10.0 μM/L, the number of cells with an intact membrane decreases by 27% and 50%, respectively. When exposed to cadmium ions at a concentration of 1.0 and 10.0 μM/L the proportion of cells found at both early and late stages of apoptosis increases on the 10 and 4 days of observation, respectively. By 30 days of observation it has been shown, that exposure to cadmium at a concentration of 1.0 and 10.0 μM leads to a significant increase in the number of cells in the irreversible stage of late apoptosis. It

has been found, that prolonged exposure to cadmium ions in concentrations of 0.5; 1.0 and 10  $\mu\text{M/L}$  per bone marrow cells *in vitro* has a clear genotoxic effect: the number of micronuclei and the degree of DNA fragmentation increase.

**Key words:** *cadmium, bone marrow, cytotoxicity, DNA damage, micronuclei, apoptosis, cell adhesion.*

## Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс *in vitro*

У Си, Т.Харченко, Е.Кот, Ю.Кот, Е.Перский

Известно, что ионы кадмия накапливаются в клетках, приводя к нарушениям их метаболизма. В данной работе исследовано влияние малых концентраций ионов кадмия на культуру клеток костного мозга крыс, полученных из *os femoris*, и проведена оценка проявлений их цитотоксичности. Для исследования был выбран диапазон концентраций ионов кадмия в культуральной среде 0,1–10 мкМ/л. Цитотоксичность кадмия оценивали по степени адгезии клеток, их морфологии, плотности культуры, целостности мембран клеток, количеству апоптотичных клеток. Степень повреждения ДНК оценивали по количеству клеток с микроядрами и фрагментации ядерной ДНК. Показано, что продолжительное воздействие ионов кадмия в концентрациях 0,1; 0,5; 1,0 и 10 мкМ/л на клетки костного мозга *in vitro* имеет выраженный цитотоксический эффект, при этом степень выраженности проявлений зависит от времени экспозиции и концентрации токсиканта. Экспозиция с кадмием в течение 30 суток в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л приводит к невысокому снижению адгезии клеток, не приводит к изменению их среднего размера и серьезному повреждению плазматической мембраны, при этом увеличивается только количество клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза (на 11% и 15% при культивировании клеток в присутствии  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л соответственно), которая является обратимой и не затрагивает фрагментацию ядерной ДНК. Экспозиция с кадмием в концентрациях 1,0 и 10,0 мкМ приводит к существенному снижению адгезии клеток, уменьшению среднего размера клетки в 1,3 и 1,8 раза соответственно, сильному повреждению клеточной мембраны. С увеличением концентрации  $\text{Cd}^{2+}$  до 1,0 и 10,0 мкМ/л происходит снижение количества клеток с неповрежденной мембраной на 27 и 50% соответственно. При экспозиции с  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ/л на 10 и 4 сутки наблюдения соответственно увеличивается доля клеток, находящихся как на ранней, так и на поздней стадиях апоптоза. Влияние ионов кадмия в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ/л приводит к существенному возрастанию количества клеток, находящихся на необратимой стадии позднего апоптоза, к 30 суткам наблюдения. Установлено, что продолжительное воздействие ионов кадмия в концентрациях 0,5; 1,0 и 10 мкМ/л на клетки костного мозга *in vitro* имеет четкий генотоксический эффект: возрастает количество микроядер и степень фрагментации ДНК.

**Ключевые слова:** *кадмий, костный мозг, цитотоксичность, генотоксичность, микроядра, апоптоз, адгезия клеток.*

### Введение

Известно, что ионы кадмия имеют свойство накапливаться в клетке, приводя к нарушениям метаболизма и, как следствие, к развитию патологий органов и систем органов (Toxicological Profile for Cadmium; Hart, Keating, 1980; Shadi et al., 2001).

Хорошо изучены многочисленные влияния ударных однократных доз кадмия на метаболизм клетки, однако, практически совсем не изучены эффекты, связанные с долгосрочным влиянием малых доз ионов этого металла, хотя именно таким влияниям подвергается организм животных, в т.ч. и человека.

Ранее в экспериментах *in vivo* было показано, что потребление крысами в течение 36 суток питьевой воды, содержащей кадмий в концентрации 1 мкг/мл, приводит к повреждению ДНК в клетках костного мозга (Сі У та ін., 2016). Однако для выяснения концентрационных и временных зависимостей такого эффекта малых доз ионов кадмия, а также для понимания механизмов его цитотоксичности, необходимы исследования на культурах клеток *in vitro*.

В связи с этим целью данной работы являлось оценить степень повреждения ДНК клеток костного мозга крыс при продолжительном культивировании их в среде, содержащей малые дозы ионов кадмия.

Анализ литературы показал, что однократная 1-часовая экспозиция культуры клеток млекопитающих в среде, содержащей ионы кадмия в концентрациях 0,04–1,5 мМ/л, оказывает цитотоксическое действие уже в первые сутки и часы культивирования (Jin Long-Jin et al., 2004; Hui

Wang et al., 2016; Khan et al., 2014). Учитывая запланированный длительный период культивирования (30 суток), постоянный характер экспозиции клеток с ионами кадмия и способность этого металла к аккумуляции в клетках, для исследования был выбран диапазон концентраций ионов кадмия в культуральной среде – 0,1–10 мкМ/л. Цитотоксичность кадмия на клетки костного мозга *in vitro* оценивали по степени адгезии клеток, морфологии и плотности культуры, целостности мембраны клеток, количеству апоптотических клеток. Степень повреждения ДНК оценивали по количеству клеток с микроядрами и фрагментации ДНК, анализируемой методом комет-анализа.

### Методы исследования

Исследования проводили на культуре клеток костного мозга крыс линии Wistar. Клетки костного мозга были получены из большой берцовой кости методом (Benton. 2009) в модификации (Кругляков и др., 2007). Жизнеспособность первичной культуры (составляла 87%) оценивали витальным окрашиванием трипановым синим и анализировали на автоматизированном счетчике клеток Invitrogen Countess (Cadena-Herrera et al., 2015). Клетки высевали в культуральные планшеты Nunc с адгезивной поверхностью Nunclon Delta и культивировали в среде Gibco®  $\alpha$ -MEM, содержащую 20% Gibco® FBS и раствор Gibco® Antibiotic-Antimycotic solution в условиях 37°C, 96% RH, 5% CO<sub>2</sub>. Культивирование производили до достижения клетками монослоя с плотностью 90–94 %, после чего производили замену культуральной среды на среду, содержащую ионы кадмия в концентрациях: 0,1; 0,5; 1,0; 10 мкМ/л. Наблюдения за клетками и забор материала для исследования проводили в течение 30 суток каждые 48 часов до замены среды на свежую, содержащую Cd<sup>2+</sup>.

Оценку степени адгезии клеток и плотность культуры оценивали фазово-контрастной микроскопией на инвертированном микроскопе Zeiss Telaval 31.

Целостность плазматической мембраны клеток и размер клеток оценивали методом их прижизненного окрашивания 0,1% трипановым синим на цитометре Invitrogen Countess.

Количество здоровых клеток и клеток, находящихся на ранней и поздней стадиях апоптоза, определяли методом проточной цитофлуорометрии с использованием цитофлуорометра Guava PCA, программного обеспечения Guava Millipore Software 6.0.2 и набора Guava Millipore Nexin (Guava Millipore Nexin protocol, 2016).

Для детекции микроядер клетки фиксировали на стеклянных слайдах и окрашивали флуоресцентным ДНК-специфичным красителем акридиновым оранжевым (Oliveira-Martins, Grisolia, 2007). Слайды анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IMT2 ( $\lambda_{Ex}$ =488 нм,  $\lambda_{Em}$ =605 нм).

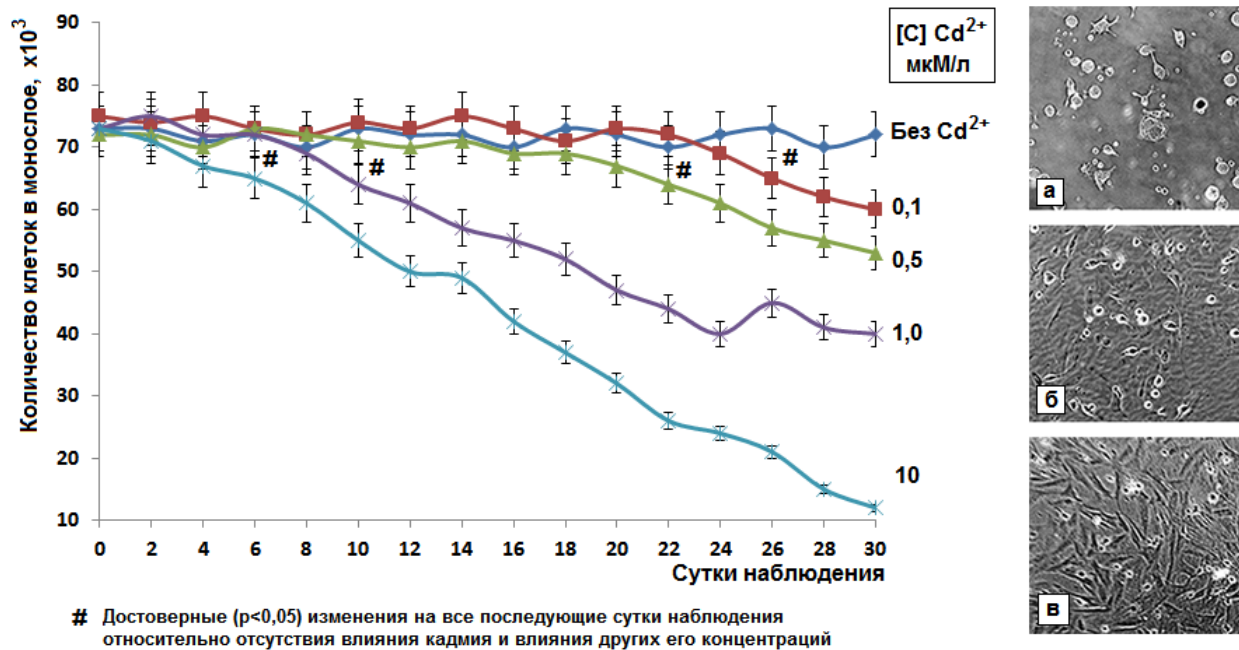
Для оценки степени фрагментации ДНК, клетки иммобилизовали в агарозном геле на стеклянном слайде CometSlides™ и проводили комет-анализ согласно с протоколом (Dhawan et al., 2003). Анализируемые треки ДНК окрашивали пропидием йодидом и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IMT2 ( $\lambda_{Ex}$ =473 нм,  $\lambda_{Em}$ =535 нм) с использованием ПО CASPlab.

Анализ полученных результатов проводили в пакете программ Origin 7.5pro.

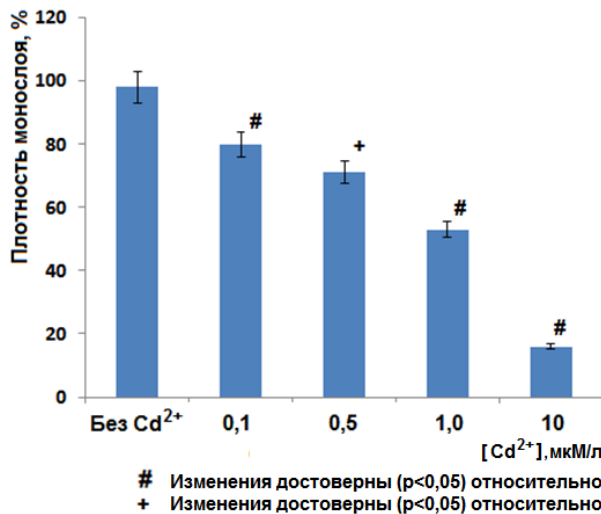
### Результаты исследования

Исследования влияния ионов кадмия на адгезию клеток костного мозга *in vitro* проводили на монослое клеток. Начиная с 24 часов после посева, костномозговые клетки адгезируются (рис. 1а) к 48 часам культивирования распластываются, приобретая фибробластоподобную морфологию (рис. 1б), и через 120 часов после посева образуют монослой с плотностью культуры 90–94 % (рис. 1в). Наблюдения начинали через 48 часов после первой замены культуральной среды на среду, содержащую ионы кадмия (0 час наблюдения), и строили зависимость количества прикрепленных клеток к подложке от времени наблюдения (рис. 1).

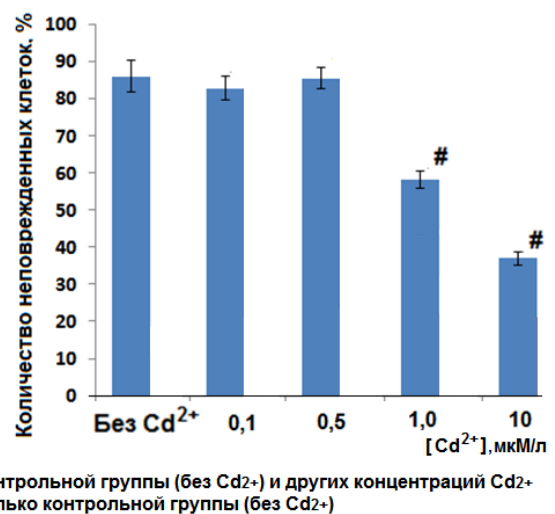
Показано, что культивирование клеток костного мозга в среде, содержащей ионы кадмия во всех исследуемых концентрациях, приводит к снижению адгезивной способности клеток. При этом видно, что такой эффект носит четко выраженную концентрационную зависимость. С увеличением концентрации кадмия к 30 суткам наблюдения непрерывно снижается количество клеток, распластанных и прикрепленных к подложке, а начало потери адгезии наступает на более ранних сроках – 26 сутки (0,1 мкМ/л), 22 сутки (0,5 мкМ/л), 10 сутки (1,0 мкМ/л) и 6 сутки (10 мкМ/л).



**Рис. 1.** Влияние ионов кадмия в различной концентрации на степень адгезии клеток костного мозга *in vitro*. На фото – адгезия и распластывание клеток на подложке (а, б) и образование монослоя (в) на 24, 48 и 120 час культивирования в среде без Cd<sup>2+</sup>



**Рис. 2.** Влияние Cd<sup>2+</sup> в различной концентрации *in vitro* на плотность монослоя клеток костного мозга на 30 сутки культивирования



**Рис. 3.** Влияние Cd<sup>2+</sup> в различной концентрации *in vitro* на количество клеток костного мозга с неповрежденной мембраной на 30 сутки культивирования

Как следствие, плотность монослоя клеток костного мозга снижается с увеличением концентрации кадмия и к 30 суткам культивирования составляет 78% (0,1 мкМ/л), 71% (0,5 мкМ/л), 52% (1,0 мкМ/л), 17% (10,0 мкМ/л), в то время как плотность монослоя клеток, культивируемых в отсутствие кадмия в культуральной среде, составляла 98% (рис. 2). При этом не обнаружено достоверной разницы между изменениями этого показателя при влиянии концентраций кадмия 0,1 и 0,5 мкМ/л.

Также показано, что культивирование клеток с ионами кадмия в концентрациях 0,1 и 0,5 мкМ/л не приводит к нарушению целостности плазматической мембраны клеток костного мозга даже на 30 сутки наблюдения (рис. 3). Однако с увеличением концентрации  $Cd^{2+}$  до 1,0 и 10,0 мкМ/л происходит существенное снижение количества клеток с неповрежденной мембраной на 27 и 50% соответственно (рис. 3).

Анализ распределения клеток костного мозга по их размеру на 30 сутки наблюдения показал, что в отсутствии влияния  $Cd^{2+}$  клеточная популяция сильно гетерогенна по этому показателю (5–40 мкм) и характеризуется средним размером клеток 22 мкм (рис. 4), что в принципе согласуется с данными литературы о существенной фенотипической, морфологической и функциональной гетерогенности клеток костного мозга как в первичной культуре, так и в культуре *in vitro* (Elsafadi et al., 2016).

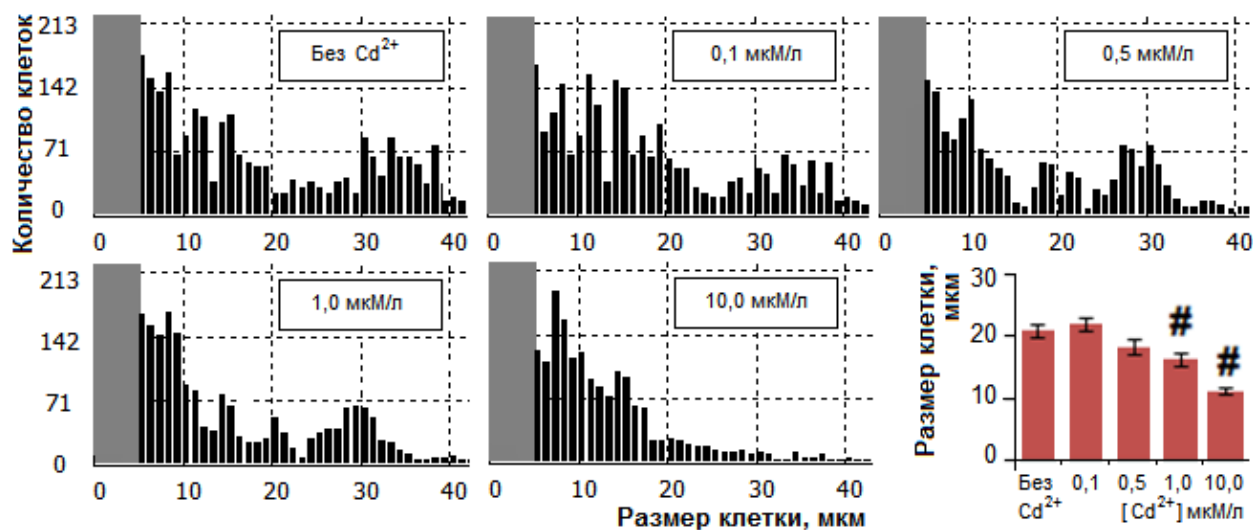


Рис. 4. Влияние  $Cd^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на распределение клеток по их размеру и средний размер клеток костного мозга на 30 сутки культивирования

Культивирование клеток в присутствии  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,1 мкМ/л не приводит к изменению среднего размера клетки, в то время как при экспозиции с  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,5 мкМ/л наблюдалась тенденция к уменьшению среднего размера, а в концентрациях 1,0 и 10,0 мкМ/л – достоверному уменьшению среднего размера клетки в 1,3 и 1,8 раза соответственно. Такое существенное снижение размера клетки и, по-видимому, их объема является следствием процесса их дегидратации, являющегося одним из признаков апоптотических процессов в клетке (Широкова, 2007).

В табл. 1 приведены результаты анализа количества здоровых клеток и клеток, находящихся на стадиях раннего и позднего апоптоза в культуре, культивируемых без ионов кадмия в среде и в присутствии ионов этого металла.

Видно, что в культуре без воздействия  $Cd^{2+}$  доля апоптотических клеток на различные сроки наблюдения не превышает 5%, что соответствует данным других исследователей для культивируемых клеток костного мозга (Tie-Long Chen et al., 2014; Novoselova et al., 2014; Fenxi Zhang et al., 2015).

Культивирование клеток в присутствии  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л не приводит к изменению количества апоптотических клеток до 24 и 22 суток наблюдения соответственно, а начиная с этого срока наблюдения их доля начинает возрастать до 11% и 15% на 30 сутки наблюдения. Причем увеличение количества происходит только для клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, для которых целостность плазматической мембраны сочетается с экспрессией на ее наружную поверхность фосфатидилсерина. Увеличение количество клеток на стадии позднего апоптоза, характеризующихся уже нарушением целостности мембраны и фрагментацией ДНК при действии этой концентрацией кадмия не наблюдалось.

При экспозиции с  $Cd^{2+}$  в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ/л на 10 и 4 сутки наблюдения соответственно увеличивается доля клеток, находящихся как на ранней, так и на поздней стадиях апоптоза, причем такой эффект был более выражен при действии самой большой дозы – 10,0 мкМ/л.

Таблица 1.

Влияние  $Cd^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на количество здоровых и апоптотических клеток костного мозга, % от общего количества клеток



Здоровые клетки,



Ранние стадии апоптоза,



Поздние стадии апоптоза,

- Annexin VPE-
- 7AAD-

- Annexin VPE+
- 7AAD-

- Annexin VPE+
- 7AAD+

Сутки наблюдения	Концентрация кадмия в среде, мкМ/л														
	Без $Cd^{2+}$			0,1			0,5			1,0			10,0		
2	95	4	1	96	2	2	93	4	3	94	4	2	96	3	1
4	95	3	2	98	2	0	93	3	4	95	3	2	85#	6#	9#
6	97	2	1	95	3	2	95	3	2	92	4	4	82	9	9
8	95	5	0	95	1	4	92	6	2	90	6	4	80	8	9
10	98	2	0	95	2	3	91	6	4	85#	5#	10#	74	6	14
12	95	2	3	95	4	1	93	4	3	87	2	11	77	6	17
14	96	2	2	97	3	0	91	8	1	85	6	9	71	9	20
16	98	1	1	92	4	4	92	5	3	82	6	12	68	8	24
18	97	2	1	95	3	2	91	7	2	71	8	21	66	10	24
20	99	1	0	94	4	2	91	8	1	68	8	24	65	10	25
22	95	1	4	93	6	1	84#	12#	4#	71	9	20	62	11	27
24	98	2	0	87#	9#	4#	85	12	3	67	8	25	59	10	31
26	97	2	1	88	8	4	82	14	4	65	11	24	54	10	36
28	95	3	2	89	9	3	81	16	3	68	8	23	51	12	37
30	94	2	4	85	11	4	81	15	4	70	9	21	52	11	37

Примечание: # – изменения достоверны с обозначенного и во всех последующих сроках наблюдения ( $p < 0,05$ ) по сравнению с предыдущими сутками. Погрешность измерений во всех группах не превышает 1%

На 30 сутки культивирования с кадмием в указанных концентрациях количество микроядер, а, следовательно, и поврежденной ДНК достоверно увеличивается с увеличением дозы кадмия, начиная с концентрации 0,5 мкМ/л (рис. 5, табл. 2).

Таблица 2.

Влияние  $Cd^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на степень фрагментации ДНК в клетках костного мозга, % от общего количества ДНК

	Концентрация кадмия в среде, мкМ/л				
	Без $Cd^{2+}$	0,1	0,5	1,0	10,0
Нефрагментированная ДНК (Head Comet)	99,0	98,0	95,0#	87,0#	81,0#
Фрагментированная ДНК (Tail Comet)	1,0	2,0	5,0#	13,0#	19,0#

Примечание: # – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными без введения  $Cd^{2+}$  и по сравнению с другими его концентрациями. Погрешность измерений во всех группах не превышает 1%,  $n$  (количество проанализированных ядер) = 100

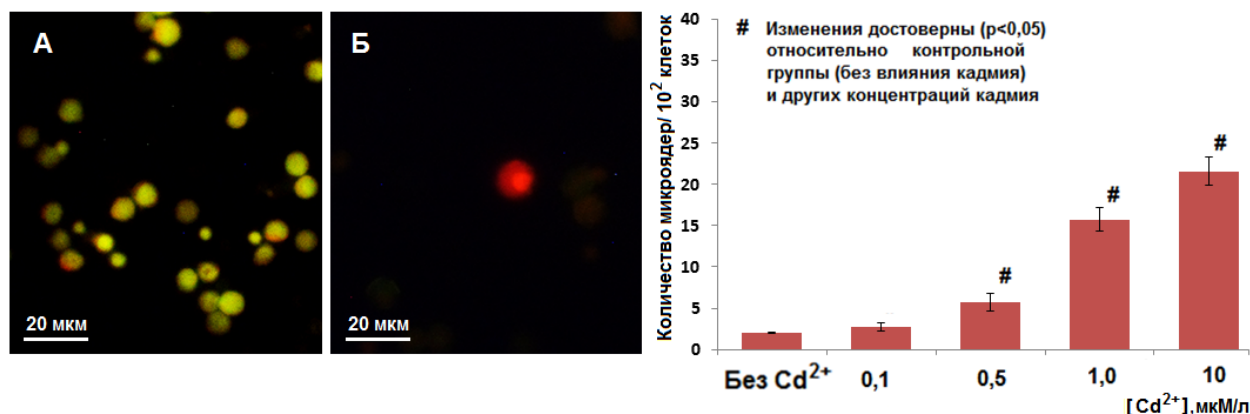


Рис. 5. Влияние Cd<sup>2+</sup> в различной концентрации *in vitro* на количество микроядер в клетках костного мозга на 30 сутки культивирования. А – ядра здоровых клеток, Б – ядра с микроядрами

### Заключение

Таким образом, показано, что длительное воздействие ионов кадмия в концентрации 0,1; 0,5; 1,0 и 10 мкМ/л на клетки костного мозга *in vitro* имеет выраженный цитотоксический эффект. При этом степень выраженности такого эффекта зависит от времени экспозиции и концентрации кадмия. Экспозиция с кадмием в течение 30 суток в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л приводит к незначительному снижению адгезии клеток, не приводит к повреждению их плазматической мембраны и изменению их среднего размера. При этом увеличивается только количество клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, которая является обратимой и не затрагивает фрагментацию ядерной ДНК. Экспозиция же с кадмием в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ приводит к существенному увеличению количества клеток, находящихся на необратимой стадии позднего апоптоза, характеризующейся повреждением плазматической мембраны клеток, уменьшением их среднего размера, фрагментацией ядерной ДНК и резким снижением адгезионных свойств к 30 суткам наблюдения.

