

Міністерство освіти і науки України

Національний авіаційний університет  
Словацький аграрний університет в місті Нітра

На правах рукопису

ШЕВЦОВА ТЕТЯНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 638.138:582.632.1:57.04 (4) (043.5)

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПИЛКУ БЕРЕЗИ БОРОДАВЧАСТОЇ (*BETULA*  
*VERRUCOSA* ENRH.) В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД МІСЦЯ ЗРОСТАННЯ

03.00.16 Екологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Наукові керівники

Гаркава Катерина Григорівна

Доктор біологічних наук

Бриндза Ян

Кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Київ, Нітра – 2016

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Пилок <i>Betula verrucosa</i> Ehrh. як екологічний фактор здоров'я популяції України .....	12
1.1.1. Ботанічна характеристика виду <i>Betula verrucosa</i> Ehrh. ....	15
1.1.2. Алергенний потенціал пилку <i>Betula verrucosa</i> Ehrh. ....	17
1.1.3. Молекулярна характеристика пилку <i>Betula verrucosa</i> Ehrh. ....	19
1.2. Біохімічна якість пилку як основа біологічної активності.....	25
1.3. Зміни пилкових зерен під впливом факторів навколишнього природного середовища .....	33
<i>Підсумок до огляду літератури</i> .....	38
РОЗДІЛ II. ОРГАНІЗАЦІЯ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	39
2.1. Організація та стратегія дослідження .....	39
2.2. Методи досліджень. ....	46
2.2.1. Визначення рівня експресії гена <i>Bet v 1</i> в пилку .....	46
2.2.2. Визначення вмісту важких металів у пилку .....	48
2.2.3. Визначення мікробіологічної якості пилку.....	49
2.2.4. Визначення біохімічних складових пилку (загальна структура, загальні білки, жирнокислотний склад загальних ліпідів, аскорбінова кислота, флавоноїдні сполуки).....	51
2.2.5. Встановлення біологічної активності пилку (загальна антиоксидантна, антимікробна, імунологічна) .....	58
2.2.6. Вимірювання морфологічних характеристик пилкових зерен .....	64
2.2.7. Застосування математично-статистичних методів при оцінці експериментальних результатів .....	66
РОЗДІЛ III. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ, МОРФОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТА БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПИЛКУ <i>BETULA VERRUCOSA</i> EHRH. ....	68

<i>Розділ 3.1. Встановлення хіміко-біологічних показників пилку Betula verrucosa Ehrh.</i>	68
3.1.1. Встановлення біохімічних складових пилку	68
3.1.2. Визначення рівня експресії гена Bet v 1 в пилку	71
3.1.3. Визначення вмісту важких металів у пилку	73
3.1.4. Оцінка мікробіологічної якості пилку	77
3.1.5. Визначення вмісту білка в пилку	84
3.1.6. Визначення жирнокислотного складу ліпідів пилку	86
3.1.7. Визначення вмісту аскорбінової кислоти в пилку	92
3.1.8. Визначення вмісту флавоноїдних сполук в пилку	93
<i>Підсумки до Розділу 3.1</i>	95
<i>Розділ 3.2. Визначення біологічної активності пилку Betula verrucosa Ehrh.</i>	98
3.2.1. Визначення антиоксидантної активності пилку	98
3.2.2. Визначення антимікробної активності пилку	103
3.2.3. Визначення імунологічної активності пилку	106
<i>Підсумки до Розділу 3.2</i>	108
<i>Розділ 3.3. Вимірювання морфометричних показників пилкових зерен Betula verrucosa Ehrh.</i>	110
РОЗДІЛ IV. ВПЛИВ МІСЦЯ ЗРОСТАННЯ НА БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПИЛКУ БЕРЕЗИ БОРОДАВЧАСТОЇ (ПОШУК ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ, ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ)	121
ВИСНОВКИ	166
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	168
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	170
ДОДАТКИ	211

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2,6-ДХФИН	—	2,6-дихлорфеноліндофенолят натрію
<i>BV</i>	—	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.
АА	—	алергенна активність
АЗ	—	алергічні захворювання
АК	—	аскорбінова кислота
АМА	—	антимікробна активність
БА	—	біологічна активність
ББ	—	береза бородавчаста
ВМ	—	важкий метал
ВЕРХ	—	високоефективна рідинна хроматографія
ДФПГ	—	2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил
ЖК	—	жирна кислота
ЗАА	—	загальна антиоксидантна активність
ІЧС	—	інфрачервона спектроскопія
КУО	—	колонієутворююча одиниця
НПС	—	навколишнє природне середовище
ПЗ	—	пилкові зерна
ПЛР	—	полімеразна ланцюгова реакція
САУ	—	Словацький аграрний університет
СЕМ	—	скануючий (а) електронний (а) мікроскоп (ія)
СЦК	—	середній цитохімічний коефіцієнт

## ВСТУП

**Актуальність теми.** В сучасних умовах екологія природного навколишнього середовища зумовлює ряд проблем, які позначаються на здоров'ї та добробуті не лише людини, а й усіх живих організмів. Навіть у такій благодійній справі як озеленення міста потрібно бути передбачливим. Яскравим прикладом ситуації, що склалася в багатьох європейських та українських містах, є береза бородавчаста (ББ). Це красиве і невід'ємне дерево слов'янської культури з економічним потенціалом – натепер причина полінозів мільйонів людей [1-3] і наразі не рекомендується для висаджування у містах [4, 5].

Пилок ББ – найважливіший аероалерген біологічного походження в Центральній і Північній Європі, Росії, Канаді [6, 7]. Він містить декілька потенційно алергенних білків, які можуть бути модифіковані за допомогою хімічних речовин, присутніх в атмосфері [8, 9]. Головний алерген ББ, Bet v 1, відповідає за зв'язування IgE в більш ніж 95% пацієнтів з алергією на пилок берези. Від 10 до 20 % населення в Північній і Центральній Європі мають алергію на пилок ББ [10]. В Україні, за даними Б. М. Пухлика (2012), на поліноз хворіє, залежно від регіону, від 20 до 30% населення. Щорічно з'являється 500 тис. нових хворих [11]. В основному, дослідження у царині алергології в Україні стосуються визначення ефективності різних лікувальних препаратів, сучасних підходів до лікування алергічних захворювань (АЗ), вивчення механізмів сенсibiliзації, особливостей перебігу АЗ. Аеробіологічний моніторинг та алергопрогнози здійснюються в окремих великих містах, зокрема, – у Вінниці та Запоріжжі (В. В. Родінкова, Б. Стремедловський, А. Малєєва, О. Б. Приходько). Система аеромоніторингу випробувана В. В. Родінковою також у Полтаві, Донецьку, Дніпропетровську, Одесі та Сімферополі, що дає змогу екстраполювати дані залежно від регіону [12].

Пилок *Betula* протягом останніх років посідає одне з провідних місць в аеропалінологічному спектрі в ряді досліджуваних міст України – м. Вінниця,

м. Полтава, м. Київ та у Київській області, обіймаючи ключові позиції у повітряному спектрі пилку з 1999-2000 рр. В сезоні 2014 року концентрації березового пилку перевищили усі раніше зареєстровані максимуми, а самі піки спостерігались на два тижні раніше, ніж зазвичай [13-16].

Щороку кількість хворих, яким необхідна діагностика за допомогою алергенів, зростає. Пилок кожного виду рослин з певного клімато-географічного району має специфічний тільки для нього антигенний набір [17-20]. Сенсibiliзація до пилових алергенів варіює між різними регіонами світу, залежно від клімату, рівня урбанізації, географії та рослинності [8]. Тому місце заготовки пилової сировини, зважаючи на модифікованість умов навколишнього природного середовища (НПС), також має першочергове значення у випадку діагностики та лікування АЗ.

Чутливість сенсibiliзованих осіб до тих чи інших видів пилку обумовлюється двома факторами, серед яких – алергенність самих пилових зерен (ПЗ), а також їх концентрації, що здатні викликати алергію [14]. Алергенність і модифікацію властивостей ПЗ зумовлюють чинники НПС, тим самим активуючи їх адаптаційні механізми. Тому пилок – генетична одиниця рослини – визнаний інструмент біоіндикації [21, 22].

Зважаючи на те, що пилок ББ продукується у великих кількостях і додатково заноситься із сусідніх міст, областей, країн [6], запобігти його впливу неможливо. Зважаючи на чутливість ПЗ до прямих і непрямих екотропних впливів на морфологічному і фізіолого-біохімічному рівнях [23- 27] та на збільшення частоти появи зміненого пилку в НПС [28], передбачити наскільки алергенним буде пилок, який уже потрапив у повітря, також важко. Проте, можливо оцінити алергенний потенціал інтактного пилку з прив'язуванням до мікрорегіональних умов зростання дерев, знаючи про специфічність антигенного набору залежно від регіону походження пилку. Показником, який враховує і відображає комплексний вплив екофакторів місць зростання на природні властивості пилку і його алергенний потенціал, і є

біологічна активність. Даний підхід було розроблено нами на прикладі сильно алергенного пилку ББ.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана у рамках науково-дослідної роботи кафедри біотехнології Національного авіаційного університету № 40/10.02.04 «Адаптогенні властивості вищих рослин в залежності від місця зростання» (номер державної реєстрації 0113U000587). Дисертант була виконавцем науково-дослідної роботи. Частину дисертаційного дослідження виконано під час наукового стажування в Інституті збереження біорізноманіття та біобезпеки Словацького аграрного університету (САУ) в м. Нітра за темою: «Морфологічні та хімічні зміни в пилку берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) залежно від місця зростання для створення діагностичних та терапевтичних препаратів».

**Мета і завдання дослідження.** *Мета роботи* – визначити морфо-біологічні особливості пилку ББ з різних місць зростання на фоні комплексного впливу екологічних факторів.

Для досягнення вказаної мети були визначені такі завдання:

- 1) обрати та порівняти місця збору пилку за природними умовами, поточними атмосферними забрудненнями та метеорологічними даними, визначити наявність впливу факторів довкілля на пилок;
- 2) оцінити пилок за вмістом алергенного білка;
- 3) оцінити пилок за рівнем забруднення важкими металами (ВМ) та мікроорганізмами;
- 4) визначити відмінності між генетичними, біохімічними та морфологічними характеристиками пилку з різних регіонів;
- 5) оцінити біологічну активність (БА) пилку;
- 6) визначити оптимальне місце зростання ББ з найвищим ступенем адаптації та найменш алергенним потенціалом пилку в сучасних екологічних умовах.

*Об'єкт дослідження* – морфологічні особливості пилку *Betula verrucosa* Ehrh. та його БА в залежності від місця зростання.

*Предмет дослідження* – вміст алергенних компонентів, мікробіологічний, біохімічний склад та морфологія пилку *Betula verrucosa* Ehrh, що зібраний у різних екотопах України та Словаччини.

**Методи дослідження.** фенологічні спостереження, відбір пилкової сировини, біохімічні (метод К'єльдаля, титриметричне визначення аскорбінової кислоти (АК)), фізико-хімічні (вібраційна спектроскопія, газорідинна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, колориметричні, електротермічна атомно-абсорбційна спектрометрія, атомно-абсорбційна спектрометрія з генерацією гідридів), молекулярний (полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі), мікробіологічні (метод розведення, диско-дифузійний метод), імунологічні (НСТ-тест, фагоцитоз), морфометричний аналіз, математичні (статистична обробка результатів досліджень).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше встановлено, що рівень експресії гену *Bet v 1* в пилку ББ, зібраному в Україні та у Словацькій республіці, відрізняється в міських та маргінальних умовах зростання беріз.

Вперше проведено комплексний аналіз вмісту білків, жирних кислот (ЖК) ліпідів, АК, флавоноїдних сполук, ВМ у пилку ББ з українських та словацького регіонів. Виявлено тенденцію впливу викидів забруднюючих речовин від стаціонарних та пересувних джерел, а також – впливу щільності викидів на 1 км<sup>2</sup> площі на вміст стеаринової та олеїнової кислот, нікелю та на сумарний вміст ВМ. Виявлено зв'язок вмісту флавоноїдів та ВМ з поточними погодними умовами.

Вперше встановлено антиоксидантну активність водних, метанолових та етанолових екстрактів пилку ББ і показано високі для анемофільного пилку значення антиоксидантної активності водних екстрактів.

Вперше показано, що кут розташування апертури до контуру ПЗ, а також довжина ребра апопоріального поля є надійно інформативними морфологічними ознаками, що відображають дію екологічних факторів.

Статистично підтверджено наявність достовірних відмінностей, обумовлених місцем зростання пилку ББ у Рівненській та Київській областях



України за вмістом білків, за сумарним вмістом насичених і ненасичених, а також поліненасичених ЖК, за вмістом АК та флавоноїдних сполук, за загальною антиоксидантною активністю (ЗАА) водних, метанолових та етанолових екстрактів пилку, за довжиною полярної осі, екваторіального діаметру, за кутом розташування апертури до контуру ПЗ, внутрішнім діаметром апертури та за довжиною ребра апопоріального поля.

Вперше розроблено комплексний підхід до оцінки алергенного потенціалу пилку.

Вперше визначено місце зростання популяцій ББ, у якому вона продукує менш алергенний, найбільшою мірою адаптований до сучасних екологічних умов, пилок.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримано нові знання щодо вмісту хімічних сполук та їх кількісного варіювання залежно від місця походження потенційно алергенного пилку ББ. Відмічено значимість визначення експресії *Vet v 1* в пилку як показника більшого алергенного потенціалу для заготовлення пилкової сировини з метою виготовлення українських регіональних діагностичних та лікувальних алергенів. Проаналізовано вплив ряду факторів, від етапу заготовки пилкової сировини до кінцевого споживання (виготовлення діагностичних та лікувальних алергенів), на якість пилку, що може бути корисним при розробці національних та міжнародних мікробіологічних параметрів якості і стандартних протоколів обробки пилку анемофільних видів з алергенним потенціалом. Отримано Патент на корисну модель №78713 Україна МПК G01N 33/68 «Спосіб оцінки жирнокислотного складу ліпідів пилку берези», в якому поданий механізм оцінки корисності застосування пилку ББ, з рекомендаціями до можливого впровадження цього механізму оцінки у клінічній медицині. Результати представлених досліджень є корисними для широкого кола слухачів медичного та біологічного профілів. Основні теоретичні положення та висновки, фактичний матеріал дисертації можуть бути залученими до написання наукових, в їх числі й монографічних праць, навчальних посібників.

**Особистий внесок здобувача.** Автором дисертації самостійно проведено пошук та аналіз літературних джерел для визначення актуальності теми роботи. Особисто заготовлено зразки пилку ББ на території України та Словацької республіки. Дисертантом проведено експериментальні дослідження, узагальнено отримані експериментальні результати. Самостійно оформлено дисертаційну роботу.

Друковані роботи підготовані автором особисто за безпосередньої участі наукових керівників та спеціалістів САУ в м. Нітра, в тому числі Інституту збереження біорізноманіття та біобезпеки, словацької екологічної лабораторії EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves, Празького університету хімічної технології, Інституту проблем патології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця, Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Лабораторії якості продукції бджільництва ННЦ «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича», які здійснювали консультування на етапі виконання практичної частини роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи висвітлено на Міжнародній конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Березне, 2011), IV Міжнародній науковій конференції «Відновлення порушених природних екосистем» (Донецьк, 2011), Науково-практичному семінарі «Перспективи та напрямки сучасної біотехнології» (Київ, 2011), Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених і студентів «Політ. Сучасні проблеми науки» (Київ, 2012, 2014 pp.), XIII Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації «Імунологія та алергологія: наука і практика» (Київ, 2012), International Scientific Symposium «Conservation of plant diversity» (Kishinev, Republic of Moldova, 2012), Міжнародних науково-практичних конференціях «Radostim-2012. Микробные биотехнологии: актуальность и будущее» (Київ, 2012), daRostim-2013 «Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища» (Львів, 2013),

Палинологической школе-конференции с международным участием «Методы палеоэкологических исследований» (Москва, 2014), Международной научно-практической конференции «Инновационные аспекты агроэкологии в повышении продуктивности растений и качества продукции» (Москва, 2014), 2-й Международной научно-технической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты создания биосферосовместимых систем» (Орел, Россия, 2014). Результати наукового стажування «Morphological and chemical changes in the pollen of silver birch (*Betula verrucosa* Ehrh.) depending on the habitat in order to create diagnostic and therapeutic drugs» звітувались в Інституті збереження біорізноманіття та біобезпеки САУ в м. Нітра, Словаччина у 2013 р. Під час навчання в аспірантурі результати досліджень звітувались два рази в рік на засіданнях кафедри біотехнології Національного авіаційного університету.

Стендові доповіді представлено на Міжнародних науково-практичних конференціях: «Фітоапітерапія: здобутки та перспективи» (Ужгород, 2012), «Новітні досягнення біотехнології» (Київ, 2013), III Міжнародному симпозіумі «Medicinal Plants, Their Cultivation and Aspects of Uses» (Petra, Jordan, 2012).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 25 наукових праць, а саме: 12 статей, у тому числі 4 – у фахових виданнях України, 1 – у провідному науковому виданні РФ, 7 – у наукових фахових виданнях інших держав, в тому числі 2 статті надруковані у виданнях, що входять до переліку наукометричної бази даних SCOPUS; 12 тез доповідей на наукових конференціях та 1 патент України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 168 сторінках друкованого тексту і складається з таких структурних частин як «Вступ», «Огляд літератури», «Організація, матеріали та методи досліджень», двох розділів «Результати досліджень», «Висновки», «Практичні рекомендації», «Список використаних джерел», який включає 389 посилань (з них 298 – іноземних авторів). Робота містить 46 таблиць, 31 рисунок та додатки.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Пилок *Betula verrucosa* Ehrh. як екологічний фактор здоров'я популяції України

*Betula verrucosa* Ehrh. – найпоширеніший вид берези в Україні [29]. Розповсюджена як в лісових, так і місцевих насадженнях. У Північній Європі ББ і *B. pubescens* є комерційно найбільш важливими породами листяних дерев [6, 30]. В 15-ти європейських країнах ці два види входять до списку 10 найбільш поширених видів. В Україні частка берези в загальному обсязі запасів деревостану складає 75 млн. м<sup>3</sup>, що становить 4%, у Словаччині – <4 млн. м<sup>3</sup>, <1% відповідно. Це декоративний, лісогосподарський, лікувальний, харчовий, санітарно-гігієнічний та діагностичний вид. Його роль в житті населення важко переоцінити. Дерево цінне своїм високоякісним пиломатеріалом, різноманітними біологічно активними речовинами молодого листя, бруньок, кори, які мають застосування у косметичній, фармацевтичній та народній медицині як лікувальні засоби – жовчогінні, сечогінні, протизапальні, протиспазматичні, ранозагоювальні, антигельмінтні, антивірусні, в'яжучі, з протипухлинною та протимікробною активністю. Береза цінна своїм поживним соком, грибом чагою, який на ній паразитує, дьогтем. З внутрішньої кори можна отримати згущувач в супи або змішувати її з борошном для приготування хліба, печива і т.д. Сік може бути зброджений у пиво, вино, з листя – заварений чай. З берези отримують цілий ряд продуктів господарського призначення (клей, віник, деревне вугілля, фарбу, деревне волокно, папір, поліруючий матеріал, засіб для відлякування комах, танін, гідроізолюючий матеріал тощо). Вищеописані властивості ББ застосовувались протягом століть у різних регіонах світу і застосовуються дотепер [30-37].

У містах ББ широко використовується в озелененні адміністративних, виробничих та промислових територій, внутрішньоквартальних насаджень у

житлових масивах. Її зовнішній вигляд привабливий білувато-сріблястою корою, витонченою формою і осінніми кольорами. Вона виконує протиерозійні, водорегулюючі та санітарно-гігієнічні функції. Посадки ББ рекомендуються для зменшення забруднення НПС металами [32, 35, 38-40].

