

А. Теплюк, асп., В. Теплюк, канд. биол. наук

Восточноукраинский национальный университет имени Леси Украинки, Луцк, Украина

ЭКОЛОГО-ФАУНИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОШЕК (*DIPTERA, SIMULIIDAE*) ГИДРОБИОЦЕНОЗОВ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО МАКРОСКЛОНА УКРАИНСКИХ КАРПАТ

Установлено, что видовое богатство мошек северо-восточного макросклона Украинских Карпат насчитывает 38 видов из 2 родов: *Prosimulium* Roubaud, 1906 (2 вида) и *Simulium* Latreille, 1802 (36 видов). В ручьях развиваются 20 видов (индекс видового разнообразия Симпсона (I_s) составляет 0,22), а в реках – 26 видов ($I_s = 0,10$). Общими для обоих типов водотоков являются 8 видов *Simuliidae* (индекс общности Чекановского-Сёренсена (I) составляет 0,26). Только в ручьях развиваются 12 видов, а в реках – 18 видов мошек. Доминируют в гидробиоценозах северо-восточного макросклона Украинских Карпат *S. trifasciatum* Curtis, 1839, *S. reptanoides* Carlsson, 1962, *S. ornatum* Meigen, 1818 и *S. intermedium* Roubaud, 1906. Широко распространены *S. trifasciatum* и *S. ornatum*. Выявлено, что фауна *Simuliidae* основных высотно-зональных растительных сообществ региона отличается по составу и количественным соотношениям видов. Эвриотопными являются *S. intermedium*, *S. ornatum* и *S. reptans* Linnaeus, 1758 и *S. trifasciatum*. В гидробиоценозах округа буковых лесов зарегистрировано 31 вид ($I_s = 0,09$), а в водотоках округа еловых горных карпатских лесов – 24 вида ($I_s = 0,18$). Установлено, что с уменьшением высоты в округе буковых лесов значение индекса видового разнообразия Симпсона уменьшается от 0,16 (20 видов) в подокруже темнохвойно-буковых водораздельных лесов до 0,11 (21 вид) в подокруже елово-буковых и буково-лихтовых прикарпатских лесов.

Ключевые слова: мошки, видовой состав, гидробиоценозы, ручьи, реки, северо-восточный макросклон Украинских Карпат.

A. Tepluk, Ph. D. stud., V. Tepluk, Ph. D.

Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine

ECOLOGY-FAUNISTIC ANALYSIS OF BLACKFLIES (*DIPTERA, SIMULIIDAE*) OF HYDROBIOCENOSIS ON THE NORTH-EASTERN MACROSLOPE OF THE UKRAINIAN CARPATHIANS

It has been installed that the species richness of the blackflies of the north-eastern macroslope of the Ukrainian Carpathians counts 38 species of 2 genera: *Prosimulium* Roubaud, 1906 (2 species) and *Simulium* Latreille, 1802 (36 species). 20 species develop in the streams (Simpson's species diversity index (I_s) equals to 0,22), and 26 species develop in the rivers ($I_s = 0,10$). There are 8 common species of *Simuliidae* for both types of watercourses (similarity index by Czekanowski-Sørensen (I) is 0,26). 12 species of blackflies develop only in the streams, and 18 species develop only in the rivers. *S. trifasciatum* Curtis, 1839, *S. reptanoides* Carlsson, 1962, *S. ornatum* Meigen, 1818 and *S. intermedium* Roubaud, 1906 dominate in the hydrobiocenoses of the north-eastern macroslope of the Ukrainian Carpathians. *S. trifasciatum* and *S. ornatum* are widespread. It has been discovered that *Simuliidae* fauna of main altitudinal zonal plant groups of the region differs in composition and quantitative correlation of species. *S. intermedium*, *S. ornatum*, *S. reptans* Linnaeus, 1758 and *S. trifasciatum* are eurytopic. In the hydrobiocenoses of the district of beech forests has been registered 31 species ($I_s = 0,09$), and in the watercourses of the district of spruce mountain Carpathian forests has been registered 24 species ($I_s = 0,18$). It has been found out that with the decrease of height in the district of the beech forests, the value of Simpson's species diversity index decreases from 0.16 (20 species) in the subdistrict of the dark-coniferous-beech watershed forests to 0.11 (21 species) in the subdistrict of fir-beech and beech-fir precarpathian forests.

Key words: blackflies, species composition, hydrobiocenoses, streams, rivers, south-western macroslope of the Ukrainian Carpathians.