### Список литературы / References

- Кругляков П.В., Полянцев Д.Г., Вийде С.К., Кислякова Т.В. Способ получения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга млекопитающих и популяция мезенхимальных стволовых клеток, полученная этим способом. Патент RU 2303632, 2007. Заявл. 04.04.2006. Оpubл. 27.07.2007. Бюл. №21. /Kruglyakov P.V., Polyntsev D.G., Viyde S.K., Kislyakova T.V. The method of obtaining mesenchymal stem cells from the mammalian bone marrow and the population of mesenchymal stem cells obtained by this method. Patent RU 2303632. 2007. Declared 04.04.2006. Published 27.07.2007. Bulletin no. 21./
- Сі У, Плотніков А., Пиріна І. та ін. Дослідження ступеня ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при довготривалому вживанні ними малих доз кадмію // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Вип.73. – С. 109–113. /Si Wu, Plotnikov A., Pyrina I. et al. The investigation of damage extent of DNA from rat bone marrow cells under the long-term consumption of low doses of cadmium // Visnyk of the Lviv University. Series Biology. – 2016. – Issue 73. – P. 109–113./
- Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки // Цитология. – 2007. – Т.49, №5. – С. 385–394. /Shirokova A.V. Apoptosis. Signaling network and changes of cell ion and water balance // Tsitologiya. – 2007. – Vol.49, no. 5. – P. 385–394./
- Benton C.B. Bone marrow isolation, crushing technique. Millipore bone marrow harvesting and hematopoietic stem cell isolation kit protocol. 2009. (<http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/Isolation-of-Bone-Marrow-byBone-Crushing.pdf>)
- Cadena-Herrera D., Esparza-De Lara J.E., Ramírez-Ibañez N.D. et al. Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated // Biotechnology Reports. – 2015. Vol.7. – P. 9–16.
- Dhawan A., Bajpayee M., Pandey A.K., Parmar D. Protocol for the single cell gel electrophoresis / Comet assay for rapid genotoxicity assessment. – Lucknow, India: Industrial Toxicology Research Centre; 2003. (<http://www.cometassayindia.org/protocol%20for%20comet%20assay.pdf>)



- Elsafadi M., Manikandan M., Atteya M. et al. Characterization of cellular and molecular heterogeneity of bone marrow stromal cells // *Stem Cells International*. – 2016. – <http://doi.org/10.1155/2016/9378081>.
- Fenxi Zhang, Tongming Ren, Junfang Wu TGF- $\beta$ 1 induces apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of mitochondrial reactive oxygen species production // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2015. – Vol.10, issue 3. – P. 1224–1228.
- Guava Millipore Nexin protocol. Users Guide. Merck-Millipore, 2016. ([https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Guava-Nexin-Reagent-for-Flow-Cytometry---100-tests,MM\\_NF-4500-0450?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.ua%2F&bd=1](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Guava-Nexin-Reagent-for-Flow-Cytometry---100-tests,MM_NF-4500-0450?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.ua%2F&bd=1))
- Hart B.A., Keating R.F. Cadmium accumulation and distribution in human lung fibroblasts // *Chemico-Biological Interactions*. – 1980. – Vol.29, issue 1. – P. 67–83.
- Hui Wang, Zheng Liu, Wenxiu Zhang et al. Cadmium-induced apoptosis of Siberian tiger fibroblasts via disrupted intracellular homeostasis // *Biol. Res*. – 2016. – Vol.49. – <http://doi.org/10.1186/s40659-016-0103-6>.
- Jin Long-Jin, Lou Zhe-Feng, Dong Jie-Ying et al. Effects of cadmium and mercury on DNA damage of mice bone marrow cell and testicle germ cell in vitro // *J. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*. – 2004. – Vol.16 (2). – P. 94–97.
- Khan H.A., Arif I.A., Sudimack A.G., Williams J.B. Cytotoxic effects of cadmium and paraquat on avian skin fibroblasts // *Annual Research & Review in Biology*. – 20104. – Vol.4 (11). – P. 1757–1768.
- Novoselova K.A., Zlatnik E.Yu., Lysenko I.B. et al. Analysis of apoptotic processes in bone marrow cell culture of lymphoma (L) patients (pts) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32, no. 15. – Suppl. – e14018.
- Oliveira-Martins C.R., Grisolia C.K. Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide // *Genet. Mol. Res*. – 2007. – Vol.6 (3). – P. 566–574.
- Shadi Abu-Hayyeh, Minder Sian, Keith J.G. et al. Cadmium accumulation in aortas of smokers // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 2001. – Vol.21. P. 863–867.
- Tie-Long Chen, Guang-Li Zhu, Jian-An Wang et al. Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by hypoxia/reoxygenation via multiple pathways // *Int. J. Clin. Exp. Med*. – 2014. – Vol.7 (12). – P. 4686–4697.
- Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, 2012. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>)

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the authors:** Wu Si – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [wu.si.biochem2018@gmail.com](mailto:wu.si.biochem2018@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5350-5569>  
T.Kharchenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [tanyakh1606@gmail.com](mailto:tanyakh1606@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3082-6340>  
K.Kot – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [kate.v.kot@gmail.com](mailto:kate.v.kot@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-4814-847X>  
Y.Kot – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [kot.juriy@gmail.com](mailto:kot.juriy@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>  
Ye.Perskyi – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [evg.perskyi@gmail.com](mailto:evg.perskyi@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-2492-9741>

**Про авторів:** У Сі – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, [wu.si.biochem2018@gmail.com](mailto:wu.si.biochem2018@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5350-5569>  
Т.Харченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, [tanyakh1606@gmail.com](mailto:tanyakh1606@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3082-6340>  
К.Кот – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, [kate.v.kot@gmail.com](mailto:kate.v.kot@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-4814-847X>

Ю.Кот – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, kot.juriy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>

Є.Перський – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, evg.persky@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2492-9741>

**Об авторах:** У Си – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, wu.si.biochem2018@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5350-5569>

Т.Харченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tanyakh1606@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3082-6340>

Е.Кот – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, kate.v.kot@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4814-847X>

Ю.Кот – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, kot.juriy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>

Е.Перский – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, evg.persky@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2492-9741>

## ••• МІКРОБІОЛОГІЯ ••• MICROBIOLOGY •••

УДК: 579.64:633.11:581.14

### Мікроміцети ризосфери та філосфери ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці (*Triticum aestivum* L.) у зв'язку з темпами розвитку та продуктивністю

О.О.Авксентьєва, О.І.Віннікова

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)  
avksentyeva@karazin.ua

У польових дослідах вивчали чисельність та видовий склад мікроміцетів ризосфери та філосфери ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці м'якої сорту Миронівська 808 у зв'язку з темпами їх розвитку. Встановлено, що лінії з доміантними генами *VRN-A1a* і *VRN-D1a* переходять до колосіння значно раніше, ніж лінія з доміантним геном *VRN-B1a*. У ліній, які розвиваються швидше, елементи індивідуальної продуктивності вищі, а вміст білка в зерні був нижчий, ніж у лінії, яка розвивається сповільненими темпами. Чисельність пропагул та видів мікроміцетів у ризосфері всіх ліній була більшою, ніж у філосфері. У результаті досліджень видової різноманітності мікоценозів NILs з ризосфери пшениці в чисту культуру було виділено 319 штамів мікроміцетів, які належали до 20 родів Zygomycota та Ascomycota. Найбільшою кількістю видів були представлені роди *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* і темнопігментовані мікроміцети. Встановлено, що у ризосфері досліджуваних ізоляцій максимальна чисельність грибних пропагул та видів мікроміцетів характерна для ізоляцій *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, які розвиваються прискореними темпами, а мінімальна – для прикореневого ґрунту лінії *VRN-B1a*. З філосфери колосів рослин пшениці усіх досліджених ліній було виділено невелике число видів мікроскопічних грибів – усього 27 штамів з 6 родів. Потенційні фітопатогени – представники роду *Fusarium* були знайдені в змивах з колосів усіх ліній, а у змивах з колосів рослин лінії *VRN-A1a* траплялися ще й представники темнопігментованих грибів. Кількість грибних пропагул також максимальною була у ізоляції з прискореними темпами розвитку *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, мінімальною – у рослин ізоляції *VRN-B1a*. Таким чином, заселеність мікроміцетами та їх видова структура як ризосфери, так і колосу корелювала з темпами розвитку ліній, які детермінуються доміантним/рецесивним станом генів *VRN*. Тому можна припустити, що гени *VRN* опосередковано, через участь у регуляції фізіолого-біохімічних процесів, можуть бути задіяними у формуванні та функціонуванні мікоценозу досліджених ізогенних ліній пшениці м'якої.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum* L., ізогенні лінії, гени *VRN*, темпи розвитку, продуктивність, ризосфера, філосфера, мікроміцети, чисельність грибних пропагул, видова різноманітність мікоценозу.

### Micromycetes of rhizosphere and phyllosphere in the lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) isogenic by *VRN* in relation to the development rate and productivity

O.O.Avksentyeva, O.I.Vinnikova

The field experiments were performed in order to assess the micromycetes number and species composition in the rhizosphere and phyllosphere of the Myronivska 808 soft wheat lines isogenic by *VRN* genes in relation to the rate of wheat development. It was established that the lines with dominant genes *VRN-A1a* and *VRN-D1a* came to the earing phase remarkably earlier than the line with the dominant gene *VRN-B1a*. In lines, which have faster development, the parameters of individual productivity were higher, and the content of protein in grains was lower than that in the line with lower development rate. The number of micromycetes species and their propagules in the rhizosphere of all wheat lines were higher than that in the phyllosphere. As a result of the study of species diversity of NILs mycocenoses from rhizosphere of wheat 319 strains of micromycetes, belonging to 20 genera of Zygomycota and Ascomycota, were isolated in pure culture. The most species were identified from genera *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, and dark-pigmented micromycetes. It was established that in the rhizosphere the maximum number of micromycetes species and propagules was associated with the isolines of *VRN-A1a* and *VRN-D1a*, which showed an accelerated development, while the minimum fungi diversity occurred in the root soil of the *VRN-B1a* line. The phyllosphere of the plant ears in all studied wheat isolines appeared to be rather poor in microscopic fungi:

only 27 strains belonging to 6 genera were identified. Potential phytopathogens – representatives of the genus *Fusarium* were found on the surface of the plant ears of all lines, and in the phyllosphere of plants of VRN-A1a line there were also representatives of dark pigmented micromycetes. The number of fungal propagules was also maximal for isolines with accelerated rates of development – VRN-A1a and VRN-D1a, and minimal for plants of VRN-B1a isolate. Thus, population density of micromycetes and their species structure, both in rhizosphere and on plant ears, correlated with the rate of development of wheat lines, which was determined by the dominant/recessive state of the VRN genes. Therefore it can be assumed that VRN genes are indirectly involved in the formation and functioning of the mycosenoses of the studied isogenic lines of soft wheat, particularly via their participation in the regulation of physiological and biochemical processes.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., isogenic lines, VRN genes, rate of development, productivity, rhizosphere, phyllosphere, micromycetes, number of fungal propagules, species diversity of mycosenosis.

## Мікроміцети ризосфери і філосфери ізогенних по генам VRN ліній пшениці (*Triticum aestivum* L.) в зв'язі з темпами росту і продуктивністю

О.А.Авксентьева, О.И.Винникова

В полевих опытах изучали численность и видовой состав микромицетов ризосферы и филосферы изогенных по генам VRN линий пшеницы мягкой сорта Мироновская 808 в связи с темпами их развития. Установлено, что линии с доминантными генами VRN-A1a и VRN-D1a переходят к колосению значительно раньше, чем линия с доминантным геном VRN-B1a. У линий, которые развиваются быстрее, элементы индивидуальной продуктивности выше, а содержание белка в зерне ниже, чем у линии, которая развивается замедленными темпами. Численность спор и видов микромицетов в ризосфере всех линий была больше, чем в филосфере. В результате исследований видовой разнообразия микоценозов NILs с ризосферы пшеницы в чистую культуру было выделено 319 штаммов микромицетов, принадлежащих к 20 родам Zygomycota и Ascomycota. Наибольшим количеством видов были представлены роды *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* и темнопигментированные микромицеты. Установлено, что в ризосфере исследуемых изолиний максимальная численность грибных спор и видов микромицетов характерна для изолиний VRN-A1a и VRN-D1a, развивающихся ускоренными темпами, а минимальная – для прикорневой почвы линии VRN-B1a. С филосферы колосьев растений пшеницы всех исследованных линий было выделено небольшое число видов микроскопических грибов – всего 27 штаммов из 6 родов. Потенциальные фитопатогены – представители рода *Fusarium* были найдены в смывах с колосьев всех линий, а в смывах с колосьев растений линии VRN-A1a встречались еще и представители темнопигментированных грибов. Количество грибных спор также максимальным было у изолиний с ускоренными темпами развития VRN-A1a и VRN-D1a, минимальным – у растений изолинии VRN-B1a. Таким образом, заселенность микромицетами и их видовой структура как ризосферы, так и колоса коррелировала с темпами развития линий, которые детерминируются доминантным/рецессивным состоянием генов VRN. Поэтому можно предположить, что гены VRN опосредованно, через участие в регуляции физиолого-биохимических процессов, могут быть задействованы в формировании и функционировании микоценозов исследованных изогенных линий пшеницы мягкой.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., изогенные линии, гены VRN, темпы развития, продуктивность, ризосфера, филосфера, микромицеты, численность грибных спор, видовой разнообразие микоценоза.

### Вступ

Сучасне землеробство – багатоконпонентна система, окремі елементи якої знаходяться у взаємозв'язку між собою та природним середовищем. Важливу роль в розвитку рослин, в тому числі й сільськогосподарських, відіграють зовнішні фактори, які в комплексі впливають на ріст і продуктивність культур (Дем'янюк та ін., 2016). Серед таких факторів значну роль відіграють біотичні, а саме взаємовідносини рослина-мікроорганізм. Спектр цих взаємовідносин є поліфункціональним: забезпечення рослинного організму поживними речовинами за рахунок утилізації та мобілізації необхідних речовин ґрунту у доступній формі; пряме стимулювання росту за дії рістстимулюючих фітогормонів; продукування біологічно активних речовин (БАВ) – вітамінів, ферментів, антибіотиків; опосередковане стимулювання росту за рахунок конкуренції з фітопатогенами тощо. В той же час рослинний організм є нішею для існування різноманітних мікроорганізмів, які у сукупності формують унікальну фітосферу рослини (ризосферу, філосферу та

ендосферу) (Мошинець, Косаківська, 2010). Збалансований мікробоценоз фітосфери є ефективним для обох макро- і мікропартнерів, але за дії екстремальних факторів факультативні мікроорганізми можуть проявляти потенційну патогенність (Яринчин, 2008). Для стимулювання підвищення якості сільськогосподарської продукції та запобігання втрат урожаю за рахунок дії патогенної мікрофлори необхідно всебічно досліджувати мікроорганізми, які розповсюджені у ризосфері та на поверхні (фітосфері) рослинного організму (Ковалишина та ін., 2016).

Однією з найбільш розповсюджених і важливих сільськогосподарських культур в Україні є озима м'яка пшениця *Triticum aestivum* L. (Дубровна та ін., 2014). Ця культура має виключно широкий ареал, що свідчить про високу біологічну пластичність (адаптивність) щодо екологічних умов, що в свою чергу, пов'язано з особливостями її генотипу (Khotyljova et al., 2002).

Перехід рослин пшениці *Triticum aestivum* L. від вегетативного періоду розвитку до генеративного є найважливішим етапом онтогенезу, який визначає багато господарсько цінних ознак цієї сільськогосподарської культури (Dhillon et al., 2010). Ключовими генами в даному процесі є гени *VRN* (vernalization response), які детермінують реакцію пшениці на яровизацію (верналізацію) і тим самим визначають темпи її розвитку (Dennis, Peacock, 2009). Реакція на яровизацію у пшениці контролюється, щонайменше, п'ятьма генами (Степаненко и др., 2012), три основних з яких *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a* і *Vrn-D1a*, локалізовані відповідно в хромосомах 5A, 5B і 5D. Озимий тип розвитку рослин проявляється тільки в тому випадку, якщо ці всі три основних гена рецесивні, а якщо хоча б один з них є домінантним, рослини розвиваються за ярим типом. Гени *VRN* активно досліджуються на молекулярно-генетичному рівні, вони клоновані і в останні роки для пшениці описано декілька їх алельних варіантів (Мутерко и др., 2015; Степаненко и др., 2012). Встановлено, що гени *Vrn-A1a* і *Vrn-B1a* є транскрипційними факторами (Trevaskis et al., 2003). Ген *Vrn-A1* кодує MADS-box транскрипційний фактор, локус *Vrn-B1* містить два тандемно дуплікованих гени, що пригнічують фактор цвітіння *ZCCT* (Distelfeld et al., 2009), а *Vrn-D1* кодує білок, схожий з інгібіторами Raf-кіназ (Степаненко и др., 2012). Ці дослідження мають дуже важливе значення для поглиблення уявлень про генетичні (Степаненко, 2012), епігенетичні (Щербань, Салина, 2013; Oliver et al., 2009) та молекулярно-біологічні (Мутерко и др., 2015; Trevaskis, 2010) механізми контролю розвитку пшениці.

Характер та інтенсивність фізіолого-біохімічних процесів, що протікають в рослинному організмі, також генетично детерміновані генами контролю темпів розвитку рослин (Авксентьева, 2011; Жмурко та ін., 2017). Це дає підставу припускати, що рівень екзометаболітів, які відіграють основну роль у формуванні та функціонуванні специфічного мікробоценозу фітосфери, може залежати від генотипу. Проте ефекти генів *VRN* на фізіологічні процеси, які координують регуляцію взаємовідносин в системі рослина-мікроорганізм, а саме здатність формувати специфічний ризоценоз, залишаються мало дослідженими (Авксентьева, Віннікова, 2016).

Сучасні дослідження мікробоценозів фітосфери рослин пшениці проводяться з вивчення різноманітності мікроміцетів кореневої зони ярої пшениці (Копилов, 2010), ризосфери ярих злаків (Гажеєва и др., 2011), залежності чисельності окремих фізіологічних груп мікроорганізмів від фаз онтогенезу рослин, умов зростання, специфічності угруповань залежно від виду макропартнеру. Проте дослідження мікроміцетів, які є дуже розповсюдженими організмами у ризосфері, проводяться переважно з вивчення їх патогенної дії на рослинний організм (Крючкова, Грицюк, 2014) та якість зернової продукції (Фузаріоз зерна..., 2012). У цих роботах висвітлені вагомні аспекти взаємодії сортів польових культур з мікроорганізмами ризосфери, які вказують на залежність цього процесу від генотипу макропартнеру. Однак, вони не дають можливості виокремити роль конкретних генів у функціонуванні системи рослина-мікроорганізм.

У зв'язку з викладеним вище, метою даної роботи було з'ясувати можливий зв'язок чисельності та видової структури мікроміцетів (ризо- та фітосфери) з темпами розвитку і характером фізіолого-біохімічних процесів у пшениці м'якої під контролем генів *VRN*.

### Матеріали та методи

Усі досліджені нами лінії пшениці створені в генофоні сорту Миронівська 808. Експериментальна модель, яка складається з ізогенних за генами *VRN* ліній (NILs) пшениці є достатньо зручною для досліджень, оскільки рослини утворені в генофоні одного сорту, відрізняються тільки за станом (домінантний/рецесивний) конкретних алелів, що дозволяє виокремити їх ефекти на досліджуваний параметр, фізіолого-біохімічний процес тощо.

Досліджувані ізогенні лінії за спільного генотипу сорту Миронівська 808 ярого типу розвитку і різняться за однією з домінантних алелей та мають наступні генотипи *VRN-A1aVRN-B1bVRN-D1b*, *VRN-A1bVRN-B1aVRN-D1b*; *VRN-A1bVRN-B1bVRN-D1a*. У тексті роботи, таблицях та на рисунках вказані тільки домінантні алелі.

Дослідні рослини вирощували в природних умовах, на польовій ділянці кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна протягом 2016–2017 років. Рослини вирощували за умов оптимальних весняних строків сівби, яку проводили вручну на ділянках 1 м<sup>2</sup> у триразовій повторності за кожним варіантом ізогенної лінії. Ґрунт дослідної ділянки – чорнозем опідзолений, важко суглинковий.

Протягом вегетаційного періоду були проведені фенологічні спостереження – визначали тривалість періоду сходи-колосіння (ПСК), а також морфометричні та біохімічні аналізи – визначали елементи індивідуальної продуктивності – довжину колосу, масу зерна з колосу, кількість зерен в колосі та масу 1000 зерен, а також білковість зерна. Вміст білку в зерні визначали методом К'ельдаля з коефіцієнтом перерахунку на білок 5,25 (Методы..., 1987). Усі дослідні і аналізи проведені у триразовій повторності. Результати оброблені статистично, в таблицях наведені середні значення та їх стандартні відхилення (Доспехов, 1985).

Для дослідження складу мікроміцетів ризосфери пшениці відбір проб проводили у фазу кушіння рослин, а для дослідження мікроміцетів колосу (філосфери) – під час колосіння та наливу зерна. Для роботи використовували по 10–12 рослин, які рандомізовано відбирали по всій ділянці. Відбір зразків здійснювали з використанням загальноприйнятих в мікологічній практиці методів (Зенова и др., 2002). Видовий склад мікроміцетів визначали методом глибинного засіву водної суспензії ризосферного ґрунту або змивної води з поверхні колосів у розплавлені живильні середовища Чапека і сусло-агар у чашки Петрі, які витримували при кімнатній температурі. Окремі штами грибів виділяли у пробірки з відповідними живильними середовищами для зберігання та ідентифікації (Методы..., 1991). Чисельність грибних пропагул визначали за умов розведення ґрунтової суспензії 1 : 100 – 1 : 1000, шляхом підрахунку колоній, що виростили на твердому поживному середовищі у чашках Петрі з подальшим перерахунком на 1 г ґрунту (Методы..., 1991). Ідентифікацію мікроміцетів здійснювали у нативних препаратах з використанням загальноживлених методів та визначників (Методы..., 1991). Систематичну структуру мікроскопічних грибів подано згідно Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (Kirk et al., 2008). В таблицях і на діаграмах наведені абсолютні значення або відсоток певної систематичної одиниці від загального числа виділених видів мікроміцетів в даній точці відбору зразка. Також представлені середні значення і стандартні відхилення кількості грибних пропагул (Доспехов, 1987).