Але останніми роками ми частіше чуємо про березу як про основну причину АЗ. Пилок ББ є найважливішим алергенним пилом в Центральній і Північній Європі, а також Росії, Канаді і в північно-східних Сполучених штатах [1, 3, 6, 7, 10, 29, 35, 41-53], а також має статус біозабрудника [54]. Розрахунки показують, що від 10 до 20 % населення в Північній і Центральній Європі мають алергію на пилок берези [10]. Тривалість сезону палінації берези, в основному, залежить від температури повітря і коливається від 2 до 8 тижнів. Пікових значень концентрація пилку набуває через 1-3 тижні після початку сезону [3]. У Європі відсоток суб'єктів з позитивним шкірним прик-тестом до алергенів берези становить від 5% в Нідерландах до 54% в Цюриху (Швейцарія) (за даними на 2007 рік) [3]. Проведені дослідження на території України показали, що у м. Вінниця, м. Полтава, м. Київ та Київській області пилок ББ лідирує серед аероалергенів дерев [14, 29, 51, 55, 56]. В містах Донецьк, Одеса, Дніпропетровськ та Сімферополь інтенсивність пилкування берези значно нижча, характерний триваліший сезон пилкування і дедалі менша кількість днів із клінічно значущими концентраціями пилку, що свідчить про міграцію ПЗ *Betula* в ці регіони з інших областей України [29, 57]. У Харківському регіоні ББ посідає лише 21-ше рангове місце та є причиною сенсibilізації у 28% хворих з алергійними хворобами [58]. Спектр пилової сенсibilізації схожий у Харківській, Запорізькій (Недельська С. М., 2009, 2010) та Луганській (Альошина Р. М., 2006) областях, але відрізняється від такого у Київському та Вінницькому регіонах [58, 59]. Оцінка сенсibilізації дитячого організму у м. Запоріжжя та екологічно-сприятливих районів Запорізької області виявила більшу сенсibilізацію до рослинних алергенів, в тому числі – до алергенів берези, – саме у дітей з міста [60].

Негативної ролі ББ додає перехресна реактивність між її пилом і безліччю рослинних продуктів (вишня, черешня, яблука, груша, слива, абрикос, нектарин, персики, морква, петрушка, кріп, волоські, лісові, бразильські горіхи, мигдаль, ківі, морква, селера, картопляна шкірка, а також березовий сік, виноградні вина, коньяк і фітопрепарати: березове листя, вільхові шишки, препарати беладони), оскільки антигени присутні не тільки в ПЗ, але й в інших частинах рослин (насіння, листя та ін.) [1, 35, 52, 6-63]. Приблизно у 70% людей з алергією на пилок ББ є симптоми перехресної реакції до їжі [35].

Протягом багатьох століть пилок рослин був абсолютно нешкідливим для організму людини. Ця унікальна за архітектонікою «інженерна споруда» з безцінним вантажем – детальною спадковою програмою розвитку, – була толерантна до дії НПС, поки концентрація забруднень, не стала причиною «стресу» для пилку [24, 64].

ББ – невід’ємний елемент зелених міських насаджень з цінними властивостями й економічним потенціалом, але при цьому її пилок є причиною сезонної алергії та здатен викликати перехресні алергенні реакції із продуктами харчування. Повністю позбутися виду в Україні не вдасться, адже він належить до категорії місцевих. До того ж ББ – однокімнатне дерево, висаджувати лише жіночі особини неможливо. Можливо зменшити алергенний потенціал пилку за рахунок зниження рівнів забруднення НПС (наприклад, обмеження використання приватних автомобілів у містах, суворий контроль викидів транспортного засобу, розширення використання альтернативних джерел енергії). Адже доведено, що пилок ряду рослин, і ББ – у тому числі, – проявляє меншу алергенну активність (АА) порівняно з міськими умовами і умовно чистими місцями зростання [65-68]. В раціоні чутливих осіб рекомендується збільшувати кількість продуктів з антиоксидантним ефектом, а також захищати нижні дихальні шляхи за допомогою антигістамінних препаратів [65]. А німецькі та голандські вчені розглядають можливість озеленення територій гіпоалергенними березами. Можливі і більш радикальні дії: викорчовувати всі старі берези і замінити їх новими [69].

Питання збереження та збільшення зелених насаджень загально-громадського значення наразі актуальне. Зменшення площі зелених насаджень негативно позначається на функціонуванні міських екосистем, а отже й на здоров'ї міського населення [70].

Отже, ББ є цінним у всіх відношеннях деревом, невід'ємним від слов'янської культури, а алергенна дія її пилку є хворобою сучасності. Завдання вчених, місцевої влади, підприємців і свідомих жителів у тому, щоб зменшити алергенність пилку, змінивши умови навколишнього середовища. Наразі є актуальним досліджувати біологічні властивості пилку, в тому числі – ББ, з прив'язуванням до конкретних місць зростання, щоб оцінити ступінь адаптації ПЗ, а значить – і самого дерева, до багатфакторного впливу умов зростання.

### 1.1.1. Ботанічна характеристика виду *Betula verrucosa* Ehrh.

Вид ББ, інші назви береза срібна, береза повисла, поникла (син. *Betula pendula* Roth.) належить до роду *Betula* L. (Береза), що відноситься до царства *Plantae* (Рослини), підцарства *Tracheobionta* (Судинні рослини), надвідділу *Spermatophyta* (Насінні рослини), відділу *Magnoliophyta* (Покритонасінні), класу *Dicotyledonae* (Дводольні), підкласу *Hamamelididae* (Гамамелієвидні), порядку *Fagales* (Букоцвітні), родини *Betulaceae* (Березові) [71-75]. ББ має широке природне поширення на території Євразійського континенту (дод. А, рис. 1) [6, 30, 76-80], а також була інтродукована в Австралії та Новій Зеландії [35].

ББ – світлолюбивий, швидкозростаючий, зимо-, посухо- і газостійкий вид [30, 38, 79, 81]; анемофіл, анемохор, мезофанерофіт, мезофіл, мікротерм, мезотроф, антропогенно-прогресивний нестійкий едифікатор тимчасових вторинних угруповань на згарищах та вирубках та асектатор корінних хвойних та широколистяних лісів [30, 31, 37, 76, 79, 81-83]. Росте в мішаних, рідше – широколистяних лісах, на просіках, згарищах, у рідколіссях лісових і

лісостепових районів, у степу – по долинах річок, утворюючи чисті і змішані з іншими породами насадження [31, 77]. Однодомний вітрозапильний вид з не великими простими квітами, розташованими в окремих чоловічих та жіночих сережках [30]. Чоловічі суцвіття довгі (2-7 см (максимум 10)), сережкоподібні, під час цвітіння висячі, розташовані на кінцях гілок, зібрані по 2-3, жовто-коричневі (дод. А. рис. 2.1) [16, 34, 38, 77, 79, 84-86]. Чоловічих квіток у кожній сережці в середньому 200-300 за даними Н-Л. Pasonen [78] і 450 за даними К. Piotrowska, в тому числі 900 тичинок [34] (дод. А рис. 2.2). Кількість ПЗ в одному суцвітті G. Erdtman визначив як  $6 \times 10^6$  [2, 87], К. Piotrowska вказує на 10044000 [34] (дод. А рис. 2.3). ББ – ранньоквітучий вид з регіональними відмінностями [16, 88]. На території України цвіте в другій-третій декаді квітня [29, 40]. Виліт пилку з пиляків більше пов'язаний з тепловим, ніж з тимчасовим чинником і календарні терміни цвітіння берези з року в рік не збігаються. Максимум пилку в повітрі припадає на дні з більш високою температурою [89]. Період висипання пилку ББ є відносно коротким з «вибуховим» початком, коли 70-80 % пилку вивільняється з пиляків протягом 2-3 днів, і поступовим спадом концентрації ПЗ [34]. Низькі рівні березового пилку можуть все ще реєструватися аж до кінця літа або внаслідок транспортування [6, 50]. Коли цвітіння відбувається в спокійному доквіллі, більша частина пилку залишається на суцвіттях. Крім того, завантажені пилком квітки можуть бути збережені на деревах протягом декількох днів, поки пилки не розвіється вітром або квіти не опадуть з дерев [2]. Щільність пилкової хмари залежить від віку березового насадження, вона щорічно змінюється. Встановлено, що для ББ характерний 3-4 річний цикл [50, 87]. За трьома сезонами високої пилкової продуктивності настає один сезон з відносно слабкою сумарною пилковою продукцією. Тенденція років низького або рясного виробництва сережок, як правило, відбувається одночасно на великій географічній області [90]. Періодичність коливань концентрації пилку пов'язують з репродуктивними циклами рослин, з впливом метеорологічних та ряду інших факторів [53].



### 1.1.2. Алергенний потенціал пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Пилок не всіх рослин може бути алергенним. За даними С. Н. Куприянова [91], існує більш як 700 найменувань алергенних рослин та їх пилку. До таких належать анемофільні рослини, що мають пристосування для розповсюдження їх ПЗ за допомогою вітру. Р. Б. Нокс (1985) зазначає, що лише 30 з більш як 300 родин квіткових рослин є анемофільними, а сенсibiliзуючі властивості їх ПЗ можуть проявлятися при наявності у них відповідних властивостей [92]. Ці рослини повинні бути широко розповсюдженими на даній території, продукувати велику кількість легкого та летючого пилку, розміром не більше 15-60 мкм, мати виражену АА [3, 24, 52, 62, 93-95]. До пилку рослин з найбільш вираженими алергенними властивостями слід віднести пилок, що містить сапоніни, прості аміни, прості алкалоїди, велику кількість білка [96]. Зараз нараховується близько 100 тис. видів пилових алергенів, які поділяють на групи відповідно до життєвих форм рослин, що їх викликають, періодів цвітіння та ступеня алергенності [54].

Пилок анемофільної ББ відповідає усім вимогам аби бути алергенним: малого розміру (20-22 мкм), легкий (повне зерно, заповнене білковим матеріалом, має щільність  $\sim 800 \text{ кг/м}^3$ ), летючий, виділяється у величезних кількостях [50, 97, 98]. Середня вага ПЗ ББ за даними Dyakowska & Zurzycki (1959) становить  $9,48 \cdot 10^{-9} \text{ г}$ , а швидкість їх осідання в нерухомому повітрі – 2,94 см/с [99]. Пилок – це не лише джерело алергії, але й «транспорт» для радіонуклідів, агресивних хімічних речовин тощо [100]. Визначено, що приблизно сферична форма сприяє перенесенню пилку ББ на десятки, сотні і навіть тисячу кілометрів (наприклад, за даними Л. А. Куприяновой (1951) ймовірна дальність занесення пилку ББ – 600 км) на висоті приблизно в 1000 м і викликає симптоми алергії там, де сезон пилювання берези ще не розпочався [6, 50, 87, 97, 99, 101, 102].

У період з 1997 по 2007 рік було опубліковано 335 наукових робіт, присвячених різносторонньому вивченню пилку ББ як алергена [98, 103]. Його

вивченням займалися і займаються вчені в різних країнах світу (Швейцарія, Швеція, Нідерланди, Великобританія, Австрія, Італія, Фінляндія, Японія, Росія та ін.). Дослідження алергенних властивостей березового пилку полягають у визначенні наявності алергенів у ньому, місць їхньої локалізації в зернах, властивостей, функцій, умов і причин виходу з ПЗ [68, 104-108]. На сьогоднішній день вчені займаються розробкою ефективних моделей для прогнозування поширення пилку, перенесення інертних домішок або передбачення середньодобових концентрацій пилку [10, 12, 109, 110] та розробкою рекомбінантних алергенів пилку ББ для специфічної імунотерапії, алерговакцин, що володіють специфічністю, зниженою алергенністю і сприяють утворенню при гіпосенсибілізації специфічних блокуючих антитіл, підбираються різні методи очищення алергенних препаратів [17, 111-114].

Під час сезону пилку ББ концентрація її зерен може бути надзвичайно високою: 1868 ПЗ на 1 м<sup>3</sup> повітря 21 квітня 1996 р. Лейден, Нідерланди [115], 1200 зерен/м<sup>3</sup> Швеція у 1991 р. [101], 2364 зерен/м<sup>3</sup> у м. Полтава в 2010 р. [15]. В Польщі концентрації пилку ББ вище 155 зерен/м<sup>3</sup> викликають задишку [10], 30 зерен/м<sup>3</sup> – серйозні симптоми у чутливого населення Іспанії [109]. У Фінляндії пороговою межею, що використовується для сенсibiliзованих пацієнтів є 100 зерен/м<sup>3</sup> [6]. Поріг концентрації залежить від групи алергенності, до якої належить рослина [15]. Клінічно значущою для представників дерев'янистої флори є порогова концентрація – у 25 зерен/м<sup>3</sup>, крім тополі. Більшість території України, включаючи Лісову та Лісостепову зони, мають сезонне навантаження ПЗ берези від 3000 до 10000 зерен/м<sup>3</sup>, зниження концентрацій ПЗ спостерігається із Заходу та Північного Заходу на Південний Схід [12].

Кількості ПЗ не завжди відображають концентрацію пилових алергенів у повітрі [61, 116]. Алергени пилку ББ часто реєструються у фракціях аерозолі менших, ніж ПЗ, навіть тоді, коли жодне ПЗ ББ не було присутнє [2, 6, 87, 106, 117, 118]. В дні з високою концентрацією пилку ББ в повітрі антигенна активність була в декілька разів меншою у дослідженні А. Rantio-Lehtimäki у

Фінляндії [118]. У дослідженнях В. В. Родінкової був встановлений факт настання симптомів сезонної алергії за добу до реєстрації високих концентрацій пилку *Betula* у повітрі м. Вінниця [12].

Щоб викликати реакції у людей, алергени, складові пилку, повинні стати біодоступними [61]. Звільнення алергену – активний механізм, що залежить від навколишньої температури, години дня і відносної вологості. У сухій атмосфері пилок дуже стійкий і може містити алергени сторіччя [93]. Механізм того як алергени звільняються з пилку берези не зовсім ясний. Розрив ПЗ *Betula* при прямому контакті з рідинами рота, носа і очей представляє ефективний спосіб звільнення частинок з алергенами. Такий розрив може бути через осмотичний шок. G. F. Schäppi (1997) вказує, що березовий пилок має дуже сильну екзину і три аперттури і, на відміну від пилку трав, не розривається під осмотичним тиском у воді [119, 120]. Забруднюючі хімічні речовини і тверді частинки, які були виявлені на ПЗ, змінюють випуск алергенів з пилку (H. Behrendt, 1992). Інша гіпотеза в тому, що осівший пилок випускає свої алергени при зволоженні (тобто, внаслідок опадів) і алергенний матеріал може потрапляти в повітря після висихання (A. Rantio-Lehtimäki, 1994), вимиті алергени можуть бути перенесені від пилку до дрібних частинок з інших джерел (G. M. Hidy, 1984), фрагменти можуть бути утворені шляхом повільної, фізичної деградації пилку берези (W. R. Solomon, 1983) [117, 120].

Отже, пилок ББ має природні «задатки» аби бути алергенним, тому багато різносторонніх досліджень зосереджено навколо цього питання. Такі властивості обумовлені як природними, так і антропогенними факторами НПС.

### **1.1.3. Молекулярна характеристика пилку *Betula verrucosa* Ehrh.**

Алергени пилку ББ досить детально охарактеризовані. Докази і аналіз інформації літературних джерел приводить до висновку, що їх основна роль – сигнальна та захисна. Досі не було знайдено загальну структурну особливість, яка може пояснити, чому деякі білки стають алергенами. Форма алергенних

молекул, визначена їх тривимірною структурою, частково визначає біохімічні функції. Кальцій-зв'язуючі білки мають регуляторну функцію через їх здатність змінювати структуру на зв'язування кальцію. Функція алергена також визначається характерними амінокислотами та його локалізацією в тканині [121]. Доречі, пилок усіх видів берези може викликати сильні алергічні реакції [122, 123].

Білок локалізовано в основному біля апертури пилку, в тонкому шарі між екзиною та інтиною, в ядрі і на поверхні орбікул [104]. L. Belin і J. R. Rowley (1971) припускали, що алергени ББ зберігаються всередині пилкової протоплазми і дифундують через апертуру під час проростання. G. El-Ghazaly (1996) локалізував головний алерген Bet v 1 в гранули крохмалю (їх розмір 0,5-2 мкм) ПЗ *B. pendula* в цитоплазмі зрілого ПЗ [105, 119, 124]. Про присутність білка в інтині пилку берези (*B. pendula*, *B. nana*, *B. pubescens*) повідомлялося багатьма авторами (наприклад, R. Knox & J. Heslop-Harrison 1970, M. Grote & H. G. Fromme 1984) [119]. При гідратації ці білки протягом 0,5-1,0 хв звільняються з цитоплазми і виявляються в ексудаті, тому можна стверджувати, що алергени виходять в основному з екзини [54, 105]. Ультраструктурні дослідження, проведені з ПЗ різних видів, в тому числі з ББ, показали, що при гідратації в ізотонічному середовищі, ПЗ залишаються недоторканими, але розчинні і низькомолекулярні білки розсіяно елююють через інтину і екзину [125]. У носі алергени звільняються з пилку в межах хвилин. Під час риніту носовий рН зростає з нормального 6,0 до 8,0. При дослідженні носових виділень з рН 8,0, число розірваних ПЗ ББ зростала [105].

Також ряд дослідників вказують на знаходження алергенів на поверхні орбікул тапетума [2, 41, 45, 105, 106]. Орбікулами, або тільцями Убіша називаються спорополенінові гранули, що розвиваються на стінці тапетума [45]. Орбікули розвиваються одночасно із ростом екзини пилку і складаються, як і екзина пилку, з спорополеніну. Вони є позаклітинними структурами, незалежні від цитоплазматичного контролю, на відміну від екзини пилку. Розмір орбікул – 2-4 мкм в аеродинамічному діаметрі [106]. Якщо алергени

присутні в орбікулах і орбікули викидаються в атмосферу, вони можуть виступати в якості дуже ефективних векторів алергенів.

Алергенний компонент ПЗ змінюється залежно від стану пилку; пилок з незрілих квітів містить менше алергенних білків, ніж пилок зі зрілих квітів, а гідратовані і активовані ПЗ мають більше алергенних білків, ніж зрілий пилок [125]. Також газоподібні і тверді забруднювачі можуть впливати на молекулярну структуру, кількість і випуск алергенних білків пилку [126].

Основний алерген пилку берези – термостабільний білок Bet v 1 (*Betula verrucosa*) з молекулярною масою 17,5 кДа, ізoeлектричною точкою 5,25 (рис. 1.1 а) [1, 107]. Він належить до родини патогенез-пов'язаних рослинних білків (PR-10) і є найвідомішим її представником. PR-10 виробляються у відповідь на захист від різних патогенів або інші стресові умови і був визначений в більш ніж 70 видів квіткових рослин [1, 68, 117, 122, 127-130]. Середній вихід Bet v 1 з одного ПЗ берези становить 3,2 пг за даними досліджень в європейських країнах. Також вміст Bet v 1 в пилку берези не є постійним [116]. Bet v 1 складається з різних природних ізоформ, закодованих сімома генами, спільно використовуючи більше ніж 95%-ву послідовність [131]. Серед багатьох ізоформ білка Bet v 1 36 з них були внесені до офіційного списку алергенів, що підтримується Комітетом з міжнародної номенклатури алергенів ВООЗ та Міжнародного союзу імунологічних товариств [68]. Ґрунтуючись на їх здатності зв'язувати імуноглобулін Е, ізоформи Bet v 1 поділяють на гіпер- та гіпоалергенні різновиди. Деякі з цих структурно тіснопов'язаних білків є сильними алергенами, в той час як інші пов'язані меншою мірою або не пов'язані взагалі [132, 133]. Пилок берези – головне джерело алергену Bet v 1, інші частини берези, в тому числі інші складові сережок, виражають низький рівень Bet v 1 [134, 135].

До цих пір біологічна функція Bet v 1 не з'ясована повністю, хоча деякі припущення на основі експериментів *in vitro* і структурних досліджень були зроблені. Докази того, що члени родини Bet v 1 можуть захистити рослини від комах свідчать останні дослідження, які показали інсектицидну активність

Bet v 1 – гомологічного білка з барвінку, PR10 [1, 105]. Також повідомлялося про рибонуклеазну активність Bet v 1 [136, 137], роль в якості носія рослинного стероїду на основі його здатності зв'язувати деякі ліпіди і стероїди [78], зв'язування і пермеабілізацію мембран. Зв'язування супроводжується основними структурними перебудовами, включаючи збільшення  $\alpha$ -спіральної структури і зменшення  $\beta$ -структури [121]. Експерименти з чоловічими суцвіттями, ізольованими в певні стадії розвитку, показали, що гени Bet v 1 специфічно експресуються в кінці двоклітинного і зрілого пилку. Ці дані свідчать про можливу роль білків Bet v 1 як сигнальних речовин у процесі проростання пилку на рильці, захищаючи жіночі репродуктивні тканини від зараження патогенами [105, 107, 134]. Те, що Bet v 1 синтезується в ПЗ на дуже пізній стадії, саме перед цвітінням вказує й I. Swoboda [106]. Частинки, звільнені з беріз за тиждень до цвітіння, в основному містять інші антигени, аніж Bet v 1.