УДК 57.021:615.919

І. Удовиченко, асп., Д. Олійник, студ., Ю. Дудкіна, студ.,

Т. Галенова, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНАЛІЗ СЕКРЕТУ ШКІРНИХ ЗАЛОЗ ЧАСНИЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ (*PELOBATES FUSCUS*) НА ПРИСУТНІСТЬ ПОТЕНЦІЙНИХ ЕФЕКТОРІВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

Оскільки хімічний синтез новітніх біологічно активних сполук сьогодні досить складна і коштвна процедура, а ціна на лікарські засоби, основу яких становлять дорогі синтетичні біологічно активні сполуки, постійно зростає, то науковці все більше уваги звертають на природні джерела як перспективну сировину для отримання різноманітних біологічно активних речовин. Секрети залозистих клітин шкірних покривів амфібій є потужним вмістилищем потенційних фармакологічних агентів. На сьогодні детально вивчено їхню антимікробну, антивірусну, кардіотонічну та антидіабетичну дію, однак майже нічого не відомо про вплив секрету шкірних залоз безхвостих земноводних на функціонування системи гемостазу. Проаналізовано потенційні ефекти компонентів секрету шкірних залоз одного з представників вітчизняної батрахофауни – Часничиці звичайної (*Pelobates fuscus*) на окремі параметри системи гемостазу. У результаті хроматографічного поділу загальної секрету було отримано 4 білкові фракції, які містили широкий спектр білків з молекулярними масами у діапазоні від 17 до 150 кДа. Компоненти фракції 1 мали активуючий ефект на протромбін і фактор X плазми. Декілька компонентів фракції 4 мали протеолітичні властивості та виражали субстратну специфічність щодо колагену. Компоненти фракцій 1 та 2 подовжували час зсідання плазми у коагуляційному тесті АЧТЧ. Доведено присутність біологічно активних компонентів у складі шкірного секрету *P. fuscus*, що вказує на перспективність подальших досліджень з метою ідентифікації окремих складових, відповідальних за прояв показаних ефектів з метою вивчення структурно-функціональних особливостей та механізму їх дії. Вирішення цих питань сприятиме подальшому більш широкому використанню секретів шкірних залоз земноводних як сировини для розробки нових оригінальних фармацевтичних агентів та/або біотехнологічних продуктів з метою їх використання у медицині та різних сферах промисловості.

Ключові слова: амфібії, секрети шкірних залоз, система гемостазу, хроматографічний поділ, протеолітична активність, субстратна специфічність, хронометричні тести.

Вступ. Сьогодні не існує жодних сумнівів у тому, що лікарські засоби природного походження представляють велику цінність для медицини. При вмілому і грамотному використанні, біологічно активні сполуки, виділені з природної сировини, можуть бути корисними у лікуванні патологічних станів, знайти своє застосування в діагностиці захворювань, а також бути цінним інструментарієм у різних лабораторних дослідженнях.

Отрути земноводних і отриманні з них компоненти міцно увійшли в практичну й експериментальну медицину [1, 2]; їх властивості продовжують вивчатися, а область застосування розширюватися. В межах світової наукової спільноти в останні десятиліття у цьому напрямку досягнуті важливі успіхи, зокрема, із шкірних секретів земноводних виділено ряд активних компонентів, що мають кардіотонічні [3], антидіабетичні [4], імуномодуючі [5], антимікробні [6, 7] та антивірусні [8, 9] активності. Більш

того, були виявлені седативні [10] та анагетичні [11] властивості компонентів секретів. Однак широке використання цих речовин у лікувальній практиці поки ускладнено тим, що механізм їх дії та можливі побічні ефекти залишаються недостатньо вивчені.

Біологічні ефекти компонентів шкірного секрету Часничниці звичайної (*Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768)) вперше зацікавили науковців ще на початку минулого сторіччя. Так, Gessner (1927) у своїх дослідженнях показав, що шкірний секрет даного виду викликав гемоліз у експериментах *in vitro* та мав летальний ефект на різних представників безхвостих амфібій, включаючи *P. fuscus*. Пізніше Labler та співавтори [12] повідомили про летальний ефект у мишей при внутрішньовенному введенні їм отрути *P. fuscus*. Автори також відзначили зниження летального ефекту секрету при підшкірному введенні та майже повну його відсутність – за умов перорального введення секрету мишам [12]. У експериментах на щурах, при внутрішньошкірному застосуванні отрути *P. fuscus*, показано геморагічну активність компонентів секрету [12]. Незважаючи на те, що була доведена присутність гемолізинів у секреті *P. fuscus* [13], більш детальні дослідження показали, що причиною загибелі тварин не був прямий гемолітичний ефект активного компоненту [12]. Отже, проаналізувавши ряд літературних джерел ми відмітили певний інтерес науковців до компонентів отрути *P. fuscus*, однак, нам не вдалося відшукати науково обґрунтованої інформації щодо природи та біологічного потенціалу конкретних складових секрету.

Беручи до уваги необхідність якісної та кількісної оцінки біологічно активних речовин, що містяться у таких мало вивчених джерелах природного походження як секрети шкірних залоз земноводних, **метою даної роботи** було дослідити потенційні ефекти компонентів шкірного секрету *P. fuscus* на параметри системи гемостазу у експериментах *in vitro*.

