

O. Kucheriavenko, postgraduate, O. Pyrih, Candidate of Agricultural Sciences,
T. Bova, Candidate of Biol. Sciences
Institute of Agricultural Microbiology and Agricultural Production NAAS, Kyiv, Ukraine,
O. Tymoshenko, Candidate of Agricultural Sciences
Chernihiv National University of Technology, Chernihiv, Ukraine,
I. Budzanivska, Doctor of Biol. Sciences
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DESIGNING OF ELISA TEST SYSTEM FOR DETECTING PVM IN PLANT MATERIAL

As a result of the work specific components needed to design a domestic ELISA test system for detecting Potato virus M were produced. The system is an integral part of the effective control of seed potato material at all stages of cultivation.

Keywords: Potato virus M, antigen, indicator plants, diagnostic antiserum, conjugate, ELISA test system.

УДК 616.72-002: 577.12

К. Дворченко, д-р біол. наук, М. Ашпін, асп.,
Є. Торгалло, канд. біол. наук, М. Тимошенко, канд. біол. наук, Л. Остапченко, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДІЯ ХОНДРОЇТИН СУЛЬФАТУ НА ГЛУТАТІОНОВУ СИСТЕМУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНОМУ ГОСТРОМУ ЗАПАЛЕННІ

Встановлено, що при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки у сироватці крові зростає вміст окисненого глутатіону та збільшується глутатіонтрансферазна активність. За тих же експериментальних умов рівень відновленого глутатіону та активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази знижується. Показано, що при сумісному введенні препарату на основі хондроїтин сульфату та каррагінану тваринам вищевказані показники суттєво відновлювались до контрольних значень.

Ключові слова: гостре запалення кінцівки, хондроїтин сульфат, глутатіонова система, сироватка крові.

Вступ. На сьогоднішній день захворювання суглобів є однією з актуальних медико-соціальних проблем. Згідно статистичних даних 30% земного населення страждає від хвороб суглобів, які призводять до передчасного обмеження працездатності людей та значного погіршення якості їх життя [5, 11]. Патогенез більшості захворювань суглобів супроводжує запалення, розвиток якого безпосередньо пов'язаний з інтенсифікацією вільнорадикальних процесів [7]. У підтримці окисно-антиоксидантної рівноваги важливу роль виконує глутатіонова система, яка бере участь у метаболічних реакціях, спрямованих на підтримку клітинного гомеостазу та захист від окисного стресу. Тривалі запальні процеси у суглобі здатні призводити до дегенеративних змін хрящової тканини. В зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними та протизапальними властивостями [1]. Виявлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту структурного компоненту хряща – хондроїтин сульфату, який забезпечує його пружність та щільність. Тому дослідження властивостей препаратів на основі хондроїтин сульфату є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів.

В зв'язку з цим, метою роботи було дослідити дію препарату на основі хондроїтин сульфату на стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому гострому запаленні задньої кінцівки.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

Всіх тварин розділяли на три експериментальні групи. Перша група – інтактний контроль. Другій групі тварин моделювали гостре запалення кінцівки щурів шляхом субплантарного введення 0,1 мл 1% розчину каррагінану у задню праву лапу [9]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагінану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат, (об'єм

речовини складав 1 мл/кг). Сироватку крові щурів отримували через 3 години після введення препаратів.

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) оцінювали за зменшенням вмісту GSH в реакції з реактивом Елмана [2]. Глутатіонтрансферазну активність (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату GSH з 1-хлор-2,4-динітробензолом [2]. Глутатіонредуктазну активність (КФ 1.8.1.7) вимірювали за зменшенням оптичної густини проб в результаті окиснення НАДФН [2]. Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначали спектрофлуориметричним методом із використанням ортофталевого альдегіду за різних значень pH середовищ [4, 8].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу.

Результати та їх обговорення. Важливим чинником, від якого залежить концентрація вільних радикалів у крові та тканинах організму є кооперативна робота ферментів антиоксидантної системи, однією із ланок якої є система глутатіону. Глутатіонова антиоксидантна система, яка включає глутатіонпероксидазу, глутатіонтрансферазу, глутатіонредуктазу та глутатіон перешкоджає накопиченню токсичних продуктів вільнорадикального окиснення, відіграє важливу роль в детоксикації, деградації та виведенні із організму чужорідних субстанцій.