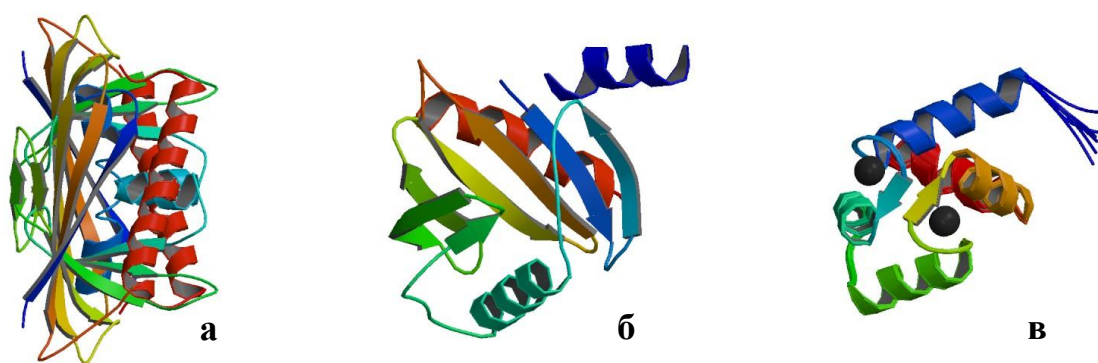


Рис. 1.1 Тривимірні структури алергенів пилку *Betula verrucosa* Ehrh.:

*a* – Bet v 1; *б* – Bet v 2; *в* – Bet v 4

Джерело: Protein Data Bank

Bet v 2 – другий добре описаний алерген пилку берези (рис. 1.1 б), належить до родини профіліни (profilins), група всюдисущих актин-зв'язуючих білків еукаріот з молекулярною масою 15 кДа [1, 105, 117, 121, 128]. Профіліни регулюють полімеризацію актину і відіграють важливу роль під час акросомної реакції чоловічої статеві клітини і пилкової трубки [117].

Крім Bet v 1 і Bet v 2 є ще й третя група алергенів з широким розподілом в пилку різних не пов'язаних рослин. Bet v 3 і Bet v 4 були визначені як EF-hand кальцій-зв'язуючі білки, які в першу чергу виражаються у зрілому пилку. Вони показують широку перехресно-реагуючу активність до іншого пилку трав, бур'янів та дерев і, таким чином, можуть служити маркером алергенів для полісенсibilізації рослин. Bet v 3 є білком з молекулярною масою 23,7 кДа, що містить три типові кальцій-зв'язуючі елементи [1, 128]. Проростання пилку сильно залежить від  $\text{Ca}^{2+}$  і цей білок є тільки в зрілому пилку під час цвітіння [117]. Bet v 4 є білком з молекулярною масою 9,3 кДа (рис. 1.1 в), містить тільки два кальцій-зв'язуючі домени і, таким чином, являє собою іншу родину кальцій-зв'язуючих алергенів, які поділяють епітопи з перехресно-реагуючих алергенів пилку трав (Cyn d 7, Phl p 7), бур'янів (Bra r 1 і Bra r 2) і пилку дерев (Aln g 4, Ole e 3) [1, 121, 128, 139].

Bet v 6 (застаріла назва Bet v 5) був ідентифікований як редуктаза ізофлавону, молекулярна маса 35 кДа [1]. Належить до родини білків, які беруть участь у реакціях захисту рослин [61].

Bet v 7 – циклофілін з молекулярною масою 18 кДа, має гомологи серед грибів [1, 45, 128, 140].

Bet v 8 – естераза пектину рослини. Клінічну значимість Bet v 6-8 детально досі не досліджено [1].

Bet v 1 містить не тільки більшість епітопів (антигенних детермінант), присутніх в пилку берези, але, внаслідок перехресної реактивності, також такі з пилку дерев порядку *Fagales* і пов'язані з їжею рослинного походження. Відповідно Bet v 1 було запропоновано в якості діагностичного алергена-маркера для виявлення пацієнтів зі справжньою сенсibilізацією до березового пилку. Bet v 1 відповідає за зв'язування IgE в більш ніж 95% пацієнтів з алергією до пилку берези [1, 61, 68, 128, 141]. Таким чином, Bet v 1 представляє собою модель алергену для вивчення захворювань I типу [141]. Проте, високо перехресно-реагуючі алергени, такі як Bet v 2 і Bet v 4, можна розглядати як

маркер-алергени, які є перехресно-реагуючими з численними непов'язаними рослинами/рослинною продукцією [1].

Близько 50 структур алергенів зараз доступні в Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>), а також базах даних <http://www.allergen.org/> та <http://www.allergenonline.org/> [1, 121].

Аналіз алергенів на молекулярному рівні став можливим завдяки дослідженню ДНК і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка є зручним і доступним інструментом для оцінки алергенів пилку [142]. ПЛР – експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі (пробі). Це реакція синтезу ДНК *in vitro*, яка повторюється багато разів: синтезовані ланцюги стають матрицями для синтезу в наступному циклі реакції. Одним із застосувань методу ПЛР є порівняння експресії генів. Експресія генів – реалізація генетичної інформації шляхом її транскрибування від ДНК до інформаційної РНК [143]. Для здійснення ПЛР треба знати принаймні короткі послідовності ДНК на кінцях того фрагмента, що має бути ампліфікований [144]. S. Longhi *et al.* (2009) використовували ПЛР у реальному часі як швидкий, точний і автоматизований метод для виявлення і кількісної оцінки таксонів алергенного пилку в повітрі [142]. Такого роду дослідження полягають у тому, щоб визначити відносну кількість алергену в зразках пилку за допомогою ПЛР у реальному часі. Кількісна ПЛР у реальному часі використовується для швидкого вимірювання кількості певної ДНК, кДНК або РНК у пробі. При цьому застосовують флуоресцентно мічені реагенти для точного вимірювання кількості продукту реакції у міру його накопичення. В даний час ПЛР широко використовується в наукових та діагностичних лабораторіях в багатьох галузях [145]. Метод ПЛР у реальному часі виявився чутливим для визначення зміни рівня експресії *Bet v 1* і може використовуватись в лабораторних дослідженнях як швидкий і відтворюваний метод виявлення алергену.



## 1.2. Біохімічна якість пилку як основа біологічної активності

Певний якісний і кількісний вміст органічних і неорганічних сполук показує, що пилок являє собою складну і різноманітну біохімічну систему, і, отже, з широким спектром БА [146]. О. І. Волошин (1998) зазначає, що пилок квітковий – це унікальний за біологічним вмістом, призначенням та багатогранністю дії продукт енциклопедичного характеру [147]. Біохімічні дослідження природного пилку, тобто пилку, отриманого при ручному зборі квітів, підтверджують, що ПЗ мають дуже багатий склад порівняно з іншими клітинами рослинного організму [148]. Унікальні властивості обумовлені хімічним складом кожного виду. У різних за походженням сортах рослин у складі пилку налічується близько 250 речовин і мінеральних елементів [149-152]. Також біохімічний склад пилку залежить і від умов зростання рослин (грунтові та кліматичні умови), особливо під час зростання і дозрівання пилку в пильовиках, і фізіологічного ступеня зрілості пилку [148]. У процесі розвитку і дозрівання в пилку відбувається ряд цитохімічних змін. Його біологічна цінність залежить від тривалості та способу зберігання, протягом яких може відбутися небажана зміна біохімічного складу. Значною мірою вірно і те, що вміст хімічних речовин багатший в пилку ентомофільних рослин порівняно з пилом анемофільних [148, 153]. Користь пилку для людського організму визначається спектром біохімічних сполук.

М. G. R. Campos *et al.* (2010) зазначають, що БА пилку безпосередньо пов'язана зі складом, тому ідентифікація біологічно активних речовин є першочерговим завданням [146]. Актуальним напрямом дослідження хімічного складу пилку є використання спектроскопічних методів, а при ідентифікації пилку навіть витісняють традиційну мікроскопію [154]. Проблемами спектрального аналізу ПЗ займається ряд авторів: Pappas *et al.* (2003), Gonzalez-Martín *et al.* (2007), Dell'Anna *et al.* (2009), Synytsya *et al.* (2010, 2011), Zimmermann *et al.* (2014a, 2014b, 2015) [155-165].

ПЗ завдяки своїм біологічним функціям складаються з широкого спектру молекул. Вони варіюють від надзвичайно стійкого біополімера, в значній мірі невідомого за складом і структурою – спорополеніну, їхнього зовнішнього шару, до флавоноїдів і каротиноїдів, лігніну, пектину та складових клітини всередині пилку, а саме білків, ліпідів, вуглеводів і нуклеїнових кислот [154]. Пилок особливо багатий на легкозасвоюваний білок і незамінні амінокислоти [152, 160, 166]. Білки пилку зберігаються в шарах пилкової стінки (екзині та інтині) або виділяються із внутрішньої частини ПЗ [104, 167-169]. Полісахариди (клітковина, поленин, крохмаль та ін.) містяться переважно в оболонці ПЗ. Оскільки товщина її неоднакова, перга, заготовлена з ентомофільних рослин, більш живильна і після її переварювання залишається менше відходів, ніж з анемофільних культур, наприклад, сосни, берези, осики [152]. Взагалі ПЗ анемофільних рослин значно бідніші за білково-жировим і вітамінно-мікроелементним складом [136].

Екзина – місце накопичення різних пігментів [154]. Участь у пігментації пилку належить зазвичай каротиноїдам. S. Henricsson досліджував хімічний склад оболонки пилку ББ [170]. Він встановив, що основні її компоненти 80 % – n-алкани (C17-C31) і n-алкени (C25:1-C31:1). Також були ідентифіковані метилкетони, етери, спирти, аміноспирти. Мінеральним компонентом екзини також є кремній [171].

Встановлено залежність АА пилку від вмісту флавоноїдів, яка носить прямо пропорційний характер [11]. Флавоноїди локалізуються на поверхні екзини, яка має більшу міцність. Ймовірно, міцність екзини обумовлена кремнієм, що входить до складу полісахаридних комплексів (наприклад, клітковини) [171]. Флавоноїди беруть участь в пігментації рослин, в процесах клітинної сигналізації та репродукції рослин, зокрема, в процесах розвитку і функціонування пилку, проростання і росту пилкової трубки, накопиченні нектару, в дозріванні плодів і насіння, в захисті рослин від різних несприятливих факторів НПС: дії ультрафіолету, температурного стресу, підвищених концентрацій ВМ, бактеріальних, вірусних та грибкових інфекцій,

від проникнення паразитів і пошкодження комахами, в захисті від окисного стресу [172-174]. Встановлено, що флавоноїди містяться в репродуктивних структурах рослин – пилку та маточці і є важливим біохімічним чинником, який регулює процеси запилення, розвитку та функціонування пилку. Крім того, забарвлення ПЗ також обумовлено флавоноїдами. Флавоноли, різновид флавоноїдів, надають пилку світло-жовтого або жовтого кольору [172].

Якість білка пилку залежить від кількості незамінних амінокислот [175]. За амінокислотним складом білки пилку близькі до білків м'яса, яєць та інших високозасвоюваних продуктів [152]. Н. Özler *et al.* (2009) провів порівняльний аналіз вмісту вільних амінокислот в пилку *Betula pendula* Roth. в тому числі, заготовленого у м. Анкара (Туреччина) в 2000 і 2008 рр. В цілому були визначені 21 амінокислота з домінуванням аргініну, аспарагіну, аспарагінової кислоти, гістидину, глютаміну, лізину, проліну, тирозину, триптофану і з нестачею глютамінової кислоти і гліцину. Пролін, лізин, метіонін, глютамінова кислота, глютамін, аспарагінова кислота і аспарагін необхідні для фертильності пилку і запилення. Лізин, глютамінова і аспарагінова кислоти відіграють важливу роль в підтримці АА молекули алергену. Примітним в отриманих результатах є те, що немає чіткої тенденції зниження або збільшення кількості амінокислотного складу з часом в різних видах. Вміст вільних амінокислот свіжих і збережених ПЗ показує унікальні зміни для кожного виду. Автор робить висновок, що склад і вміст вільних амінокислот може залежати від декількох факторів – кліматичних, ґрунтових та умов зберігання пилку [169].

Процеси проростання пилку і росту пилкової трубки забезпечуються активізацією багатьох біохімічних процесів, в тому числі і ліпідного обміну, оскільки ліпіди і їх складові, ЖК, слугують важливим джерелом енергії. Після попадання пилку на рильце маточки, ЖК виконують субстратну і/або енергетичну роль, а також беруть участь у синтезі речовин, що забезпечують ріст пилкової трубки. У берези процес цвітіння випереджає формування вегетативної сфери, тому фертильність пилку і здатність його до проростання значною мірою залежать від стану мембран та їх збереження [176]. Вміст

ліпідів коливається в межах 1-20% [148]. Ліпіди є основними компонентами екзини пилку [3, 177]. У зрілому пилку основних представників роду *Betula* L. вміст сумарних ліпідів варіюється від 32 до 52 мг/г сухої речовини. За складом сумарні ліпіди пилку представлені як нейтральними, або запасними ліпідами, так і полярними – фосфо- і гліколіпідами, які є структурною основою мембран [176].

Ступінь мінливості жирнокислотного складу мембранних ліпідів залежить не тільки від факторів НПС, а й визначається генотипом [178]. Здатність клітин адаптуватися до низьких температур пов'язують з можливістю синтезувати *de novo* ненасичені ЖК, в тому числі ліноленову, яка підвищує текучість ліпідного бішару і запобігає фазовому поділу ліпідів під дією низьких температур [176, 179]. Група ненасичених ЖК типу  $C_{18}$  відіграє визначальну роль не тільки в структурній організації гліколіпідів, а й у функціональному стані клітинних мембран в цілому [180]. Встановлено, що олеїнова кислота в подальшому може призводити до змін функціонального стану мембран рослини, оскільки є субстратом для синтезу лінолевої і ліноленової ЖК [181]. Довголанцюгові ненасичені ЖК в пилку, такі як ліолева і ліноленова кислоти, слугують попередниками для біосинтезу ряду гормонів рослин – фітопростанів [3, 182]. Найбільшу кількість фітопростаноїдів F1 (32 мкг/г) знайдено в свіжому пилку берези білої (*Betula alba* L.) [183]. Показано, що в період проростання в бруньках деревних рослин (тополя, береза, модрина) вміст простаноїдів збільшується, що може свідчити про їх участь у ростових процесах рослин. Крім того, встановлено, що рівень ендогенних простаноїдів збільшується в різних умовах, пов'язаних з підвищенням генерації вільних радикалів (біотичний і абіотичний стреси) [184]. Відповідно до сучасних уявлень, простаноїди є важливим класом сигнальних молекул, як у тваринних, так і рослинних організмах, і беруть участь у формуванні стрес-відповіді. Найімовірніше, під дією стресу відбувається утворення активних форм кисню, які викликають процеси неензиматичного окислення ліноленової та інших ненасичених ЖК і утворення фітопростанів [183].

Нещодавно було продемонстровано, що ПЗ під впливом фізіологічних умов, випускає не тільки алергени, а й біоактивні ліпіди, які мають структурну подібність із запальними ліпідними медіаторами простагландину E2 і лейкотрієну B4 [177]. Встановлено, що ліпідні фракції з пилових екстрактів *Betula alba* L. викликають хемотаксис і активацію нейтрофілів і еозинофілів [3, 44]. Крім того, неушкоджені зерна пилку індукують активацію і дозрівання дендритних клітин *in vitro*, тому припускається, що пилок може діяти не лише як носій алергену, але також в якості ад'юванта в індукційній фазі алергічної реакції [3]. Таким чином, пилок в повітрі не тільки носій алергену, але може мати – в силу звільнення біологічно активних медіаторів – набагато більший вплив на здоров'я людини, ніж передбачалося раніше [177].

Хімічна якість пилку також полягає у дотриманні норм вмісту ВМ, радіонуклідів та пестицидів. Вміст ВМ у генеративних органах рослин, як правило, незначний, що має велике біологічне значення для збереження здатності до репродукції. Проте дослідження деяких авторів свідчать про те, що ВМ здатні до переміщення в генеративні органи рослин. При значному підвищенні рівня вмісту металів у ґрунтах їх вміст у генеративних органах збільшується [185]. У районах, забруднених промисловими викидами і пестицидами, було виявлено у вмісті пилку хлор і фосфорорганічні сполуки, алкіловані феноли, насичені і ненасичені вуглеводні і ВМ (Pb, Cd) [173]. Стрес, викликаний ВМ, носить затяжний характер і зачіпає всі стадії розвитку рослини від «насіння до насіння» [186]. Під впливом ВМ може знижуватися частка фертильних ПЗ і, відповідно, підвищуватися кількість стерильного пилку [185].

Лях и др. (2004) вивчав чутливість чоловічого гаметофіту *B. pendula* Roth. до ВМ за здатністю пилку проростати на штучному живильному середовищі з додаванням солі ВМ (Pb, Cr, Cu, Zn) в концентрації 0,1, 1,0 і 10 мг/л [187]. Пилок *B. pendula* Roth. виявився найбільш чутливим до Cu і Zn, що проявилось в пригніченні росту пилової трубки. У Словаччині J. Supruka (1993) показав пряму залежність динаміки накопичення забруднювачів, включаючи ВМ, в листі *B. pendula* Roth. в умовах міст, транспортних магістралей і рекреаційних

зон від рівня забруднення ґрунту [22]. При порівнянні накопичення ВМ листям і пилком *B. pendula* Roth. із Західно-Сибірського регіону показано, що в листі кадмію, цинку, міді накопичується значно більше [26].

Встановлено, що для біоіндикації забруднення середовища ВМ пилки *B. pendula* Roth. придатний [21, 22].

Не менш важливим критерієм якості пилку є мікробіологічна чистота – відсутність мікотоксинів і наявність мікробіоти в межах норм. Наразі критерії якості розроблені для пилку бджолиного і на національному рівні [160, 188].

Усередині пиляків пилки стерильний [189, 190]. Крім того, ПЗ в квітах можуть секретувати речовини, які інгібують мікробне проростання спор [191]. Забруднення пилку можливе через медоносних бджіл, погоду, рослинні матеріали, комах і тварин, людей і їх сільськогосподарську техніку, а також у процесі зберігання [148, 189, 191]. S. Bogdanov (2005) зазначає, що небезпека забруднення продуктів бджільництва відбувається в процесі бджільницької практики, аніж з факторів НПС. У разі анемофільного пилку, який має алергенний потенціал, забруднення мікроорганізмами можливе при взаємодії з іншими аерозолями, при виході пилку з пилкового мішка, під час падіння пилку або через те, що забрудненість рослин дріжджами і грибами поширена повсюдно [192, 193]. Беручи до уваги вміст поживних речовин в пилку, різноманітні мікроорганізми можуть рости на ньому [191]. Мікроорганізми виділяють в навколишнє середовище екзоензими, які руйнують клітинну стінку пилку і використовують необхідні речовини у своєму метаболізмі [148]. Пилки для них є також своєрідним способом поширення в НПС, включаючи економічно важливі фітопатогенні бактерії [194]. Потрапляючи до дихальної системи людини, пилки подразнює слизові оболонки дихальних шляхів і викликає алергічну реакцію. Бактерії вдихаються разом з пилком. Вони потрапляють в сприятливі умови для свого росту і розмноження. Якщо ці бактерії містять стійкі гени, є можливість передачі стійких бактерій і їх генів до бактерій травної системи людини чи тварини [148, 195]. Мікробіологічне забруднення анемофільного пилку також може стати причиною контамінації

алергенних екстрактів, які використовуються для лікування алергічних захворювань в алерген-специфічній імунотерапії [196]. Тому важливо контролювати мікробіологічні показники, особливо відсутність хвороботворних мікробів і грибів згідно із законодавством, що застосовується для виробництва продуктів харчування [189, 188].