Матеріали та методи. Статевозрілих особин виду *P. fuscus* (n=15; обох статей) відловлювали біля р. Десна, Чернігівської області, з подальшим утриманням у фаунобоксах віварію КНУ імені Тараса Шевченка. Водні суспензії шкірних секретів отримували шляхом промивання поверхні шкіри невеликою кількістю дистильованої води (близько 5 мл) після інтенсивного механічного подразнення шкірних залоз, розміщених паралельно повздовжньої осі тіла. Отримані суспензії ліофільно висушували (Telstar LyoQuest), сухий матеріал зберігали при 4°C. Ліофілізований секрет, перед використанням розчиняли з розрахунку 100 мг сухого матеріалу на 1 мл 50 мМ Тріс-НСІ буфера (рН 7,4), що містив 0,2 М NaCl. З метою відокремлення нерозчинних компонентів суспензію центрифугували при 3000 g протягом 10 хв. Концентрацію білка у супернатанті визначали за методом Бредфорд [14]. Білки секрету фракціонували методом хроматографії, що поділяє за розміром. Як хроматографічний носій використовували Superdex 75 16/60 GL (GE Healthcare Limited, Сполучене Королівство Великої Британії). Фракції збирали по піках за швидкості потоку 1 мл/хв. Білково-пептидний склад отриманих фракцій досліджували методом диск-електрофорезу у 15 % поліакриламідному гелі згідно з описаною методикою [15]. Ензим-електрофорез проводили відповідно до методики [16]. Розділювальний гель полімеризували за присутності желатину, колагену та фібриногену з розрахунку 1 мг відповідного субстратного білка на 1 мл розділюючого гелю. Аналіз одержаних електрофореграм здійснювали з використанням програми TotalLab 2.04. Представлені електрофореграми є типовими для серії повторних дослідів.

Плазму крові отримували згідно зі стандартним протоколом із стабілізованої цитратом венозної крові кроля. Час зсідання плазми крові досліджували у хронометричних тестах: "тромбіновий час" (ТЧ), "протромбіновий час" (ПЧ) та "активованний частковий тромбопластиновий час" (АЧТЧ) з використанням готових реактивів відповідних комерційних наборів (Ренам, РФ). У кюветі коагулометра змішували 45 мкл плазми крові та 5 мкл загального секрету *P. fuscus* або 5 мкл зразків фракцій, отриманих у результаті хроматографічного розділення загального секрету. Для визначення ТЧ до суміші вносили 50 мкл розчину тромбіну з активністю 3 МО/мл; для визначення ПЧ – 100 мкл тромбопластин-кальцієвої суміші; для визначення АЧТЧ – 50 мкл АЧТЧ-реагенту з подальшим додаванням 50 мкл розчину 0,025 М CaCl₂. Час зсідання у секундах фіксували на коагулометричному аналізаторі (Rayto RT-2201C, Китай).

Протеолітичну активність визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у складі наступних синтетичних хромогенних субстратів: Phe-Pip-Arg-pNA (S₂₂₃₈, субстрат до тромбіну), Val-Leu-Lys-pNA (S₂₂₅₁, субстрат до плазміну), Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S₂₂₂₂, субстрат до фактору Ха), pyroGlu-Pro-Arg-pNA (S₂₃₆₆, субстрат до активованого протеїну С). Реакцію проводили у лунках 96-лункового мікропланшету. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища становив 250 мкл. У ході дослідження до 0,05 М Тріс-НСІ буфера, рН 7,4, додавали зразок загального секрету *P. fuscus* або зразок фракцій, отриманих у ході хроматографічного розділення загального секрету, з вмістом загального білка – 20 мкг. Після 5 хв інкубації за 37° С реакцію ініціювали додаванням відповідного специфічного хромогенного субстрату, кінцева концентрація кожного з них становила 0,3 мМ. Контрольний зразок включав ті ж компоненти, але замість відповідних фракцій секрету містив рівний об'єм 50 мМ Тріс-НСІ буфера, рН 7,4. Інкубацію проводили за 37° С протягом 90 хв. Оптичну щільність проб визначали через рівні проміжки часу при довжині хвилі 405 нм, використовуючи мікропланшеточний спектрофотометр (μQuant, BioTek Instruments, США). Активність виражали у нмоль пара-нітроаніліну (п-НА), вивільненого за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка.