Встановлено, що у щурів при гострому запаленні задньої кінцівки, індукованого каррагінаном, у сироватці крові знижується глутатіонпероксидазна активність – в 1,5 раза, глутатіонредуктазна активність – в 1,7 раза, при цьому глутатіонтрансферазна активність зростає в 1,6 раза відносно контролю (табл. 1). За даних експериментальних умов у сироватці крові вміст відновленого глутатіону знижується в 1,6 раза, а рівень окисненого глутатіону зростає в 1,5 раза порівняно з показниками контрольної групи. При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається зростання глутатіонпероксидазної активності – в 1,3 раза, глутатіонредуктазної активності – в 1,4 раза,

при цьому глутатіонпероксидазна активність знижується в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю запалення, індукованого каррагінаном (табл. 1). Виявлено, що у групі щурів з гострим запаленням, яким вводили препарат на основі хондроїтин сульфату, вміст відновленого глутатіону зростає в 1,3 раза, а рівень окисненого глутатіону знижується в 1,3 раза відносно групи тварин, яким вводили каррагінан (табл. 1).

Таблиця 1. Показники глутатіонової системи у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора ($M \pm m$, $n = 10$)

Показник	Контроль	Каррагінан	Каррагінан + "Драстоп"
Глутатіонпероксидазна активність, нмоль GSH $\times$ хв $^{-1}$ $\times$ мг білка $^{-1}$	36,28 $\pm$ 3,51	23,89 $\pm$ 2,35	30,67 $\pm$ 2,81 ^{*#}
Глутатіонтрансферазна активність, нмоль $\times$ хв $^{-1}$ $\times$ мг білка $^{-1}$	6,85 $\pm$ 0,62	11,05 $\pm$ 0,97	8,78 $\pm$ 0,79 ^{*#}
Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФН $\times$ хв $^{-1}$ $\times$ мг білка $^{-1}$	0,38 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03 ^{*#}
Глутатіон відновлений, нмоль $\times$ мг білка $^{-1}$	19,47 $\pm$ 1,88	11,85 $\pm$ 1,23 [*]	14,98 $\pm$ 1,37 ^{*#}
Глутатіон окиснений, нмоль $\times$ мг білка $^{-1}$	5,91 $\pm$ 0,55	8,78 $\pm$ 0,86 [*]	7,01 $\pm$ 0,62 [#]

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили каррагінан.

Подібний ефект інтенсифікації вільнорадикальних процесів при каррагінан-індукованому запаленні виявлено іншими дослідниками. Так, індійські дослідники показали, що при запаленні, викликаному каррагінаном, у крові щурів зростає активність циклооксигенази, ліпоксигенази, синтази оксиду азоту, мієлопероксидази та вмісту малонового діальдегіду на фоні зниження активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та вмісту відновленого глутатіону [6]. Єгипетські вчені виявили, що за умов каррагінаового запалення у щурів зростає рівень фактору некрозу пухлин альфа, інтерлейкіну-6, оксиду азоту, продуктів перекисного окиснення ліпідів та знижується рівень відновленого глутатіону [3]. У дослідженнях Oluwole та співав. [10] показано, що при запаленні, викликаному каррагінаном, зростає рівень фактору некрозу пухлин альфа, нітритів, малонового діальдегіду, активності мієлопероксидази на фоні зниження вмісту глутатіону.

В ході проведених експериментальних досліджень виявлене при гострому запаленні зниження активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, вмісту відновленого глутатіону на фоні збільшення глутатіонтрансферази та рівня окисненого глутатіону свідчить про розвиток окисного стресу у щурів, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів [12]. Це призводить до надлишкового утворення токсичних метаболітів кисню, знешкодження яких відбувається за рахунок як антирадикальних ферментів супероксиддисмутази та каталази, так і ферментів системи глутатіону. Виявлене зниження глутатіонредуктазної активності у сироватці крові при гострому запаленні свідчить про зменшення здатності організму підтримувати необхідний для нормального функціонування рівень відновленого глутатіону, оскільки функцією глутатіонредуктази є відновлення GSSG до GSH за рахунок розщеплення НАДФН.

Отримані нами результати свідчать, що ефективним було введення шурам з гострим запаленням кінцівки, препарату на основі хондроїтин сульфату, який є коректором метаболізму хрящової та кісткової тканини. Це сприяло зменшенню маніфестації суглобових уражень та сповільненню прогресування запалення та вільнорадикальних процесів в організмі при каррагінан-індукованому запаленні.

Висновки. Отримані результати свідчать, що за умов каррагінаового запалення у сироватці крові порушується окисно-антиоксидантний баланс у бік акти-

вації вільнорадикальних процесів, про що свідчить порушення роботи глутатіонової ланки антиоксидантного захисту. Під дією препарату на основі хондроїтин сульфату у щурів з експериментальною моделлю гострого запалення в сироватці крові спостерігається часткове відновлення досліджуваних показників, зокрема активності глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази та вмісту відновленого глутатіону. Досліджуваний хондропротектор суттєво відновлює показники активностей антиоксидантних ферментів та рівень відновленого глутатіону в крові, що свідчить про його здатність блокувати розвиток окисних пошкоджень в організмі в умовах запалення кінцівки, індукованого каррагінаном. Таким чином, препарат "Драстоп" є ефективним засобом корекції при експериментальній моделі гострого запалення.