### Результати та обговорення

Відомо, що мікроорганізми ризосфери можуть істотно впливати на ріст, розвиток і продуктивність рослин, зокрема пшениці (Копилов, 2010). З цієї точки зору доцільним було визначити характер (темпи) розвитку, елементи продуктивності та вміст білку в зерні досліджених ліній, які використані як модель макропартнера для дослідження чисельності та видової структури мікроміцетів у їх ризо- та філосфері, залежно від генотипу за генами *VRN*.

Фенофаза колосіння-цвітіння рослин пшениці головним чином є визначальною для формування майбутнього врожаю. Показано, що фотосинтетична активність і азотний статус впливають на накопичення сухої маси і вміст білку в зерні (Моргун и др., 2010). Результати фенологічних спостережень показали (табл. 1), що лінії з домінантними генами *VRN-A1a* та *VRN-D1a* переходили до колосіння через 57 та 52 доби після сходів відповідно, тоді як ізолінія *VRN-B1a* колосилася через 65 діб після сходів. Отже за даними фенологічних спостережень залежно від генотипу за генами *VRN* ізолінії можна розподілити на лінії з прискореними темпами розвитку *VRN-A1a* та *VRN-D1a* і зі сповільненими темпами розвитку – *VRN-B1a*, що співпадає з даними літератури та раніше одержаними нами даними (Степаненко и др., 2012; Жмурко та ін., 2017).

На нашу думку, різні темпи розвитку ліній можуть бути обумовлені саме комбінацією домінантних та рецесивних алелів, за якою ізолінії різняться між собою. Вірогідно, що домінантні та рецесивні алелі генів функціонально пов'язані як генетична регуляторна система, яка детермінує темпи розвитку пшениці м'якої (Степаненко и др., 2012).

Таблиця 1.  
 Темпи розвитку та вміст білка в зерні рослин різних ізогенних ліній пшениці сорту  
 Миронівська 808

Генотип лінії	Період сходи- колосіння (ПСК), діб	Темпи розвитку	Вміст білку, мг/г сухої маси
<i>VRN-A1aVRN-B1eVRN-D1e</i>	57 ± 2	Прискорені	140,3±2,0
<i>VRN-A1eVRN-B1aVRN-D1e</i>	65 ± 4	Сповільнені	161,3±3,5
<i>VRN-A1eVRN-B1eVRN-D1a</i>	52 ± 1	Прискорені	155,0±1,1

Вміст білка в зерні пшениці – одна з найважливіших господарських ознак, яка визначає поживну цінність і хлібопекарські якості борошна. Показана залежність вмісту білка в зерні пшениці від зовнішніх факторів і генотипу сорту (Рибалка та ін., 2011). Досліджені ізолінії сорту Миронівська 808 у напрямку зниження вмісту білка в зерні ранжуються в наступному порядку: *VRN-B1a* > *VRN-D1a* > *VRN-A1a*. Тобто, найвищий вміст білка в цих умовах виявлений у лінії, що найбільш повільно розвивається, – *VRN-B1a*, дещо нижчий у лінії *VRN-D1a*, а мінімальний – у лінії *VRN-A1a*. Можливо, це може бути пов'язане з опосередкованою, через регуляцію темпів розвитку, участю генів *VRN* у формуванні рівня білковості зерна пшениці.

Біологічна продуктивність рослин пов'язана, головним чином, з процесом фотосинтезу (Моргун и др., 2010). Результати вивчення продуктивності досліджених ліній показали таку закономірність – показники елементів продуктивності у лінії, що найбільш повільно розвивається, – *VRN-B1a*, були нижчі, ніж у ліній, що розвиваються прискореними темпами, – *VRN-A1a* і *VRN-D1a* (табл. 2).

Таблиця 2.  
 Показники індивідуальної продуктивності рослин ізогенних за генами *VRN* ліній  
 пшениці сорту Миронівська 808

Генотип лінії*	Довжина колоса, см	Маса зерна з колосу, г	Кількість зерен в колосу, шт.	Маса 1000 зерен, г
<i>VRN-A1a</i>	10,0±0,5	0,72±0,02	23,7±0,2	27,8±0,5
<i>VRN-B1a</i>	7,7±0,3	0,31±0,01	16,2±0,2	17,4±0,4
<i>VRN-D1a</i>	7,8±0,2	0,41±0,01	18,0±0,3	25,8±0,5

\* показані тільки домінуючі гени.

Максимальні відмінності стосувалися числа зерен у колосі: у рослин лінії *VRN-A1a* даний показник був у 1,3–1,5 рази більшим, ніж у рослин інших ліній. Що стосується маси 1000 зерен, то за цим показником найбільші відмінності були встановлені для ліній *VRN-A1a* і *VRN-D1a* відносно лінії *VRN-B1a* – майже у 1,6 рази, а відмінності між лініями *VRN-A1a* і *VRN-D1a* були незначущими (табл. 2). Отже, лінії *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, які переходять до колосіння раніше, ніж лінія *VRN-B1a*, формують і більш високу продуктивність, що свідчить про участь генів *VRN* в детермінації цього процесу (табл. 2).

Як відомо, ґрунтові мікроміцети достатньо поширені, мають важливе значення у кругообігу речовин та формуванні ефективних мікоценозів рослин пшениці м'якої (Копилов, 2010), тому дослідження чисельності та видового складу мікроміцетів кореневої зони та філосфери колосу є важливим. Дослідження чисельності та видової різноманітності мікроміцетів у ризосфері та на поверхні колосів пшениці різних ізогенних ліній показали відмінності даних показників. В цілому показано, що прикоренева зона – ризосфера є більш заселеною мікроміцетами, ніж філосфера, що пов'язано з більш жорсткими умовами дії фізичних факторів існування у філосфері – перепад температур, зневоднення, інсоляція, обмеженість трофічних факторів (Мошинець, Косаківська, 2010). Кількість грибних пропагул та число видів мікроміцетів у ризосфері є на порядок вищим, ніж у філосфері колосся у всіх досліджуваних ліній, незалежно від їх генотипу (табл. 3).

Таблиця 3.

Чисельність грибних пропагул та число видів мікроміцетів у ризосфері та на поверхні колосу (філосфері) ізогенних за генами VRN ліній пшениці сорту Миронівська 808

Генотип ізоляції*	Ризосфера		Філосфера	
	кількість грибних пропагул	число видів мікроміцетів	кількість грибних пропагул	число видів мікроміцетів
VRN-A1a	$1,66 \pm 0,05 \times 10^3$	28	$1,25 \pm 0,02 \times 10^2$	5
VRN-B1a	$1,33 \pm 0,02 \times 10^3$	22	$1,12 \pm 0,01 \times 10^2$	2
VRN-D1a	$1,57 \pm 0,03 \times 10^3$	26	$1,25 \pm 0,02 \times 10^2$	4

\* показані тільки домінуючі гени.

Встановлено, що у ризосфері досліджуваних ізоляцій максимальна чисельність грибних пропагул та число видів мікроміцетів характерна для ізоляцій VRN-A1a і VRN-D1a, які розвиваються прискореними темпами, а мінімальна – у прикореновому ґрунті лінії VRN-B1a (табл. 3). Як було показано нами в попередніх дослідженнях (Самойлов и др., 2009), це може бути пов'язано з продукуванням рослинами цих ліній більшої кількості кореневих виділень – розчинних цукрів, також більш інтенсивний розвиток може приводити до інтенсивного росту корінців, а відмерлі клітини кореневої системи є поживними речовинами для мікроміцетів.

Прискорений розвиток ізоляцій VRN-A1a і VRN-D1a пов'язаний з інтенсифікацією фотосинтетичних процесів (Жмурко та ін., 2017), що, можливо, стимулює відтік асимілятів до атрагуючих центрів – колосся, що формуються, та кореневої системи. Саме тому, можливо, ці лінії в більшій мірі постачають трофічні речовини в кореневу зону, що в свою чергу, зумовлює більшу чисельність мікроміцетів.

Результати вивчення видової різноманітності мікобіоти під посівами пшениці різних ізогенних ліній представлені на рис. 1.

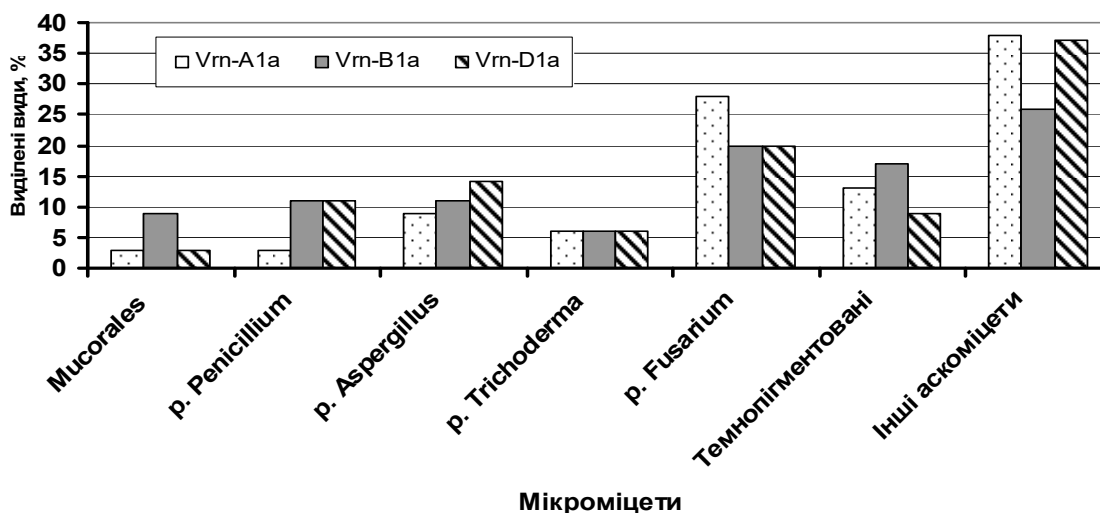


Рис. 1. Різноманітність ризосферних мікроміцетів у ізогенних за генами VRN ліній пшениці сорту Миронівська 808

У результаті дослідження видової різноманітності мікоценозів NILs встановлено, що з ризосфери пшениці в чисту культуру було виділено 319 штамів мікроміцетів, які належали до 20 родів Zygomycota та Ascomycota. Найбільшою кількістю видів були представлені роди *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, темнопігментовані мікроміцети та ін. В цілому, систематична структура ризосферних мікроміцетів, які виявлені у досліджених ліній,



характеризувалася незначною різноманітністю і була аналогічною. Проте співвідношення родів і груп мікроміцетів у мікобіоті певної лінії відрізнялося. Так, суттєві відмінності стосувалися видів – потенційних фітопатогенів (темнопігментовані гриби та представники р. *Fusarium* Link): максимальний їх відсоток виявлений в мікобіоті лінії *VRN-A1a*, дещо менше їх було в ризосфері рослин лінії *VRN-B1a*. Ризосфера рослин лінії *VRN-D1a* містила найменшу кількість потенційних фітопатогенів, з чого можна робити припущення про більш високу потенційну стійкість даного генотипу до фітопатогенів. Також слід відмітити, що вклад у мікобіоту природних антагоністів фітопатогенів, грибів роду *Trichoderma* Pers., для ризосфери рослин усіх ліній, був однаковим – 6% (рис. 1).

З поверхні філосфери колосів рослин пшениці усіх досліджених ліній було виділено незначне число видів мікроскопічних грибів – всього 27 штамів, які належали до 6 родів (табл. 4). Потенційні фітопатогени – представники роду *Fusarium* були знайдені в змивах з колосів усіх ліній, а у змивах з колосів рослин лінії *VRN-A1a* траплялися ще й представники темнопігментованих грибів. Кількість грибних пропагул також максимальною була у ізоляції з прискореними темпами розвитку *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, мінімальною – у рослин ізоляції *VRN-B1a* (див. табл. 3).

Таким чином, в результаті проведених досліджень нами встановлено, що ізоляції, які розвиваються прискореними темпами, характеризувалися більш чисельним та різноманітним складом мікоценозу. Ізоляція, яка розвивалася повільно та мала більш тривалий вегетаційний період, була здатна формувати більш специфічний мікоценоз. Отже, одержані дані показали, що чисельність та видова структура мікроміцетів ризосфери і колосу (філосфери) досліджених ізогенних ліній пов'язана з їх генотипом за генами *VRN*.

Таблиця 4.

**Перелік видів мікроміцетів, виділених з поверхні колосів рослин ізогенних ліній сорту Миронівська 808**

Мікроміцети**	Генотип ізоляції*		
	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>Vrn-D1a</i>
<i>Mucor</i> sp.	-	-	+
<i>Penicillium</i> sp. секція <i>Asymmetrica</i>	+	-	-
<i>Fusarium avenaceum</i> var. <i>herbarum</i> (Corda) Sacc.	+	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	+	+	+
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	+
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keiss.	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fr.) de Vri.	+	-	-
Усього видів	5	2	4

\* показані тільки домінантні гени;

\*\* (+) наявний, (-) відсутній вид.

На нашу думку, пояснити встановлені відмінності між дослідженими лініями за чисельністю і видами мікроміцетів у кореневій зоні та колосі можна, спираючись на особливості протікання у них фізіолого-біохімічних процесів. Показано, що для ізоляції пшениці сорту Миронівська 808, які несуть домінантні гени *Vrn-A1a* і *Vrn-D1a* і розвиваються швидше, ніж ізоляція з домінантним геном *Vrn-B1a*, характерний більш інтенсивний вуглеводний та азотний обмін і перебіг ростових процесів (Жмурко та ін., 2017). Встановлено, що лінії з прискореними темпами розвитку відрізняються від лінії із сповільненим розвитком більшим рівнем виділення та іншим складом метаболітів у кореневій зоні (Самойлов и др., 2009). Отже, саме це може бути одним з головних чинників, які обумовлюють різницю між лініями за чисельністю, видовим складом та співвідношенням видів мікроміцетів у ризосфері.

Той факт, що ізоляції різняться за чисельністю мікроміцетів у філосфері, може бути пов'язаний з різними темпами їх розвитку. Досліджені лінії переходять до колосіння у різні строки, тому ця фенофаза може протікати у них за різного рівня напруги чинників довкілля – температурних, фотоперіодичних умов, інсоляції та зволоження. Ці чинники, як відомо, впливають на рівень розвитку мікроорганізмів залежно від їх біологічних особливостей.

Таким чином, аналіз одержаних результатів дозволяє припустити, що гени VRN беруть участь у формуванні і функціонуванні мікоценозів пшениці. Вірогідно, що ці їх ефекти реалізуються опосередковано, через участь у регуляції темпів розвитку, продуктивності, якості зерна та перебігу фізіолого-біохімічних процесів.

Автори виражають подяку заступнику директора з наукової роботи Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насінництва і сортовивчення НААН України д.б.н. Файту Віктору Івановичу за представлений рослинний матеріал – ізогенні за генами VRN лінії сорту Миронівська 808 для проведення досліджень.

Робота виконана в рамках держбюджетної теми «Дослідження фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних механізмів генетичного контролю розвитку і продукційного процесу сільськогосподарських культур» (номер держреєстрації № 0112U000101) за пріоритетним тематичним напрямком «Фундаментальні проблеми наук про життя і розвиток біотехнологій».

### Список літератури / References

- Авксентьева О.А. Физиолого-биохимическая регуляция темпов развития изогенных линий пшеницы *Triticum aestivum* L. // Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти. Матеріали II міжнародної наукової конференції. – Харків, 2011. – С. 15–16. /Avksentyeva O.A. Physiological and biochemical regulation of the rate of development of wheat isogenic lines of *Triticum aestivum* L. // Regulation of growth and development of plants: physiological, biochemical and genetic aspects. Materials of the II International Scientific Conference. – Kharkiv, 2011. – P. 15–16./
- Авксентьева О.А., Вінникова О.І. Чисельність мікроміцетів у ризосфері ізогенних за генами VRN ліній пшениці у зв'язку з темпами розвитку та продуктивністю // Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці. Матеріали міжн. конф., присвяченої 100-річчю селекції пшениці в Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннезнавства та сортовивчення. – Вінниця: ТОВ Нілан-ЛТД, 2016. – С. 54–56. /Avksentyeva O.A., Vinnikova O.I. The number of micromycetes in the rhizosphere of the wheat lines isogenic by VRN genes in connection with the rate of development and productivity // Current trends of breeding improvement of wheat. Materials of the international conference dedicated to the 100<sup>th</sup> anniversary of wheat selection at the Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation. – Vinnitsa: LLC Nilan LTD, 2016. – P. 54–56./
- Гажеева Т.П., Гордеева Т.Х., Масленникова С.Н. Динамика численности и состава микроорганизмов ризосферы некоторых злаковых растений в процессе их роста и развития // Вестник ОГУ. – 2011. – №12 (131). – С. 328–330. /Gazheeva T.P., Gordeeva T.H., Maslennikova S.N. Dynamics of the number and composition of microorganisms of the rhizosphere of some cereal plants in the process of their growth and development // Bulletin of the OSU. – 2011. – No. 12 (131). – P. 328–330./
- Дем'янюк О.С., Шерстобоева О.В., Чайковська В.В. Спрямованість біологічних процесів у ґрунті за різних систем удобрення пшениці озимої та погодних умов // Збалансоване природокористування. – 2016. – №2. – С. 146–151. /Dem'yanyuk O.S., Sherstoboeva O.V., Chaykovska V.V. Direction of biological processes in the soil under different fertilizer systems of winter wheat and weather conditions // Balanced Natural Resources. – 2016. – No. 2. – P. 146–151./
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351с. /Dospikhov B.A. Methodology of field experience. – M.: Agropromizdat, 1985. – 351p./
- Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біологічна характеристика та господарське значення пшениці та чинники, що обмежують її урожайність // Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. – К.: Логос, 2014. – С. 11–16. /Dubrovna O.V., Morgun B.V., Baval A.V. Biological characteristics and economic value of wheat and factors limiting its yield // Biotechnology of wheat: cell selection and genetic engineering. – K.: Logos, 2014. – P. 11–16./
- Жмурко В.В., Авксентьева О.О., Юхно Ю.Ю. та ін. Ефекти генів фотоперіодичної чутливості і потреби в яровизації у рослин пшениці м'якої та сої культурної // Фізіологія рослин: досягнення та нові напрями розвитку. – К.: Логос, 2017. – С. 187–197. /Zhmurko V.V., Avksentyeva O.O., Yukhno Yu.Yu. et al. Effects of genes of photoperiodic sensitivity and the need for vernalization in soft wheat and soybean plants // Plant physiology: achievements and new directions of development. – K.: Logos, 2017. – P. 187–197./
- Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А. Практикум по биологии почв. – М.: Издательство МГУ, 2002. – 120с. /Zenova G.M., Stepanov A.L., Likhacheva A.A. Workshop on soil biology. – Moscow: Publisher MSU, 2002. – 120p./
- Ковалишина Г.М., Демидов О.А., Муха Т.О. та ін. Миронівські сорти пшениці озимої із груповою стійкістю проти хвороб для Лісостепу України // Ел. журнал «Наукові доповіді НУБіП України». – 2016. – №5 (62). – [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd\\_2016\\_5\\_23](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2016_5_23). /Kovalishina G.M., Demidov O.A., Mukha T.O. et al.

- Mironovsky winter wheat varieties with group resistance to diseases for the forest-steppe of Ukraine // Electronic journal "Scientific Reports of NUBiP of Ukraine". – 2016. – No. 5 (62)./
- Копилов Є.П. Видове різноманіття мікроміцетів лучно-чорноземного вилугованого ґрунту кореневої зони пшениці ярої // Агроекологічний журнал. – 2010. – №3. – С. 55–59. /Kopylov Ye.P. Species diversity of micromycetes of meadow-chernozem extracted soil of the root zone of spring wheat // Agroecological Journal. – 2010. – No. 3. – P. 55–59./
- Крючкова Л.О., Грицьок Н.В. Кореневі гнилі пшениці озимої – поширення в Північному Лісостепу України // Карантин і захист рослин. – 2014. – №2. – С. 9–12. /Kryuchkova L.O., Gritsyuk N.V. Root rot of winter wheat – distribution in the Northern Forest-steppe Ukraine // Quarantine and Plant Protection. – 2014. – No. 2. – P. 9–12./
- Методы биохимического анализа растений / Под ред. А.И.Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 432с. /Methods of biochemical analysis of plants / Ed. A.I.Ermakov. – L.: Agropromizdat, 1987. – 432p./
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г.Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304с. /Methods of soil microbiology and biochemistry / Ed. D.G.Zvyagintsev. – M.: MSU Publishing House, 1991. – 304p./
- Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т.42, №5. – С. 371–393. /Morgun V.V., Shvartau V.V., Kiriziy D.A. Physiological bases of formation of high productivity of grain cereals // Physiology and Biochemistry Cult. Plants. – 2010. – Vol.42, no. 5. – P. 371–393./
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 1. Структурно-функціональна характеристика ризо-, енто- та філосфери // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – 2010. – Вип.2. – С. 19–35. /Moshinets O.V., Kosakivska I.V. Ecology of the phytosphere: plant-microbial interrelations. 1. Structural-functional characteristic of rhize, endo- and phyllosfera // Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series: Biology. – 2010. – Vol.2. – P. 19–35./
- Мутерко О.Ф., Балашова І.А., Файт В.І., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетичні механізми регуляції типу розвитку пшениці // Цитологія і генетика. – 2015. – Т.49, №1. – С. 71–86. /Muterko O.F., Balashova I.A., Fayt V.I., Sivolap Yu.M. Molecular genetic mechanisms of regulation of wheat development type // Cytology and Genetics. – 2015. – Vol.49, no. 1. – P. 71–86./
- Рибалка О.І., Моргун В.В., Починок В.М. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т.43, №6. – С. 463–477. /Rybalka O.I., Morgun V.V., Pochynok V.M. Contemporary researches on the quality of wheat grain in the world: biosynthesis and accumulation of spare proteins, structure, aggregation and rheology in connection with the technology of grain products // Physiology and Biochemistry Cult. Plants. – 2011. – Vol.43, no. 6. – P. 463–477./
- Самойлов А.М., Авксентьева О.А., Жмурко В.В. Энд- и экзометаболиты корней изогенных по генам *VRN* линий озимой пшеницы и их влияние на хемотаксический ответ *Azospirillum brasilense* // Физиология растений: проблемы и перспективы развития. – К.: Логос, 2009. – Т.1. – С. 585–593. /Samoylov A.M., Avksentyeva O.A., Zhmurko V.V. Endo- and exometabolites of the roots of the isogenic lines of winter wheat by *VRN* genes and their influence on the chemotaxis response of *Azospirillum brasilense* // Plant physiology: problems and prospects of development. – K.: Logos, 2009. – Vol.1. – P. 585–593./
- Степаненко І.Л., Смирнова О.Г., Титов І.І. Модель генной сети регуляции времени цветения у озимой пшеницы и ячменя // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т.16, №1. – С. 99–106. /Stepanenko I.L., Smirnova O.G., Titov I.I. Model of the gene network for the regulation of flowering time in winter wheat and barley // Vavilovsky Journal of Genetics and Selection. – 2012, Vol.16, no. 1. – P. 99–106./
- Фузариоз зерна: опасность и меры снижения вредоносности / Bayer Crop Science /Fusarium grain: danger and harm reduction measures / Bayer Crop Science./ (<http://www.bayercropscience.ru/ru/fusarium.html>)
- Щербань А.Б., Салина Е.А. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов яровизации // Цитология. – 2013. – Т.55, №4. – С. 234–237. /Shcherban A.B., Salina E.A. Epigenetic regulation of expression of vernalization genes // Cytology. – 2013. – Vol.55, no. 4. – P. 234–237./
- Яринчин А.М. Оптимальный состав комплекса грибов рода *Fusarium* LK:FR для штучной инокуляции озимой пшеницы при селекции на стойкость // Захист і карантин рослин. – 2008. – Вип.54. – С. 504–509. /Yarynchin A.M. Optimal composition of the complex of fungi of the genus *Fusarium* LK:FR for artificial inoculation of winter wheat in breeding for resistance // Plant protection and quarantine. – 2008. – Vol.54. – P. 504–509./
- Dennis E., Pearce W. Vernalization in cereals // Journal of Biology. – 2009. – Vol.8, no. 57. – P. 1–4.
- Dhillon T., Pearce S.P., Stockinger E.J. et al. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the VRN-1 connection // Plant Physiol. – 2010. – Vol.153. – P. 1846–1858.
- Distelfeld A., Tranquilli G., Li C. et al. Genetic and molecular characterization of the VRN2 loci in tetraploid wheat // Plant. Physiol. – 2009. – Vol.149 (1). – P. 245–257.
- Khotyljova L.V., Kaminskaya L.N., Koren L.V. Influence of genetic systems of VRN- and PPD genes on the ecological adaptation of wheat and *Triticale* // Biologija. – 2002. – No. 4. – P. 45–48.

Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. et al. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. – CAB International, 2008. – 771p.

Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S. et al. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol.106. – P. 8386–8391.

Trevaskis B., Bagnall D.J., Ellis M.H. et al. MADS-box genes control vernalization-induced flowering in cereals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol.100 (22). – P. 13099–13104.

Trevaskis B. The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals // Funct. Plant Biol. – 2010. – Vol.37. – P. 479–487.

---

**Представлено: В.П.Петренко / Presented by: V.P.Petrenkova**

**Рецензент: С.Н.Шамрай / Reviewer: S.N.Shamray**

*Подано до редакції / Received: 02.03.2018*

**About the authors:** O.O.Avksentyeva – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

O.I.Vinnikova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

**Про авторів:** О.О.Авксентьева – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

О.І.Віннікова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

**Об авторах:** О.А.Авксентьева – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

О.И.Винникова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

---

••• ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН •••  
••• PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS •••

---

УДК: 612.419 (615.811.2)

**Гемопоетична активність кісткового мозку щура на фоні впливу  
сольового екстракту *Hirudo verbana* Carena, 1820**

**Р.Ф.Амінов**

*Запорізький національний університет (Запоріжжя, Україна)  
91\_amin\_91@ukr.net*

Досліджено мітотичну активність кісткового мозку нелінійних самок щурів після вигодовування їх приплоду та оцінено цей показник у їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку – на 1, 15, 30, 45, 60-ту добу. Самкам два тижні до злучки з самцями і два тижні після внутрішньочеревно вводився (з розрахунку 5 мг/кг маси тварини) сольовий екстракт *Hirudo verbana*, один раз, кожного тижня. У дослідній групі самок мітотичний індекс достовірно збільшився (на 33,61%); у їх приплоді максимальне підвищення мітотичного індексу спостерігали на першу добу (на 50,88%); підвищення проліферативної активності клітин кісткового мозку спостерігали і в інші терміни спостереження: на 30-ту добу (на 25,67%) та на 60-ту добу (на 18,35%). У дослідній групі тварин підвищувались також всі гемопоетичні показники периферичної крові (кількість лейкоцитів, еритроцитів, гемоглобін). Збільшення кількості лейкоцитів у дослідній групі самок відбувалося без істотних змін їх відносних популяційних співвідношень у лейкоцитарній формулі крові. У дослідній групі приплоду виявлено вплив екстракту медичної п'явки на зміни диференціювання популяції лейкоцитів. Так, у приплоду на першу добу зсув лейкоцитарної формули крові вліво зменшувався за рахунок зниження клітин вродженого імунітету (гранулоцити та моноцити) та збільшення клітин адаптивного імунітету (лімфоцити), це свідчить про прискорене диференціювання лімфоїдної системи у напрямку дорослих тварин. Деякі відмінності диференціювання лейкоцитів відмічали на початку статевого дозрівання (30-ту добу) та в його кінці (60-ту добу). На цих термінах відбувався нейтрофільозний зсув вліво, як наслідок напруги вродженої ланки імунітету при наявності адекватної кількості клітин адаптивного імунітету. Таким чином, у результаті дослідження було виявлено стимулюючу дію екстракту медичної п'явки на мітотичну активність кісткового мозку, як у статевозрілих самок, так і у їх приплоду, яка призвела до збільшення кількості лейкоцитів, еритроцитів, гемоглобіну, кольорового показника. У приплоді у період підвищеної напруги морфогенезу має місце активація як вродженої, так і адаптивної ланок імунітету у дослідній групі тварин.

**Ключові слова:** екстракт медичної п'явки, кістковий мозок, мітотична активність, лейкоцити, лейкоцитарна формула, еритроцити.

**Hematopoietic activity of rat bone marrow at the influence of salt extract of  
*Hirudo verbana* Carena, 1820**

**R.F.Aminov**

The mitotic activity of the bone marrow of non-linear female rats after feeding their offspring was studied and this index was estimated in their offspring in the early stages of postembryonic development – on the 1, 15, 30, 45, 60th day. Females two weeks prior to mating with males and two weeks after were intraperitoneally injected with *Hirudo verbana* saline extract (5 mg/kg of the weight of an animal), once, every week. In the experimental group of females, the mitotic index significantly increased (by 33.61%); in their offspring, the maximum increase in the mitotic index was observed on the first day (by 50.88%); the increase in the proliferative activity of bone marrow cells was observed at other observation times: on the 30th day (by 25.67%) and on the 60th day (by 18.35%). In the experimental group of animals, all hematopoietic parameters of peripheral blood (the number of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin) also increased. An increase in the number of leukocytes in the experimental group of females occurred without significant changes in their relative population ratios in the leukocyte blood formula. In the experimental group of the offspring, the effect of the leech extract on the changes in the differentiation of leukocyte populations was revealed. Thus, in the offspring for the first day the shift of the leukocyte blood formula to the left decreased due to the decrease in cells of innate immunity (granulocytes and monocytes) and increase in adaptive immunity cells (lymphocytes),

which indicates an accelerated differentiation of the lymphoid system towards adult animals. Some differences in the differentiation of leukocytes were noted at the onset of sexual maturation (on the 30th day) and at its end (on the 60th day). At these times, a neutrophilic shift occurred to the left, as a consequence of the intension of the congenital link of immunity in the presence of an adequate number of cells of adaptive immunity. Thus, as a result of the study, the stimulating effect of the extract of the medical leech on the mitotic activity of the bone marrow was revealed, both in mature females and in their offspring, which resulted in an increase in the number of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, and color index. In the offspring, during the period of increased stress of morphogenesis, there is an activation of both the congenital and adaptive links of immunity in the experimental group of animals.

**Key words:** *medical leech extract, bone marrow, mitotic activity, leukocytes, leukocyte formula, erythrocytes.*

### **Гемопоэтическая активность костного мозга крысы на фоне влияния солевого экстракта *Hirudo verbana* Carena, 1820 Р.Ф.Аминов**

Исследована митотическая активность костного мозга нелинейных самок крыс после выкармливания их приплода и оценен этот показатель у их приплода на ранних этапах постэмбрионального развития – на 1, 15, 30, 45, 60-ые сутки. Самкам две недели до случки с самцами и две недели после внутрибрюшинно вводился (из расчета 5 мг/кг массы животного) солевой экстракт *Hirudo verbana*, один раз, каждую неделю. В опытной группе самок митотический индекс достоверно увеличился (на 33,61%); в их приплоде максимальное повышение митотического индекса наблюдали на первые сутки (на 50,88%); повышение пролиферативной активности клеток костного мозга наблюдали и в другие сроки наблюдения: на 30-ые сутки (на 25,67%) и на 60-ые сутки (на 18,35%). У опытной группы животных повышались также все гемопоэтические показатели периферической крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобин). Увеличение количества лейкоцитов у опытной группы самок происходило без существенных изменений их относительных популяционных соотношений в лейкоцитарной формуле крови. В опытной группе приплода выявлено влияние экстракта медицинской пиявки на изменения дифференцирования популяций лейкоцитов. Так, у приплода на первые сутки сдвиг лейкоцитарной формулы крови влево уменьшался за счет снижения клеток врожденного иммунитета (гранулоциты и моноциты) и увеличения клеток адаптивного иммунитета (лимфоциты), это свидетельствует об ускоренном дифференцировании лимфоидной системы в направлении взрослых животных. Некоторые отличия дифференцирования лейкоцитов отмечали в начале полового созревания (30-ые сутки) и в его конце (60-ые сутки). На этих сроках происходил нейтрофилезный сдвиг влево, как следствие напряжения врожденного звена иммунитета при наличии адекватного количества клеток адаптивного иммунитета. Таким образом, в результате исследования было выявлено стимулирующее действие экстракта медицинской пиявки на митотическую активность костного мозга, как у половозрелых самок, так и у их приплода, которое привело к увеличению количества лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, цветного показателя. В приплоде в период повышенного напряжения морфогенеза имеет место активация как врожденного, так и адаптивного звеньев иммунитета у опытной группы животных.

**Ключевые слова:** *экстракт медицинской пиявки, костный мозг, митотическая активность, лейкоциты, лейкоцитарная формула, эритроциты.*

#### **Вступ**

Незважаючи на високу ефективність багатьох синтетичних лікарських засобів, все більше від них підвищується частота ускладнень, у вигляді хронізації захворювань та появи різних побічних ефектів. Окрім того, синтетичні лікарські засоби є ксенобіотиками для людини та тварин, що ініціює імунні реакції до них, які призводять до підвищення алергій та аутоалергій (Матвеева та ін., 2011; Солошенко, 2012). Тому медично-біологічна спільнота все активніше досліджує натуротерапевтичні методи впливу на організм тварини та людини. Одним з яких є грудотерапія – лікування п'явками. Секрет слинних залоз медичної п'явки в своєму складі має більше 100 біологічно активних речовин, які проявляють різну терапевтичну дію: антитромботичну, протизапальну, судинорозширювальну, бактерицидну, антисклеротичну, імуностимулюючу та іншу (Жаров, 2003; Савинов, 2004; Баскова, Завалова, 2001; Каменев, Барановский, 2006). Протягом багатьох десятиліть вчені та науковці намагаються довести ефективність грудотерапії для лікування та профілактики різних захворювань, вивести її на рівень офіційної медицини (Pospelova, Barnaulov, 2010; Фролов и др., 2010; Abbas et al., 2011; Hildebrandt, Lemke, 2011; Multiple, 2011; Abdullah et al., 2012; Kumar, 2012;

Коеппен et al., 2014; Frolov, Litvinenko, 2015). Проведені дослідження морфологічних змін у кіз після курсів гірудопунктури; у період їх роздоювання у них підвищувалася маса тіла, збільшувалася молочність без ускладнення маститом, а в репродуктивний період – відзначається 100% запліднення із народженням двійнят зі збільшеною вагою (Фролов и др., 2010а). При дослідженні, які були проведені на коровах, гірудопунктура сприяла пришвидшеній післяпологовій реабілітації, зворотній інволюції репродуктивних органів до фізіологічного стану (Попова, 2003). Нами було доведено в попередніх дослідженнях, що антигени та слина медичної п'явки в процесі гірудотерапії стимулює морфогенетичні процеси, які опосередковані в основному через фактори імунної системи (підвищення фізичних параметрів тіла, стимуляція мієлоїдної та лімфоїдної тканин селезінки і тимусу і, як наслідок, збільшення розмірів органів), підвищення функціональної активності нейтрофілів крові (Амінов, Фролов, 2016; Aminov, Frolov, 2017, 2018). Оскільки більшість тяжких побічних реакцій від синтетичних ліків викликають гематологічні розлади внаслідок пригнічення функції клітин кісткового мозку, стало актуально дослідити проліферативну активність кісткового мозку та гематологічні показники крові на фоні впливу екстракту *Hirudo verbana*.

### Матеріал та методи дослідження

Самкам нелінійних щурів один раз на тиждень, 2 тижні до злучки із самцями і 2 тижні після, вводилися внутрішньочеревно антигени сольового екстракту медичної п'явки *Hirudo verbana* Capena, 1820, отримані методом, запропонованим Фролов та ін. (2013). Дозування антигенів сольового екстракту здійснювали за вмістом білка (визначали за Лоурі). Фіксували тварин за допомогою фіксувального пристрою (Амінов та ін., 2016). Тварин розподіляли на дві групи: перша – дослідна група тварин перебувала під впливом антигенів сольового екстракту медичної п'явки у дозі з розрахунку 5 мг/кг маси тварини, кількістю 0,5 мл; друга – контрольна група тварин, яким внутрішньочеревно вводився фізіологічний розчин у розмірі 0,5 мл. Досліджували самок після вигодовування приплоду та приплід у динаміці на 1-шу, 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу (Западнюк и др., 1983). Експериментальні дослідження виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні в індивідуальних клітках. Усього в експерименті використано 40 самок нелінійних щурів та 200 особин їх приплоду.

Всіх тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого швидко вилучали стегнові кістки, очищали їх від прилеглих м'язів за допомогою стерильної марлі. Відрізали епіфізи та розрізали вздовж кістки. Кістковий мозок із стегнової кістки вимивали теплим (37°C) гіпотонічним 0,9% розчином цитрату натрію у стерильну центрифужну пробірку, використовуючи для цієї мети пастерівську піпетку. Шматочки кісткового мозку інтенсивно піпетували. Отриману клітинну суспензію інкубувати в гіпотонічному середовищі 10 хв. при температурі 37°C. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв. при 1000 об/хв. Обережно відсмоктували всю надосадову рідину, намагаючись при цьому не пошкодити осад. Клітини у осаді фіксували метиловим спиртом із крижаною оцтовою кислотою (3 частини метилового спирту та 1 частина оцтової кислоти). До осаду обережно доливали свіжоприготований та охолоджений фіксатор, близько 2 мл, намагаючись не розбити осад. Загальний час фіксації 12 год. За час фіксації змінювали 3 рази фіксатор, з проміжним ресуспензуванням осаду і наступним центрифугуванням. Осад ресуспензували та на чисте холодне предметне скло наносили суспензію клітин у фіксаторі. Скло швидко проводили через полум'я пальника, щоб фіксатор запалав, але не допускаючи перегрівання. Фіксатор при цьому вигорав, а клітини міцно фіксувалися до скла. Висушені препарати фарбували 15% барвником Романовського-Гімза 40 хв. Після чого промивали у дистильованій воді та диференціювали у підкисленій краплинами HCl дистильованій воді. При аналізі 3000 клітин визначали ті, що знаходяться у мітозі (рис. 1). Мітотичний індекс виражали в промілі – кількості мітозів на 1000 клітин (Богданов, 2016). У крові тварин досліджували кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові, кількість еритроцитів, гемоглобін та кольоровий показник (Беркало та ін., 2003).

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програмного пакету SPSS v.21.0. (IBMSPSS Statistics, USA). Вибіркові параметри, наведені далі в таблиці, мають такі позначення:  $\bar{x}$  – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

**Результати та обговорення**

Аналіз даних табл. 1 і 2 виявив збільшення всіх аналізованих показників дослідної групи тварин у порівнянні з контрольною. Так, у дослідної групи самок мітотичний індекс достовірно збільшився (на 33,61%) порівняно з контрольною групою тварин,  $p < 0,05$ . В їх приплоді максимальне підвищення мітотичного індексу спостерігали у дослідної групи на першу добу (на 50,88%) порівняно з контрольною групою тварин,  $p < 0,05$ . Достовірне підвищення проліферативної активності клітин кісткового мозку спостерігали і в інші терміни спостереження: на 30-ту добу (на 25,67%,  $p < 0,05$ ) та на 60-ту добу (на 18,35%,  $p < 0,05$ ) порівняно з контрольною групою тварин. Тенденція до збільшення мітотичного індексу спостерігалася і на 15-ту (16,83%) та 45-ту добу (на 33,3%) (табл. 1). Як наслідок збільшення мітотичного індексу кісткового мозку у дослідної групи тварин підвищувались також всі гемопоетичні показники периферичної крові (табл. 2). Так, кількість лейкоцитів в артеріовенозній крові у дослідних самок збільшилася на 41%, кількість еритроцитів – на 6%, гемоглобін – на 23,6% порівняно з контрольною групою тварин (табл. 2). При аналізі лейкоцитарної формули крові встановлено, що відносне співвідношення популяцій лейкоцитів у дослідної групи тварин залишається без суттєвих змін їх популяційних співвідношень, що свідчить про гомеостатичне диференціювання лейкоцитів мієлопоезу та лімфопоезу під впливом БАР МП (біологічно активних речовин медичної п'явки) (табл. 3). Разом з тим абсолютні значення кількості різних типів лейкоцитів у дослідної групи самок значно збільшувались, як наслідок зростання їх загальної кількості під впливом стимуляції мітотичного індексу кісткового мозку. Збільшення кількості лейкоцитів у дослідної групи приплоду зберегло основні тенденції їх розподілу у лейкоцитарній формулі крові, як у статевозрілих самиць.

**Таблиця 1.**

**Мітотична активність кісткового мозку дослідної та контрольної групи щурів ( $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=20$ )**

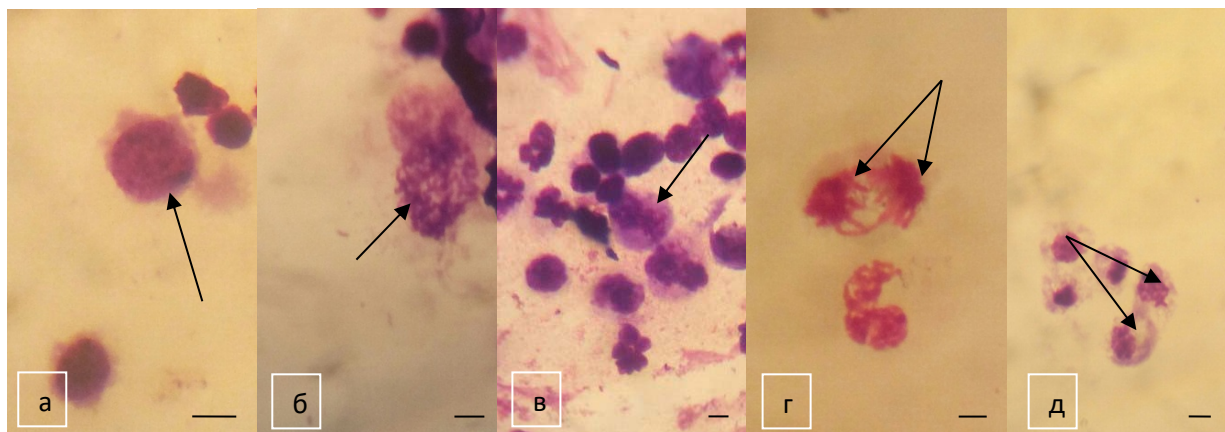
Група тварин	Мітотичний індекс, ‰	
	контроль	дослід
статевозрілі самки	16,87 ± 1,77	23,15 ± 1,84*
приплід – 1 доба	16,77 ± 0,97	34,22 ± 3,65*
приплід – 15 доба	18,23 ± 0,20	21,92 ± 2,14*
приплід – 30 доба	11,05 ± 1,30	14,76 ± 0,48*
приплід – 45 доба	10,40 ± 0,23	16,16 ± 0,72*
приплід – 60 доба	12,92 ± 0,66	15,83 ± 1,37*

Примітка: \*  $p < 0,05$ .

Однак слід зазначити наявність впливу БАР МП на зміни диференціювання популяцій лейкоцитів. Так, у приплоді на першу добу зсув лейкоцитарної формули крові вліво зменшувався за рахунок зниження клітин вродженого імунітету (гранулоцити та моноцити) та збільшення клітин адаптивного імунітету (лімфоцитів), це свідчить про прискорене диференціювання лімфоїдної системи у напрямку дорослих тварин за рахунок дії БАР МП. Деякі відмінності диференціювання лейкоцитів відмічали на початку статевого дозрівання (30-ту добу) та в його кінці (60-ту добу). На цих термінах відбувався нейтрофілїозний зсув вліво, як наслідок напруги вродженої ланки імунітету при наявності адекватної кількості клітин адаптивного імунітету. Таким чином, в період підвищеної напруги морфогенезу має активація як вродженої, так і адаптивної ланок імунітету у дослідної групи тварин. Причому найбільший ступінь цих змін реєструвався на 1-ту, 15-ту та 60-ту добу життя (табл. 2). Цей факт свідчить про гомеостатичний вплив біологічно активних речовин слини медичної п'явки на стимуляцію гематологічних гістогенезів, без інгібіції або стимуляції одного із них. Тому можна передбачити, що в подальшому розвитку онтогенезу у дослідної групи приплоду не будуть спостерігатись відхилення від фізіологічних меж. Представлені дані свідчать, що введення дозованого сольового екстракту біологічно активних речовин *Hirudo verbana* самкам два тижні до спарування і два тижні після призводить до підвищення проліферуючої активності кісткового мозку у них та у їх приплоду.



Адекватно підвищенню мітотичного індексу клітин кісткового мозку, збільшуються еритроцитарні показники (кількість еритроцитів та гемоглобін) і лейкоцитарні показники (кількість лейкоцитів) крові. Отримані результати мають фундаментальну та прикладну перспективу по вивченню можливостей механізмів позитивної регуляції онтогенезу за впливу дозованого сольового екстракту біологічно активних речовин *Hirudo verbana* Carena, 1820.



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

**Таблиця 2.**

**Загальна кількість лейкоцитів та еритроцитів, гемоглобін, кольоровий показник дослідної та контрольної групи щурів ( $x \pm SE$ ,  $n=20$ )**

Група тварин		Показники			
		лейкоцити/л ( $\times 10^9$ )	еритроцити/л ( $\times 10^{12}$ )	гемоглобін, г/л	кольоровий показник
статевозрілі самки	контроль	6,83 $\pm$ 0,13	5,97 $\pm$ 0,14	145,95 $\pm$ 2,16	0,74 $\pm$ 0,13
	дослід	11,90 $\pm$ 0,37*	6,13 $\pm$ 0,25	199,99 $\pm$ 8,37*	0,91 $\pm$ 0,10
приплід – 1 доба	контроль	8,02 $\pm$ 0,54	1,75 $\pm$ 0,19	76,45 $\pm$ 3,46	1,98 $\pm$ 0,19
	дослід	8,86 $\pm$ 0,36	2,09 $\pm$ 0,06*	107,14 $\pm$ 2,56*	1,72 $\pm$ 0,28
приплід – 15 доба	контроль	4,40 $\pm$ 0,26	1,27 $\pm$ 0,03	80,20 $\pm$ 0,79	2,04 $\pm$ 0,86
	дослід	6,06 $\pm$ 0,35 *	1,94 $\pm$ 0,22*	106,7 $\pm$ 1,62*	0,97 $\pm$ 0,29
приплід – 30 доба	контроль	5,02 $\pm$ 0,18	2,70 $\pm$ 0,11	103,46 $\pm$ 2,06	1,21 $\pm$ 0,14
	дослід	4,64 $\pm$ 0,17	3,80 $\pm$ 0,27*	109,04 $\pm$ 5,51	0,98 $\pm$ 0,17
приплід – 45 доба	контроль	6,07 $\pm$ 0,15	2,62 $\pm$ 0,14	139,92 $\pm$ 5,86	1,54 $\pm$ 0,90
	дослід	6,54 $\pm$ 0,16*	4,02 $\pm$ 0,29*	137,08 $\pm$ 2,54	1,11 $\pm$ 0,36
приплід – 60 доба	контроль	5,50 $\pm$ 0,16	4,26 $\pm$ 0,16	135,00 $\pm$ 3,47	0,95 $\pm$ 0,09
	дослід	7,20 $\pm$ 0,53*	5,20 $\pm$ 0,07*	148,43 $\pm$ 2,70*	0,86 $\pm$ 0,07

Примітка: \*  $p < 0,05$ .