Для вивчення здатності компонентів секрету *P. fuscus* активувати певні проферменти системи гемостазу, використовували інкубаційне середовище аналогічного складу як описано вище, куди окрім досліджуваних зразків також вносили 20 мкл плазми крові. Реакцію ініціювали додаванням відповідного хромогенного субстрату з кінцевою концентрацією 0,3 мМ. Контрольний зразок включав ті ж компоненти, але замість досліджуваних зразків секрету містив рівний об'єм 50 мМ Тріс-НСІ буфера, рН 7,4. Визначення кількості вільного п-НА проводили за тотожних умов, описаних вище. При аналізі потенційного ефекту компонентів секрету *P. fuscus* на проензими плазми обрахунок отриманих результатів проводили наступним чином: значення, що відповідали кількості п-НА, вивільненого з відповідного синтетичного субстрату за умов прямої гідролітичної дії компонентів секрету, віднімали від значень, що відповідали кількості п-НА, який вивільнявся у експерименті з додаванням до інкубаційного середовища плазми. Така маніпуляція дозволила виокремити активність активних ензимів плазми, що потенційно могли утворитися внаслідок дії компонентів секрету на відповідні проензими. Одержані дані було оброблено методом варіаційної статистики. Різнниця вважалася достовірною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Питання щодо потенційних терапевтичних властивостей секретів шкіри земноводних останнім часом все частіше стає предме-

том дискусії на наукових конференціях. Особливо гостро підкреслюється те, що отрути земноводних є комплексним матеріалом, що водночас містить низку біологічно активних речовин, які відрізняються своїми біологічними ефектами на організм. А отже використання цих перспективних агентів з лікувальними цілями, їх подальше впровадження в фармацевтичну промисловість та/або біотехнологічне виробництво вимагає обов'язкового поділу вихідної сировини на окремі компоненти, ідентифікації природи та механізму дії даних компонентів.

З метою фракціонування загального секрету шкірних залоз *P. fuscus* нами було застосовано метод хроматографії, що поділяє за розміром. Для забезпечення оптимального поділу як хроматографічний носій ми використовували Superdex 75, оскільки даний носій

характеризується оптимальною, на нашу думку, хроматографічною зоною для поділу шкірного секрету (від 3 до 70 кДа), високою фізико-хімічною стабільністю та інертністю до утворення неспецифічних взаємодій зі зразком, що аналізується [17]. Як робочий буфер використовували 0,05 М Трис-НСІ, рН 7,4 з вмістом 0,2 М NaCl і вихідною кондуктивністю 29,5 мС; швидкість потоку становила 1 мл/хв. Оптимальний склад буферного розчину та швидкість хроматографування були попередньо підібрані експериментальним шляхом (дані не представлені). Зокрема, у ході хроматографічного розділення загального секрету шкірних залоз *P. fuscus* було отримано 4 піки, які було використано як об'єкт для подальших досліджень (рис. 1).

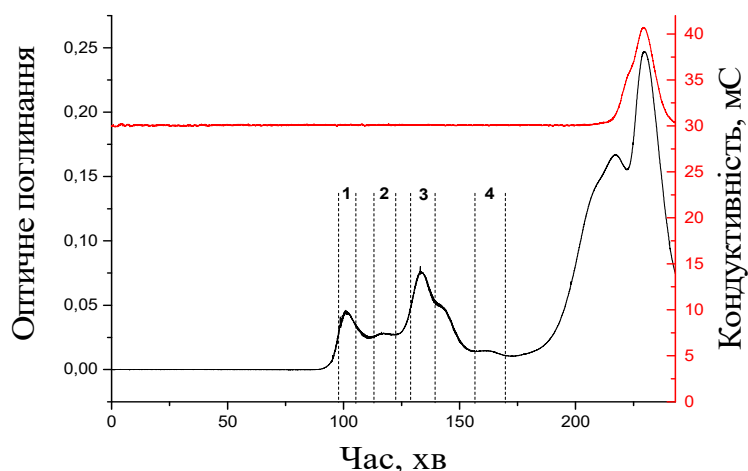


Рис. 1. Типова хроматограма поділу загального секрету шкірних залоз *P. fuscus* на колонці з Superdex 75 за умов використання як робочого буфера 0,05 М трис-НСІ, рН 7,4 з вмістом 0,2 М NaCl та при швидкості потоку 1 мл/хв. Цифрами (1-4) позначено піки хроматографічного розділення

Якісний аналіз білкового складу отриманих фракцій із застосуванням методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності

додецилсульфату натрію показав присутність у досліджуваних зразках широкого спектру білкових молекул, що різняться за молекулярними масами (рис. 2).