Г. Чекрыга (2006) вказує на вплив району збору з його природно-кліматичними особливостями на формування мікоценозів пилкового обніжжя [197]. R. Śpiewak *et al.* (1996) досліджував мікробіоту пилку ББ, заготовленого з відносно екологічно чистого регіону в провінції Кракова, Польща, на території житлового комплексу та поблизу коксохімічного заводу у м. Краків [192]. Було встановлено наявність на ПЗ змішаної мікробіоти, що складалась з грампозитивних і грамнегативних мезофільних бактерій, термофільних актиноміцетів (*Thermoactinomyces thalophilus*) і грибів (*Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., дріжджі). Цікаво, що зразки з відносно екологічно чистого регіону були забруднені мікроорганізмами, а зразки з території коксохімічного заводу – вільні від них [192, 198]. Навіть при забезпеченні контролю і стерильності в процесі досягання і падіння пилку вищезгадані мікроорганізми виявлялися на ПЗ [192]. А. Б. Антропова и др. (2008) дослідили 54 зразки пилку *B. pendula* Roth. з м. Москва та Московської області, Росія [49]. Авторами було виділено 24 види мікроміцетів з 12 родів. Абсолютно домінували *Aureobasidium pullulans* і вид близький до *Quambariaria cyanescens*. Мікроміцет *A. pullulans* часто зустрічається на листі різних рослин. *Q. cyanescences* відомий як фітопатоген, що викликає хвороби пагонів рослин роду *Eucalyptus* і близького до нього роду *Corymbia*.

Не виключено, що частина алергічних симптомів, викликаних пилом берези, може бути пов'язана з наявністю мікроорганізмів та продуктів їх метаболізму на ПЗ. Їх присутність на пилку різних видів підтвердили J. Lasey *et al.*, R. Śpiewak *et al.* [192, 199]. R. Śpiewak *et al.* (1996) ставив за мету визначити чи можуть ПЗ бути забруднені ендотоксином в кількостях, достатніх, щоб впливати на клінічний перебіг полінозу [198]. Він дослідив пилок жита, полину,

ліщини, вільхи і окремо берези з різних місць зростання. Концентрація ендотоксину на усіх зразках ББ виявилася однаковою – 7,5 нг/мг (кількість ендотоксину на кожному ПЗ берези масою 9,48 нг:  $7,11 \cdot 10^{-5}$  нг) і для жодного зразку пилку усіх видів не спостерігалася кореляція між кількістю грамнегативних бактерій та ендотоксинів. Крім того, знайдені рівні ендотоксинів у досліджуваних зразках пилку, аналогічні із значеннями, опублікованими для дерева, пилу від силосу, пилу від свиноферм та курячих ферм і в 10-1000 разів нижче, ніж у пилу від зерна, трав, сіна і заболоні сосни, які показують дуже сильну ендотоксичну потужність. При піковій концентрації пилку берези в Центральній і Східній Європі (між 550 і 1000 зерен/м<sup>3</sup>) рівень асоційованого з березовим пилом ендотоксину в цей час оцінюється як 0,039-0,071 нг/м<sup>3</sup>. Це лише 0,43-0,79 % від порогової для бавовняного пилу. Однак можливо, що під час пилювання берези, пилок з інших видів рослин, також несучи ендотоксин, присутній в повітрі. Відомо, що навіть невелика кількість бактеріальних та грибкових продуктів життєдіяльності може викликати алергічні чи імунотоксичні реакції [200]. Наприклад, ендотоксин, вироблений грамнегативними бактеріями, активує продукцію інтерлейкіну-1, фактору некрозу пухлин та інші цитокіни макрофагами, що ініціюють запальні процеси в дихальних шляхах [201].

Мікроскопічні гриби та продукти їх життєдіяльності, подібно до бактерій, можуть викликати алергічні та імунотоксичні реакції. Відомо, що склад мікобіоти рослин визначається сукупністю чинників, які формують середовище, – вид, вік, орган рослини, а також умови місцезростання [197]. Алергенна діяльність грибів пов'язана зі спорами, хоча інші частини гриба, такі як фрагменти міцелію, можуть також сприяти алергенності. Грибковий ріст посилюється у вологих умовах і гриби часто ростуть на відкритому повітрі на листках, у ґрунті та залишках рослин [202]. Чисельність спор грибів в атмосферному повітрі, як правило, значно вища, ніж концентрація пилку [203]. Встановлено, що гриби, які належать до родів *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* та *Cladosporium* володіють сильними алергенними властивостями [24, 202-206].



Контроль за вмістом спор грибів *Cladosporium* та *Alternaria* у повітрі є обов'язковим при аеробіологічному спостереженні [12]. Рід *Penicillium* належить до поширених сапрофітно-паразитичних мікроскопічних грибів у ґрунті, воді і на різних органічних субстратах. Їх негативний вплив проявляється у формуванні мікотоксинів (охратоксинів) під час гниття рослин і можуть викликати алергію у людини і тварин. Представники роду *Aspergillus* поширені в ґрунті, на рослинних і тваринних залишках як сапрофіти. Деякі види *Aspergillus*, наприклад, *A. flavus*, *A. parasiticus*, виробляють токсини у рослинному субстраті (афлатоксини). Види роду *Rhizopus*, які зустрічаються на пилку, присутні у фруктах. Вони сприяють їх гниттю і бродінню. Деякі види є патогенними для тварин і людини [148, 207].

Багато робіт присвячені вивченню біохімічного складу пилку бджолиного, так як він має найвищу поживну цінність [148]. Існуючі сенсорні, мікробіологічні і фізико-хімічні критерії якості пилку також розроблені для пилку бджолиного і на національному рівні [160]. Пилок вітрозапильних рослин не використовується для харчових, фармацевтичних, косметичних потреб, в якості біологічно активних добавок, хоча ці рослини і їх складові мають таке застосування. Імовірно причина в його здатності провокувати алергічні реакції у населення. Тому анемофільний пилок наразі застосовується в медичній палінології, окрім традиційних – репродуктивної біології, селекції, генетичної інженерії. Актуальним є його застосування для біоіндикації та біомоніторингу. Ми вважаємо необхідним дослідити біохімічний склад найсильнішого алергенного анемофільного пилку ББ з різних місць зростання, порівняти зразки між собою та з відомими літературними даними.

### **1.3. Зміни пилкових зерен під впливом факторів навколишнього природного середовища**

Репродуктивна система є однією з найбільш чутливих систем у живому організмі. Тому органи репродукції рослин використовуються в екологічних

дослідженнях в якості біомоніторів гаметоцидної дії різних поллютантів [208-212]. Українськими науковцями під керівництвом д.б.н. Горової А.І. розроблено ефективний підхід для встановлення рівня токсико-мутагенної активності досліджуваної території, оцінюючи цитогенетичні показники біоіндикаторів, пилку *Betula* в тому числі [209-212]. Оцінка реакції генеративної структури – пилку – називається паліноіндикацією. На пилок впливають природні (несприятлива погода з надмірно низькими чи високими температурами, з великою або малою вологістю) та антропогенні фактори (утворені внаслідок діяльності людини хімічні речовини, частинки неорганічного пилу тощо) НПС [18, 20, 46, 213, 214]. Під їх впливом змінюються властивості пилку, який тепер виступає в ролі індикатора якості НПС [208-212, 215]. Непрямий вплив забруднення повітря на ПЗ можливий через ґрунт. Якщо рослина росте в забрудненому ґрунті, її фізіологічні функції можуть змінитися і впливати на властивості ПЗ, що розвиваються [25].

Забруднювачі повітря можуть самотійно, так і в поєднанні з аероалергенами, викликати і підсилювати АЗ [216-218, 230-234]. Тому проведення аеропалінологічних та паліноіндикаційних досліджень є актуальним саме в умовах урбанізованої екосистеми.

Зміни в пилку визначаються на генетичному, біохімічному та морфологічному рівнях. Фіксація і оцінка фізіолого-біохімічних та анатомо-морфологічних перебудов дають достовірну картину умов місця зростання рослин і відображають стан міського середовища [215]. Тому пилок є унікальним об'єктом для оцінки стану НПС.

#### **а) Морфологічні зміни**

В оптимальних умовах існування пилок має певні видоспецифічні особливості будови. Хоча пилок рослин генетично міцно і жорстко захищений від впливу факторів НПС досконалою по конструкції, формі і скульптурі оболонкою, під впливом промислових емісій у всіх видів змінюються розміри і форма ПЗ, кількість, обриси і тип апертур, їх розміри та розташування відносно одна одної. Вихлопні гази розсіюються у повітрі і мікроскопічні тверді

частинки прилипають до поверхні ПЗ, до орнаментів і пор екзини, спричиняючи зміни в їх структурі. Головне, змінюються найстабільніші структури ПЗ – скульптура поверхні спородерми, а також кількість і товщина її шарів [22, 93, 219, 220]. В умовах дестабілізації середовища рослини продукують багато тератоморфних (потворних) і стерильних ПЗ. Чим гірша екологічна обстановка, тим більше тератоморфного пилку продукується рослинами [209-211, 235]. ПЗ, зібрані з забруднених територій, менші і більш крихкі порівняно з контрольними. Розшаровування екзини відбувається швидше і більше в забруднених ПЗ [219]. Зміни можуть відбуватися на всіх етапах формування пилку: в порожнині пиляка і при попаданні його в повітряне середовище, де пилок піддається додатковому впливу антропогенних факторів [213, 219, 236]. Забруднюючі речовини впливають на проростання та ріст пилкової трубки після розкриття пиляків і до досягнення нею рильця [219]. Довжина пилкової трубки і швидкість її росту є важливими характеристиками пилку, оскільки забезпечують той чи інший рівень конкурентоспроможності при проростанні пилку на рильці маточки [103]. У забруднених місцевостях зустрічаються наступні різновиди морфологічних змін: 1 – забруднені ПЗ з чітко помітними на поверхні чужорідними частками; 2 – розірвані ПЗ з тріщинами, відірваними частинами, розривами екзини або апертур, 3 – деформовані – недорозвинені або зрощені ПЗ, які мають структури, не властиві даному виду пилку (вирости різної величини і форми) [18].

Важливо володіти інформацією щодо будови та морфологічних особливостей нормальних ПЗ, в даному випадку ББ (див. дод. А.3), щоб зуміти виділити зміни, зокрема при біоіндикаційних та аеробіологічних дослідженнях.

У тератоморфних ПЗ, в більшості випадків змінюються не тільки морфологічні структури, але і їх біохімічні властивості. При цьому неминуче змінюється і міцність оболонок [93, 235].

#### **б) Біохімічні зміни**

На молекулярному рівні забруднювачі повітря мають відносно сильний окислювальний вплив, спрямований на біомолекули, такі як білки, ліпіди і

нуклеїнові кислоти, перешкоджаючи проростанню пилку і подовженню пилкової трубки [8]. На поверхні ПЗ є пори, які вивільняють білки. У результаті дії факторів забруднення, кількість і якість випущених білків зазнають значних змін. Більшість білків, що виділяються – протеолітичні білки, які при зміні концентрацій подразнюють слизову оболонку, з якою вони контактують, ініціюючи алергічні реакції. Це пояснює, чому багато видів рослин, які не були настільки алергенними або просто злегка алергенними в минулому, стали сильно алергенними в останні десятиліття, викликаючи алергію на пилок серед чутливих осіб [237]. Пилок із забруднених зон вивільняє більшу кількість білків, які є алергенними [238].

Забруднення повітря викликає накопичення флавоноїдів в значно високих кількостях в забруднених ПЗ [219]. Захисні реакції можуть включати в себе збільшення антиоксидантних ферментів та метаболітів.

### **в) Генетичні зміни**

Пилок видів, що зростають у забрудненому НПС, змінений на рівні генетичного матеріалу. Згідно з науковими дослідженнями, мутації відбуваються на рівні генів, які кодують структуру та орнамент екзини таким чином, яким вони забезпечують життєздатність пилку і виконання репродуктивної функції в модифікованих умовах НПС [237]. Екозабруднювачі впливають на генетичний апарат пилку, збільшуючи час його життєздатності [18, 19]. Збільшення часу життєздатності пилку алергенних рослин означає зростання випадків захворюваності на поліноз. На генотипічному рівні внаслідок порушень мейозу і цитокінезу при спорогенезі і гаметофітогенезі значно підвищується різноманітність генотипів зародків [22, 229].

Отже, пилок є носієм генетичної інформації і від рівня його пристосування до дії факторів середовища залежить майбутнє популяції даного виду. Ступінь мінливості мікрогаметофіта може бути пов'язана як з генотипічними особливостями рослини (мутації, гени-модифікатори, різна швидкість розвитку тощо), так і з умовами зовнішнього середовища (природно-кліматичними, антропогенними). Проте до цих пір недостатньо вивчені

трансформація забруднюючих речовин в різних структурах і на різних стадіях життєвого циклу, проникність тканин спорофіту і гаметофіту, роль інтенсивності і тривалості негативного впливу у появі аномалій [22]. Визначити конкретний негативний фактор як причину появи аномалій в репродуктивній сфері часто виявляється нелегко через тривалість репродуктивного процесу і віддаленої в часі реакції структур, що розвиваються, на багатofакторний вплив.

### *Підсумок до огляду літератури*

Отже, вищенаведені дані свідчать про наступне:

1. ББ – традиційний, економічно та екологічно перспективний вид як в Україні, так і в ряді європейських країн. Різносторонні характеристики рослинного пилку роблять його об'єктом активного дослідження і використання в ряді галузей – палінології, систематиці, генетиці та селекції, лісівництві, бджільництві, екології, аеробіології, медицині, алергодіагностиці, харчовій промисловості, криміналістиці.

2. Пилок як структурна та функціональна одиниця, враховуючи природні особливості, є універсальним показником екологічного стану НПС. Природно-кліматичні фактори та їх зміни впливають на процеси формування пилку, ініціюють його вихід, розповсюдження, стимулюють звільнення алергенів. Антропогенні фактори, у вигляді повітряних забруднюючих речовин від промислових та транспортних викидів, взаємодіють з пилом рослин, викликаючи зміну онтогенезу, морфології і фізіології зерен пилку, і на поверхні і в межах протоплазми.

3. Своє реагування на екологічні фактори ПЗ демонструють від морфо-фізіологічних змін, помітних при додаткових дослідженнях, до провокування алергічних реакцій у чутливих осіб, кількість яких зростає.

4. Лише екологічний підхід допоможе зрозуміти і конкретизувати вплив факторів НПС на нормальні і патологічні процеси в ПЗ до виходу зерен у навколишнє середовище, вплив яких на людський організм виключити неможливо.

## РОЗДІЛ II

### ОРГАНІЗАЦІЯ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Організація та стратегія дослідження

Стратегію вирішення завдання дисертаційної роботи наведено на узагальнюючій схемі (рис. 2.1).

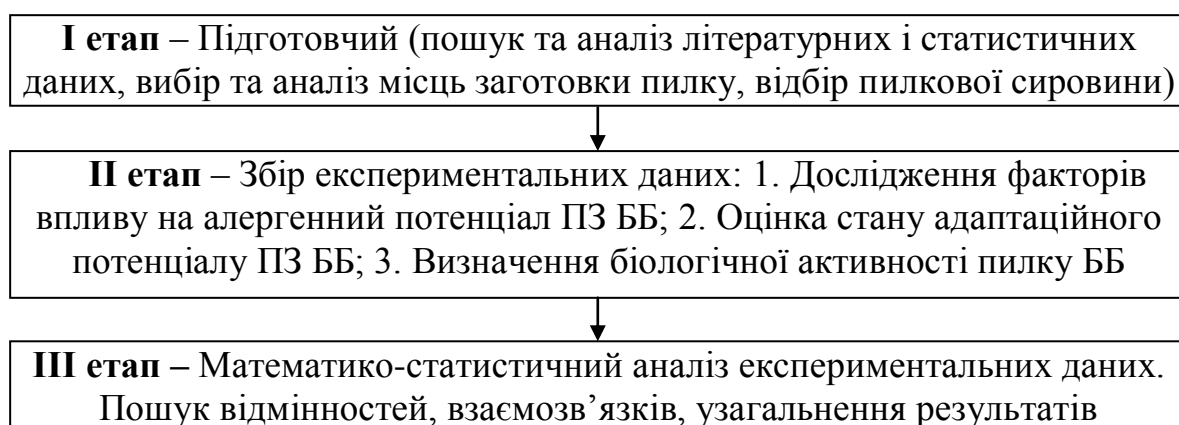


Рис. 2.1 Узагальнююча стратегія вирішення завдання дисертаційної роботи

**Вибір місць заготовки пилку ББ** був першим етапом дослідження і ґрунтувався на підборі різних природних умов зростання дерев (різні природні зони; місто, селище міського типу, село; паркова, лісова зона, територія природного музею, ботанічний сад; житловий масив, автомобільна траса, територія аеродрому, близькість розташування атомної електростанції) та антропогенного на них навантаження, а також враховувався фактор доступності для можливості відбору зразків пилку протягом періоду цвітіння ББ. Також доцільним було порівняння зразків пилку ББ з відносно віддалених регіонів. З цією метою порівнювались зразки пилку ББ з різних областей України (Київська та Рівненська) та з різних країн – Україна та Словачка республіка.

Всього було сформовано 7 зразків пилку ББ на території України в Київській та Рівненській областях (BV1, BV2a, BV2b, BV3, BV4, BV5, BV6) (рис. 2.2) та 3 зразки пилку на території Словачкої республіки (BV7, BV8, BV9) (рис. 2.3). В Україні зразки пилку ББ було заготовлено з 18 по 24 квітня 2011 року, у Словаччині – з 15 по 19 квітня 2013 року.

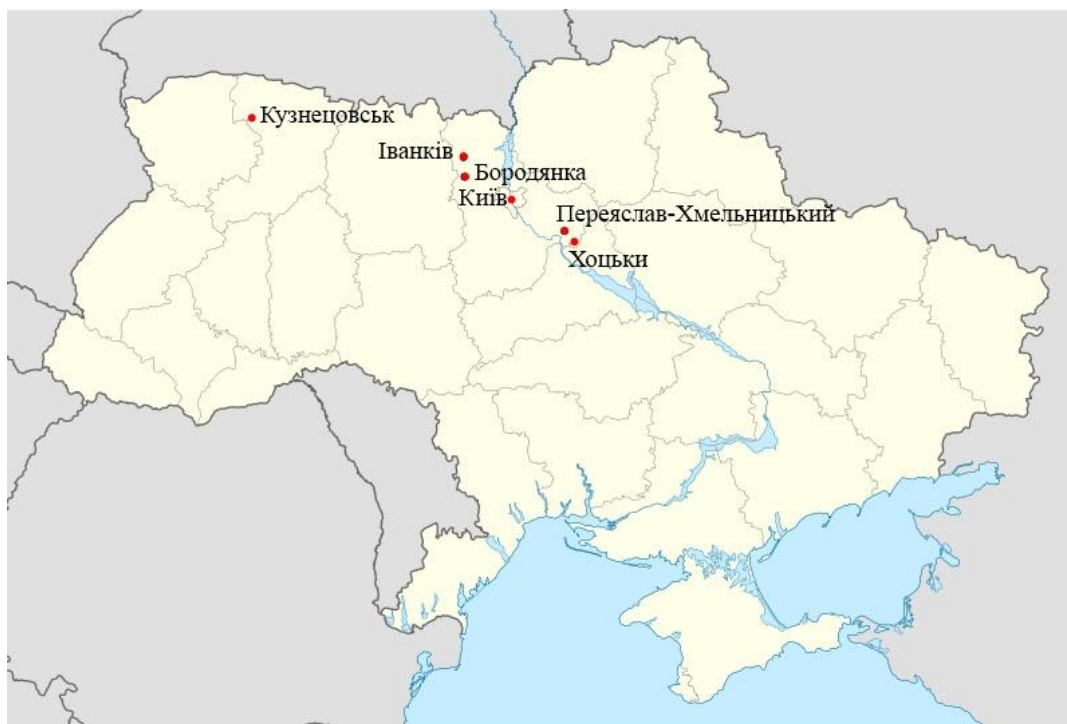


Рис. 2.2 Місця заготовки пилку *Betula verrucosa* Ehrh. на території України



Рис. 2.3 Місце заготовки пилку *Betula verrucosa* Ehrh. на території Словацької республіки

Умови зростання рослин, залежно від населеного пункту, були наступними:

BV1 – м. Київ (пилок зібрано з беріз, що зростають в парковій зоні «Відродний» та неподалік від нього);

BV2a і BV2b – м. Переяслав-Хмельницький Київської обл., розташоване на відстані 112 км на південний захід м. Київ (зразок BV2a заготовлено на



території житлового масиву поблизу автомобільних доріг; зразок BV2b заготовлено на території Музею народної архітектури та побуту під відкритим небом як контрольний). Музей народної архітектури та побуту розташований поблизу заповідної території міста [239];

BV3 – с. Хоцьки Київської обл., розташоване на відстані 120 км на південний захід від м. Київ (пиллок зібрано з беріз, що ростуть на окремих галявинах серед лісу; також вважали контрольним зразком);

BV4 – смт. Іванків Київської обл., що відноситься до III зони, що зазнала радіоактивного забруднення після Чорнобильської катастрофи [240], і знаходиться на відстані 80 км на північний захід від м. Київ (пиллок зібрано з беріз, що ростуть біля автомобільних доріг і житлових будинків);

BV5 – м. Кузнецовськ Рівненської обл., що відноситься до IV чорнобильської зони і розташоване на відстані 339 км на пн. захід від м. Київ (пиллок зібрано з беріз, що ростуть біля лісу, але поблизу автомобільних доріг). На території міста функціонує Рівненська атомна електростанція. Відстань від РАЕС до місць заготовки пилку становить приблизно 6 км.