Таблиця 3.

Лейкоцитарна формула крові дослідної та контрольної групи щурів ( $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=20$ )

Група тварин	Лейкоцити/л ( $\times 10^9$ )	Лейкоцитарна формула						лімфоцити, % / кл. $\times 10^9$	моноцити, % / кл. $\times 10^9$
		еозинофіли, % / кл. $\times 10^9$	нейтрофіли			загальний відсоток			
			паличкоядерні, % / кл. $\times 10^9$	сегментоядерні, % / кл. $\times 10^9$	загальний відсоток				
статевозрілі самки	контроль	$0,45 \pm 0,07$	$7,70 \pm 1,25$	$18,70 \pm 1,99$	$26,40 \pm 2,40$	$70,80 \pm 0,99$	$2,35 \pm 0,52$		
	дослід	$0,03 \pm 0,001$	$0,52 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,06$	$1,80 \pm 0,09$	$4,90 \pm 0,24$	$0,09 \pm 0,005$		
приплід - 1 доба	контроль	$0,40 \pm 0,06$	$6,00 \pm 0,80$	$17,70 \pm 1,22$	$23,70 \pm 2,25$	$72,10 \pm 1,01$	$3,80 \pm 0,66^*$		
	дослід	$0,05 \pm 0,002$	$0,71 \pm 0,03^*$	$2,11 \pm 0,10^*$	$2,82 \pm 0,14^*$	$8,58 \pm 0,43^*$	$0,45 \pm 0,02^*$		
приплід - 15 доба	контроль	$0,52 \pm 0,07$	$33,67 \pm 1,39$	$15,33 \pm 2,14$	$49,00 \pm 2,98$	$45,15 \pm 1,93$	$5,33 \pm 0,63$		
	дослід	$0,04 \pm 0,002$	$2,7 \pm 0,13$	$1,23 \pm 0,06$	$3,93 \pm 0,20$	$3,62 \pm 0,18$	$0,43 \pm 0,02$		
приплід - 30 доба	контроль	$0,64 \pm 0,08$	$21,67 \pm 3,02^*$	$16,05 \pm 0,36$	$37,72 \pm 2,01^*$	$59,38 \pm 2,09^*$	$2,26 \pm 0,44^*$		
	дослід	$0,03 \pm 0,002$	$1,92 \pm 0,09^*$	$1,42 \pm 0,07^*$	$3,32 \pm 0,17^*$	$5,26 \pm 0,26^*$	$0,20 \pm 0,01^*$		
приплід - 45 доба	контроль	$0,21 \pm 0,04$	$3,80 \pm 0,67$	$9,40 \pm 1,14$	$13,20 \pm 3,38$	$83,21 \pm 0,94$	$3,40 \pm 0,49$		
	дослід	$0,009 \pm 0,0004$	$0,17 \pm 0,008$	$0,41 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,03$	$3,66 \pm 0,18$	$0,15 \pm 0,007$		
приплід - 60 доба	контроль	$0,12 \pm 0,02$	$6,25 \pm 1,21$	$13,75 \pm 1,49^*$	$20,00 \pm 3,19^*$	$77,38 \pm 0,78^*$	$2,5 \pm 0,34$		
	дослід	$0,007 \pm 0,0004$	$0,38 \pm 0,02^*$	$0,83 \pm 0,04^*$	$1,21 \pm 0,06^*$	$4,69 \pm 0,23^*$	$0,15 \pm 0,007$		
приплід - 30 доба	контроль	$0,41 \pm 0,05$	$3,00 \pm 0,34$	$2,65 \pm 0,11$	$5,65 \pm 2,42$	$88,95 \pm 0,50$	$4,99 \pm 0,22$		
	дослід	$0,02 \pm 0,001$	$0,15 \pm 0,007$	$0,13 \pm 0,007$	$0,28 \pm 0,01$	$4,46 \pm 0,22$	$0,25 \pm 0,01$		
приплід - 45 доба	контроль	$0,50 \pm 0,07$	$7,72 \pm 1,85^*$	$6,75 \pm 0,61$	$14,47 \pm 3,57^*$	$79,78 \pm 1,47$	$5,25 \pm 0,50$		
	дослід	$0,023 \pm 0,001$	$0,36 \pm 0,002^*$	$0,31 \pm 0,01^*$	$0,67 \pm 0,03^*$	$3,70 \pm 0,18^*$	$0,24 \pm 0,01$		
приплід - 60 доба	контроль	$0,2 \pm 0,09$	$2,05 \pm 0,45$	$6,05 \pm 0,71$	$8,10 \pm 1,22$	$89,35 \pm 1,07$	$2,35 \pm 0,56$		
	дослід	$0,012 \pm 0,0006$	$0,12 \pm 0,006$	$0,37 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,02$	$5,42 \pm 0,27$	$0,14 \pm 0,007$		
приплід - 60 доба	контроль	$0,3 \pm 0,1$	$3,15 \pm 0,66$	$7,75 \pm 1,21$	$10,90 \pm 3,25^*$	$84,45 \pm 1,74^*$	$3,75 \pm 0,41^*$		
	дослід	$0,02 \pm 0,001$	$0,21 \pm 0,01^*$	$0,51 \pm 0,02^*$	$0,72 \pm 0,04^*$	$5,52 \pm 0,28$	$0,24 \pm 0,01^*$		
приплід - 60 доба	контроль	$0,81 \pm 0,11$	$4,82 \pm 0,95$	$5,76 \pm 0,60$	$10,58 \pm 3,04$	$86,76 \pm 1,62$	$2,65 \pm 0,12$		
	дослід	$0,04 \pm 0,002$	$0,22 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,02$	$3,90 \pm 0,19$	$0,12 \pm 0,006$		
приплід - 60 доба	контроль	$0,88 \pm 0,17$	$12,88 \pm 1,86^*$	$8,17 \pm 1,51$	$21,05 \pm 3,11^*$	$74,01 \pm 1,80$	$4,06 \pm 0,59$		
	дослід	$0,06 \pm 0,003$	$0,93 \pm 0,05^*$	$0,59 \pm 0,03^*$	$1,52 \pm 0,08^*$	$5,33 \pm 0,27^*$	$0,29 \pm 0,01^*$		

Примітка: \*  $p < 0,05$ , % – відносне значення, кл.  $\times 10^9$  – абсолютне значення.

### Список літератури / References

- Амінов Р.Ф., Фролов О.К. Фагоцитарна та метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку за впливу біологічно активних речовин сольового екстракту *Hirudo verbana* // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2016. – Vol.7. – P. 96–100. /Aminov R.F., Frolov O.K. Phagocytic and metabolic activity of rat neutrophils in the early stages of post-embryonic development due to the influence of biologically active substances of *Hirudo verbana* salt extract // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2016. – Vol.7. – P.96–100./
- Амінов Р.Ф., Фролов О.К., Федотов Є.Р. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент №107289 України. 2016. Заявл. 22.12.2015. Опубл. 25.05.2016. Бюл. №10. /Aminov R.F., Frolov O.K., Fedotov E.R. Device for fixing small laboratory animals. Patent No. 107289, Ukraine. Declared 22.12.2015. Published 25.05.2016. Bulletin No.10./
- Баскова И.П., Завалова Л.Л. Ингибиторы протеолитических ферментов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) (обзор) // *Биохимия*. – 2001. – Т.66, №7. – С. 869–883. /Baskova I.P., Zavalova L.L. Inhibitors of proteolytic enzymes of medical leech (*Hirudo medicinalis*) (review) // *Biochimiya*. – 2001. – Vol.66, no. 7. – P. 869–883./
- Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. – Полтава: Полімет, 2003. – 320с. /Berkalo L.V., Bobovich O.V., Bobrov N.O. et al. Methods of clinical and experimental research in medicine. – Poltava: Polimet, 2003. – 320p./
- Жаров Д.Г. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2003. – 320с. /Zharov D. G. Secrets of hirudotherapy or how to treat with leeches. – Rostov-on-Don: Phoenix, 2003. – 320p./
- Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища школа, 1983. – 383с. /Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakharia E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratory animals. Breeding, keeping, use in the experiment. – K.: Vyshcha shkola, 1983. – 383p./
- Каменев О.Ю., Барановский А.Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. – СПб.: Весь, 2006. – 304с. /Kamenev O.Yu., Baranovsky A.Yu. Treatment with leeches: theory and practice of hirudotherapy: a guide for doctors. – St. Petersburg: Ves', 2006. – 304p./
- Матвеева О.В., Вікторов О.П., Бліхар В.Є. та ін. До питання класифікації побічних реакцій лікарських засобів та підходів до їх диференціації (бібліографічний огляд) // *Укр. мед. часопис*. – 2011. – №2 (82). – С. 78–84. /Matveyev O.V., Viktorov O.P., Bichar V.Ye. et al. To the question of classification of adverse reactions of drugs and approaches to their differentiation (bibliographic review) // *Ukrainian Medical Journal*. – 2011. – No. 2 (82). – P. 78–84./
- Попова И.С. Воспроизводительная способность молочных коров разных генотипов и использование гирудопунктуры для ее коррекции. Автореф. дис. канд. вет. наук / 16.00.07. – Воронеж, 2003. – 21с. /Popova I.S. Reproductive ability of milk cows of different genotypes and the use of the hirudopuncture for its correcting. Author's abstract of the thesis for a Candidate Degree in Veterinary Sciences / 16.00.07. – Voronezh, 2003. – 21p./
- Савинов В.А. Гирудотерапия: руководство. – М.: Медицина, 2004. – 432с. /Savinov V.A. Hirudotherapy: guidance. – M.: Medicine, 2004. – 432p./
- Солошенко Э.Н. Лекарственная болезнь в проблеме побочного действия лекарственных средств: современное состояние // *Международный медицинский журнал*. – 2012. – №3. – С. 80–88. /Soloshenko E.N. Medicinal disease in the problem of the side effect of medicines: the current state // *International Medical Journal*. – 2012. – No. 3. – P. 80–88./
- Фролов А., Копейка В., Федотов Е. и др. Влияние гирудотерапии на физиологические показатели у коз // *Тваринництво України*. – 2010а. – №7. – С. 7–10. /Frolov A., Kopeika V., Fedotov E. et al. The effect of hirudotherapy on physiological indices in goats // *Stock raising of Ukraine*. – 2010a. – No. 7. – P. 7–10./
- Фролов А., Копейка В., Федотов Е. и др. К механизму иммуотропного действия гирудотерапии // *Імунологія та алергологія: наука і практика*. – 2010б. – № 3–4. – С. 32–34. /Frolov A., Kopeika V., Fedotov E. et al. To the mechanism of immunotropic action of hirudotherapy // *Immunology and Allergology: Science and Practice*. – 2010b. – No. 3–4. – P. 32–34./
- Фролов О.К., Литвиненко Р.О., Копійка В.В., Федотов Є.Р. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки. Патент України UA 80665. 2013. Заявл. 03.12.12. Опубл. 10.06.13. Бюл. №11. /Frolov O.K., Lytvynenko R.O., Kopyyka V.V., Fedotov E.R. Method for producing antigens from medicinal leeches. Patent UA 80665. 2013. Declared 03.12.12. Published 10.06.13. Bulletin No. 11./
- Aminov R.F., Frolov A.K. Influence of ectoparasite – *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism – rattus // *Current Trends in Immunology*. – 2017. – Vol.18. – P. 107–117.
- Aminov R.F., Frolov A.K. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development // *Annals of Parasitology*. – 2018. – Vol.64 (1). – P. 13–20.
- Abbas Zaidi S.M., Jameel S.S., Zaman F. et al. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches // *Altern. Med. Rev.* – 2011. – Vol.16, no. 1. – P. 59–65.

- Abdullah S., Dar L.M., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy. Leech therapy: applications and indications in surgery // Arch. Clin. Exp. Surg. – 2012. – Vol.1, no. 3. – P. 172–180.
- Frolov A.K., Litvinenko R.A. Basic morphofunctional features of pharmaceutic leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820) tissues in various forms of response after hirudotherapeutic procedures // Annals of Parasitology. – 2015. – Vol.61 (1). – P. 27–35.
- Hildebrandt J.P., Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* // Naturwissenschaften. – 2011. – Vol.98, no. 12. – P. 995–1008.
- Koeppe D., Aurich M., Rampp T. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review // Wien. Med. Wochenschr. – 2014. – Vol.164 (5–6). – P. 95–102.
- Kumar S.A. Antiinflammatory effect of leech therapy in the patients of psoriasis // Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation. – 2012. – Vol.1 (1). – P. 71–74.
- Pospelova M.L., Barnaulov O.D. Effects of hirudotherapy on intravascular thrombosis activation in different groups of patients with cerebrovascular pathologies // Aktualnosti neurol, psihijatrije granicnih podrucja. – 2010. – Vol.18 (3). – P. 27–32.
- 

**Представлено: О.Г.Куш / Presented by: O.G.Kushch**  
**Рецензент: А.Ю.Утєвський / Reviewer: A.Yu.Utevsky**  
Подано до редакції / Received: 18.11.2017

**About the author:** R.F.Aminov – Zaporizhzhya National University, Zhukovskogo Str., 66, Zaporizhzhya, Ukraine, 69600, 91\_amin\_91@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8471-1525>

**Про автора:** Р.Ф.Аминов – Запорізький національний університет, вул. Жуковського, 66, Запоріжжя, Україна, 69600, 91\_amin\_91@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8471-1525>

**Об авторе:** Р.Ф.Аминов – Запорожский национальный университет, ул. Жуковського, 66, Запорожье, Украина, 69600, 91\_amin\_91@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8471-1525>

УДК: 577.3:612.82

## **Взаємодії дофаміну, оксиду азоту і тестостерону в мозковій системі мотиваційного підкріплення щурів з алкогольною залежністю та під впливом донатору оксиду азоту**

**А.М.Тіткова, О.Г.Берченко, А.В.Шляхова, О.В.Веселовська, О.О.Пріходько**

*ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України» (Харків, Україна)  
annatitkova2@ukr.net*

В експерименті на 65 безпородних статевозрілих щурах-самцях з моделлю хронічної алкоголізації (протягом 40 днів прийому алкоголю в дозі 1,25 г/кг маси тіла) та синдрому відміни алкоголю (протягом двох діб) задіяно комплекс нейрофізіологічних методів дослідження (стереотаксичне вживлення електродів до структур мозку, реєстрація електричної активності неокортекса, гіпокампа, гіпоталамуса і *nucleus accumbens*). Виявлена провідна роль функціональних змін електрогенезу в гіпокампі, гіпоталамусі та *nucleus accumbens* при формуванні алкогольної залежності. Показано найвищу абсолютну спектральну потужність коливань бета- та тета-діапазону в гіпокампі та прояви генералізованої гіперсинхронної активності з ініціацією в гіпокампі та гіпоталамусі. Після відміни прийому алкоголю пароксизмальна активність на ЕЕГ структур лімбіко-неокортикальної системи мозку мала вибуховий характер з включенням високоамплітудних гострих хвиль. Через 40 днів алкоголізації тварин (через 30 хв після останнього прийому розчину етанолу), а також через дві доби відміни алкоголю проведено комплекс нейрохімічних досліджень (визначення концентрації дофаміну і тестостерону методами імуноферментного аналізу та оксиду азоту спектрофотометричним методом в структурах головного мозку та сироватці крові щурів). Продемонстровано зниження рівня тестостерону та оксиду азоту в гіпоталамусі і гіпокампі, а також тестостерону в *nucleus accumbens* та сироватці крові як після прийому алкоголю, так і в стані його відміни. Встановлено вивільнення дофаміну в *nucleus accumbens* у відповідь на прийом чергової дози алкоголю та відновлення його рівня в стані відміни алкоголю. В гіпоталамусі виявлений протилежний ефект: зниження вмісту дофаміну після прийому алкоголю. Інтраназальне п'ятиразове (2 рази на добу) введення донатору оксиду азоту – нітропрусиду натрію в дозі 8 мг/кг маси тіла (по 10 мкл розчину до кожної ніздрі) відновлювало рівень оксиду азоту і тестостерону в структурах мотиваційного підкріплення та пригнічувало судомну активність на ЕЕГ головного мозку, але не змінювало концентрацію тестостерону в сироватці крові щурів. Отримані дані розглядаються як один з важливих аспектів взаємодій в системі гормонально-медіаторно-метаболічної регуляції механізмів мотиваційного підкріплення при формуванні та купіруванні алкогольної залежності.

**Ключові слова:** дофамін, оксид азоту, тестостерон, нітропрусид натрію, електрогенез, алкогольна залежність, щури.

## **Interaction of dopamine, nitric oxide and testosterone in the brain system of motivational reinforcement in rats with alcohol dependence and under nitric oxide donator impact**

**A.M.Titkova, O.G.Berchenko, A.V.Shlyakhova, E.V.Veselovskaya, E.A.Prikhodko**

The complex of neurophysiological methods (stereotaxic implantation of electrodes into brain structures, recording of electrical activity of the neocortex, hippocampus, hypothalamus, and *nucleus accumbens*) was applied to 65 laboratory male rats with models of chronic alcoholization (during 40 days of alcohol consumption in dose 1.25 g/kg body mass) and alcohol withdrawal during 2 days. The leading role of functional changes of electrogenesis in hippocampus, hypothalamus and *nucleus accumbens* has been revealed in rats being in states of alcohol dependence. The highest absolute spectral powers of oscillations of the  $\beta$  and  $\theta$  rhythms in the hippocampus and manifestations of generalized hypersynchronous activity with initiation in the hippocampus and hypothalamus were noted in rats under alcohol dependence. The paroxysmal pattern of activity on EEG of the structures of the limbico-neocortical system acquired an "explosive" character after alcohol withdrawal. The complex of neurochemical methods (detection of dopamine and testosterone concentration with enzymeimmunoassay and nitric oxide concentration with spectrophotometric analysis in the brain structures and serum) was carried out after 40 days of alcoholization as well as after 2 days of alcohol withdrawal. Decreased levels of testosterone and nitric oxide were identified in hypothalamus and hippocampus as well as testosterone in *nucleus accumbens* and serum. There were observed increased dopamine release in *nucleus accumbens* in response to latest dose of alcohol consumption and recovery of dopamine level after alcohol withdrawal. To the contrary, the dopamine content

decreased in hypothalamus in the state of alcohol withdrawal. The five-time (twice a day) intranasal introduction of sodium nitroprusside repaired nitric oxide and testosterone levels in the brain structures of motivational reinforcement and suppressed seizure pattern on EEG but didn't change testosterone concentration in serum. Obtained data are considered as one of the important aspects of interactions in the system of hormonal-neurotransmitter-metabolic regulatory mechanisms of motivational reinforcement under formation and suppression of alcohol dependence.

**Key words:** *dopamine, nitric oxide, testosterone, sodium nitroprusside, electrogenesis, alcohol dependence, rats.*

### **Взаимодействия дофамина, оксида азота и тестостерона в мозговой системе мотивационного подкрепления крыс с алкогольной зависимостью и под влиянием донатора оксида азота**

**А.М.Титкова, О.Г.Берченко, А.В.Шляхова, Е.В.Веселовская, Е.А.Приходько**

В эксперименте на 65 беспородных половозрелых крысах-самцах с моделью хронической алкоголизации (в течение 40 дней приема алкоголя в дозе 1,25 г/кг массы тела) и синдрома отмены алкоголя (в течение двух суток) применен комплекс нейрофизиологических методов исследования (стереотаксическое вживление электродов в структуры мозга, регистрация электрической активности неокортекса, гиппокампа, гипоталамуса и *nucleus accumbens*). Выявлена ведущая роль функциональных изменений биоэлектрической активности в гиппокампе, гипоталамусе и *nucleus accumbens* при формировании алкогольной зависимости у животных. Показаны наивысшая абсолютная спектральная мощность колебаний бета- и тета-диапазона в гиппокампе и проявления генерализованной гиперсинхронной активности с инициацией в гиппокампе и гипоталамусе. После отмены приема алкоголя пароксизмальная активность на ЭЭГ структур лимбико-неокортикальной системы мозга имела взрывной характер с включением высокоамплитудных острых волн. Через 40 дней алкоголизации животных (через 30 мин после последнего приема раствора этанола), а также через двое суток отмены алкоголя произведен комплекс нейрохимических исследований (определение концентрации дофамина и тестостерона методами иммуноферментного анализа и оксида азота спектрофотометрическим методом в структурах головного мозга и сыворотке крови крыс). Продемонстрировано снижение уровня тестостерона и оксида азота в гипоталамусе и гиппокампе, а также тестостерона в *nucleus accumbens* и сыворотке крови как после приема алкоголя, так и в состоянии его отмены. Установлен выброс дофамина в *nucleus accumbens* в ответ на прием очередной дозы алкоголя и восстановление его уровня в состоянии отмены алкоголя. В гипоталамусе выявлен противоположный эффект: снижение содержания дофамина после приема алкоголя. Интраназальное пятикратное (2 раза в сутки) введение донатора оксида азота – нитропруссид натрия в дозе 8 мкг/кг массы тела (по 10 мкл раствора в каждую ноздрю) восстанавливало уровень оксида азота и тестостерона в структурах мотивационного подкрепления и подавляло судорожную активность на ЭЭГ головного мозга, но не изменяло концентрацию тестостерона в сыворотке крови крыс. Полученные данные рассматриваются как один из важных аспектов взаимодействий в системе гормонально-медиаторно-метаболической регуляции механизмов мотивационного подкрепления при формировании и купировании алкогольной зависимости.

**Ключевые слова:** *дофамин, оксид азота, тестостерон, нитропруссид натрия, электрогенез, алкогольная зависимость, крысы.*

#### **Введение**

В основе формирования поведения, зависящего от алкоголя, лежат нарушения нейрональной пластичности в системе мотивационного подкрепления. Основные процессы нейропластичности в норме и при патологии базируются на избирательности ключевых нейромедиаторных и модуляторных гормонально-метаболических механизмов регуляции. Ведущая роль в формировании алкогольной зависимости принадлежит мезолимбической дофаминергической системе мозга (Voileau et al., 2003). Одними из наименее изученных в развитии зависящего поведения являются мозговые системы оксида азота и нейростероидов и их регуляторные взаимоотношения с дофаминергической системой (Berchenko et al., 2017). На разных этапах формирования алкогольной зависимости для них могут быть характерны как защитные, так и повреждающие свойства. Оксид азота обладает стресс-лимитирующими эффектами, является регулятором нейрогенеза в герминативных зонах мозга (Манухина, Малышев, 2000; Аниол, Степаничев, 2007). Снижение уровня оксида азота является фактором

риска апоптоза нейронов при алкогольной зависимости (Randall, Syapin, 2005). Во многих исследованиях последних десятилетий показано, что активный стероидогенез происходит не только в специфических периферических железах или плаценте, но и в структурах головного мозга, которые имеют полный набор ферментов для синтеза нейростероидов из холестерина *de novo* (Mellon et al., 2001). Тестостерон – одна из мишеней в действии этанола. С одной стороны, этанол может являться субстратом для вновь синтезированных молекул гормона в головном мозгу (Alomary et al., 2003), а с другой – хроническое воздействие алкоголя подавляет стероидогенез (Adams et al., 1993). Тестостерон и оксид азота оказывают взаимное регуляторное влияние (Alomary et al., 2003; Ward, 2009), однако характер этих влияний мало изучен. Установлено, в том числе и нашими исследованиями, что хроническая алкоголизация подавляет уровень оксида азота и тестостерона в тканях организма, что в конечном итоге проявляется в нарушениях механизмов регуляции в системе мотивационного подкрепления (Randall et al., 2005; Berchenko et al., 2017). Для компенсации нарушенных функций в системе оксида азота целесообразным является восстановление его уровня с применением веществ, повышающих его синтез, или донаторов оксида азота. Одним из таких веществ является нитропруссид натрия.