Список використаної літератури

1. Барна О.М. Дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів: доготривала терапія як шлях до успіху / Барна О.М., Сабадаш В.С., Корост Я.В., Пехенько В.С. // Ліки України. – 2017. – №2(208). – С. 15-20.
2. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Переслегина // Лаб. дело. – 1990. – Вып. 8. – С. 19–22.
3. Ahmed M.M. Evaluation of anti inflammatory properties and possible mechanism of action of Egyptian quince (Cydonia oblonga) leaf / Ahmed M.M., Bastawy S. // Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 2014. – Vol. 32, №2. – P. 190-205.
4. Hissin P.J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / Paul J. Hissin, Russell Hilf // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 74, Issue 1. – P. 214–226.
5. Kelli D. Golightly Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence / Kelli D. Allen, Yvonne M. // Curr. Opin. Rheumatol. – Curr Opin Rheumatol. – 2015. – Vol. 27, N3. – P. 276–283.
6. Mathew L.E. Dolichos biflorus exhibits anti-inflammatory and anti-oxidant properties in an acute inflammatory model / Mathew L.E., Sindhu G., Helen A. // Journal of Food and Drug Analysis. – 2014. – Vol. 22(4). – P. 455-462.
7. Mobasheri A. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis / Mobasheri A., Rayman M.P., Gualillo O. et al. // Nat. Rev. Rheumatol. – 2017. – Vol. 13, N5. – P. 302-311.
8. Lewis C. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay / Lewis C. Mokrasch, Eric J. Teschke // Analytical Biochemistry. – 1984. – Vol. 140, Issue 2. – P. 506–509.
9. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / Morris C.J. // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121.
10. Oluwole O.G., Ologe O., Alabi A. et al. Anti-inflammatory effects and anti-oxidant capacity of Myrathius arboreus (Cecropiaceae) in experimental models // J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. – 2017. – Vol. 3. – P. 1-9.
11. Xie F. Economic and humanistic burden of osteoarthritis: a systematic review of large sample studies / Xie F., Kovic B., Jin X. et al. // Pharmacoeconomics. – 2016. – Vol. 34, N11. – P. 1087-1100.
12. Ziskoven C. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction / Ziskoven C., Jäger M., Kircher J. et al. // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 89, №7. – P. 455-466.

References

1. Барна О.М., Сабадаш В.Є., Корост Я.В., Пехенько В.С. Дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів: довготривала терапія як шлях до успіху // Ліки України. – 2017. – №2(208). – С. 15-20. Available from: http://www.health-medic.com/articles/liki_ukr/2017-04-05/3.pdf
2. Власова С.Н. Активність глутатионзависимих ферментів зрит-роцитів при хронічних захворюваннях печінки у дітей / С.Н. Власова, Е.И. Шабуніна, І.А. Переслегіна // Лаб. дело. – 1990. – Вып. 8. – С. 19–22.
3. Ahmed M.M., Bastawy S. Evaluation of anti inflammatory properties and possible mechanism of action of Egyptian quince (*Cydonia oblonga*) leaf // Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 2014. – Vol. 32, №2. – P. 190-205. Available from: http://applications.emro.who.int/emr/egypt_j_biochem_mol_biol/egypt_j_biochem_mol_biol_2014_32_2_190_205.pdf
4. Hissin P.J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / Paul J. Hissin, Russell Hilf // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 74, Issue 1. – P. 214–226. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Russell_Hilf/publication/22193040_Fluorimetric_method_for_determination_of_oxidized_and_reduced_glutathione_in_tissues/links/55f81e1308ae07629d04ae4/Fluorimetric-method-for-determination-of-oxidized-and-reduced-glutathione-in-tissues.pdf
5. Kelli D. Allen, Yvonne M. Golightly Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence // Curr. Opin. Rheumatol. – Curr Opin Rheumatol. – 2015. – Vol. 27, N3. – P. 276–283. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405030/pdf/nihms680923.pdf>
6. Mathew L.E., Sindhu G., Helen A. Dolichos biflorus exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an acute inflammatory model // Journal of Food and Drug Analysis. – 2014. – Vol. 22(4). – P. 455-462. Available from: [http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498\(14\)00050-7/pdf](http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498(14)00050-7/pdf)
7. Mobasheri A., Rayman M.P., Gualillo O. et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis // Nat. Rev. Rheumatol. – 2017. – Vol. 13, N5. – P. 302-311. Available from: <https://www.nature.com/nrrheum/journal/v13/n5/pdf/nrrheum.2017.50.pdf>
8. Mokrasch L.C. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay / Lewis C. Mokrasch, Eric J. Teschke // Analytical Biochemistry. – 1984. – Vol. 140, Issue 2. – P. 506–509. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6486436>
9. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
10. Oluwole O.G., Ologe O., Alabi A. et al. Anti-inflammatory effects and anti-oxidant capacity of *Myrtilus arborea* (Cecropiaceae) in experimental models // J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. – 2017. – Vol. 3. – P. 1-9. Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/jbcp-2016-0114/jbcp-2016-0114.xml>
11. Xie F., Kovic B., Jin X. et al. Economic and humanistic burden of osteoarthritis: a systematic review of large sample studies // Pharmacoeconomics. – 2016. – Vol. 34, N11. – P. 1087-1100. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40273-016-0424-x>
12. Ziskoven C., Jäger M., Kircher J. et al. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 89, №7. – P. 455-466. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 08.02.17

Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Н. Ашпин, асп., Е. Торгалло, канд. биол. наук, М. Тимошенко, канд. биол. наук, Л. Остапченко, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ДЕЙСТВИЕ ХОНДРОИТИН СУЛЬФАТА НА ГЛУТАТИОНОВУЮ СИСТЕМУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ.

Установлено, что при каррагинан-индуцированном воспалении задней конечности в сыворотке крови увеличивается содержание окисленного глутатиона и возрастает глутатионтрансферазная активность. При тех же экспериментальных условиях уровень восстановленного глутатиона и активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы снижается. Показано, что при совместном введении препарата на основе хондроитин сульфата и каррагинана животным вышеуказанные показатели существенно восстанавливались до контрольных значений.

Ключевые слова: острое воспаление конечности, хондроитин сульфат, глутатионовая система, сыворотка крови.

K. Dvorshchenko, DSc., M. Ashpin, PhD stud., Ie.Torgalo, PhD., M. Tymoshenko, PhD., L. Ostapchenko, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ACTION OF CHONDROITIN SULFATE ON THE GLUTATHIONE SYSTEM IN BLOOD SERUM AT CARRAGEENAN-INDUCED ACUTE INFLAMMATION.

Increase of content of oxidized glutathione (GSSG) is fixed in blood serum at carrageenan-induced rat paw inflammation, as well as increase of the glutathione transferase activity. Upon the same experimental conditions, the level of reduced glutathione (GSH) and activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase were decreased. All above mentioned indices was closer to control values in animals treated simultaneously with carrageenan and drug on the basis of chondroitin sulfate.

Key words: acute paw inflammation, chondroitin sulfate, glutathione system, blood serum.

УДК 581.132:504.055: 581.522.5+543.42

Н. Нужина, канд. біол. наук, В. Кондратюк-Стоян, пров. інж.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЖАРОСТІЙКІСТЬ ТА ПОСУХОСТІЙКІСТЬ ДЕЯКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *RHODODENDRON* L.

Наведено дані про зміну вмісту фотосинтезуючих пігментів у листях рослин *Rhododendron makinoi*, *R. degranianum*, *R. callimorphum* і *R. brachycarpum* після впливу високих температур. Встановлено ступінь посухостійкості даних рослин. Найбільш посухо- і жаростійкими видами є рослини, батьківщиною яких є Японія.

Ключові слова: *Rhododendron makinoi*, *R. degranianum*, *R. callimorphum* і *R. brachycarpum* фотосинтезуючі пігменти, гіпертермія, посухостійкість.

Вступ. За останнє століття багатьма дослідниками підтверджено наявність тенденції до підвищення середньорічної температури повітря [1; 2; 3]. Такі кліматичні зміни часто супроводжуються різкими коливаннями температури. Багаточисельні дослідження підтверджують негативний вплив гіпер- та гіпотермії на ріст та розвиток рослинних організмів. Однією із найчутливіших до температурного впливу є пігментна система [4; 5]. Разом з цим, більшість робіт присвячено вивченню впливу температурного стресу на трав'янисті сільськогосподарські культури [1; 6], і зовсім мало уваги приділено дерев'янистим рослинам. Представники роду

Rhododendron L. надзвичайно популярні в першу чергу, як декоративні рослини. Тому метою нашої роботи було вивчення адаптивних особливостей різних видів рододендронів до короткотривалої дії високотемпературного стресу та їх посухостійкості, що допоможе успішніше культивувати рослини та інтродукувати нові цінні види.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження слугували види роду *Rhododendron*: *R. makinoi* Tagg ex Nakai et Koidz., *R. degranianum* Carrière, *R. callimorphum* Balf. f. & W.W. Sm. *R. brachycarpum* D. Don ex G. Don. Для дослідів відбирали види з різних природних ареалів, а отже з відмінною пристосованістю до високих темпера-