BV6 – аеродром «Бородянка» 2 км на північ від смт. Бородянка Київської обл., що також відноситься до IV чорнобильської зони, розташоване на відстані 30 км на північний-захід м. Київ (пиллок зібрано з беріз, що ростуть біля аеродрому);

Словацькі зразки пилку ББ цілеспрямовано заготовлено на території одного міста – м. Нітра, Нітранський край, Словаччина:

BV7 – пиллок зібрано з берези, що росте біля автомобільної дороги;

BV8 – пиллок зібрано з берези, що росте на території Ботанічного саду САУ;

BV9 – пиллок зібрано з беріз, що ростуть на території жилого масиву поблизу автомобільних доріг (табл. 2.2).

Різні місця зростання обраних дерев ББ об'єднали в 4 групи для представлення різних типів зелених насаджень, що характерні для України та Словаччини: паркові насадження (в групу віднесли зразки пилку BV1, BV2b,

BV8), лісові насадження – BV3, придорожні насадження – BV2a, BV4, BV5, BV7, BV9, насадження спеціального призначення – BV6.

В табл. 2.1 також наведено географічні координати населених пунктів – місць збору пилку ББ.

Таблиця 2.1

Топографічні дані місць заготовки пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Населений пункт	Зразки пилку	Висота, м	Широта	Довгота	Дата збору	Кількість дерев
Київ	BV1	105	50°26'	30°33'	18, 20, 22.04.11	15
Переяслав-Хмельницький	BV2a	92	50°03'	31°26'	21.04.11	3
	BV2b					4
Хоцьки	BV3	127	49°54'	31°38'	21.04.11	4
Іванків	BV4	134	50°55'	29°54'	24.04.11	13
Кузнецовськ	BV5	168	51°20'	25°51'	19.04.11	10
Бородянка	BV6	137	50°38'	29°55'	22.04.11	3
Нітра	BV7	167	48° 18'	18° 50'	19.04.13	1
	BV8	144	48°19'	18°06'	18.04.13	1
	BV9	167	48° 18'	18° 50'	15, 18, 19.04.13	8

Примітка: Джерело даних для українських населених пунктів – [weather.in.ua](http://weather.in.ua); для м. Нітра – <http://www.nisys.sk/>, <http://www.bz.uniag.sk>

Дані щодо основних видів, методів та обсягу досліджень наведено в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Основні види, методи та обсяг проведених досліджень

Методи досліджень	Показники та методики досліджень	Кількість досліджень
<b>Відбір пилкової сировини, збір статистичних даних</b>		
Відбір пилкової сировини	Проведення фенологічних спостережень у м. Київ (2010-2012), м. Переяслав-Хмельницький (2010-2011), с. Хоцьки (2011), смт. Іванків (2011), м. Кузнецовськ (2010-2012), біля смт. Бородянка (2011), м. Нітра (2013)	23 виїзди, 93 операції
Аналіз екологічного стану та метеоданих пунктів відбору ПЗ	Інформаційні запити до Міністерства екології та природних ресурсів України, Українського гідрометеорологічного центру та Словацького гідрометеорологічного інституту	8

<b>Дослідження властивостей пилку ББ</b>		
Молекулярний аналіз пилку	Визначення рівня експресії Bet v 1 методом ПЛР в реальному часі (наважка $1 \cdot 10^{-6}$ г). Контроль – зразок з лісової місцевості (BV3).	10
Фізико-хімічний аналіз пилку	Визначення вмісту Cd, Pb, Hg, Cr, As, Ni, Se, Co методом атомно-абсорбційної спектрометрії: електротермічної, з генерацією гідридів. Для аналізу узято по одному зразку пилку з кожної групи зелених насаджень (BV1, BV3, BV6, BV9). Наважки пилку – As, Hg – 1 г, інші – 5 г.	32
	Структурний аналіз пилку методами вібраційної спектроскопії: інфрачервоної (ІЧС) Фур'є і Раман. Наважка пилку – $\sim 0,001$ г.	20
	Визначення складу ЖК ліпідів методом газорідинної хроматографії. Наважка пилку – 0,5 г.	80
	Фотоелектроколориметричне визначення вмісту флавоноїдних сполук згідно ДСТУ 3127-95. Наважка пилку – 0,2 г.	9
	Колориметричне визначення ЗАА водних, метанолових, етанолових екстрактів пилку з використанням стабільного радикала ДФПГ. Наважка пилку – 5 г для кожного екстракту.	135
Мікро-біологічний аналіз пилку	Визначення ентеробактерій, аеробних та анаеробних бактерій, грибів, дріжджів методом розведення та посіву на відповідні поживні середовища. Наважка пилку – 1 г для кожного аналізу.	150
	Визначення мікотоксинів методом рідинної хроматографії (ВЕРХ) з флуоресцентним детектором для зразків BV1, BV3, BV4, BV9. Наважка пилку – 10 г.	56
	Встановлення антимікробної активності (АМА) водних (0,1%) та водно-сольових екстрактів до патогенних бактерій, мікроскопічних грибів, дріжджів (в цілому проти 11 видів мікроорганізмів). Наважка пилку – 0,001 г.	188
Біохімічний аналіз пилку	Визначення загального вмісту білків методом К'ельдаля. Наважка пилку – 1 г.	30
	Визначення АК титриметричним методом. Наважка пилку – 0,5 г.	20

Продовження табл. 2.2

Імунологічний аналіз пилку	Оцінка імунологічної активності водно-сольових екстрактів пилку методами НСТ-тесту та фагоцитозу. Наважка пилку – 0,0002 г для кожного аналізу.	72
Морфометричний аналіз ПЗ	Фотодокументування ПЗ за допомогою СЕМ Zeiss Evo LS 15 при збільшеннях від 1000 до 10000 разів.	268 мікрофото
	Вимірювання довжини полярної осі, екваторіального діаметру, внутрішньої ширини апертури, кута розташування апертури до контуру ПЗ, довжини ребра апопоріального поля за допомогою програми Axio Vision 40.	3000 вимірювань
Математико-статистичний аналіз та узагальнення даних	Аналіз метеоданих та показників забруднення повітря	98
	Описова статистика, кореляційний, дисперсійний, кластерний аналізи, простий та множинний регресійний аналіз, тест відмінностей середніх; пошук взаємозв'язків, узагальнення результатів.	~ 1227 операцій
Всього	23 виїзди, ~ 72 відбори пилкових зразків, ~ 21 операція підготовки пилку до аналізів, 5135 досліджень	

**Процес заготовки пилку ББ** має свої особливості. Пилок ББ виділяється рясно. Оптимальним часом для його збору є переддень цвітіння, а також ранкові години. Сигналом для збору є зовнішній вигляд сережок, які протягом дозрівання змінюються від стоячих твердих коротких темно-коричневих до висячих м'яких довших світло-жовтих. Світло-жовтий колір свідчить про дозрівання пилку – яскравого світло-жовтого. Крім того, під час цвітіння ББ починають розпускатися листочки і з'являються жіночі сережки. Для збору пилку сережки зривали у паперові пакети, пластикові пакети, що герметично закриваються та скляні банки. У літературі зустрічаються інші способи заготовки пилку, наприклад, зрізання гілок з сережками або на квітучі гілки надягають пластикові пакети і стукають по них палицею. Зібраний пилок просіюють через сито і тонким шаром сушать на папері. Нами було обрано найбезпечніший для дерева метод збору.

В той же день сережки ББ розкладали в теплому приміщенні не під прямим сонячним світлом на папері. Для вибору найкращого типу паперу, провели додаткове дослідження. Аналізували звичайний білий папір формату А4, фотопапір, тонкий папір та крафт-папір – високоміцний обгортковий папір, зручний для зберігання сипких речовин, рекомендований А. Кайясом для сушіння пилку-обніжки [244]. Виявилося, що для сушіння і збору пилку ББ оптимальним є папір з гладкою поверхнею і не дуже цупкий. Тому використовували конверти із крафт-паперу.

Уже на наступний день після збору сережок пилок висипався на поверхню. Висипання пилку залежить від ступеня стиглості сережки. Для максимального збору пилку з сережок, кожену додатково струшували в скляну банку. Робота дуже клопітка і потребує витримки. Процес прискорить наявність сит з отворами пор 30-40 мікрон. Після струшування зразки пилку поміщали в морозильну камеру з температурою -20 °С. Пилок рекомендується зберігати в герметично закритих скляних ємностях або пластикових пакетах для харчових продуктів, що і було зроблено [146].

Правильний збір, сушіння та зберігання пилку впливають на його мікробіологічну та біологічну якість при подальшому зберіганні.

При заготовленні пилку ББ було відмічено, що береза цвіте всього лише декілька днів, тому головне – не втратити момент. В один і той же час даний вид берези цвіте по-різному в залежності від місця зростання. На сонячному місці сережки беріз дозрівають швидше. Навіть берези, які ростуть не далеко одна біля одної цвітуть у різний час. На лісових полянах берези зростають близько одна біля одної, тому вони високі і сережки розміщені на верхівках.

Аналіз місць заготовки пилку, а саме характеристика клімато-географічних умов, рослинності, ситуації щодо АЗ населення досліджуваних регіонів, екологічного стану та метеоумов в роки досліджень наведено у додатку Б.

## 2.2. Методи дослідження

### 2.2.1. Визначення рівня експресії гена Bet v 1 в пилку

Мета дослідження в тому, щоб визначити відносну кількість алергенного білка ББ Bet v 1 в зразках пилку з різних місць зростання на території України та Словаччини за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі з використанням барвника SYBR GREEN. Також необхідно було підібрати ідеальний ген контролю для нормування, оскільки немає одного гена, який би залишався в незмінній формі незалежно від умов експерименту, в різних тканинах і типах клітин, на будь-якій стадії розвитку клітин і тканин і незалежно від впливу дослідника на зразок [284, 285].

ПЛР являє собою серію з трьох циклічно повторюваних стадій реакції (15-30 циклів по 1-3 хв):

- 1) теплова денатурація вихідної ДНК при  $\sim 94^{\circ}\text{C}$ ;
- 2) відпал ДНК-затравок (праймерів) при  $\sim 50\text{-}60^{\circ}\text{C}$  на отримані одноланцюгові матриці;
- 3) синтез дволанцюгових ДНК при  $72^{\circ}\text{C}$  з кожним із праймерів назустріч один одному на протилежних ланцюгах ДНК.

Реакцію проводять в спеціальному приладі – термоциклері, або ампліфікаторі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання пробірок. По завершенні кожного циклу кількість синтезованого продукту подвоюється і відбувається збільшення кількості вихідних копій ДНК в геометричній прогресії. В якості праймерів використовуються короткі (15-25 нуклеотидних основ) одноланцюгові ДНК – олігонуклеотиди, комплементарні кінцям цільового фрагмента ДНК. Найважливішим компонентом ПЛР є термостабільні ДНК-полімерази, здатні зберігати активність протягом всієї реакції ПЛР, незважаючи на вплив високих температур на стадії теплової денатурації ДНК [145].

**Процес підготовки РНК.** Загальна РНК із зразків пилку ББ була екстрагована за допомогою набору GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit (Fermentas) відповідно до рекомендацій заводу-виробника. Якість РНК та концентрація були визначені спектрофотометрично. Зворотну транскрипцію виконували з використанням Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit для кількісної ПЛР зі зворотною транскрипцією (Fermentas, Leon-Rot, Німеччина), використовуючи 1000 нг загальної РНК виділеної з пилку, відповідно до рекомендацій заводу-виробника та з температурою і часом, зазначеними у протоколі.

Праймери для ПЛР у реальному часі були підібрані на основі послідовностей мРНК гена *Bet v 1* і трьох генів «домашнього господарства» – альфа-тубуліну, циклофіліну і фактора транскрипції CBF1. Всі вони перераховані в базах даних NCBI під інвентарним номером (табл. 2.3). Праймери були розроблені з використанням інструменту для пошуку специфічних праймерів Primer-Blast [286]. Послідовності праймерів, які використовували в аналізі ПЛР у реальному часі, також перераховано в табл. 2.3.

Для оптимізації умов ПЛР для кожного праймера були розглянуті температура відпалу та стандартна крива ефективності ПЛР. Специфічність ПЛР ампліфікації була перевірена за допомогою аналізу кривої плавлення.

Таблиця 2.3

## Послідовності використаних праймерів

Назва праймера	Послідовності праймерів
Tub-Bet-R	CAGAACCAGTGCCTCCACCA
Tub-Bet-F	CTGCCAACAACCTTTGCCCGT
Transcr-Bet-R	AGGGTGGAGGCAAGAGCATC
Transcr-Bet-F	TGCGGAGTCTAAGGCTGTGG
Cycloph-Bet-R	TGCCGGGGCCGGTGTGCTTC
Cycloph-Bet-F	GCCGCTCCGGCAAGCCCCTC
BetV1-R	CTCCATCAGGGGTTGCCACT
BetV1-F	ATGGAGGGCCTGGAACCATT

**Процедура ПЛР у реальному часі та обробка даних.** Всі реакції проводили в установці Biorad CFX96 (Братислава, Словаччина). Для отримання необхідної кількості продукту незалежно один від одного були оптимізовані концентрації праймерів. Потім було розраховано ефективність ампліфікації для кожної оптимізованої пари праймерів з використанням 2-кратних серій розведення. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master mix (2X) (Fermentas), 0,2  $\mu$ M кожного праймера і 400 нг транскрибованої кДНК. Аналіз ПЛР у реальному часі проводили в об'ємі 15 мкл. Використовували наступні температурні та часові умови: початковий крок денатурації за температури 95 °C протягом 10 хв, 40 циклів за температури 95 °C протягом 15 с, за температури 60 °C протягом 30 с і за температури 72 °C протягом 40 с. Флуоресценцію спостерігали за температури 60 °C протягом кожного циклу. В результаті криві плавлення були визначені для кожної реакції для гарантування, що окремі продукти були вироблені. Підсумкову реакцію проводили на 1,8 % агарозному гелі, щоб підтвердити, що продукт унікальний і правильного розміру. Було проведено три повторності кількісної ПЛР у реальному часі. Потім було проведено кількісне визначення алергену Bet v 1 відповідно до методу Pfaffl [287]. В результаті аналізу алерген було унормовано по відношенню до метаболічного гену циклофіліну і порівняно з експресією одного і того ж гену алергена зразка пилку BV3 (с. Хоцьки), який було обрано в якості калібратора. Лише циклофілін забезпечив гарний конститутивний контроль, в той час як для альфа-тубуліну і фактора транскрипції CBF1 спостерігали значні варіювання в рівнях їх експресії.

### **2.2.2. Визначення вмісту важких металів у пилку**

ВМ – один із стресових факторів для рослини. Їх вміст в ПЗ – показник рівня забруднення в місці зростання популяцій ББ і фактор розвитку алергенного потенціалу пилку. З метою оцінки потенційних алергенних



властивостей зразки пилку ББ було проаналізовано на вміст Cd, Pb, Hg, Cr, As, Ni, Se, Co. Вищеперераховані метали віднесли до важких на основі робіт Л. І. Танащук, М. М. Біланич, Е. А. Валетовой, И. В. Анциферовой [288-291].

Вміст ВМ у зразках березового пилку визначали в екологічній лабораторії EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves, Словаччина за допомогою різновидів атомно-абсорбційної спектроскопії: електротермічної, з генерацією гідридів. Атомно-абсорбційна спектроскопія ґрунтується на вимірюванні поглинання резонансного випромінювання вільними атомами, що знаходяться в газовій фазі, за відносно короткий час [292]. Визначення невідомої концентрації ВМ базується на порівнянні інтенсивностей спектральних ліній у спектрах проб і стандартних зразків. Для цього готується серія стандартів, в яких вміст елемента, що визначається охоплює весь діапазон очікуваних концентрацій елемента в пробі. Потім будується графік залежності інтенсивності ліній у спектрах атома (або іона) елемента, що визначається від його концентрації в стандартах. Невідома концентрація визначається на основі вимірної інтенсивності в спектрі проби інтерполяцією за градуювальним графіком. Серед переваг атомно-абсорбційного елементного аналізу – висока селективність, низька межа виявлення, задовільна відтворюваність результатів. Результати представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення.

### 2.2.3. Визначення мікробіологічної якості пилку

Мікроорганізми та продукти їх метаболізму на ПЗ – одна із причин алергічних та імунотоксичних реакцій людського організму. Згідно з мікробіологічними критеріями якості пилку, контролюються такі показники як кількість ентеробактерій, загальна кількість аеробних бактерій, загальна кількість анаеробних бактерій, *Salmonella* та *Staphylococcus aureus*, які є факультативними анаеробами, мікроскопічні гриби та дріжджі [168]. Тому на ці показники був спрямований мікробіологічний аналіз. Вміст *Salmonella* та *Staphylococcus aureus* визначали як загальну кількість анаеробних бактерій.

Концентрацію мікроорганізмів в зразках пилку визначали методом розведення та посіву на відповідні поживні середовища. Пилок кожного зразка у кількості 1 г поміщали у ємність з  $99 \text{ см}^3$  0,85 % хлориду натрію (розведення  $10^{-2}$ ) і механічно перемішували протягом 30 хв. Після енергійного перемішування були зроблені десятикратні серійні розведення до концентрації  $10^{-3}$ , додаванням  $1 \text{ см}^3$  суспензії концентрації  $10^{-2}$  до  $9 \text{ см}^3$  0,85 % хлориду натрію. Один сантиметр кубічний суспензії у двох концентраціях в трикратній повторності було висіяно на відповідні поживні середовища для виявлення ентеробактерій, мезофільних аеробних та анаеробних бактерій, мікроскопічних грибів та дріжджів. Підрахунок колоній представників родини *Enterobacteriaceae* проводили через одну добу росту на середовищі Ендо (Pronadisa, Іспанія) за температури 37 °C, представників анаеробних бактерій – через 36 год за температури 37 °C на агарі для анаеробів (Imuna, Словаччина), мезофільних аеробних бактерій – через 48 год за температури 30 °C на середовищі GTK (глюкозо-триптонно-дріжджовий агар, (Imuna, Словаччина)), колонії грибів та дріжджів – через 5-7 діб за температури 25 °C на агарі Сабуро (Biomark Laboratories, Індія).

Колонії грибів були ізольовані та ідентифіковані на рівні роду згідно з «Dictionary of the Fungi» [204]. Результати представлені як логарифм (log) числа колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1 г пилку. В КУО/г результати представлені для порівняння з існуючими нормами.

Для виявлення достовірних відмінностей між середніми значеннями застосовували тест Тьюкі ( $p \leq 0,05$ ), який дозволяє порівняти середні значення і об'єднати зразки в групи з достовірними відмінностями.

Поводження з пилковою сировиною має бути належним, у протилежному випадку утворюються мікотоксини. Мікотоксини в зразках пилку визначали в екологічній лабораторії EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves, Словаччина методом ВЕРХ з флуоресцентним детектором. ВЕРХ є варіантом колонкової рідинної хроматографії, в якому рухома фаза – елюент – проходить через сорбент, що заповнює колонку, з великою швидкістю за рахунок значного тиску на вході в

колонку. Перевагою ВЕРХ перед іншими методами є її універсальність і об'єктивність. ВЕРХ зараз є основним методом кількісного визначення в фармакопеї США, широко застосовується в Європейській, Британській, Німецькій фармакопеях і, в перспективі, може витіснити всі інші методи аналізу [293]. Флуоресцентний детектор більш чутливий до мікотоксинів і визначення є більш специфічним [294, 295]. Аналіз полягає в пробопідготовці, що включає екстракцію мікотоксину (метанол, ацетонітрил, вода) та очищення екстракту (на імуноферментних колонках, колонках з певним сорбентом). Залежно від класу мікотоксину хроматографічне розділення відрізняється підбором адсорбенту, рухомої фази, довжини хвилі збудження та детектування [295, 296].