Целью исследования было изучение регуляторных эффектов экзогенного оксида азота на взаимодействия оксида азота, тестостерона и дофамина в мозговой системе мотивационного подкрепления крыс с алкогольной зависимостью.

#### **Объекты и методы исследования**

Исследования выполнены на 65 беспородных половозрелых крысах-самцах массой 220–250 г. Животные были разделены на 5 групп:

- Интактные животные (n=13);
- Алкоголизованные (n=13);
- Алкоголизованные, с отменой алкоголя в течение трех суток (n=13);
- Алкоголизованные, с приемом нитропруссид натрия в течение последних трех суток на фоне приема алкоголя (n=13);
- Алкоголизованные, с приемом нитропруссид натрия на фоне отмены алкоголя в течение трех суток (n=13).

Оперативные вмешательства и забой животных осуществлялись в соответствии с «Порядком проведения науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (№249 от 01.03.20120), Закона Украины «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№3447-IV от 21.02.2006).

Алкоголизацию крыс производили раствором этанола в дозе 1,25 г/кг массы тела в течение 40 суток. После формирования алкогольной зависимости стереотаксическим способом вводили долгосрочные электроды в область сенсомоторного неокортекса, гиппокампа, гипоталамуса, *nucleus accumbens* (Буреш и др., 1962). Электрическую активность мозга регистрировали биполярно на компьютерно-диагностическом комплексе «НЕЙРОН СПЕКТР +» в состоянии зависимости животных от приема алкоголя, на третьи сутки после его отмены, а также после первого, пятого введения нитропруссид натрия и через сутки после его последнего введения на фоне отмены алкоголя. Осуществляли визуальный и компьютерный анализ ЭЭГ с использованием программ вычисления абсолютной спектральной мощности биопотенциалов мозга.

В структурах головного мозга и сыворотке крови крыс определяли концентрацию дофамина (в *nucleus accumbens*, на наборах для иммуноферментного анализа (ИФА) «Tri Cat», Германия), тестостерона (в сыворотке крови, гипоталамусе и миндалевидном комплексе на наборах для ИФА «Гранум», Украина). Оптическую плотность образцов определяли с помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 2100, USA. Концентрацию оксида азота определяли в сыворотке крови и структурах головного мозга (гиппокамп, гипоталамус, *nucleus accumbens*) спектрофотометрическим методом (Голиков, Николаева, 2003) на спектрофотометре СФ-46.

Раствор донатора оксида азота – нитропруссид натрия – готовили непосредственно перед введением и вводили в дозе 8 мкг/кг массы тела интраназально по 10 мкл в каждую ноздрю. Процедуру введения выполняли пятикратно (по 2 раза в сутки). Животных брали в эксперимент через 30 мин после последнего введения нитропруссид натрия.

Результати проаналізовані статистически с помощью программ Excel и Statistica 6.0 с использованием критерия Стьюдента и непараметрических Т-критерия Вилкоксона и критерия Манна-Уитни. Определяли средние значения и ошибку среднего ( $M \pm m$ ).

### Результаты и обсуждение

У крыс со сформированной зависимостью от алкоголя на фоне синхронизированной электрической активности в структурах лимбико-неокортикальной системы мозга регистрировались элементы судорожной активности и генерализованные пароксизмы с инициацией в гипоталамусе и гиппокампе (рис. 1А). В спектрограмме гиппокампа выявлена наивысшая абсолютная спектральная мощность осцилляций в  $\delta$ - и  $\theta$ -диапазонах. В первые сутки отмены алкоголя в структурах лимбико-неокортикальной системы мозга выявлено достоверное снижение абсолютной спектральной мощности колебаний  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta_{nc}$ -ритмов в гиппокампе и  $\beta_{nc}$ -колебаний в неокортексе с повышением пароксизмальных проявлений на ЭЭГ. На третьи сутки отмены алкоголя снижение спектральной мощности  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов отмечалось также и в *nucleus accumbens*. При этом пароксизмальная активность на ЭЭГ имела взрывной характер с включением высокоамплитудных острых волн (рис. 1Б), что рассматривается как ЭЭГ-коррелят развития абстинентного синдрома (Воробьева, 2002; Coutin-Churchman, Moreno, 2008).

После первого интраназального введения нитропрусида натрия (НН) в электрической активности преобладали ритмы  $\theta$ - и  $\alpha$ -диапазонов. Первыми структурами, которые отреагировали на введение НН, были неокортекс и гиппокамп (рис. 1В). Пятое интраназальное введение НН вызывало подавление элементов судорожной активности на ЭЭГ с достоверным повышением спектральной мощности  $\alpha$ -ритма в неокортексе и гиппокампе (рис. 1Г). Через сутки после последнего введения НН положительная динамика изменений на ЭЭГ сохранялась (рис. 1Д). Наблюдалось повышение спектральной мощности колебаний  $\theta$ - и  $\alpha$ -диапазонов в гиппокампе и  $\alpha$ -диапазона – в неокортексе.

Таким образом, в динамике формирования структурно-функциональной матрицы алкогольной зависимости ведущими структурами являются гиппокамп, гипоталамус и *nucleus accumbens*. Введение донатора оксида азота – нитропрусида натрия – подавляет судорожную активность на ЭЭГ структур системы мотивационного подкрепления.

Как показали результаты биохимических исследований, развитие генерализованной судорожной активности в структурах головного мозга крыс в состоянии алкогольной зависимости происходит на фоне истощения тормозных влияний, в частности со стороны оксида азота в гиппокампе и гипоталамусе, и сопровождается снижением уровня тестостерона в гипоталамусе, миндалевидном комплексе и сыворотке крови как после приема очередной дозы алкоголя, так и в состоянии его отмены (табл. 1). Показано также, что разные звенья дофаминергической системы головного мозга по-разному задействованы в обеспечении мотивационного подкрепления на разных этапах развития состояния зависимости от алкоголя. В *nucleus accumbens* наблюдается выброс дофамина в ответ на прием алкоголя. При этом происходит торможение обмена дофамина в гипоталамусе в ответ на удовлетворение текущей мотивации. Таким образом, прием алкоголя активирует мезолимбическое звено дофаминергической системы и угнетает – гипоталамическое. Отмена алкоголя восстанавливает исходный уровень дофамина в этих структурах, то есть восстанавливает активность гипоталамического дофаминергического звена и не поддерживает активацию мезолимбического. Параллельно этому снижается уровень оксида азота в *nucleus accumbens* при отмене алкоголя (табл. 1).

Изучение влияния пятикратного интраназального введения нитропрусида натрия на уровень оксида азота и тестостерона продемонстрировало восстановление концентрации этих веществ в гипоталамусе и гиппокампе, а также оксида азота – в *nucleus accumbens* (табл. 1). При этом надо отметить, что интраназальное введение нитропрусида натрия не восстанавливало уровень тестостерона в крови животных. Таким образом, интраназальное введение нитропрусида натрия оказывает различные регуляторные влияния на центральном и периферическом уровнях: нормализующее действие на баланс тестостерона и оксида азота в ЦНС, но не на периферии организма.



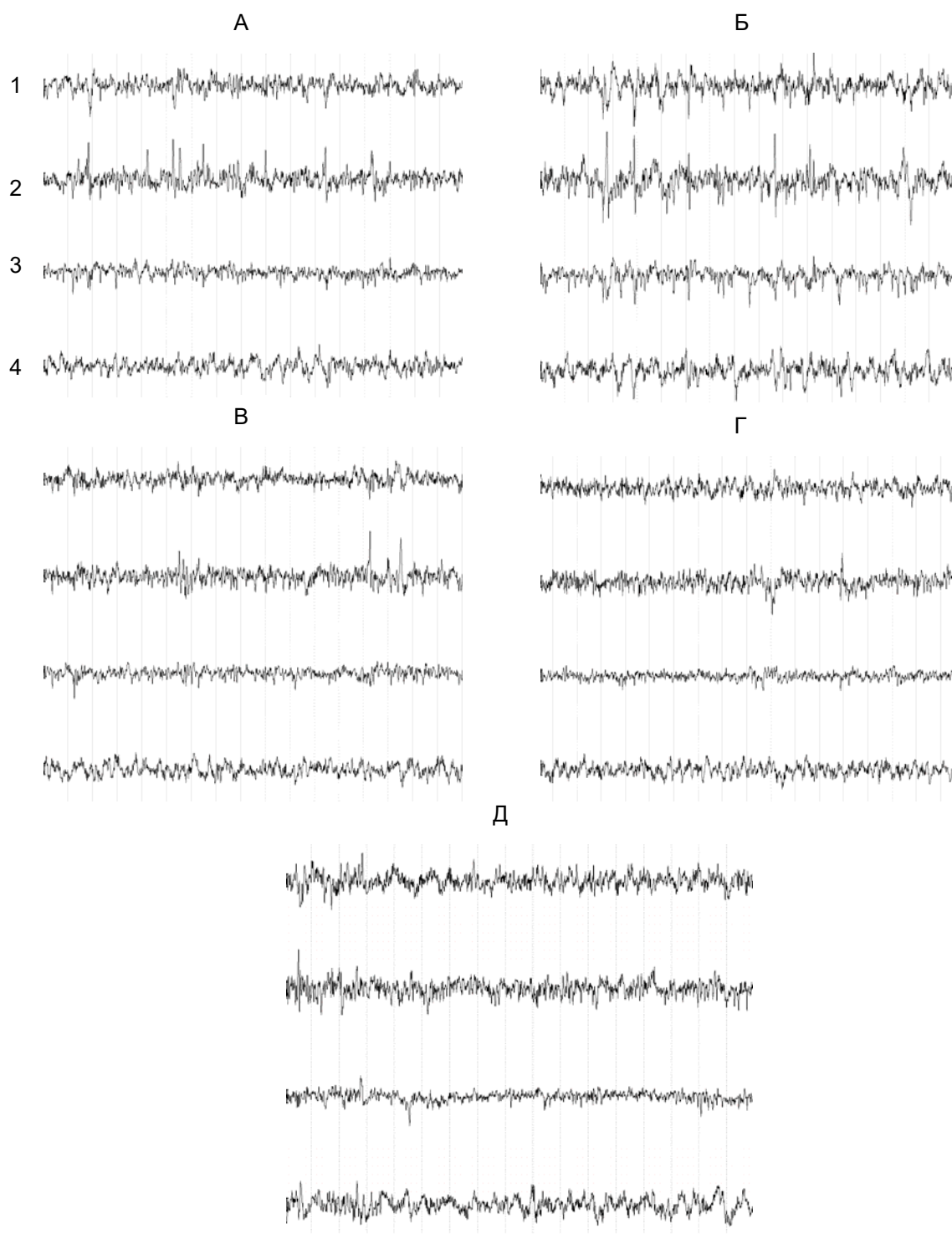


Рис. 1. Электрическая активность мозга крыс с алкогольной зависимостью (А), на 3-и сутки отмены алкоголя (Б) и в динамике введения нитропрусида натрия на 1-е (В), 3-и (Г) сутки и в отставленном периоде (Д) – через сутки после последнего введения. 1 – неокортекс, 2 – гиппокамп, 3 – гипоталамус, 4 – *nucleus accumbens*

Таблиця 1.

Изменения содержания оксида азота, тестостерона и дофамина в структурах головного мозга и сыворотке крови крыс с алкогольной зависимостью и после приема нитропрусида натрия ( $M \pm m$ ,  $n=13$ )

Исследуемые вещества	Интактные	Прием алкоголя	Прием алкоголя + нитропруссид натрия	Отмена алкоголя	Отмена алкоголя + нитропруссид натрия
Гипоталамус					
Оксид азота, нмоль/г ткани	519,1±101,0	274,0±36,3 <sup>1)</sup>	423,3±97,8	271,4±45,9 <sup>1)</sup>	665,4±109,0 <sup>3)</sup>
Тестостерон, пмоль/г ткани	45,3±5,6	29,0±3,5 <sup>1)</sup>	52,1±0,8 <sup>3)</sup>	31,2±4,1 <sup>1)</sup>	53,0±1,6 <sup>3)</sup>
Дофамин, нмоль/г ткани	25,21±4,80	13,86±1,27 <sup>1)</sup>	-	18,10±1,53 <sup>2)</sup>	-
Гиппокамп					
Оксид азота, нмоль/г ткани	371,0±44,6	200,0±29,3 <sup>1)</sup>	555,1±105,7 <sup>3)</sup>	227,6±35,6 <sup>1)</sup>	454,7±62,2 <sup>3)</sup>
Тестостерон, пмоль/г ткани	38,0±3,7	36,8±4,2	44,9±2,7	41,8±5,4	39,4±2,8
Миндалевидный комплекс					
Тестостерон, пмоль/г ткани	39,1±6,7	19,1±2,9 <sup>1)</sup>	22,3±1,5	31,9±7,3	32,8±1,4
<i>Nucleus accumbens</i>					
Оксид азота, нмоль/г ткани	342,0±31,0	342,4±39,0	239,0±24,7 <sup>1)</sup>	236,1±42,6 <sup>1)</sup>	411,6±111,2 <sup>3)</sup>
Дофамин, нмоль/г ткани	26,36±2,47	35,47±6,03 <sup>1)</sup>	-	30,24±4,31	-
Сыворотка крови					
Оксид азота, мкмоль/л	16,3±1,2	14,8±1,5	8,1±0,7 <sup>1,3)</sup>	20,1±1,9 <sup>2)</sup>	8,0±0,8 <sup>1,3)</sup>
Тестостерон, нмоль/л	7,3±1,6	3,1±0,9 <sup>1)</sup>	2,8±0,4	3,2±0,7 <sup>1)</sup>	3,4±0,7

Примечание: <sup>1)</sup> – разница значений показателя достоверна при  $p \leq 0,05$  относительно значений этого показателя у интактных животных; <sup>2)</sup> – разница значений показателя достоверна при  $p \leq 0,05$  относительно группы «прием алкоголя»; <sup>3)</sup> – разница значений показателя достоверна при  $p \leq 0,05$  относительно соответствующих групп «прием алкоголя» или «отмена алкоголя».

В основе поддержания мотивационно-зависимого поведения лежит активация дофаминергической мезолимбической системы, берущей начало в вентральной тегментальной области, с главным фокусом активности в *nucleus accumbens*. Уровень дофамина в *nucleus accumbens* зависит от координирующей активности глутамата, оксида азота и тестостерона.

Тестостерон стимулирует синтез оксида азота, повышая экспрессию фермента его синтеза – NO-синтазы. Оксид азота и глутамат активируют высвобождение дофамина в *nucleus accumbens* (Randall, Syarin, 2005). Как показали наши исследования, под влиянием хронической алкоголизации снижается уровень тестостерона и оксида азота в *nucleus accumbens*, то есть ослабляются их регуляторные влияния на дофамин, но сохраняется выброс дофамина при очередном приеме алкоголя. Вероятно, это лежит в основе трансформации естественного мотивированного поведения в алкоголь-зависимое. Интраназальное введение нитропрусида натрия, являющегося донатором оксида азота, восстанавливает регуляторный уровень оксида азота и тестостерона в *nucleus accumbens* и подавляет генерализованную судорожную активность в структурах лимбической системы мозга, вовлеченных в реализацию мотивационного возбуждения.

**Список литературы / References**

- Аниол В.А., Степаничев М.Ю. Оксид азота и гамма-аминомасляная кислота как регуляторы нейрогенеза в мозге взрослых млекопитающих при моделировании судорожной активности // *Нейрохимия*. – 2007. – Т.1, № 4. – С. 265–274. /Aniol V.A., Stepanichev M.Yu. Nitric oxide and gamma-aminobutyric acid as regulators of neurogenesis in the brain of adult mammals: Models of seizure activity // *Neurochemical Journal*. – 2007. – Vol.1, no. 4. – P. 265–274./
- Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования. – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – 466с. /Bures J., Petran M., Zachar J. Electrophysiological methods in biological research. – Moscow: Foreign literature publishing house, 1962. – 466p./
- Воробьева Т.М. Нейробиология вторично приобретенных мотиваций // *Международ. мед. журнал*. – 2002. – № 1–2. – С. 211–217. /Vorobyova T.M. Neurobiology of newly acquired motivations // *International Medical Journal*. – 2002. – No. 1-2. – P. 211–217./
- Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Методика определения оксида азота (NOx) в спинномозговой жидкости у нейрохирургических больных // *Нейрохирургия*. – 2003. – №3. – С. 35–37. /Golikov P.P., Nikolayeva N.Yu. A method of NOx determination in the spinal-marrow liquid in neurosurgical patients // *The Russian Journal of Neurosurgery (Neirokhirurgiya)*. – 2003. – No. 3. – P. 35–37./
- Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Стресс-лимитирующая система оксида азота // *Росс. физиол. журнал*. – 2000. – №10. – С. 1283–1292. /Manukhina E.B., Malyshev I.Yu. The stress-limiting system of nitric oxide // *Russian Journal of Physiology*. – 2000. – No. 10. – P. 1283–1292./
- Adams M.L., Forman J.B., Kalicki J.M. et al. Antagonism of alcohol-induced suppression of rat testosterone secretion by an inhibitor of nitric oxide synthase // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 1993. – Vol.17, no. 3. – P. 660–664.
- Alomary A.A., Vallée M.M., O'dell L.E. et al. Acutely administered ethanol participates in testosterone synthesis and increases testosterone in rat brain // *Alcoholism. Clinical and Experimental Research*. – 2003. – Vol.27, no. 1. – P. 38–43.
- Berchenko O.G., Titkova A.M., Veselovs'ka O.V. et al. Electrical activity of the cerebral structures and regulatory effects of NO, steroid hormones, and BDNF in rats with experimental alcohol addiction // *Neurophysiology*. – 2017. – Vol.49, no. 3. – P. 240–242.
- Boileau I.I., Assaad J.M., Pihl R.O. et al. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens // *Synapse*. – 2003. – Vol.15, no. 49 (4). – P. 226–231.
- Coutin-Churchman P., Moreno R. Intracranial current density (LORETA) differences in QEEG frequency bands between depressed and non-depressed alcoholic patients // *Clinical Neurophysiology*. – 2008. – Vol.119, no. 4. – P. 948–958.
- Mellon S.H., Griffin L.D., Compagnone N.A. Biosynthesis and action of neurosteroids // *Brain Res. Rev.* – 2001. – Vol.37. – P. 3–12.
- Randall L.D., Syapin P.J. Interactions of alcohol and nitric-oxide synthase in the brain // *Brain Res. Rev.* – 2005. – Vol.49, no. 3. – P. 494–504.
- Ward R. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol – induced brain damage in chronic or «binge drinking» alcohol abuse // *Alcohol Alcohol*. – 2009. – Vol.44, no. 2. – P. 128–135.

**Представлено: О.А.Наконечна / Presented by: O.A.Nakonechna**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the authors:** A.M.Titkova – Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Akademika Pavlova St., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, annatitkova2@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-7161-4507>

O.G.Berchenko – Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Akademika Pavlova St., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, berchenko.olga@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0003-4201-4542>

A.V.Shlyakhova – Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Akademika Pavlova St., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, avshlyakhova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3934-5888>

E.V.Veselovskaya – Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Akademika Pavlova St., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, veselovskaelena4@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5209-4606>

E.A.Prihodko – Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Akademika Pavlova St., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, prihodkoelena756@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8239-0943>

**Про авторів:** А.М.Тіткова – Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61088, annatitkova2@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-7161-4507>

О.Г.Берченко – Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61088, berchenko.olga@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0003-4201-4542>

А.В.Шляхова – Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61088, avshlakhova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3934-5888>

О.В.Веселовська – Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61088, veselovskaelena4@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5209-4606>

О.О.Приходько – Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61088, prihodkoelena756@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8239-0943>

**Об авторах:** А.М.Титкова – Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, annatitkova2@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-7161-4507>

О.Г.Берченко – Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, berchenko.olga@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0003-4201-4542>

А.В.Шляхова – Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, avshlakhova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3934-5888>

Е.В.Веселовская – Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, veselovskaelena4@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5209-4606>

Е.А.Приходько – Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, prihodkoelena756@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8239-0943>

## •• ОГЛЯДИ •• REVIEWS ••

УДК: 616.153.96:616.894

### Нейрозапалення у біохімічних механізмах амілоїдозу

В.В.Соколік

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України» (Харків, Україна)  
Sokolik67@rambler.ru

В обзорі представлено аналіз сучасного рівня розуміння впливу нейрозапального процесу на біохімічні механізми виникнення, прискорення та перебігу амілоїдозу при нейродегенеративній патології. Особлива увага приділена функції цитокинової ланки вродженого імунітету нервової тканини головного мозку. Зокрема, детально проаналізовано вплив прозапальних цитокинів першої хвилі цитокинового каскаду на процеси пам'яті і регуляцію нейропластичності. Зазначена специфічність відповіді вродженого імунітету у сигнальних шляхах ефектів інтерлейкіну-1 $\beta$  і фактору некрозу пухлин  $\alpha$  в умовах надлишкового синтезу і амілоїдогенного процесингу протеїну попередника  $\beta$ -амілоїдного пептиду. Розглянуто характер впливу цитокинів на клітини (аутокринно, паракринно або системно) та наведено схему каскаду цитокинової активації при амілоїдозі. В обзорі приділено увагу й іншим регуляторним пептидам: інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-10, протеїну S100B тощо. А саме представлені особливості сигнальної трансдукції при взаємодії інтерлейкіну-6 зі своїм мембранним або розчинним рецепторами та необхідність останніх у стимулюванні розростання нейритів і виживанні нейронів, а також при регенерації нервів через ремієлінізацію. Наведені відомості про пост-транскрипційну регуляцію рівня антизапального інтерлейкіну-10, яка вміщує контроль стабільності мРНК за допомогою АС-збагачених елементів та окремих мікроРНК та зазначена його функція у пригніченні синтезу прозапальних цитокинів. Підкреслена здатність S100B посилювати експресію попередника  $\beta$ -амілоїдного пептиду і його мРНК, що веде до розладу навчання і пам'яті та атрофії мозку. Детально представлені сучасні відомості щодо впливу кожного з розглянутих цитокинів на синтез і метаболізм протеїну попередника  $\beta$ -амілоїдного пептиду, а також власні результати щодо індукції прозапальних цитокинів у мононуклеарах *in vitro* та у неокортексі і гіпокампі головного мозку експериментальних тварин *in vivo* під впливом агрегатів  $\beta$ -амілоїдних пептидів. Зроблено узагальнення, що цитокіни здебільшого активують синтез протеїну попередника  $\beta$ -амілоїдного пептиду і утворення агрегатів  $\beta$ -амілоїдних пептидів при хронічній дії, як це спостерігається при старінні або хворобі Альцгеймера, тому вони можуть брати безпосередню участь в посиленні амілоїдогенезу.