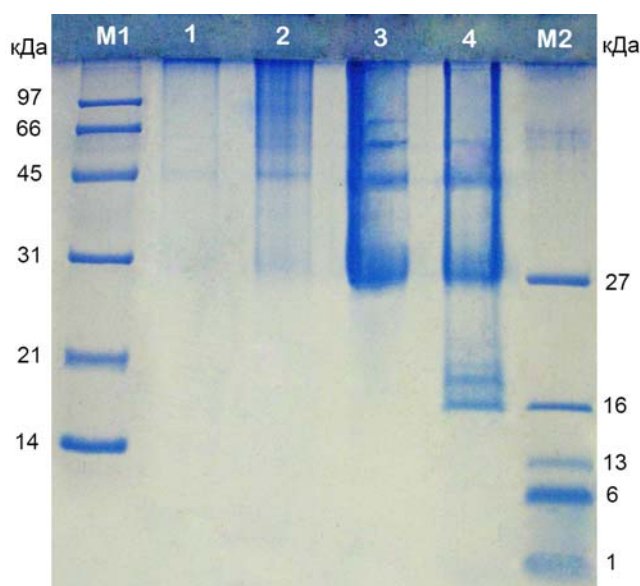


Рис. 2. Типова електрофореграма поділу білків секрету шкірних залоз *P. fuscus*. Цифрами (1-4) позначено номери піків хроматографічного розділення. Треки M1 та M2 – маркери молекулярних мас (кДа)

Подальший аналіз ензим-електрофореграм за допомогою програми TotalLab 2.04 дозволив ідентифікувати білки у діапазоні молекулярних мас від 17 до 150 кДа (табл. 1).

Таблиця 1. Молекулярні маси (ММ) білків у фракціях, отриманих у результаті хроматографічного поділу секрету шкірних залоз *P. fuscus*

№ фракції	ММ, кДа
1	150; 96; 88; 53
2	88; 53; 45; 37; 30
3	74; 54; 44; 30
4	56; 44; 30; 19; 17

Протеолітичну активність компонентів отриманих білкових фракцій досліджували методом ензим-електрофорезу. З метою деталізації субстратної специфічності протеолітичних ферментів у складі досліджуваних зразків, розділяючи гель полімеризували за присутності різних білків-субстратів – желатину, колаге-

ну та фібриногену. Поява у площині гелю, що містив колаген як субстратний білка, світлих зон гідролізу зумовлена проявом протеолітичної активності, що слугувало доказом присутності в досліджуваних фракціях секрету *P. fuscus* активних ферментів, що виявляли специфічність до колагену як субстрату (рис. 3).

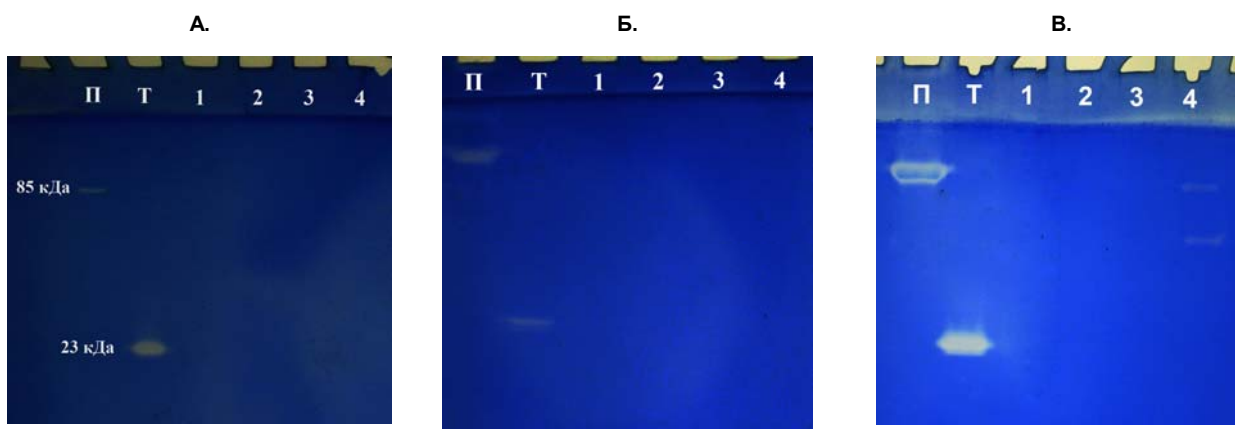


Рис. 3. Типові ензим-електрофореграми дослідження протеолітичної активності фракцій секрету *P. fuscus* із застосуванням як субстратів – желатину (А), фібриногену (Б), колагену (В).

Цифрами (1–4) позначено номери піків хроматографічного розділення.

Трек П – плазмин (85 кДа); трек Т – трипсин (23 кДа)

Специфічну протеолітичну активність компонентів фракцій, отриманих у результаті хроматографічного розділення шкірного секрету *P. fuscus* визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у синтетичних

хромогенних субстратах, специфічних до плазміну, тромбіну, фактора Ха та протеїну С. Результати дослідження наведені у табл. 2.