Результати представлені в мкг/кг як середнє  $\pm$  стандартне відхилення.

#### **2.2.4. Визначення біохімічних складових пилку (загальна структура, загальні білки, жирнокислотний склад загальних ліпідів, аскорбінова кислота, флавоноїдні сполуки)**

**Визначення загальної структури пилку.** Ідентифікація біологічно активних речовин є першочерговим завданням для оцінки БА біооб'єкту. Для загального уявлення про спектр біохімічних сполук анемофільного пилку ББ було проведено попередній аналіз за допомогою методів вібраційної спектроскопії – ІЧС-Фур'є та Раман-спектроскопії (спектроскопії комбінаційного розсіювання). В основі ІЧС – взаємодія речовини з електромагнітним випромінюванням в ІЧ діапазоні. Для ідентифікації та визначення хімічної структури першорядне значення має середня інфрачервона область ( $4000-400\text{ см}^{-1}$ ). ІЧС-Фур'є, як і Раман, надають інформацію про коливальний рух молекул і базуються на параметрах, які характеризують первинну структуру молекули. Дані методи не вимагають спеціальної підготовки зразка і виключають фактори, що призводять до спотворення результатів (хімічне або термічне розкладання, втрата інгредієнтів під час

підготовки та екстракції і т.д.). Обидва методи забезпечують додаткову інформацію про структуру біологічного зразка, а отже, є взаємодоповнюючими. Вони були успішно застосовані для ідентифікації алергенного пилку та квіткового пилку 20 медоносних рослин [148, 161, 162, 165].

ІЧ-Фур'є-спектри окремих зразків пилку вимірювали на ІЧ-спектрометрі Nicolet 6700, а Раман-спектри – на ІЧ Раман спектрометрі Nicolet NXR (Thermo Fischer Scientific, USA), програмне забезпечення Omnic 7.0 (Thermo Fischer Scientific, США). ІЧ-Фур'є-спектри були виміряні в спеціальній таблетці зі зразка пилку та KBr (Merck, Німеччина) у співвідношенні 1:10 в діапазоні довжини хвилі  $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$  з роздільною здатністю  $2\text{ см}^{-1}$  і числом сканувань 64. Для Раман-спектрів не потрібна спеціальна обробка пилку. Діапазон довжини хвилі  $4000\text{--}200\text{ см}^{-1}$ , роздільна здатність –  $4\text{ см}^{-1}$ , число сканувань – 500-3000. Потім усі спектри експортувалися у форматі електронної таблиці для подальшої обробки програмним забезпеченням Origin 6.0 (Microcal Origin, США) і Excel 2007 (Microsoft, США). Спектри були згладжені використанням FFT та Adjacent Averaging фільтрів, 5-10 пунктів. Здійснювалася корекція базової лінії і нормалізація значень інтенсивності за найбільш значимим піком.

**Визначення загального вмісту білків.** Загальний вміст білків в зразках пилку ББ було досліджено з метою оцінки антистресового механізму та адаптивного потенціалу. Аналіз проводили в екологічній лабораторії EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves, Словаччина. Вміст білків визначали за загальноприйнятим методом К'ельдаля [297], який базується на принципі мінералізації азотистих сполук та зв'язування аміаку в сульфат амонію [298]. Дотепер метод К'ельдаля залишається єдиним загальновизнаним арбітражним методом визначення білка і найчастіше використовується в якості еталонного для калібрування і настроювання інших методик аналізу сировини і готової продукції.

Основні етапи аналізу: добір і підготовка проб, мокре озолення, відгін з парою і визначення концентрації амонію (фотометрично або титриметрично). Виділення азоту проводиться шляхом мінералізації (спалювання) маси наважки

проби сірчаною кислотою у присутності каталізатора (сірчаноокислої міді, перекису водню, селену тощо). При цьому всі органічні речовини окиснюються киснем, який утворюється під час розпаду сірчаного ангідриду, що виділився. При спалюванні маси наважки виділяється аміак, який зв'язується надлишком сірчаної кислоти з утворенням сірчаноокислого амонію. Під впливом концентрованого розчину гідроксиду натрію із сірчаноокислого амонію виділяється аміак. У присутності надлишку розчину гідроксиду натрію аміак переганяють у титрований розчин сірчаної кислоти і по масі, яка зв'язалася з аміаком сірчаної кислоти, визначають масову частку загального азоту в масі наважки. Після визначення масової частки загального азоту в масі наважки визначають масову частку сирого білка.

Для визначення у продуктах масової частки сирого білка отриману масову частку загального азоту у відсотках множать на відповідний коефіцієнт. У зв'язку з тим, що масова частка азоту в білку різних продуктів є неоднаковою, то коефіцієнт переліку азоту на білок також різний [299].

Результати представлені у відсотках як середнє  $\pm$  стандартне відхилення при рівні значущості  $p < 0,05$ . Порівняння вмісту білка між зразками було проведено за допомогою  $\phi$ -критерію кутового перетворення Фішера, який розраховували за формулою:

$$\phi = (\phi_1 - \phi_2) * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}}, \phi = 2 * \arcsin(\sqrt{\rho}),$$

де  $\rho$  – це процентна частка, виражена в частках одиниці

Цей метод використовується для порівняння двох процентних часток, при аналізі якісних даних, не великому обсязі вибірок [300, 301], що задовольняє наш випадок.

**Визначення жирнокислотного складу загальних ліпідів.** Зміни в ліпідному складі мембран – один із антистресових адаптаційних механізмів. З цією метою і було досліджено жирнокислотний склад ліпідів зразків пилку ББ методом газорідинної хроматографії [302]. Метод обрано на основі аналізу літературних джерел [176, 303-305].

Наважку пилку ББ кількістю 0,3-0,5 г переносили до мірної пробірки об'ємом 10 см<sup>3</sup> і заливали екстрагуючою сумішшю.

Загальні ліпіди тканин екстрагували 5 см<sup>3</sup> хлороформ-метаноловою сумішшю у співвідношенні 2:1 і витримували 30 хв у холодильнику. Для кращого розподілу фаз додавали 1 см<sup>3</sup> дистильованої води. Далі відбирали хлороформну нижню фазу піпеткою Пастера. Для повної реакції етап екстракції повторювали двічі. Об'єднані хлороформні екстракти концентрували випарюванням до об'єму однієї краплі під струменем газоподібного азоту при температурі 45 °С на водяній бані.

Для проведення гідролізу та метилювання вищих ЖК ліпідів тканин до сухого осаду ліпідів додавали 5 см<sup>3</sup> 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метанолі. Розчин переносили до скляної ампули ємністю 10 см<sup>3</sup>. Після запаювання проводили гідроліз і метилювання в термостаті за температури 85 °С протягом 20 хв.

Екстракцію етильованих ЖК проводили двічі гексан-ефірною сумішшю у співвідношенні 1:1 у кількості 5 см<sup>3</sup>. Для розподілу фаз додавали 1 см<sup>3</sup> дистильованої води. Відбирали верхню фазу піпеткою Пастера. Об'єднані екстракти упарювали досуха в потоці азоту за температури 45 °С на водяній бані. Сухий осад розчиняли в 40-50 мкл чистого гексану і вводили у випарювач хроматографа у кількості 5 мкл.

Газохроматографічний аналіз спектру ЖК ліпідів здійснювали на газовому хроматографі серії «Цвет-500» в ізотермічному режимі із полум'яно-іонізуючим детектором при наступних умовах: для визначення спектру ЖК ліпідів використовували скляну колонку (розміри 3,0 м x 0,3 см), заповнену фазою 5%-го поліетиленгліколь сукцинату на хромотоні N-AW-HMDS (зернування 0,125-0,160 мм), температура колонки – 190 °С, температура випарювача – 250 °С, затрати азоту та водню – 35 мл/хв, затрати повітря – 200 мм/год, швидкість діаграмної стрічки – 240 мм/год, чутливість шкали підсилювача – 10<sup>-7</sup> А, об'єм проби, що вводили – 5,0-8,0 мкл, тривалість аналізу – 30 хв.

Чутливість газорідинної хроматографії – 10<sup>-10</sup> А.

Кількісну оцінку спектру ЖК ліпідів проводили методом нормування шляхом вимірювання площі піків етильованих похідних ЖК та визначення їх складу у відсотках (%). Похибка визначення становила  $\pm 10,0\%$ .

Порівняння вмісту ЖК ліпідів між зразками було проведено за допомогою  $\varphi$ -критерію кутового перетворення Фішера, який розраховували за формулою:

$$\varphi = (\varphi_1 - \varphi_2) * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}}, \varphi = 2 * \arcsin(\sqrt{\rho}),$$

де  $\rho$  – це процентна частка, виражена в частках одиниці.

**Визначення вмісту аскорбінової кислоти.** Визначення вмісту вітамінів – один із біологічних параметрів оцінки БА пилку [146]. Необхідність визначення вмісту АК ( $C_6H_8O_6$ ) в березовому пилку обумовлена її визнаними антиоксидантними властивостями [306]. Як відомо, антирадикальний захист організму – один із антистресових адаптаційних механізмів. Крім того, АК бере участь в окисно-відновних процесах, активує синтез та функціональну здатність багатьох ферментів, онкопротектор, відіграє роль в імунній функції. Природні комплекси вітаміну захищають від алергії та лікують деякі її форми, беруть участь у виробленні окремих субстанцій нервових трансмітерів, гормонів, синтезі карнітину, абсорбції та утилізації деяких харчових субстанцій [306]. АК може прискорювати руйнування гістаміну – посередника алергії та простудних захворювань [307]. Тому цей компонент було обрано для аналізу.

АК в пилку визначали методом відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу, який в лужному середовищі має синє забарвлення, в кислому – червоне, а при відновленні обезбарвлюється [308]. Для готування екстракту наважку проби масою 0,5 г зважували з погрішністю  $\pm 0,01$  г. У якості екстрагуючого розчину використовували розчин хлороводневої кислоти з масовою часткою 2% у кількості 10  $cm^3$ . Розчин механічно перемішували протягом 30 хв і фільтрували. Об'єм відфільтрованого екстракту фіксували ( $V_3$ ). Отримані екстракти відразу ж використовували для титрування. У колбу місткістю 50  $cm^3$  піпеткою вносили 1  $cm^3$  отриманого екстракту ( $V_4$ ), додавали 9  $cm^3$  води і титрували розчином

2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію (2,6-ДХФИН) до світло-рожевого кольору, що не зникав протягом 15-20 с. В результаті отримували значення  $V_1$ . Одночасно проводили контрольний дослід на вміст у продукті речовин, що редукують. Для цього в колбу поміщали  $1 \text{ см}^3$  екстракту, додавали рівний йому об'єм ацетатного буферного розчину, розчин формальдегіду в об'ємі, рівному половині об'єму буферного розчину, перемішували і витримували протягом 10 хв, закривши колбу пробкою. Потім вміст титрували розчином 2,6-ДХФИН ( $V_2$ ).

Попередньо встановлювали титр розчину 2,6-ДХФИН за стандартним розчином АК концентрації  $0,1 \text{ мг/см}^3$  у день проведення дослідів. Для цього в дві колби місткістю  $50 \text{ см}^3$ , у які попередньо додали по  $20 \text{ см}^3$  води, вносили піпеткою по  $1 \text{ см}^3$  розчину АК і швидко титрували розчином 2,6-ДХФИН до появи ясно-рожевого забарвлення, що не зникало протягом 15-20 с. Для контрольного дослідів в колбу місткістю  $100 \text{ см}^3$  вносили  $1 \text{ см}^3$  екстрагуючого розчину,  $9 \text{ см}^3$  дистильованої води і титрували розчином 2,6-ДХФИН.

Титр розчину 2,6-ДХФИН в грамах АК, еквівалентному одному кубічному сантиметру розчину 2,6-ДХФИН, обчислювали за формулою:

$$T = \frac{m}{V_1 - V_2},$$

де  $m$  – маса АК, що міститься в  $1 \text{ см}^3$  стандартного розчину, г;

$V_1$  – об'єм розчину 2,6-ДХФИН, витрачений на титрування стандартного розчину АК,  $\text{см}^3$ ;

$V_2$  – об'єм розчину 2,6-ДХФИН, витрачений на контрольний дослід,  $\text{см}^3$ .

Масову частку АК (X) обчислювали за формулою:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T \cdot V_3 \cdot 10}{V_4 \cdot m},$$

де  $V_1$  – об'єм розчину 2,6-ДХФИН, витрачений на титрування екстракту проби,  $\text{см}^3$ ;

$V_2$  – об'єм розчину 2,6-ДХФИН, витрачений на контрольний дослід,  $\text{см}^3$ ;

$T$  – титр розчину 2,6-ДХФИН,  $\text{г/см}^3$ ;



$V_3$  – об’єм екстракту, отриманий при екстрагуванні вітаміну С з наважки продукту,  $\text{см}^3$ ;

$V_4$  – об’єм екстракту, що використаний для титрування,  $\text{см}^3$ ;

$m$  – маса наважки продукту, г.

Визначення проводили у 3-разовій повторності. Математичну обробку результатів здійснювали за загальноприйнятими методиками [309] з використанням програми Excel 2007. Для виявлення наявності достовірних відмінностей у вмісті АК між зразками пилку застосовували непараметричний Н-критерій Краскела-Уолліса, оскільки вибірка складається з невеликої кількості замірів. Для виявлення відмінностей між окремими зразками пилку з різних місць зростання використовували метод Бонфероні, так як він застосовується також при малих кількостях замірів (до  $n=8$ ). Обробку результатів виконували в Statistica 8.1. Результати представлені в  $\text{г}/\text{см}^3$ .

**Визначення вмісту флавоноїдних сполук.** Вміст флавоноїдних сполук у зразках пилку ББ визначали з метою оцінки їх синтезу як протекторних сполук. Аналіз проводили згідно ДСТУ 3127-95 [310]. Наважку пилку у кількості 0,2 г поміщали в хімічний стакан місткістю  $50 \text{ см}^3$ , доливали  $4 \text{ см}^3$  дистильованої води і ретельно перемішували скляною паличкою. До розчину додавали  $20 \text{ см}^3$  ацетону «чда», перемішували і залишали у темному місці на 1 год. Після цього розчин перемішували і фільтрували через паперовий фільтр в конічну колбу місткістю  $100 \text{ см}^3$ . Потім вимірювали оптичну густину одержаного розчину на фотоелектроколориметрі, використовуючи світлофільтр №3 з довжиною хвилі 400 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Кількість флавоноїдних сполук ( $\Phi$ ) у відсотках в пилку, вираховували за формулою:

$$\Phi = \frac{D \cdot 24}{8,37 \cdot a},$$

де  $D$  – оптична густина розчину, що досліджується;

24 – розведення,  $\text{см}^3$ ;

8,37 – коефіцієнт пропорційності оптичної густини і концентрації флавоноїдних сполук за довжини хвилі 400 нм;

а – маса наважки продукту, г.

Вимірювання проводили у 3-разовій повторності. Результати представлені у відсотках як середнє  $\pm$  стандартне відхилення при рівні значущості  $p < 0,05$ . Порівняння вмісту масової частки флавоноїдних сполук між зразками було проведено за допомогою  $F$ -критерію кутового перетворення Фішера.

### **2.2.5. Встановлення біологічної активності пилку (загальна антиоксидантна, антимікробна, імунологічна)**

***Визначення загальної антиоксидантної активності.*** Антиоксидантна активність – один із способів оцінки БА [311-313].

Метод з використанням стабільного радикала ДФПГ $\cdot$  (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил) ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ,  $M=394,33$ ) розглядається як одна з основних методик оцінки антирадикальної активності продуктів бджільництва [148, 314-317]. Саме він і був обраний для нашого дослідження.

Відомо, що ДФПГ здатен від'єднувати атом водню від молекул деяких органічних сполук (ароматичні аміни, феноли, АК та ін.) [318]. При використанні вільного радикалу ДФПГ реєструється передача електронів від антиоксиданту до радикалу, який при цьому змінює своє забарвлення з фіолетового на жовтий, що фіксується спектрофотометрично [319]. Антиоксидантну активність пилку оцінювали за рівнем вільних радикалів, після реакції ДФПГ, розчиненого в метанолі кількістю 0,025 г в 100 см<sup>3</sup>, зі зразком пилку ББ за модифікованою методикою Y.-T. Као [320]. Для приготування екстрактів використовували три розчинники: дистильовану воду кімнатної температури, метанол та 70%-ий етанол. Екстракція пилку покращує антиоксидантну активність [321]. Водні витяжки найбільш часто застосовуються в якості лікарських засобів в народній медицині. Компонентний

склад і властивості сумішей, отриманих з використанням органічних розчинників, вивчені менш детально [322]. Розчинники та їх концентрації були обрані на основі аналізу інформації з літературних джерел.

Метанол, або метиловий спирт ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) – одноатомний спирт, безбарвна рідина зі слабким спиртовим запахом. Гарний розчинник для багатьох органічних речовин. Отруйна речовина, яка діє на нервову і судинну системи людини. Метанол широко застосовується в лабораторній практиці як розчинник для проведення реакцій з полярними органічними речовинами, як розчинник для хроматорграфічного розділення і як реагент для отримання метилових ефірів кислот.

Етанол, або етиловий спирт ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) – одноатомний спирт, прозора безбарвна рухлива, летюча рідина з характерним спиртовим запахом і пекучим смаком. У фармацевтичній промисловості застосовується для виготовлення настоянок, екстрактів і лікарських форм для зовнішнього застосування, як розчинник та допоміжний засіб при виготовленні фармацевтичних препаратів. Спирт-екстрагент має ширший діапазон витягування БАР, ніж вода, причому його здатність екстрагувати залежить від концентрації. При екстрагуванні етанолом концентрацією не менше 70% отримують витяжки, вільні від біополімерів (білків, слизу, пектинів). Також 70% спирт є оптимальним екстрагентом для екстрагування флавоноїдів [308, 323].

Пилок кожного зразку у кількості 5 г розчиняли в  $100\text{ см}^3$  розчинника протягом 2 год перемішуванням на механічній мішалці Kavalier LT-2. Час оптимальної екстракції було підібрано шляхом серії експериментів. Після екстракції та фільтрування екстракту, надосадову рідину у кількості  $0,1\text{ см}^3$  змішували з робочим розчином ДФПГ кількістю  $3,9\text{ см}^3$  і вимірювали кінетику реакції фотоколориметричним методом на спектрофотометрі серії «Genesys 20», модель 4001/4. Метаноловий розчин ДФПГ має інтенсивне фіолетове забарвлення з максимумом поглинання при довжині хвилі 515 нм. В результаті реакції фіолетове забарвлення переходить у світло жовте. Результат фіксували

через 10 хвилин перебігу реакції в темряві. Відсоток ЗАА розраховували за наступною формулою:

$$\% \text{ ЗАА} = [(\text{контроль-зразок})/\text{контроль}] \cdot 100$$

Усі визначення ЗАА проводили в 5-разовій повторності. Математичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методиками [309] з використанням програми Excel 2007. Для виявлення відмінностей у вмісті вільних радикалів в екстрактах був використаний t-критерій Стюдента, так як перевірка за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова підтвердила гіпотезу про те, що отримані дані підкоряються закону нормального розподілу. Також застосовували дисперсійний аналіз для оцінки ролі розчинника. Результати обробляли у програмному забезпеченні Statistica 7.0.

**Визначення антимікробної активності.** АМА є найбільш популярною і однією з найбільш інтенсивно досліджуваних біологічних дій бджолиних продуктів [189, 324, 325]. З літературних джерел відомо, що антибактеріальні речовини пилок активізують організм на боротьбу з вірусами і бактеріями. Пилок сприяє виробленню в організмі власного інтерферону, що підвищує імунний захист організму і значно знижує ризик онкозахворювань. Квітковий пилок має протимікробну дію. Його АМА залежить від виду рослини, часу збирання і, в кінцевому рахунку, від його якісного стану [197, 324]. З літературних даних відомо, що пилок берези проявляє сильні антибіотичні властивості [86].

В якості об'єктів перевірки біологічної дії – антимікробних властивостей пилку ББ було обрано фітопатогенні гриби та бактерії (*Botrytis cinerea* (небезпечний фітопатоген), *Ralstonia solanacearum* (одна з найважливіших фітопатогенних бактерій в світі), *Pseudomonas syringae*, *Penicillium expansum*), патоген для комах (*Paenobacillus larvae*), не патогенні (*Saccharomyces cerevisiae*), умовно патогенні (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) і патогенні види для людини (*Clostridium perfringens*), а також алергенний вид *Cladosporium sphaerospermum* [326-331].