**Ключові слова:**  $\beta$ -амілоїдний пептид, нейрозапалення, цитокіни, амілоїдоз.

### Neuroinflammation in the biochemical mechanisms of amyloidosis

V.V.Sokolik

The review presents an analysis of the current level of understanding of the influence of the neuroinflammatory process on the biochemical mechanisms of the onset, acceleration and course of amyloidosis in neurodegenerative pathology. Particular attention is paid to the function of the cytokine link of the innate immunity of the brain's nervous tissue. In particular, the influence of proinflammatory cytokines of the first wave of the cytokine cascade on the processes of memory and regulation of neuroplasticity is analyzed in detail. Specificity of the response of innate immunity in the signaling pathways of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  effects in terms of excess synthesis and amyloidogenic processing of the  $\beta$ -amyloid peptide precursor is noted. The character of the influence of cytokines on cells (autocrine, paracrine or systemic) is considered and the scheme of the cascade of cytokine activation at amyloidosis is presented. The review also focuses on other regulatory peptides: interleukin-6, interleukin-10, protein S100B, and the like. Namely, the features of signal transduction in the interaction of interleukin-6 with their membrane or soluble receptors are presented, and the latter's need for stimulation of neurite outgrowth and survival of neurons, as well as regeneration of the nerves through remyelination. Information is given on post-transcriptional regulation of anti-inflammatory interleukin-10 level, which contains the control of the stability of mRNA with the help of AC-enriched elements and individual miRNAs and indicates its function in suppressing the synthesis of proinflammatory cytokines. Underlined the ability of S100B to enhance the expression of the precursor of the  $\beta$ -amyloid peptide and its mRNA, leading to learning disorder and memory and brain atrophy. Detailed information is presented on the effect of each of the cytokines examined on the synthesis and metabolism of the protein of the precursor of the  $\beta$ -amyloid peptide, as well as own results on the induction of proinflammatory cytokines in mononuclear cells *in vitro* and in the neocortex and hippocampus of the brain of experimental animals *in vivo* under the influence of

$\beta$ -amyloid peptides aggregates. It is generalized that cytokines primarily activate the synthesis of the protein of the precursor of the  $\beta$ -amyloid peptide and the formation of  $\beta$ -amyloid peptide aggregates during chronic exposure, as observed at aging or Alzheimer's disease, therefore, they can directly participate in the amplification of amyloidogenesis.

**Key words:**  *$\beta$ -amyloid peptide, neuroinflammation, cytokines, amyloidosis.*

## Нейровоспаление в биохимических механизмах амилоидоза В.В.Соколик

В обзоре представлен анализ современного уровня понимания влияния нейровоспаления на биохимические механизмы возникновения, ускорения и течения амилоидоза при нейродегенеративной патологии. Особое внимание уделено функции цитокинового звена врожденного иммунитета нервной ткани головного мозга. В частности, подробно проанализировано влияние провоспалительных цитокинов первой волны цитокинового каскада на процессы памяти и регуляцию нейропластичности. Отмечена специфичность ответа врожденного иммунитета в сигнальных путях эффектов интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухолей  $\alpha$  в условиях избыточного синтеза и амилоидогенного процессинга белка предшественника  $\beta$ -амилоидного пептида. Рассмотрен характер воздействия цитокинов на клетки (аутокринно, паракринно или системно) и приведена схема каскада цитокиновой активации при амилоидозе. В обзоре уделено внимание и другим регуляторным пептидам: интерлейкину-6, интерлейкину-10, белку S100B и др. А именно представлены особенности сигнальной трансдукции при взаимодействии интерлейкина-6 с его мембранными или растворимыми рецепторами, а также необходимость последних в стимуляции разрастания нейритов и выживаемости нейронов, а также регенерации нервов путем ремиелинизации. Приведены данные о пост-транскрипционной регуляции уровня противовоспалительного интерлейкина-10, которая вмещает контроль стабильности мРНК с помощью АС-обогащенных элементов и отдельных микроРНК, а также указана его функция в подавлении синтеза провоспалительных цитокинов. Подчеркнута способность S100B усиливать экспрессию предшественника  $\beta$ -амилоидного пептида и его мРНК, что приводит к расстройству обучения, памяти и атрофии мозга. Подробно представлены современные данные о влиянии каждого из рассматриваемых цитокинов на синтез и метаболизм белка предшественника  $\beta$ -амилоидного пептида, а также собственные результаты по индукции провоспалительных цитокинов в мононуклеарах *in vitro* и в неокортексе и гиппокампе головного мозга экспериментальных животных *in vivo* под действием агрегатов  $\beta$ -амилоидных пептидов. Сделано обобщение, что цитокины в основном активируют синтез протеина предшественника  $\beta$ -амилоидного пептида и образование агрегатов  $\beta$ -амилоидных пептидов при хроническом действии, как это наблюдается при старении или болезни Альцгеймера, поэтому они могут принимать непосредственное участие в усилении амилоидогенеза.

**Ключевые слова:**  *$\beta$ -амилоидный пептид, нейровоспаление, цитокины, амилоидоз.*

Нейрозапалення є однією з «гарячих точок» механізмів патології центральної нервової системи (ЦНС), включаючи нейродегенеративні захворювання з амілоїдозом, а медіаторами слугують цитокіни. Ці недовго існуючі поліпептиди забезпечують взаємодію між клітинами ЦНС, ендокринної та імунної систем. Встановлено, що цитокіни і рецептори до них є майже у всіх структурах головного мозку. Наявність на мембрані нейронів рецепторів до цитокинів свідчить про участь останніх в інтегративній функції нервових клітин. Показано, що окремі цитокіни спроможні впливати на вміст нейромедіаторів у різних структурах головного мозку. При патологічних процесах в ЦНС підвищена експресія прозапальних цитокинів – інтерлейкіну-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) і фактору некроза пухлин  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) в клітинах імунної та нервової систем опосередковується відповідними внутрішньомозковими рецепторами і реалізується через активацію дофамін- і серотонінергічних систем мозку. Існує небагато даних про залежність вираженості неврологічних порушень від характеру експресії цитокинів в ЦНС. Прозапальні цитокіни (IL-1 $\beta$ , IL-6 і TNF $\alpha$ ) у головному мозку активують гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову систему, пірогенез, повільнохвильовий сон, а також знижують здатність до навчання, уповільнюють швидкість розумових процесів і активність нейромедіаторних систем, пов'язаних з процесами пам'яті, впливаючи на продукцію протеїнів, залучених в регуляцію процесів нейропластичності (Taishi et al., 2008). Зниження рівня прозапальних цитокинів і збільшення рівня протизапальних (IL-4, IL-10 та ін.) перешкоджає демієлінізації, розвитку гліозу, уповільнює атрофію нервової тканини мозку, тим самим запобігаючи збільшенню стійкого неврологічного і когнітивного дефіциту (Rage et al., 2006).

Інтерлейкін-1 $\beta$  (ген *IL1B*) – прозапальний цитокін, член сімейства інтерлейкіну 1. Вперше IL-1 $\beta$  був описаний в 1985 році разом із IL-1 $\alpha$  (March et al., 1985). Він синтезується у вигляді попередника масою 33 кДа. Активна форма IL-1 $\beta$  утворюється шляхом відщеплення частини попередника за каталітичної дії інтерлейкін-1-конвертуючого ензиму (ICE) або каспази-1 (CASP1) (Schönbeck et al., 1988). IL-1 $\beta$  здатний індукувати NO-синтазу, тим самим призводячи до підвищеного виробництва оксиду азоту (Corbett et al., 1993).

Система цитокіну IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  і «блокуючий» ліганд, так званий антагоніст рецептора, IL-1ra) у купі з рецепторами сімейства IL-1 мають схожість з механізмами передачі сигналу в одній з центральних гілок вродженого імунітету – TLR рецепторах. Підмножиною важливих регуляторних і ефекторних генів, які активуються при відповіді вродженого імунітету, також є гени інших прозапальних цитокінів: TNF $\alpha$ , IL-6 або IL-1. Після продукції цитокіни діють на ті ж або інші клітини (аутокринно, паракринно або системно) через специфічні рецептори. По суті передача сигналу від цих рецепторів збігається з таким для більшості TLR. Головною адаптерною молекулою є MyD88, який рекрутується на TIR домен внутрішньоклітинної частини рецептора. Через короткий каскад, який включає IRAK і TRAF6, активуються сигнальні кінази комплексу IKK. Мішенню цього комплексу є інгібітор NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B), який після фосфорилування отримує «поцілунок смерті» у вигляді убіквітину і деградує. Головними транскрипційними факторами є димери протеїнів NF $\kappa$ B.

Наразі встановлено, що надлишкова експресія IL-1 $\beta$  активованою нейроглією за умов поліморфізму гену цього цитокіну у 6 разів збільшує ризик раннього розвитку амілоїдозу в патогенезі хвороби Альцгеймеру (Griffin et al., 2002). На загальній схемі залученості IL-1 $\beta$  до нейропатогенезу при амілоїдозі звертає увагу наявність як прямих напрямків впливу на синтез і амілоїдогенний процесинг протеїну попередника  $\beta$ -амілоїдного пептиду (A $\beta$ PP), так і опосередковані шляхи дії (рис. 1). Наведений каскад IL-1 $\beta$  ґрунтується на експериментальних і клінічних спостереженнях. Зокрема, з'ясовані надлишкові рівні експресії IL-1 $\beta$  активованою мікроглією і цитокіну S100B астроцитами (Forloni et al., 1992; Sheng et al., 1994; Goldgaber et al., 1989) у хворих на амілоїдоз, який є наслідком хвороби Дауна або хвороби Альцгеймера. Доведено, що секреція IL-1 $\beta$  індукує синтез запальних молекул другої хвилі цитокінового каскаду, а саме IL-6, S100B,  $\alpha$ 1-антихимоทริปсину ( $\alpha$ 1-ACT), та активує ензими iNOS і ICE (Bauer et al., 1991; Das et al., 1995; Zhu et al., 1999; Sheng et al., 1996a). З іншого боку, встановлене вік-залежне прогресуюче збільшення експресії IL-1 $\beta$  і його мРНК (Sheng et al., 1998) та S100B і його мРНК (Sheng et al., 1996b) у головному мозку пацієнтів, яке не пов'язане з генетичним підґрунтям.

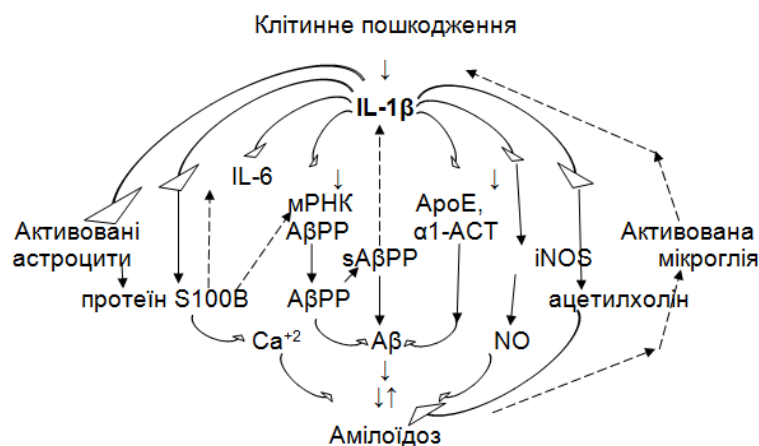


Рис. 1. Каскад інтерлейкіну-1 $\beta$  при амілоїдозі

Фактор некрозу пухлин  $\alpha$  об'єднує суперсімейство з 18 протеїнів, які взаємодіють з 29 рецепторами (Old, 1985). TNF $\alpha$  синтезується як мембранний протеїн з молекулярною масою 26 кДа. Після дії специфічної металопротеази, так званого TNF $\alpha$ -конвертуючого ензиму (ADAM17), мембрано-зв'язуючий фрагмент відщеплюється і утворюється розчинний TNF $\alpha$  з молекулярною масою 17 кДа. Активною формою цитокіну є гомотример, який втрачає активність при дисоціації субодиниць, оскільки лише тример здатний зв'язуватися з рецептором і олігомеризувати його, що необхідно для запуску NF $\kappa$ B сигнального шляху (Verstrepen et al., 2008). У головному мозку TNF $\alpha$

відіграє центральну роль у нейрозапаленні, апоптозі, а також у контролі синаптичної щільності (Stellwagen, Malenka, 2006). У пацієнтів з амілоїдозом виявлені високі рівні TNF $\alpha$  (Fillit et al., 1991; Tarkowski et al., 1999).

TNF $\alpha$  може стимулювати два сигнальні шляхи: виживання або загибелі клітин. Індукція шляху виживання залежить від NF $\kappa$ B та/або FLIP-L-залежної активації ERK (Micheau, Tschopp, 2003). У нормі TNF $\alpha$  не токсичний для нейронів, бо низка регуляторних протеїнів запобігають індукції апоптозу на різних етапах сигналізації TNF $\alpha$  (Marques-Fernandez et al., 2013). Виражена виключно в нейронах, довга форма Fas-апоптоз пригнічуючої молекули протеїну (FAIM-L) здатна регулювати сигналізацію TNF $\alpha$  (Segura et al., 2007; Carriba, Comella, 2014). Рівні FAIM-L визначають захисний або шкідливий вплив TNF $\alpha$  у нервових клітинах, в той час як  $\beta$ -амілоїдний пептид (A $\beta$ ) викликає зниження експресії нейрональної FAIM-L, обумовлюючи сценарій апоптозу (Carriba et al., 2015).

Фактор некрозу пухлин спочатку був відкритий у зв'язку зі своїми протипухлинними ефектами, але згодом виявився надзвичайно важливим і плейотропним цитокином. Ці свої функції TNF $\alpha$  здійснює через клітинний рецептор p55 (TNFR1), який експресується на багатьох типах клітин. Зокрема, TNF $\alpha$  є одним з трьох головних прозапальних цитокинів (нарівні з IL-1 та IL-6), його синтез запускається через хвилини після активації багатьох рецепторів вродженого імунітету (рецепторів сімейства TLR). Інший найважливіший рецептор цього сімейства – Fas (Apo-1, або CD95), який запускає програму апоптозу і є одним з центральних регуляторів гомеостазу клітин імунної системи. Рецептори цього сімейства утворюють гомотример, після того як вони зв'язуються з TNF $\alpha$  також у тримерній формі. П'ять рецепторів сімейства TNF $\alpha$  (в тому числі Fas і TNFR1) містять у внутрішньоклітинній частині так звані «домени смерті». Ці протеїнові модулі рекрутують спеціальні адаптерні протеїни, які, у свою чергу, зв'язують і активують попередники каспаз – особливий клас протеаз, які беруть участь у програмованій загибелі клітин. Рецептори сімейства TNF $\alpha$  сигналять аналогічно (але не ідентично) рецепторам сімейства IL-1 і TLR. Через свою систему адаптерних молекул вони рекрутують і активують сигнальні кінази, які в кінцевому підсумку активують фактори транскрипції двох найважливіших сімейств: NF $\kappa$ B і AP-1.

Інтерлейкін 6 (IL-6) являє собою інтерлейкін, який діє і як прозапальний цитокин, і як протизапальний міокін. Він функціонує як один з найважливіших медіаторів гострої фази запалення. Протизапальний ефект IL-6 реалізується через пригнічення TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$  та активацію IL-1ra і IL-10. Інтерлейкін 6 зв'язується на поверхні клітин з гетеродимерним рецепторним комплексом, на ім'я рецептор цитокинів I типу, який складається з двох трансмембранних протеїнів: рецептора інтерлейкіну 6 і gp130 (Heinrich et al., 1998). Сигнальна трансдукція включає активацію JAK (Janus кінази), яка належить до сімейства тирозинкіназ, що веде до активації факторів транскрипції STAT (сигнали трансдукції і активатори транскрипції). Ще одним важливим шляхом сигналізації для IL-6 є MAPK (мітоген-активованій протеїнкіназний каскад) (Heinrich et al., 2003).

Більшість нейронів не реагують на стимуляцію IL-6 поодиночі, бо вони не мають мембранного рецептору для IL-6, але їх диференціація та виживання можуть бути опосередковані через дію розчинної форми цього рецептора – SIL-6R. SIL-6R/IL-6 комплекс здатний стимулювати розростання нейритів і сприяти виживанню нейронів і, отже, може видатися в нагоді при регенерації нервів через ремієлінізацію (Swardfager et al., 2010; Luterman et al., 2000).

Інтерлейкін-10 (IL-10) належить до когорти антизапальних (інгібіторних) цитокинів і функціонує у гомодимерній формі. IL-10 сигналінг реалізується через рецепторний комплекс, що складається з двох IL-10-рецептор-1 і двох IL-10 рецептор-2 молекул протеїнів. Цей цитокин індукує STAT3 сигналінг через фосфорилування цитоплазматичних хвостів IL-10-рецептора 1 + IL-10-рецептор 2 з JAK1 і Tyk2 відповідно (Mosser, Zhang, 2008). Індукція IL-10 включає ERK1/2, p38 і NF- $\kappa$ B залежну активацію транскрипції шляхом зв'язування NF $\kappa$ B і AP-1 факторів транскрипції з промотором гену (Saraiva, O'Garra, 2010). IL-10 може ауторегулювати свою експресію за допомогою негативного зворотного зв'язку шляхом аутокринної стимуляції IL-10-рецептору та інгібування p38 сигналізації (Hammer et al., 2005). Експресія цього інтерлейкіну регулюється на пост-транскрипційному рівні, який вміщує контроль стабільності мРНК за допомогою AC-збагачених елементів (Powell et al., 2000) та мікроРНК, таких як let-7 (Schulte et al., 2011) або miR-106 (Sharma et al., 2009). Серед численних функцій IL-10 найбільш вражаючою є пригнічення синтезу прозапальних цитокинів: IL-1, IL-6, IL-12 і TNF $\alpha$  та посилення експресії антагоніста рецептору IL-1 (Ouyang et al., 2011).

Церебральний протеїн S100 – це комбінація двох тісно пов'язаних сімейств протеїнів: S100A1 (S100 $\alpha$ ) і S100B (S100 $\beta$ ) (Donato, 1999). З деякими винятками протеїни S100 у клітинах існують у



вигляді димерів. Так, у мозку S100A1 і S100B утворюють гомодимери S100A12 і S100B2, а також гетеродимери S100A1 / S100B (Isobe, Okuyama, 1981). Завдяки здатності до регуляції активності цілого пулу протеїнів, S100A1 і S100B залучені до трансдукції сигналів, які контролюють активність ензимів енергетичного обміну в клітинах мозку (Landar et al., 1996), кальцієвий гомеостаз (Barger, Van Eldik, 1992), клітинний цикл, функції цитоскелету (Sorci et al., 1998), транскрипцію (Heizmann, 2002), проліферацію і диференціювання клітин, їх рухливість, секреторні процеси (Marenholz et al., 2004), структурну організацію біомембран (Donato, 1999). Однак найбільш незвичайною характеристикою окремих членів сімейства S100 є їх здатність секретуватися позаклітинно. S100-протеїни у позаклітинному просторі виявляють властивості цитокінів і взаємодіють з RAGE-рецепторами (Agutugam et al., 2004), які експресуються в нервовій системі нейронами, мікроглією, астроцитами, клітинами судинної стінки (Lue et al., 2005). Встановлено, що одним з медіаторів в глія-нейрональних і глія-гліальних взаєминах є S100B, який секретується гліальними клітинами (Adami et al., 2001; Nishiyama et al., 2002).

Як і у більшості біологічно активних молекул, ефекти позаклітинного S100B дозозалежні. У наномолярних концентраціях S100B аутокринно впливав на астроцити, стимулюючи їх проліферацію *in vitro* (Selinfreud et al., 1991), а димер S100B2 модулював довготривалу синаптичну пластичність і ріст нейронів (Nishiyama et al., 2002). У мікромольних концентраціях позаклітинний S100B у формі гомо- і гетеродимеру мав нейротоксичний вплив для нейронів і глії, індуюючи як апоптоз, так і некроз клітин (Adami et al., 2001). В основі даного ефекту лежить здатність S100B індукувати прозапальні цитокіни, ферменти оксидативного стресу, зокрема iNOS (Hu et al., 1997), і посилювати інші сигнали, спрямовані на нейрони і гліальні клітини (Hu, Van Eldik, 1999). Так, S100B здатний підсилювати експресію IL-1 $\beta$  та IL-6 (Li et al., 2000) в мікроглії і нейронах, що може призводити до патологічних змін властивостей нейронів, зокрема до гіперфосфорилування tau-протеїну, зниження рівня деяких синаптичних білків (Li et al., 2003) і збільшення синтезу і активності ацетилхолінестерази. S100B також збільшує експресію попередника  $\beta$ -амілоїдного пептиду (A $\beta$ PP) і його мРНК в культурах нейронів (Barger, Basile, 2001) і підсилює активацію астроцитів, викликану  $\beta$ -амілоїдним пептидом (Hu et al., 1997). У свою чергу, і IL-1, і  $\beta$ -амілоїд індуюють експресію S100B (Liu et al., 2005), замикаючи, у такий спосіб, порочне коло потенціювання нейротоксичних ефектів S100B. Індуковане S100B посилення експресії A $\beta$ PP і активація iNOS сприяють генералізації запальної активації і нейродегенерації, оскільки  $\beta$ -амілоїдний пептид може секретуватися, а монооксид азоту (NO) – дифундувати. NO, в свою чергу, може запускати синтез і вивільнення інших прозапальних молекул з астроцитів, наприклад IL-8 і TNF $\alpha$  (Hu et al., 1997). Порушення експресії S100B веде не тільки до атрофії мозку, але й до розладу навчання і пам'яті (Mrak, Griffin, 2001).

Розуміння того, що рівні цитокінів, як правило, зростають при старінні, і, зокрема, при таких вік-залежних нейродегенеративних захворюваннях, як хвороба Альцгеймера (Kronfol, Remick, 2000; Bodies, Barger, 2004), обумовило численні дослідження з проблеми асоціації цитокінів і A $\beta$ PP метаболізму (табл. 1).

Показано, що прозапальний цитокін IL-1 $\beta$  підвищував рівень мРНК A $\beta$ PP у первинних кортикальних нейронах щурів і в ендотеліальних клітинах, отриманих з пупкової вени людини, а також знижував рівень мРНК A $\beta$ PP в гліобластома-клітинних лініях людини, але не виявив ефекту в первинних астроцитах щурів (Goldgaber et al., 1989; Forloni et al., 1992; Yang et al., 1993). Аналогічно, IL-6 збільшував мРНК A $\beta$ PP кортикальних нейронів щурів, але був неефективним для астроглії (Del Bo et al., 1995). IL-1 підвищував активність промотору A $\beta$ PP-регулюючих репортерних генів, які експресуються у первинних нейронах гіпокампу щурів (Yang et al., 1998), або в мишиних клітинах нейробластоми (Goldgaber et al., 1989), що свідчить про активацію транскрипції. Хоча IL-1 та IL-6 не впливав на рівень мРНК A $\beta$ PP у гліальних клітинах, IL-1 $\alpha$  і IL-1 $\beta$  посилювали трансляцію мРНК транскриптів в первинних людських астроцитах і в клітинах астроцитоми людини, не змінюючи рівень мРНК A $\beta$ PP. Таким чином, IL-1 може регулювати синтез A $\beta$ PP обома механізмами: транскрипційно і трансляційно, в залежності від типу клітин. На відміну від ефектів IL-1, інтерферон  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) пригнічував активність A $\beta$ PP промотору у людській лінії клітин нейробластоми (Rogers et al., 1993; Ringheim et al., 1996). Короточасний вплив IL-1 $\beta$  підвищував секрецію A $\beta$ PP незалежно від впливу на його синтезу. У ендотеліальних клітинах або клітинах гліоми цей цитокін *in vitro* викликав 2–3-разове збільшення секреції розчинного A $\beta$ PP до позаклітинного середовища (Vuxbaum et al., 1993).

Таблиця 1.