Таблиця 2. Протеолітична активність компонентів білкових фракцій (нмоль п-НА/мг*хв), отриманих у ході хроматографічного поділу загального секрету шкірних залоз *P. fuscus*

№ фракції	Субстрат до тромбіну	Субстрат до плазміну	Субстрат до фактора Ха	Субстрат до протеїну С
Загальний секрет	0,16±0,02	-	-	0,24±0,03
1	0,40±0,04	0,15±0,03	0,19±0,03	0,68±0,02
2	0,31±0,04	-	-	0,79±0,07
3	0,13±0,02	-	-	0,23±0,03
4	-	-	-	-

Наступним нашим завданням було визначити потенційний ефект компонентів фракцій секрету *P. fuscus* на відповідні проензими плазми. Для проведення цього експерименту в інкубаційне середовище з відповідним субстратом та зразком секрету шкірних залоз *P. fuscus* додатково вносили плазму крові кроля.

Встановлено, що загальний секрет шкірних залоз *P. fuscus* ініціював утворення активного тромбіну та фактору Ха у плазмі, тоді як під час дослідження впливу чотирьох фракцій даного виду амфібії, лише компоненти фракції №1 показали здатність активувати протромбін та фактор Х у плазмі (табл. 3).

Таблиця 3. Активність специфічних ензимів плазми (нмоль п-НА/мг*хв), які утворилися в результаті активації відповідних проензимів компонентами фракцій, отриманих у ході хроматографічного поділу загального секрету шкірних залоз *P. fuscus*

№ фракції	Активність тромбіну	Активність плазміну	Активність фактора Ха	Активність протеїну С
Загальний секрет	0,77	-	0,56	-
1	0,85	-	0,64	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

Коагуляційний гемостаз – каскад ферментативних реакцій, за допомогою яких неактивні попередники перетворюються у активні фактори. Обидва, зовнішній та внутрішній шляхи гемостазу призводять до утворення фібрину – білка, який зв'язує тромбоцити та інші молекули у стабільний тромб. У даній роботі для дослідження впливу компонентів фракцій шкірного секрету *P. fuscus* на функцію згортання плазми використовували коагулометричні тести АЧТЧ визначали для оцінки функціональної активності факторів згортання XII, IX, XI, VIII, X, V, протромбіну та фібриногену, які запускають внутрішній шлях коагуляційного гемостазу. Зовнішній шлях зсідання крові відтворювали за допомогою тесту ПЧ, де швидкість утворення згустку суттєво залежить від концентрації фактора VII, а також активності V і X факторів. ТЧ показує час, необхідний фібриногену для утворення ниток фібрину в присутності тромбіну. Визначення параметрів даного тесту дозволяє виявити порушення на кінцевих стадіях коагуляційного гемостазу.

Нам не вдалося виявити статистично значущих змін часу зсідання плазми крові у тестах ПЧ та ТЧ за умов

інкубації плазми з досліджуваними фракціями секрету шкірних залоз *P. fuscus*. Показники даних тестів за умов інкубації плазми з загальним секретом *P. fuscus* також були на рівні контрольних значень (табл. 4). Більш цікаві результати було отримано під час визначення часу зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ. Показано, що при інкубації плазми крові кроля з загальним секретом шкірних залоз *P. fuscus* показник АЧТЧ перевищував контрольні значення на 35 %. Властивість подовжувати час, необхідний плазмі на утворення згустку у ході даного тесту був показаний для компонентів фракції 1 та 2, отриманих у ході хроматографічного розділення загального шкірного секрету *P. fuscus*. Оскільки для компонентів даних фракцій, як і для загального секрету в цілому, нами було відмічено низький рівень протеолітичної активності, отримані результати навряд чи можуть бути обумовлені деградацією факторів внутрішнього шляху коагуляційного гемостазу під впливом компонентів секрету *P. fuscus*. Тому припустимо присутність у даних фракціях інгібіторів факторів, що задіяні до процесу зсідання плазми.

Таблиця 4. Час зсідання плазми крові (с) за дії компонентів фракцій секрету шкірних залоз *P. fuscus* у коагуляційних тестах

Номер фракції	АЧТЧ	ПЧ	ТЧ
Контроль	18,1 ± 0,5	6,4 ± 0,1	33,3 ± 2,2
Загальний секрет	24,3 ± 0,3*	6,7 ± 0,5	32,0 ± 0,4
1	28,3 ± 0,3*	7,3 ± 0,3	33,0 ± 0,2
2	29,9 ± 0,5*	7,1 ± 0,2	32,2 ± 0,5
3	19,3 ± 0,4	8,3 ± 0,5	30,2 ± 0,2
4	21,3 ± 0,3	7,6 ± 0,4	28,4 ± 0,7

Примітка: * зміни статистично достовірні, порівняно з контролем

Висновки. Отже, у результаті попереднього скринінгу потенційних ефектів компонентів секрету шкірних залоз *P. fuscus* на окремі параметри системи гемостазу показано, що дана природна сировина може бути перспективним джерелом біологічно активних речовин, які мають протеолітичну активність, здатні активувати проензими плазми, зокрема протромбін та фактор X, а також впливати на коагуляційний гемостаз. На нашу думку, перспективним є подальше отримання та характеристика окремих білкових молекул, що відповідають за прояв показаних ефектів з метою подальшого вивчення структурно-функціональних особливостей та механізму їх дії. Вирішення цих питань буде сприяти подальшому більш широкому використанню секретів шкірних залоз земноводних як сировини для розробки нових оригінальних фармацевтичних агентів та/або біотехнологічних продуктів з метою їх використання у медицині та різних сферах промисловості.