Для визначення чутливості мікроорганізмів до березового пилку застосовували загальноприйнятий диско-дифузійний метод із застосуванням паперових дисків діаметром 0,005 м [324]. Визначення чутливості мікроорганізмів до екстрактів пилку ґрунтується на принципі дифузії активно діючої речовини в агар із паперових дисків. Для всіх вищезазначених тест-культур досліджували дію водних екстрактів пилку ББ, а для культур *E. coli* М-17, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* додатково дію водно-сольових екстрактів. Концентрація водних екстрактів становила 0,1%.

Зважений пилок у кількості 0,001 г поміщали в пробірки з 1 см<sup>3</sup> дистильованої води і добре перемішували. Потім, на завчасно підготовлені чашки Петрі з тест-культурами, поміщали диски, змочені екстрактом пилку. На одній чашці Петрі розміщували 4 або 6 дисків з обов'язковим контролем. Контролем слугували антибіотик гентаміцин, мікробіологічний препарат для захисту садових і огородніх культур від грибкових хвороб і шкідників «Гаупсин» та диметилсульфоксид (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, М=78,13). Результати враховували після доби культивування за температури 37 °С для бактерій і за температури 25 °С для грибів. Реєстрували діаметр зони інгібування росту тест-культур екстрактом пилку ББ в мм. Дослід було поставлено в трикратній повторності.

**Визначення імунологічної активності.** За допомогою НСТ-тесту і фагоцитозу оцінювали імунотропну активність пилкових екстрактів ББ.

*Визначення кисеньгенеруючої активності фагоцитуючих клітин периферичної крові в реакції з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест).* НСТ-тест дозволяє оцінити стан фагоцитарної системи, а саме стан кисеньзалежного механізму бактерицидності (внутрішньоклітинної НАДФ-Н-оксидазної антибактеріальної системи) фагоцитів крові (*in vitro*) – першої лінії захисту організму від негативної дії різних факторів НПС. НАДФ-Н-оксидаза добре вивчена на фагоцитарних клітинах, де її функція пов'язана із знищенням за допомогою вироблених нею активних форм кисню патогенних мікроорганізмів. НАДФ-Н-оксидаза фагоцитуючих клітин – це складний ферментний комплекс, що складається з декількох білкових компонентів [332].

НСТ-тест відображає кисеньзалежний метаболізм нейтрофілів. Принцип методу полягає в тому, що НСТ відновлюється до диформазану при контакті з активованим нейтрофілом, що у вигляді гранул, нерозчинних у воді і більшості органічних розчинників, відкладається усередині або на поверхні клітин. Кількість диформазану, що випала, слугує критерієм інтенсивності реакції. Нейтрофіли крові в нормі знаходяться в неактивованому стані, тому в основному не відновлюють НСТ. Цей показник називається спонтанним НСТ-тестом. Для оцінки функціональних резервних можливостей нейтрофілів використовують НСТ-тест у присутності різних стимуляторів. Такий тест називається індукованим НСТ-тестом [333].

Для початку реакції до пробірки додавали усі необхідні реактиви, а саме: забуферений фізіологічний розчин (1,8% NaCl) кількістю  $0,05\text{ см}^3$ ;  $0,05\text{ см}^3$  НСТ-тесту;  $0,05\text{ см}^3$  розчину об'єкту дослідження;  $0,1\text{ см}^3$  гепаринізованої крові.

Далі суміш інкубували в термостаті за температури  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 15 хв, періодично струшуючи. Після цього у пробірку додавали п'ятикратний об'єм дистильованої води для лізису еритроцитів. Тоді пробірки центрифугували за швидкості 1500 об/хв 5-7 хв. Після центрифугування надосадову рідину зливали, до осаду додавали  $0,05\text{ см}^3$  фізіологічного розчину. Осад ресуспензували і виливали на предметне скло.

Після висихання мазки забарвлювали розчином нейтрально-червоного індикатора концентрацією 72%, який попередньо приготували наступним чином: до  $75\text{ см}^3$  96%-го спирту додавали  $25\text{ см}^3$  дистильованої води. Тоді 100 мг нейтрально-червоного індикатора розчиняли в  $100\text{ см}^3$  отриманого розчину спирту. Залишали в термостаті до повного розчинення. Потім відфільтрували. Барвник наносили на 40-50 хв, після чого змивали дистильованою водою.

*Підрахунок результатів.* За допомогою мікроскопу Ломо Микмед-1 підраховували кількість клітин, які вміщували гранули формазану (кількість на 100 клітин). Відсоток НСТ-позитивних клітин становить відсоток від загальної кількості фагоцитуючих клітин крові. За кількістю частин формазану в

підрахованих клітинах вираховували середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) для оцінки активності пероксидазних систем:

$$СЦК = \frac{0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot в + 3 \cdot з + 4 \cdot д}{100},$$

де  $a$  – кількість клітин, у яких відсутні гранули формазану;  $b$  – кількість клітин, у яких кількість гранул формазану займає 1/4 площі клітини;  $в$  – кількість клітин, у яких кількість гранул формазану займає 2/4 площі клітини;  $з$  – кількість клітин, у яких кількість гранул формазану займає 3/4 площі клітини;  $д$  – кількість клітин, у яких кількість гранул формазану займає всю площу клітини [334].

*Визначення фагоцитарної (поглинальної) активності нейтрофілів.* Фагоцитоз показує поглинальну активність фагоцитів крові. В основі методу лежить здатність фагоцитів захоплювати частинки латексу.

В пробірку вносили 0,1 см<sup>3</sup> 2%-го розчину цитрату натрію, 0,1 см<sup>3</sup> суспензії латексу розміром  $d=1,0-1,3$  мкм, водно-сольову витяжку об'єкта дослідження і 0,2 см<sup>3</sup> цільної крові, до якої попередньо додали розчин гепарин-натрій з розрахунком 1 крапля розчину гепарину на 1 см<sup>3</sup> крові. Старанно перемішували піпетуванням. Тоді інкубували в термостаті 30 хв за температури 37 °С. Потім центрифугували при швидкості 1500 об/хв протягом 10 хв. Після центрифугування збирали надосадову рідину, яка не є потрібною. До осаду додавали 1 краплю фізіологічного розчину. Краплю осаду за допомогою пастерівської піпетки переносили на предметне скло і робили тонкий мазок. Після підсихання мазок забарвлювали барвником Мая-Грюнвальда, який змивали дистильованою водою через 2-3 хв. Потім наносили барвник Романовського-Гімза у розведенні 2 краплі барвника на 1 см<sup>3</sup> дистильованої води і залишали на 17 хв. Препарати змивали дистильованою водою, висушували на повітрі.

*Підрахунок результатів.* Розрахунок результатів проводили на 100 нейтрофілів у двох паралелях за допомогою мікроскопу Ломо Микмед-1. Визначали процент фагоцитуючих клітин, фагоцитарний індекс ( $\Phi_i$ ) – кількість

клітин, що поглинають частинки та фагоцитарне число ( $\Phi_{\text{ч}}$ ) – число частин латексу в одному фагоциті. В нормі фагоцитарне число становить 4-8, фагоцитарний індекс – 40-80% [335].

### 2.2.6. Вимірювання морфологічних характеристик пилових зерен

Даний аналіз було проведено з метою порівняння традиційних морфологічних параметрів ПЗ ББ із різних місць зростання, так і з метою виділення нових кількісних морфологічних критеріїв як більш чутливих до інтенсивності дії негативних екологічних факторів.

Фотографії ПЗ були отримані за допомогою СЕМ Zeiss Evo LS 15. При роботі зі СЕМ висушені ПЗ тонким шаром поміщали на спеціальну липку основу, кріпили на об'єктному металічному столику діаметром 10 мм. ПЗ фотографували при збільшеннях від 1000 до 10000 разів.

Морфологічну характеристику ПЗ проводили, вимірюючи такі параметри як довжина полярної осі (Р) (ознака 1) – пряма лінія між дистальним і проксимальним полюсами ПЗ, довжина екваторіального діаметру (Е) (ознака 2) – ширина ПЗ, відстань між полюсами в екваторіальній частині, кут розташування апертури до контуру ПЗ (ознака 3), внутрішній діаметр апертури (ширина пори) (ознака 4) і довжину ребра апопоріального поля (ознака 5) (рис. 2.4). Апопоріальне поле – це площа трипорового ПЗ, що обмежена лінією, яка з'єднує зовнішні краї пор. Кут розташування апертури до контуру ПЗ вимірювали, оскільки у ПЗ *Betula* апертури розташовані по кутах контуру у вигляді з полюса (angularaperture) [138]. Також визначали форму ПЗ або індекс Р/Е – відношення довжини полярної осі до екваторіального діаметра. Описували ПЗ, використовуючи загальноприйняту термінологію [227]. Крім загальнодіагностичних ознак ПЗ, а саме довжини полярної осі, екваторіального діаметру та характеристик пори, ознаки 3 і 5 визначали, виходячи із аналізу особливостей будови ПЗ *Betula* згідно з термінологічним словником спор та пилку (2006) [138].



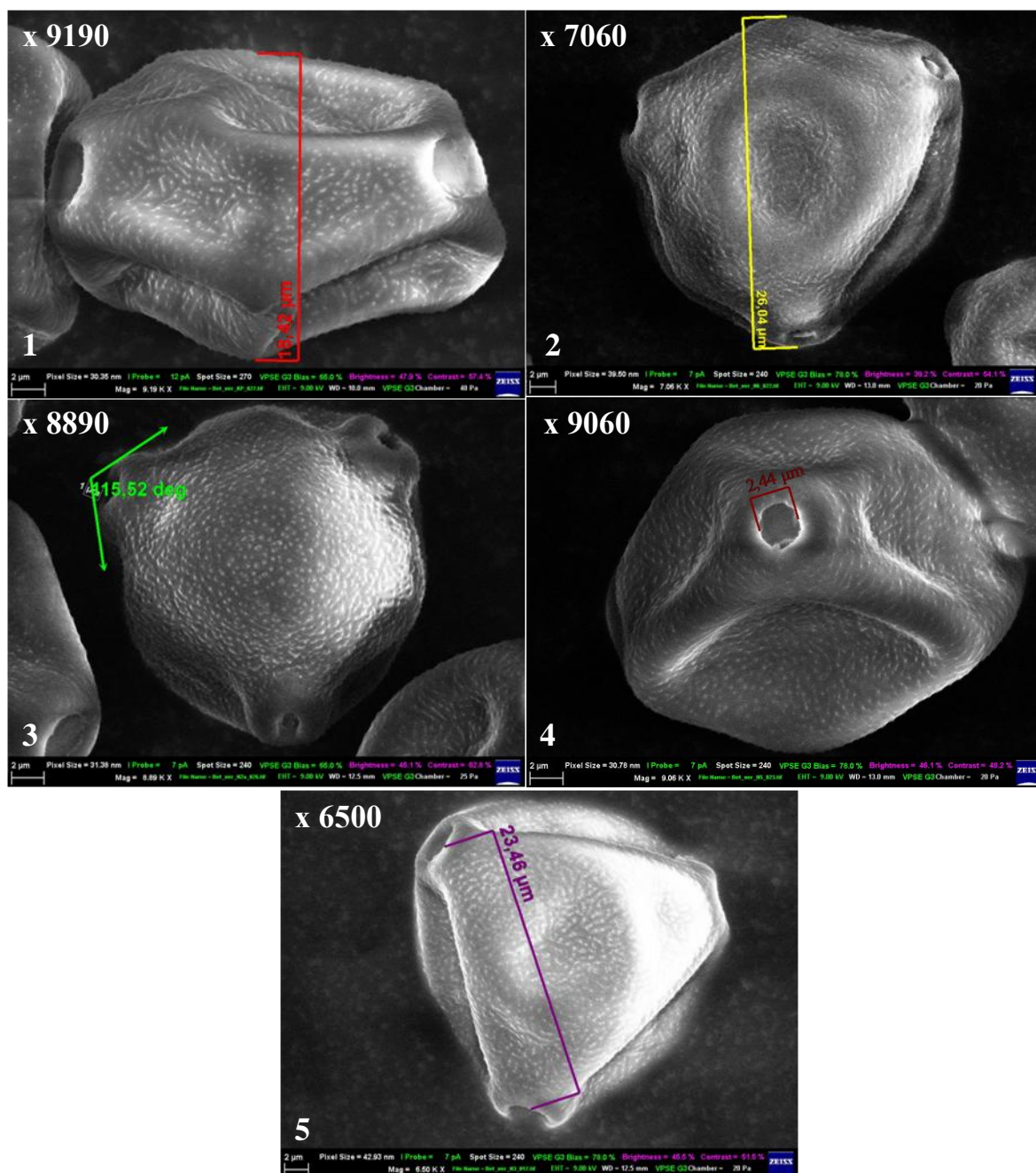


Рис. 2.4 Види вимірювань морфологічних характеристик пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh.: 1 – довжина полярної осі (P); 2 – довжина екваторіального діаметра (E); 3 – кут розташування апертури до контуру ПЗ; 4 – довжина внутрішнього діаметра апертури; 5 – довжина ребра апопоріального поля (Фото: Р. Островськи, Т. Шевцова 2011)

Вимірювали 60 показань для кожної морфологічної характеристики з точністю до сотих. Для цього використовували ліцензійну програму Axio Vision 40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss, Jena, Німеччина). Математичну обробку результатів

вимірювань проводили за загальноприйнятими методиками [309] з використанням програми Excel 2007 та Statistica 7.0.

Для порівняння морфологічних ознак пилку, заготовленого в Україні і в Словаччині, був застосований параметричний t-критерій Стюдента. Рішення про застосування параметричного методу було прийнято на підставі результатів перевірки даних на підпорядкування закону нормального розподілу за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Для виявлення та оцінки ступеня лінійних зв'язків між морфологічними ознаками використовували кореляційний аналіз за коефіцієнтами кореляції Пірсона. Для групування даних застосовували кластерний аналіз.

#### **2.2.7. Застосування математично-статистичних методів при оцінці експериментальних результатів**

Оцінку отриманих результатів, пошук взаємозв'язків та відмінностей проводили із застосуванням наступних статистичних методів:

а) Описова статистика (мінімум, максимум, середнє арифметичне значення, стандартне відхилення, коефіцієнт варіації).

б) Кореляційний аналіз – коефіцієнт кореляції Пірсона для визначення міри зв'язків між змінними.

в) Дисперсійний аналіз – визначення найменш значної різниці за тестом середніх Тьюкі.

г) Критерій Колмогорова-Смірнова для перевірки даних на підпорядкування закону нормального розподілу, t-критерій Стюдента для перевірки рівності середніх значень,  $\phi$ -критерій кутового перетворення Фішера для порівняння часток, непараметричний H-критерій Краскела-Уолліса і метод Бонфероні для виявлення достовірних відмінностей між зразками пилку.

д) Кластерний аналіз для класифікації даних в морфологічному аналізі.

е) Простий та множинний регресійний аналіз для дослідження впливу антропогенних факторів та погодних умов на морфологію ПЗ, вмісту у них білку, ЖК ліпідів, АК, флавоноїдів, ВМ.

ж) Тест відмінностей середніх значень з використанням середніх, стандартного відхилення і кількості змінних для пошуку найзбалансованішого зразку пилку.

**РОЗДІЛ III**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ, МОРФОМЕТРИЧНИХ**  
**ПОКАЗНИКІВ ТА БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПИЛКУ**  
***BETULA VERRUCOSA* EHRLH.**

**3.1. Встановлення хіміко-біологічних показників пилку**

***Betula verrucosa* Ehrh.**

**3.1.1. Встановлення біохімічних складових пилку**

Провести повний біохімічний аналіз будь-якого біологічного об'єкту є завданням складним, дорогим і не завжди обґрунтованим. В основному визначають головні сполуки (вміст білків, жирів, вуглеводів, вітамінів тощо) або конкретні речовини певного класу органічних та неорганічних сполук залежно від мети дослідження. Було визначено спектри біохімічних складових пилку ББ, окремо вміст білків, жирнокислотний склад ліпідів, вміст АК та флавоноїдів, які дозволяють обґрунтувати БА.

Результати аналізу біохімічного складу пилку представлено у вигляді ІЧ-Фур'є та Раман спектрів на рис. 3.1 та 3.2. Значення отриманих піків, які відповідають коливанням функціональних груп хімічних речовин та їх пояснення відповідно з літературними джерелами представлено в додатку В табл. 1.1 і 1.2 [158, 159, 161, 162, 336, 337].

Широка інтенсивна смуга з піком близько  $3388\text{ см}^{-1}$  відповідає валентним коливанням молекул води і гідроксильних груп вуглеводів. Вужча область  $3010\text{-}2850\text{ см}^{-1}$  відповідає валентним коливанням СН груп. Слабка смуга близько  $3010\text{ см}^{-1}$  характеризує валентні коливання ненасичених  $=\text{CH}$  груп, що вказує на присутність ароматичних речовин або каротиноїдів. Дві вузьких смуги  $2926\text{ см}^{-1}$  і  $2854\text{ см}^{-1}$  відповідають антисиметричним і симетричним валентним коливанням метиленових груп  $\text{CH}_2$ , які можна віднести, головним чином, до ліпідів. Плече  $2960\text{ см}^{-1}$  і слабкий пік  $2873\text{ см}^{-1}$  свідчать про антисиметричні і симетричні коливання метилових груп  $\text{CH}_3$ , які характерні для

білків. Область  $1800\text{--}1500\text{ см}^{-1}$  містить інтенсивні смуги, які відповідають, головним чином, валентним коливанням  $\text{C=O}$  і  $\text{C=C}$  груп. Два плеча  $1738\text{ см}^{-1}$  і  $1710\text{ см}^{-1}$  демонструють присутність складних ефірів (жирів) і органічних кислот.

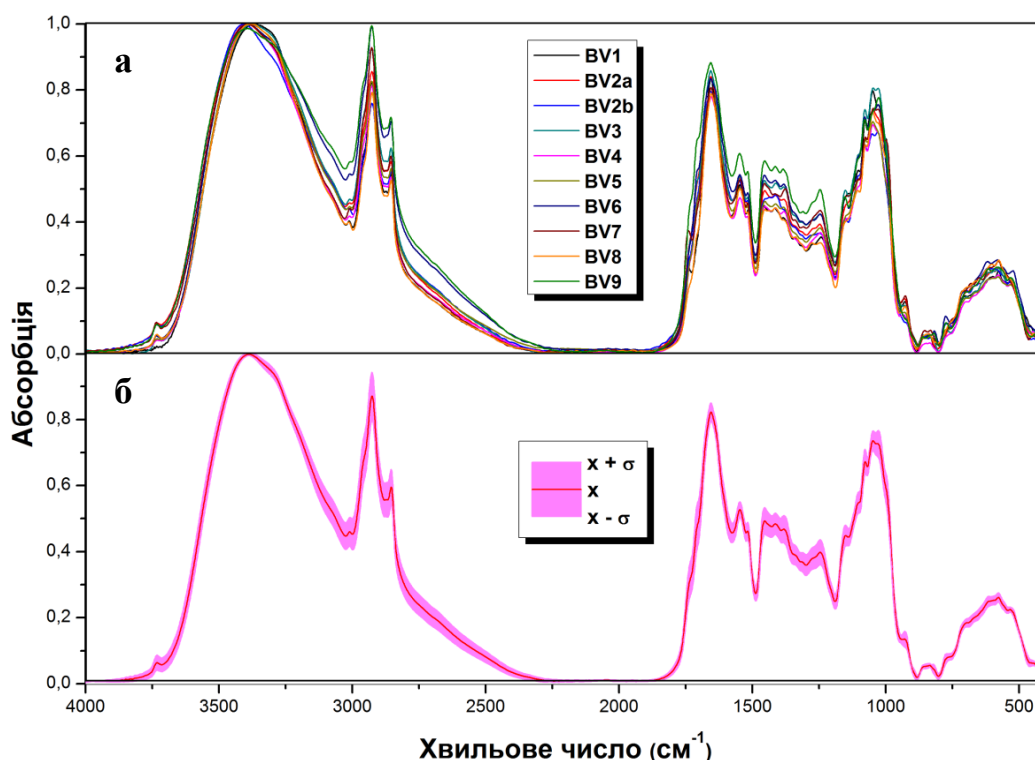


Рис. 3.1 ІЧ-Фур'є-спектр квіткового пилку *Betula verrucosa* Ehrh.: *a* – спектри усіх пилкових зразків; *б* – усереднений спектр з інтервалом стандартного відхилення

Група смуг –  $1678\text{ см}^{-1}$ ,  $1655\text{ см}^{-1}$  (максимум),  $1636\text{ см}^{-1}$ ,  $1604\text{ см}^{-1}$ , які сильно перекриваються, свідчить про наявність білків, ароматичних речовин і солей органічних кислот. Смуга  $1548\text{ см}^{-1}$  вказує на коливання амід II білків. Слабка смуга  $1518\text{ см}^{-1}$  відповідає ароматичним кислотам, наприклад, феруловій або *para*-кумаровій. Смуга при  $1454\text{ см}^{-1}$  відповідає асиметричним деформаційним коливанням  $\text{CH}_3$  груп, яка вказує головним чином на білки. Плече  $1467\text{ см}^{-1}$  свідчить про ножичні коливання  $\text{CH}_2$  груп ліпідів, смуга  $1415\text{ см}^{-1}$  вказує на солі органічних кислот, смуга  $1246\text{ см}^{-1}$  – на складні ефіри та кислоти. Область  $1150\text{--}930\text{ см}^{-1}$ , яку часто називають «областю цукрів», містить смуги валентних коливань груп  $\text{CO}$ ,  $\text{CC}$  і, меншою мірою,  $\text{CN}$ , які

вказують головним чином на вуглеводи і менш на ліпіди і білки. Смуга  $836\text{ см}^{-1}$  вказує на пектин. В області  $700\text{--}500\text{ см}^{-1}$  знаходяться смуги скелетних коливань різного походження. В цілому ІЧ-Фур'є-спектр пилку відображає присутність її головних хімічних компонентів – білків, ліпідів і вуглеводів. Також виявлені органічні кислоти, включаючи фенольні кислоти.