Модуляція цитокінами синтезу і метаболізму протеїну попередника β-амілоїдного пептиду

Цитокін	Час дії	Ефект	Експериментальна модель	Посилання
TNFα + INFγ	24 год	↑ AβPP мРНК, ↑ розчинного AβPP ↑ sAβPPα, ↑ Aβ	Клітини нейробластоми SK-N-SH; епітеліальні клітини і первинні астроцити людини	Blasko et al., 1999; Blasko et al., 2000; Sastre et al., 2003
IL-1β + INFγ	24 год	↑ sAβPPα, ↑ Aβ	Клітини астроцитоми людини лінії U373	Blasko et al., 2000
TNFα, IL-1β	24 год	Активация γ-секретази, ↑ Aβ	HEK293 лінія клітин	Ma et al., 2005
IL-1α/β	12-24 год	↑ AβPP мРНК, ↑ активності промотору AβPP	HUVEC Нейробластома миші	Goldgaber et al., 1989; Forloni et al., 1992
IL-1β	24 год	↑ активності промотору AβPP	Первинні нейрони гіпокампу щурів	Yang et al., 1998
IL-1β	48 год	↓ AβPP мРНК	Лінія клітин гліобластоми людини	Forloni et al., 1992; Yang et al., 1993
IL-1β	2-24 год	↔ AβPP мРНК	Первинні астроцити щурів	Forloni et al., 1992
IL-6	6 год	↑ AβPP мРНК ↔ AβPP мРНК	Первинні кортикальні нейрони щурів Первинні астрогліальні клітини щурів	Del Bo et al., 1995
IL-1α/β	6-16 год	↑ AβPP мРНК трансляцію	Первинні астроцити людини	Rogers et al., 1993
IL-1β	1 год	↑ sAβPPα	HUVEC, Hs 638 клітини гліоми	Buxbaum et al., 1993
IL-1β	2 год	↑ sAβPPα ↓ розчинного AβPP	U251 клітини нейрогліоми	Ma et al., 2005
IL-1β	1 год 5 год	↑ sAβPPα ↓ розчинного AβPP ↔ sAβPPα, ↑ Aβ	H4 клітини нейрогліоми людини	Vasilakos et al., 1994; Dash, Moore, 1995
IL-1β	3 год	↑ sAβPPα ↓ розчинного AβPP	PC12	Dash, Moore, 1995
TGFβ	16 год	↑ AβPP мРНК (ЕСМ-залежне)	BV-2 лінія мікрогліальних клітин	Monning et al., 1994
TGFβ	2-8 год	↑ AβPP мРНК, ↑ активності промотору AβPP, ↑ розчинного AβPP, ↑ AβPP-CTFs, ↑ Aβ	Астроцити людини	Burton et al., 2002
TGFβ	24-72 год	↑ AβPP мРНК, ↑ розчинного AβPP, ↑ sAβPP, ↑ Aβ, ↔ AβPP мРНК, ↔ розчинного AβPP, ↔ sAβPP	Кортикальні астроцити миші Кортикальні нейрони миші	Lesne et al., 2003
TGFβ	24 год	↑ активності промотору AβPP	Mv1 Lu клітини	Docagne et al., 2004

Певні комбінації цитокінів виявили адитивний вплив на метаболізм AβPP. А саме, добовий вплив комбінації фактора некрозу пухлини α (TNFα) та інтерферону γ (INFγ) суттєво збільшував секрецію Aβ порівняно з ефектом одного з цитокінів у лінії клітин нейробластоми людини (Blasko et

al., 1999). Це супроводжувалося зниженням секреції розчинних N-кінцевих похідних АβPP. Так само в первинних астроцитах і в лінії клітин астроцитоми комбінації TNFα + INFγ або IL-1β + INFγ обумовлювали збільшення секреції Аβ пептидів і sAPPβ, в той час як окремі цитокіни мало або взагалі не впливали (Blasko et al., 2000). Ті ж комбінації цитокінів збільшували секрецію Аβ і sAPPβ у клітинах нейробластоми миші та SK-N-SH клітинах нейробластоми. Це було пов'язано зі збільшенням рівнів мРНК і β-секретази (BACE 1) та зі збільшенням активності BACE 1 в екстрактах клітин, що пояснює регуляцію транскрипції BACE 1, яка полягає в основі амілоїдогенних ефектів довгострокового впливу цих цитокінів (Sastre et al., 2003).

Трансформуючий фактор росту β (TGFβ) у якості протизапального і імуносупресивного цитокіну також був задіяний в регуляцію синтезу АβPP і утворення Аβ-депозитів. Обробка клітинної лінії мікроглії TGFβ викликала підвищення рівня зрілого АβPP (Mopping et al., 1994). TGFβ також збільшував мРНК АβPP в мишачих і людських астроцитах, що викликало підвищення рівня АβPP, який асоційований з клітинами, та підвищення секреції Аβ-пептидів (Burton et al., 2002; Lesne et al., 2003). TGFβ1 збільшував утворення Аβ-депозитів у трансгенній моделі миші (Wyss-Coray et al., 1997).

Наші власні дослідження виявили індукцію прозапальних цитокінів (TNFα, IL-6) у мононуклеарах *in vitro* та IL-1β, TNFα, IL-6 у неокортексі і гіпокампі головного мозку експериментальних тварин *in vivo* під впливом агрегатів β-амілоїдних пептидів (Sokolik et al., 2016, 2017, 2015).

Встановлено, що ряд цитокінів, у тому числі IL-1, IL-6, TNFα і TGFβ підвищені в сироватці крові та в тканинах мозку пацієнтів з амілоїдозом (Kronfol et al., 2000; Bodies et al., 2004; Van der Wal et al., 1993). Крім того, активована мікроглія, яка експресує IL-1α, знаходиться в безпосередній близькості від нейритних бляшок, а IL-1 сприяє синтезу IL-2, IL-6, TNFα і S100β (Kronfol et al., 2000; Griffin, 2006). Оскільки ці цитокіни здебільшого активують синтез АβPP і утворення Аβ при хронічній дії, як це спостерігається при старінні або хворобі Альцгеймера, вони можуть брати безпосередню участь в посиленні амілоїдогенезу. Отже, запальні механізми залучені до патогенезу нейродегенеративних розладів.

#### Список літератури / References

- Adami C., Sorci G., Blasi E. et al. S100B Expression in and effects on microglia // *Glia*. – 2001. – Vol.33. – P. 131–142.
- Arumugam T., Simeone D.M., Schmidt A.M., Logsdon C.D. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE) // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol.279. – P. 5059–5065.
- Barger S.W., Van Eldik L.J. S100b stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol.267. – P. 9689–9694.
- Barger S.W., Basile A.S. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function // *J. Neurochem.* – 2001. – Vol.76. – P. 846–854.
- Bauer J., Strauss S., Schreiter-Gasser U. et al. Interleukin-6 and alpha2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol.285. – P. 111–114.
- Blasko I., Marx F., Steiner E. et al. TNFα plus INFγ induce the production of Alzheimer's β-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs // *FASEB J.* – 1999. – Vol.13. – P. 63–68.
- Blasko I., Veerhuis R., Stampfer-Kountchev M. et al. Costimulatory effects of interferon-γ and interleukin-1β or tumor necrosis factor α on the synthesis of Aβ1-40 and Aβ1-42 by human astrocytes // *Neurobiol. Dis.* – 2000. – Vol.7. – P. 682–689.
- Bodies A., Barger S.W. Cytokines and the aging brain- what we don't know might help us // *Trends Neurosci.* – 2004. – Vol.27. – P. 621–626.
- Burton T., Liang B.H., Dibrov A. et al. Transcriptional activation and increase in expression of Alzheimer's β-amyloid precursor protein gene is mediated by TGF-β in normal human astrocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol.295. – P. 702–712.
- Buxbaum J.D., Oishi M., Chen H.I. et al. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer's pA4 amyloid protein precursor // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1993. – Vol.89. – P. 10075–10078.
- Carriba P., Comella J.X. Amyloid beta, TNFα and FAIM-L; approaching new therapeutic strategies for AD // *Front Neurol.* – 2014. – Vol.5. – P.276.

- Carriba P., Jimenez S., Navarro V. et al. Amyloid- $\beta$  reduces the expression of neuronal FAIM-L, thereby shifting the inflammatory response mediated by TNF $\alpha$  from neuronal protection to death // *Cell Death Dis.* – 2015. – Vol.6, no. 2. – P.e1639.
- Corbett J.A., Kwon G., Turk J. et al. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide // *Biochemistry.* – 1993. – Vol.32, no. 50. – P. 13767–13770.
- Das S., Potter H. Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factors  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E is induced in astrocytes by IL-1 // *Neuron.* – 1995. – Vol.14. – P. 447–456.
- Dash P.K., Moore A.N. Enhanced processing of APP induced by IL-1 $\beta$  can be reduced by indomethacin and nordihydroguaiaretic acid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol.208. – P. 542–548.
- Del Bo R., Angeretti N., Lucca E. et al. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and  $\beta$ -amyloid production in cultures // *Neurosci. Lett.* – 1995. – Vol.188. – P. 70–74.
- Docagne F., Gabriel C., Lebourrier N. et al. Spl and Smad transcription factors co-operate to mediate TGF- $\beta$ -dependent activation of amyloid- $\beta$  precursor protein gene transcription // *Biochem. J.* – 2004. – Vol.383. – P. 393–399.
- Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1999. – Vol.1450. – P. 191–231.
- Fillit H., Ding W.H., Buee L. et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease // *Neurosci Lett.* – 1991. – Vol.129. – P. 318–320.
- Forloni G., Demicheli F., Giorgi S. et al. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1 // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1992. – Vol.16. – P. 128–134.
- Goldgaber D., Harris H.W., Hla T. et al. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol.86. – P. 7606–7610.
- Griffin W.T., Mrak R.E. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease // *J. Leukoc. Biol.* – 2002. – Vol.72, no. 2. – P. 233–238.
- Griffin W.S.T. Inflammation and neurodegenerative diseases // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2006. – Vol.83. – P. 470S–474S.
- Hammer M., Mages J., Dietrich H. et al. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10 // *European Journal of Immunology.* – 2005. – Vol.35, no. 10. – P. 2991–3001.
- Heinrich P.C., Behrmann I., Müller-Newen G. et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway // *Biochem. J.* – 1998. – Vol.334, pt 2. – P. 297–314.
- Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation // *Biochem. J.* – 2003. – Vol.374, pt 1. – P. 1–20.
- Heizmann C.W. The multifunctional S100 protein family // *Methods Mol. Biol.* – 2002. – Vol.172. – P. 69–80.
- Hu J., Ferreira A., Van Eldik L.J. S100 beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes // *J. Neurochem.* – 1997. – Vol.69. – P. 2294–2301.
- Hu J., Van Eldik L.J. Glial derived proteins activate cultured astrocytes and enhance  $\beta$ -amyloid-induced astrocyte activation // *Brain Res.* – 1999. – Vol.842. – P. 46–54.
- Isobe T., Okuyama T. The amino acid sequence of the K-subunit in bovine brain S100a protein // *Eur. J. Biochem.* – 1981. – Vol.116. – P. 79–86.
- Kronfol Z., Remick D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry // *Am. J. Psychiat.* – 2000. – Vol.157. – P. 683–694.
- Landar A., Caddell G., Chessher J., Zimmer D.B. Identification of an S100A/S100B target protein: phosphoglucomutase // *Cell Calcium.* – 1996. – Vol.20. – P. 279–285.
- Lesne S., Docagne F., Gabriel C. et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 potentiates amyloid- $\beta$  generation in astrocytes and in transgenic mice // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol.278. – P. 18408–18418.
- Li Y., Barger S. W., Liu L. et al. S100 $\beta$  induction of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in neurons // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol.74. – P. 143–150.
- Li Y., Liu L., Barger S. W., Griffin W.S. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol.23. – P. 1605–1611.
- Liu L., Li Y., Van Eldik L. J. S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol.92. – P. 546–553.
- Lue L.F., Yan S.D., Stern D.M., Walker D.G. Preventing activation of receptor for advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease // *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* – 2005. – Vol.4. – P. 249–266.

- Luterman J.D., Haroutunian V., Yemul S. et al. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia // *Arch. Neurol.* – 2000. – Vol.57. – P. 1153–1160.
- Ma G., Chen S., Wang X. et al. Short-term interleukin-1 $\beta$  increases the release of secreted APP $\alpha$  via MEK1/2-dependent and JNK-dependent  $\alpha$ -secretase cleavage in neuroglia U251 cells // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – Vol.80. – P. 683–692.
- March C.J., Mosley B., Larsen A. et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs // *Nature.* – 1985. – Vol.315, no. 6021. – P. 641–647.
- Marenholz I., Heizmann C.W., Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol.322. – P. 1111–1122.
- Marques-Fernandez F., Planells-Ferrer L., Gozzelino R. et al. TNF $\alpha$  induces survival through the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol.4. – P.e493.
- Micheau O., Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes // *Cell.* – 2003. – Vol.114. – P. 181–190.
- Monning U., Sandbrink R., Banati R.B. et al. Transforming growth factor  $\beta$  mediates increase of mature transmembrane amyloid precursor protein in microglial cells // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol.342. – P. 267–272.
- Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine // *Immunological Reviews.* – 2008. – Vol.226, no. 1. – P. 205–218.
- Mrak R.E., Griffin W.S. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.* – 2001. – Vol.22. – P. 915–922.
- Nishiyama H., Knopfel T., Endo S., Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol.99. – P. 4037–4042.
- Old L.J. Tumor necrosis factor (TNF) // *Science.* – 1985. – Vol.230, no. 4726. – P. 630–632.
- Qiyang W., Rutz S., Crellin N.K. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease // *Annual Review of Immunology.* – 2011. – Vol.29. – P. 71–109.
- Powell M.J., Thompson S.A., Tone Y. et al. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region // *Journal of Immunology.* – 2000. – Vol.165, no. 1. – P. 292–296.
- Rage F., Silhol M., Tapia-Arancibia L. IL-1 $\beta$  regulation of BDNF expression in rat cultured hypothalamic neurons depends on the presence of glial cells // *Neurochem Int.* – 2006. – Vol.49. – P. 433–441.
- Ringheim G.E., Szcapanik A.M., Burgher K. L. et al. Transcriptional inhibition of the beta-amyloid precursor protein by interferon-gamma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol.224. – P. 246–251.
- Rogers J.T., Leiter L.M., McPhee J. et al. Translation of the Alzheimer's amyloid precursor protein mRNA is upregulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol.274. – P. 6421–6431.
- Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells // *Nature Reviews. Immunology.* – 2010. – Vol.10, no. 3. – P. 170–181.
- Sastre M., Dewachter I., Landreth G.E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of  $\beta$ -secretase // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol.23. – P. 9796–9804.
- Schönbeck U., Mach F., Libby P. Generation of biologically active IL-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 $\beta$  processing // *J. Immunol.* – 1988. – Vol.161, no. 7. – P. 3340–3346.
- Schulte L.N., Eulalio A., Mollenkopf H.J. et al. Analysis of the host microRNA response to Salmonella uncovers the control of major cytokines by the let-7 family // *The EMBO Journal.* – 2011. – Vol.30, no. 10. – P. 1977–1989.
- Segura M.F., Sole C., Pascual M. et al. The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol.27. – P. 11228–11241.
- Selinfreud R.H., Barger S.W., Pledger W.J., Van Eldik L.J. Neurotrophic protein S100 $\beta$  stimulates glial cell proliferation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol.88. – P. 3554–2558.
- Sharma A., Kumar M., Aich J. et al. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol.106, no. 14. – P. 5761–5766.
- Sheng J.G., Mrak R.E., Griffin W.S.T. S100 $\beta$  protein expression in Alzheimer's disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques // *J. Neurosci. Res.* – 1994. – Vol.39. – P. 398–404.
- Sheng J.G., Ito K., Skinner R.D. et al. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis // *Neurobiol. Aging.* – 1996a. – Vol. 17. – P. 761–766.

- Sheng J.G., Mrak R.E., Rovnaghi C.R. et al. Human brain S100 $\beta$  and S100 $\beta$  mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.* – 1996b. – Vol.17. – P. 359–363.
- Sheng J.G., Mrak R.E., Griffin W.S. Enlarged and phagocytic, but not primed, IL-1 $\alpha$  microglia increase with age in normal human brain // *Acta Neuropathol.* – 1998. – Vol.94. – P. 1–5.
- Sokolik V.V., Berchenko O.G., Shulga S.M. Comparative analysis of nasal therapy of curcumin soluble and liposomal forms of rats with model of Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism.* – 2017. – Vol.7, no. 4. – P.1000357.
- Sokolik V.V., Koliada O.K., Shulga S.M. Effect of  $\beta$ -amyloid peptide 42 on the dynamics of expression and formation of A $\beta$ <sub>40</sub>, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 by peripheral blood mononuclear cells *in vitro* and its correction by curcumin // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol.88, no. 1. – P. 109–118.
- Sokolik V.V., Maltsev A.V. Cytokines neuroinflammatory reaction to the action of  $\beta$ -amyloid 1-40 administered to rats in homoaggregated and liposomal forms // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* – 2015. – Vol.9, no. 4. – P. 355–361.
- Sorci G., Agneletti A.L., Bianchi R., Donato R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol.1448. – P. 277–289.
- Stellwagen D., Malenka R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$  // *Nature.* – 2006. – Vol.440. – P. 1054–1059.
- Swardfager W., Lanctôt K., Rothenburg L. et al. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease // *Biological Psychiatry.* – 2010. – Vol.68, is. 10. – P. 930–941.
- Taishi P., Churchill L., De A. et al. Cytokine mRNA induction by interleukin-1 beta or tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo // *Brain Res.* – 2008. – Vol.1226. – P. 89–98.
- Tarkowski E., Blennow K., Wallin A. et al. Intracerebral production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia // *J. Clin. Immunol.* – 1999. – Vol.19. – P. 223–230.
- Van der Wal E.A., Gomez-Pinilla F., Cotman C.W. Transforming growth factor-beta is in plaques in Alzheimer's and Down pathologies // *Neuroreport.* – 1993. – Vol.4. – P. 69–72.
- Vasilakos J.P., Carroll R.T., Emmerling M.R. et al. Interleukin-1 $\beta$  dissociates  $\beta$ -amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid peptide secretion // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol.354. – P. 289–292.
- Verstrepen L., Bekaert T., Chau T.L. et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- $\kappa$ B: variations on a common theme // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol.65, no. 19. – P. 2964–2978.
- Wyss-Coray T., Masliah E., Mallory M. et al. Amyloidogenic role of cytokine TGF- $\beta$ 1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease // *Nature.* – 1997. – Vol.389. – P. 603–606.
- Yang F., Jansen L., Friedrichs W.E. et al. IL1 $\beta$  decreases expression of amyloid precursor protein gene in human glioma cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol.191. – P. 1014–1019.
- Yang Y., Quitschke W.W., Brewer G.I. Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1998. – Vol.60. – P. 40–49.
- Zhu S.G., Sheng J.G., Jones R.A. et al. Increased interleukin-1 $\beta$  converting enzyme expression and activity in Alzheimer disease // *J. Neuropathol. Exp. Neurobiol.* – 1999. – Vol.58. – P. 582–587.

**Представлено: О.А.Наконечна / Presented by: O.A.Nakonechna**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 26.04.2018*

**About the author:** V.V.Sokolik – Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Akademika Pavlova St., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, Sokolik67@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6829-2300>

**Про автора:** В.В.Соколик – Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61088, Sokolik67@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6829-2300>

**Об авторе:** В.В.Соколик – Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины, ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, Sokolik67@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6829-2300>

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ**  
**журналу «Вісник Харківського національного**  
**університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»**

У серії Вісника публікуються результати досліджень за всіма напрямками біологічних наук.

До публікації приймаються:

- закінчені оригінальні роботи, що досі ніде не видавалися (статті об'ємом 5–10 сторінок друкованого тексту, включаючи перелік посилань);
- описання оригінальних методів та приладів;
- теоретичні та проблемно-оглядові статті об'ємом до 20 сторінок друкованого тексту, включаючи перелік посилань;
- матеріали та повідомлення про події наукового життя;
- рецензії на книги.

Статті друкуються українською, російською та англійською мовами.

Текст експериментальної статті повинен складатися з наступних розділів: **«Вступ», «Методика» («Об'єкти та методи дослідження»), «Результати», «Обговорення»** (можливий об'єднаний розділ **«Результати та обговорення»), «Перелік посилань».**

Текст статті починається з індексу УДК, далі заголовок звичайним шрифтом (**Arial – 12 pt**), ініціали та прізвища авторів (**Arial – 10 pt**), повні назви наукових установ, адреси електронної пошти (**Arial – 9 pt**) – **наявність контактної електронної адреси обов'язкова.**

**Анотація** розміщується під «шапкою» статті мовою оригіналу (**Arial – 9 pt**). Її обсяг – орієнтовано до 10 рядків. Під анотацією курсивом друкується список ключових слів (не більше 10). Анотація повинна бути побудована як реферат у реферативних журналах та відобразити суть експериментів, основні результати та їх інтерпретацію. Анотація не повинна містити баластні слова, ввідні фрази та неінформативні вислови. Далі друкуються анотації (**Arial – 9 pt**) англійською і російською (якщо стаття написана українською) мовами разом із транскрипціями прізвищ авторів, перекладом назви роботи і відповідними списками ключових слів (**всього в статті мають бути резюме трьома мовами – українською, англійською, російською**).

Розділ **«Вступ»** повинен містити постановку проблеми у загальному вигляді та її зв'язок з важливими науковими або практичними завданнями; короткий аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких розпочато рішення даної проблеми, виділення конкретних невирішених питань, яким присвячена стаття, формулювання мети роботи. Інакше кажучи, вступ повинен відповідати на питання: що відомо у даній області; що залишається невідомим; яка задача даної роботи. Бажано, щоб у експериментальних роботах формулюванню мети передувала робоча гіпотеза.

Розділ **«Методика»** повинен містити відомості про об'єкт (об'єкти) дослідження (з обов'язковим вказуванням повних латинських назв видів та авторів класифікації), умови експериментів, аналітичні методи, прилади та реактиви. У цьому ж розділі даються відомості про повтори експериментів, методи статистичного аналізу результатів.

У розділі **«Результати»** необхідно лише описати виявлені ефекти, не коментуючи їх, усі коментарі та пояснення виносяться в обговорення. Викладення результатів не повинно зводитись до переказу вмісту таблиць та графіків, воно повинно відображувати закономірності, які витікають з отриманих даних. Результати рекомендується представляти у минулому часі.

Задачею розділу **«Обговорення»** є узагальнення та інтерпретація результатів, аналіз причинно-наслідкових зв'язків між виявленими ефектами. Отриману інформацію необхідно порівняти з наявними літературними даними та показати її новизну. Обговорення повинно завершуватись відповіддю на питання, яке поставлено у вступі.

**Таблиці** друкуються у тексті, кожна повинна мати свій заголовок.

**Рисунки** виконуються у чорному кольорі, розміщуються у тексті. Кожний рисунок повинен мати свій заголовок. На кривих (крім безперервних реєстрацій) повинні бути нанесені експериментальні точки.

**Посилання на літературу** у тексті подаються у круглих дужках з вказуванням прізвища автора та року видання. Список посилань складається за абеткою, спочатку кирилицею, потім латиницею. Список не нумерується.

Електронні версії статей надсилаються до редакції електронною поштою.

Тексти статей повинні бути виконані у редакторі Ms Word з використанням **шрифту Arial – 10 pt; абзац – 1 см; міжрядковий інтервал – одинарний; поля: верхнє та нижнє – 3,5; ліве та праве – 2 см.** Разом з електронною версією до редакції надсилається тверда копія у двох примірниках, один з яких має бути підписаний авторами.

До статті прикладається рецензія фахівця у даній області досліджень (**зовнішня рецензія**).

На окремій сторінці вказують повністю **імена, по батькові та прізвища усіх авторів, телефони, факси, адреси електронної пошти та повні поштові адреси.**

Стаття, яка надходить до редакції, реєструється та направляється до наукового рецензента, який підписує статтю до друку. При наявності зауважень статтю повертають авторам для доопрацювання. Виправлений варіант (у двох примірниках) автор повинен повернути до редакції разом з початковим варіантом статті та відповіддю на всі зауваження.

Черговість виходу статей визначається датою надходження останнього варіанту.

Редакція залишає за собою право **виправляти та скорочувати рукопис, а також повертати авторам роботи, які не відповідають вимогам редакції.**

Вартість публікації статті розраховується наступним чином: 200 грн за роботу редакції (сума є фіксованою, не залежить від обсягу статті) + 40 грн за публікацію однієї сторінки (помножується на кількість сторінок) + вартість пересилання авторського екземпляра. Оплата приймається після отримання автором інформації про прийняття статті до друку.

Оплата приймається у вигляді поштового переказу на ім'я відповідального секретаря.