Список використаних джерел:

1. Clarke B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medicinal applications / B.T. Clarke // Biol.

Rev., 1997. – Vol. 72, № 3. – P. 365-379. doi: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x.

2. Xu X. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions / X. Xu, R. Lai // Chem. Rev., 2015. – Vol. 115, № 4. – P. 1760-1846. doi: 10.1021/cr4006704.

3. Congestive heart failure model in rabbits: effects of digoxin and a drug containing toad venom / S. Morishita, M. Shoji, Y. Oguni et al. // Jpn. J. Pharmacol., 1991. – Vol. 56, № 4. – P. 427-432. doi: 10.1254/jjp.56.427.

4. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures / L. Marenah, P.R. Flatt, D. F. Orr et al. // Biol. Chem., 2004. – Vol. 385, №3-4. – P. 315-321. doi: 10.1515/BC.2004.027.

5. Shimizu Y. Effect of the water-soluble and non-dialyzable fraction isolated from Senso (Chan Su) on lymphocyte proliferation and natural killer activity in C3H mice / Y. Shimizu, E. Inoue, C. Ito // Biol. Pharm. Bull., 2004. – Vol. 27, №2. – P. 256-260. doi: 10.1248/bpb.27.256.

6. Barberio C. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous 'venom' of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata pachypus*) / C. Barberio, G. Delfino, G. Mastromei // Toxicon., 1987. – Vol. 25, №8. – P. 899-909.

7. Soravia E. Antimicrobial properties of peptides from Xenopus granular gland secretions / E. Soravia, G. Martini, M. Zasloff // FEBS Lett., 1988. – Vol. 228. – P. 337-342. doi: 10.1016/0014-5793(88)80027-9.

8. Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides / B. Yasin, M. Pang, J. S. Turner et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2000. – Vol. 19, №3. – P. 187-194.

9. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranaturin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin / V. G. Chinchar, J. Wang, G. Murti et al. // *Virology*, 2001. – Vol. 288, №2. – P. 351-357. doi: 10.1006/viro.2001.1080.
10. The primary structure of tryptophan containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins) / P. C. Montecucchi, L. Gozzini, V. Erspamer, P. Melchiorri // *Int. J. Peptide. Res.*, 1984. – Vol. 24, №4. – P. 276-281. doi: 10.1111/j.1399-3011.1984.tb02720.x.
11. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei* / P. C. Montecucchi, R. de Castiglione, S. Piani et al. // *Int. J. Pept. Protein. Res.*, 1981. – Vol. 17, №3. – P. 275-283.
12. Toxic skin secretions of the spadefoot toad *Pelobates fuscus* / L. Lábler, H. Keilová, F. Sorm et al. // *Toxicon.*, 1968. – Vol. 5, №4. – P. 247-251.
13. Michl H. Chemie und biochemie der amphibiengifte / H. Michl, E. Kaiser // *Toxicon.*, 1963. – Vol. 1, №4. – P. 175-228.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical. Biochemistry*, 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
15. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // *Nature*, 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.
16. Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2011. – Vol. 2. – P. 20-26. doi:10.4236/abb.2011.21004.
17. The Hand book Collection. Gel filtration. Principles and methods // GE Healthcare, 2001. – P. 1093-1100.

Reference (Scopus):

1. Clarke B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medicinal applications. *Biol Rev* 1997;72(3):365-379. doi: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x
2. Xu X., Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*. 2015;115(4):1760-1846. doi: 10.1021/cr4006704.
3. Morishita S., Shoji M., Oguni Y., Ito C., Noguchi K., Sakanashi M. Congestive heart failure model in rabbits: effects of digoxin and a drug containing toad venom. *Jpn. J. Pharmacol.* 1991;56(4):427-432. doi: 10.1254/jip.56.427
4. Marenah L., Flatt P. R., Orr D. F., McClean S., Shaw C., Abdel-Wahab Y. H. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures. *Biol Chem.* 2004;385(3-4):315-321. doi: 10.1515/BC.2004.027
5. Shimizu Y., Inoue E., Ito C. Effect of the water-soluble and non-dialyzable fraction isolated from Senso (Chan Su) on lymphocyte proliferation and natural killer activity in C3H mice. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(2):256-260. doi: 10.1248/bpb.27.256

6. Barberio C., Delfino G., Mastromei G. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous 'venom' of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata pachypus*). *Toxicon.* 1987;25(8):899-909.
7. Soravia E., Martini G., Zasloff M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus granular gland secretions*. *FEBS Lett.* 1988;228:337-342. doi: 10.1016/0014-5793(88)80027-9
8. Yasin B., Pang M., Turner J. S., Cho Y., Dinh N. N., Waring A. J., Lehrer R. I., Wagar E. A. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000;19(3):187-194.
9. Chinchar V. G., Wang J., Murti G., Carey C., Rollins-Smith L. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranaturin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology*. 2001;288(2):351-7. doi: 10.1006/viro.2001.1080
10. Montecucchi P. C., Gozzini L., Erspamer V., Melchiorri P. The primary structure of tryptophan containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins). *Int. J. Peptide. Res.* 1984;24(4):276-281. doi: 10.1111/j.1399-3011.1984.tb02720.x
11. Montecucchi P. C., de Castiglione R., Piani S., Gozzini L., Erspamer V. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1981;17(3):275-283.
12. Lábler L., Keilová H., Sorm F., Kornalík F., Stýblová Z. Toxic skin secretions of the spadefoot toad *Pelobates fuscus*. *Toxicon.* 1968;5(4):247-51.
13. Michl H., Kaiser E. Chemie und biochemie der amphibiengifte. *Toxicon.* 1963;1(4):175-228
14. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;7(72):248-254.
15. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
16. Ostapchenko L., Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2011;2:20-26. doi:10.4236/abb.2011.21004
17. The Hand book Collection. Gel filtration. Principles and methods. GE Healthcare. 2001;1093-1100.

Надійшла до редколегії 01.02.2019
Отримано виправлений варіант 04.03.2019
Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019
Received a revised version on 04.03.2019
Signed in the press on 04.03.2019

И. Удовиченко, асп., Д. Олейник, Ю. Дудкина, студ.,
Т. Галенова, канд. биол. наук, О. Савчук д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

АНАЛИЗ СЕКРЕТА КОЖНЫХ ЖЕЛЕЗ ЧЕСНОЧНИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PELOBATES FUSCUS*) НА ПРИСУТСТВИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОРОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Поскольку химический синтез новых биологически активных соединений в наше время является достаточно сложной и дорогостоящей процедурой, а цена на лекарственные средства, основу которых составляют дорогие синтетические биологически активные соединения, постоянно растет, то ученые все больше внимания обращают на природные источники как перспективное сырье для получения различных биологически активных веществ. Секреты железистых клеток кожных покровов амфибий являются мощным естественным фармакологическим агентом. На сегодня подробно изучены их антимикробное, антивирусное, кардиотоническое и противодиабетические действия, однако почти ничего не известно о влиянии секретов кожных желез бесхвостых земноводных на функционирование системы гемостаза. Проанализированы потенциальные эффекты компонентов секрета кожных желез одного из представителей отечественной батрахофауны – чесночницы обыкновенной (*Pelobates fuscus*) на отдельные параметры системы гемостаза. В результате хроматографического разделения общего секрета было получено 4 белковые фракции, содержащие широкий спектр белков с молекулярными массами в диапазоне от 17 до 150 кДа. Компоненты фракции 1 имели активирующий эффект на протромбин и фактор X плазмы. Несколько компонентов фракции 4 имели протеолитические свойства и выражали субстратную специфичность по отношению к коллагену. Компоненты фракций 1 и 2 удлиняли время свертывания плазмы в коагуляционном тесте АЧТВ. Доказано присутствие биологически активных компонентов в составе кожного секрета *P. fuscus*, что указывает на перспективность дальнейших исследований с целью идентификации отдельных составляющих, ответственных за проявление показанных эффектов для изучения структурно-функциональных особенностей и механизма их действия. Решение этих вопросов будет способствовать дальнейшему более широкому использованию секретов кожных желез земноводных как сырья для разработки новых оригинальных фармацевтических агентов и/или биотехнологических продуктов с целью их использования в медицине и различных сферах промышленности.

Ключевые слова: амфибии, секреты кожных желез, система гемостаза, хроматографическое разделение, протеолитическая активность, субстратная специфичность, хронометрические тесты.

I. Udovychenko, Ph. D. stud., D. Oliynyk, stud.,
J. Dudkina, stud., T. Halenova, Ph. D., O. Savchuk, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALYSIS OF THE COMMON SPADEFOOT TOAD (*PELOBATES FUSCUS*) SKIN SECRETIONS ON THE PRESENCE OF THE POTENTIAL HEMOSTASIS SYSTEM EFFECTORS

Since nowadays the chemical synthesis of new bioactive compounds is a complicated and expensive procedure, alongside with the increased price for drugs based on synthetic biologically active compounds, scientists lay emphasize on natural sources as a promising raw material for various biologically active substances. Amphibian skin glands secretions are a powerful source of potential pharmacological agents. Currently their antimicrobial, antiviral, cardiotonic and antidiabetic activities have been studied in detail, although almost nothing is known about the effects