Наявність плеча при  $\sim 1660\text{ см}^{-1}$  (білки) і його відсутність при  $1570\text{ см}^{-1}$  є характерною рисою пилку ББ [162], що можна спостерігати і в даному випадку (див. рис. 3.2).

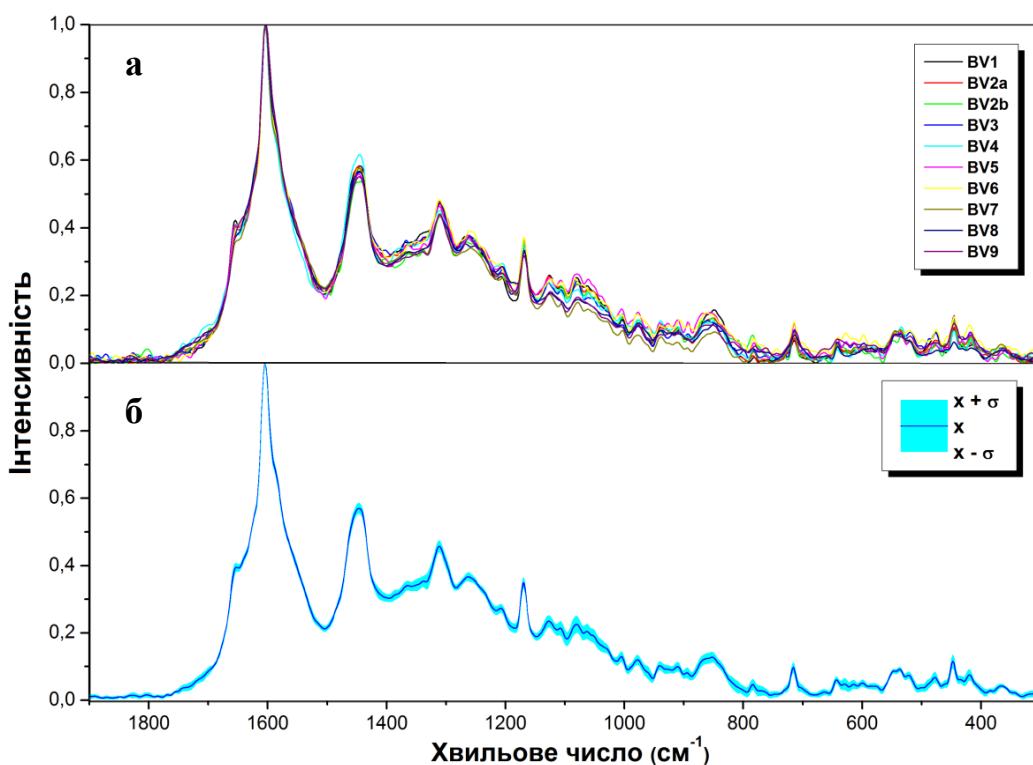


Рис. 3.2 Раман-спектр квіткового пилку *Betula verrucosa* Ehrh.: *а* – спектри усіх пилкових зразків; *б* – усереднений спектр з інтервалом стандартного відхилення

Найінтенсивніший пік  $1605\text{ см}^{-1}$  виникає з кільцевої структури фенольної групи [161]. Смуга  $1447\text{ см}^{-1}$  відображає вплив групи  $\text{CH}_2$  (ліпіди). Інші смуги середньої інтенсивності присутні близько  $1312\text{ см}^{-1}$  (ліпіди),  $1263\text{ см}^{-1}$  (білки),  $1169\text{ см}^{-1}$  (білки, нуклеїнові кислоти),  $1126\text{ см}^{-1}$  (ліпіди, вуглеводи),  $1109\text{--}1063\text{ см}^{-1}$  і  $978\text{ см}^{-1}$  (ліпіди, вуглеводи),  $852\text{ см}^{-1}$  з плечем близько  $830\text{ см}^{-1}$

(дублет тирозину),  $716\text{ см}^{-1}$  (нуклеїнові кислоти) і  $642\text{ см}^{-1}$  (білки). Смука «дихання» фенілаланінового кільця є маркером білка.

Обидва спектри відображають порівняльний склад пилку ББ, присутність різних хімічних речовин (білків, ліпідів, вуглеводів). Але найбільш вираженими серед них будуть все ж поліфеноли. Вони характеризуються найінтенсивнішими піками та складністю інтерпретації.

### 3.1.2. Визначення рівня експресії гена *Bet v 1* в пилку

Рівень експресії алергенного гену *Bet v 1* був підтверджений і визначений для шести різних зразків пилку з України, які були заготовлені на урбанізованій території навколо м. Київ та у м. Кузнецовськ Рівненської обл., а також для трьох зразків пилку з м. Нітра за допомогою ПЛР з детекцією «за кінцевою точкою».

Кількісна ПЛР у реальному часі показала відхилення у відносному вмісті білка *Bet v 1* серед зразків з різних місць зростання (рис. 3.3). У всіх випадках спостерігали збільшення експресії *Bet v 1* порівняно з контрольним лісовим зразком, заготовленим в Україні.

Як показано на рис. 3.3, експресія *Bet v 1* серед українських зразків пилку значно нижча у беріз, які ростуть на урбанізованій території (BV1, BV2a, BV2b, BV4), ніж в маргінальних районах, де по сусідству немає ні житлових, ні інших типів будинків (BV5, BV6). У зразках з урбанізованих місць зростають при порівнянні із лісовим зразком, експресія алергену *Bet v 1* в середньому вища у 1,5 рази (варіювалася від 0,77 і до 2-х разів). У зразках, заготовлених на кордоні урбанізованих територій, експресія алергену *Bet v 1* була лише у 0,55 разів вищою при порівнянні зі зразком із лісу.

Для зразків зі Словацької республіки, заготовлених на території одного міста, значення експресії подібні, особливо для зразків з дерев BV7 і BV8, які зростають недалеко один від одного (див. рис. 3.3). Значення експресії гена

близькі до таких з урбанізованих місць зростань в Україні. Порівняно з контролем рівень експресії варіює від 1,03 до 1,65 разів.

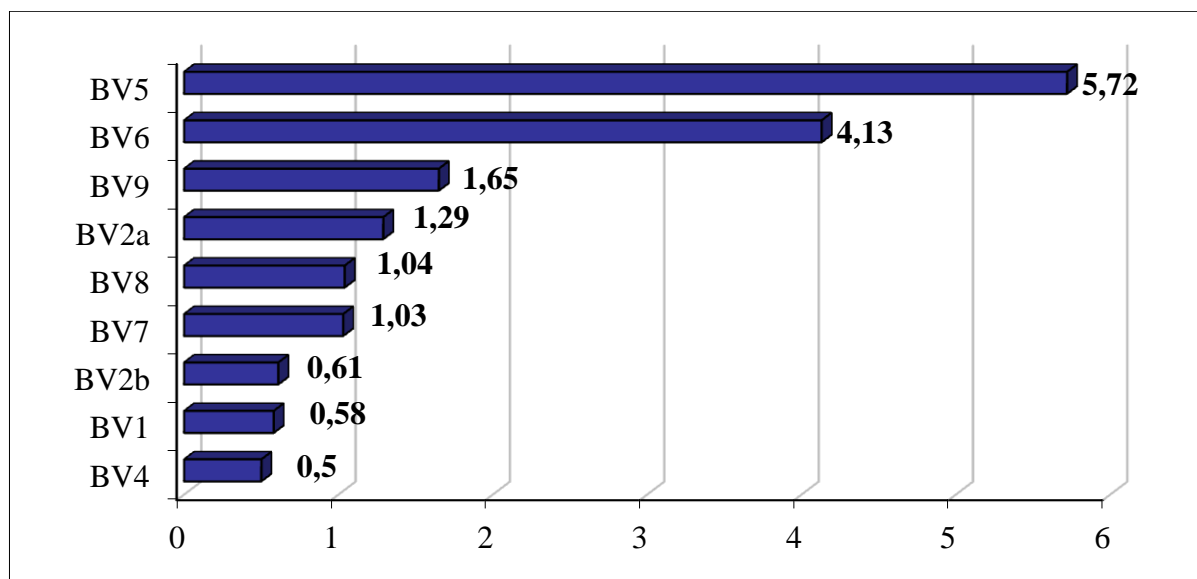


Рис. 3.3 Візуалізація співвідношень експресії досліджуваних зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh. із контрольним зразком (BV3)

Відмінності між рівнями експресії добре зареєстровані для багатьох алергенів на різних етапах росту [338, 339]. Також існують дослідження щодо різних рівнів експресії алергену для змінних кліматичних умов [340]. У своєму дослідженні М. Врусє *et al.* [67] показав, що пилок берези з міських районів має більш високий алергенний потенціал, ніж пилок з сільської місцевості, хоча вміст алергену залишається незмінним. М. L. Helander *et al.* [25] показав, що відстань від джерел промислових забруднень, зокрема комбінованого забруднення ВМ і діоксидом сірки, не корелює з експресією *Bet v 1*. Автори дійшли висновку, що інші фактори, включаючи затінення, властивості ґрунту та генетичний фон дерева можуть значно впливати на кількість і склад алергенів пилку берези. Підтвердженням тому є результати досліджень М. Hjelmsroos *et al.* (1995), який показав неоднорідність білків пилку для окремого дерева *Betula pendula* [341]. Вміст алергенів більший з південної сторони беріз. М. Hjelmsroos також відмітив, що пилок берези, зібраний поблизу автомагістралей або іншого джерела насиченого руху транспорту, характеризується низьким вмістом



алергенів порівняно зі зразками із контрольних районів [25]. М. Focke *et al.* [139] зазначив, що на експресію алергену і вміст в пилку можна впливати, наприклад, умовами зростання і факторами НПС, шляхом вибору певних сортів рослин або умов збирання, кліматичними умовами і стадіями дозрівання пилку. До того ж J. Buters *et al.* [342] показав, що випуск Bet v 1 також варіює з року в рік. Пилкові алергени, такі як Bet v 1, швидко мігрують до екзини пилку у вологих умовах, а, отже, й умови зберігання можуть вплинути на концентрацію алергену у ПЗ.

У нашому випадку усі досліджувані зразки пилку ББ були зібрані в одному році і за день до цвітіння (в іншому випадку пилок не висипався б з пиляків (власні спостереження)), тому такі фактори впливу на результати експресії Bet v 1 як рік заготовки, стадія зрілості пилку, кліматичні умови, умови збирання можна виключити. Тому варіабельність експресії Bet v 1 зразків пилку ББ може свідчити про вплив місця зростання на синтез протеїну. Можливо причиною тому є як біотичні, так й абіотичні фактори.

### 3.1.3. Визначення вмісту важких металів у пилку

За вмістом ВМ пилок ББ з різних типів зелених насаджень також відрізняється (табл. 3.1 та рис. 3.4, 3.5). Найбільше він забруднений нікелем (в середньому 1,69 мг/кг, частка у відсотках становить 43,1 (див. рис. 3.5)), це ПЗ із лісу та аеродрому, найменше – ртуттю (0,004 мг/кг, 0,1 % відповідно) з усіх досліджуваних екотопів.

Таблиця 3.1

Вміст важких металів у пилку *Betula verrucosa* Ehrh., мг/кг

Зразок	x	S <sub>x</sub>	V%	Середнє всіх зразків
Кадмій (Cd)				
BV1	0,103	0,005	18	0,23
BV3	0,560	0,005	9	
BV6	0,210	0,005	18	
BV9	0,046	0,005	18	

Продовження табл. 3.1

Плюмбум (Pb)				
BV1	0,33	0,05	18	0,35
BV3	0,31	0,05	18	
BV6	0,52	0,05	18	
BV9	0,24	0,05	18	
Гідраргіум (Hg)				
BV1	0,003	0,002	13	0,004
BV3	0,004	0,002	13	
BV6	0,005	0,002	13	
BV9	0,005	0,002	13	
Хром (Cr)				
BV1	0,50	0,3	17	0,68
BV3	0,51	0,3	17	
BV6	0,87	0,3	17	
BV9	0,84	0,3	17	
Миш'як (As)				
BV1	<0,3	0,3	—	<0,3
BV3	<0,3	0,3	—	
BV6	<0,3	0,3	—	
BV9	<0,3	0,3	—	
Нікель (Ni)				
BV1	1,56	0,2	19	1,69
BV3	2,41	0,2	19	
BV6	2,10	0,2	19	
BV9	0,67	0,2	19	
Селен (Se)				
BV1	0,24	0,10	19	0,56
BV3	0,67	0,10	19	
BV6	0,12	0,10	19	
BV9	0,19	0,10	19	
Кобальт (Co)				
BV1	<0,1	0,1	—	0,12
BV3	0,15	0,1	14	
BV6	0,11	0,1	14	
BV9	НВ	—	—	

Примітка:  $\bar{x}$  – середнє значення;  $S_x$  – стандартне відхилення,  $V\%$  – коефіцієнт варіації, НВ – не визначали

На рис. 3.4 проілюстровано наявність достовірних відмінностей у вмісті кадмію в ПЗ з усіх досліджуваних екотопів, у вмісті нікелю – у пилку із паркової та придорожньої зон, оскільки між лісовим пилком і таким з території

аеродрому немає відмінностей. За вмістом плюмбуму також різниться зразок пилку ББ із території аеродрому порівняно з ПЗ з усіх інших місць збору, а за вмістом селену – зразок пилку із лісової місцевості.

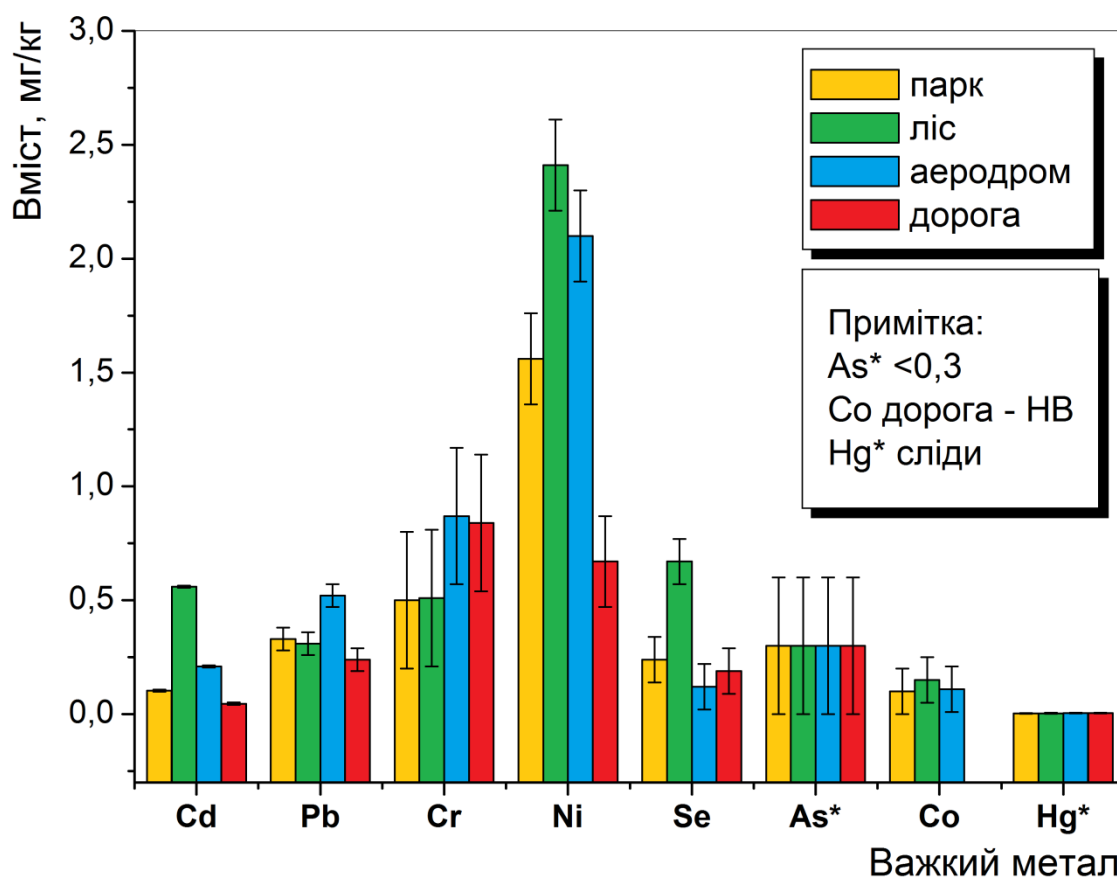


Рис. 3.4 Вміст важких металів в пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від типу зелених насаджень

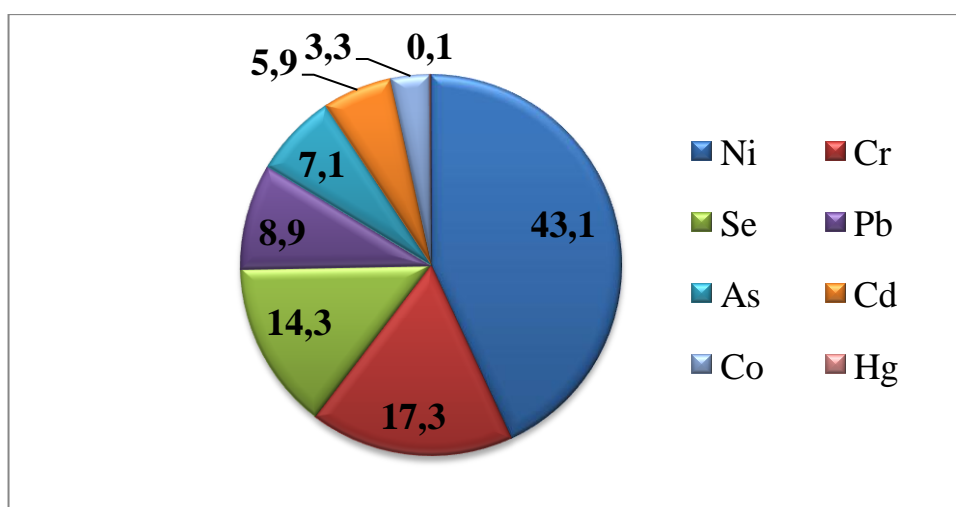


Рис. 3.5 Частка важких металів в зразках пилку *Betula verrucosa* Ehrh., %

Так як ВМ в пилку є одним із фізико-хімічних критеріїв його якості, їх вміст контролюється для пилку бджолиного, меду і має певні обмеження. Порівнюючи отримані значення з існуючими вимогами до вмісту ВМ у пилку бджолиному (табл. 3.2), бачимо, що вимоги не порушені лише для вмісту ртуті із представлених даних. За вмістом кадмію норма перевищена в 1,03-5,6 разів у всіх зразках пилку, крім словацького (BV9), заготовленого на території житлового комплексу поблизу автомобільних доріг, де кадмію менше в 2,2 рази. За вмістом свинцю всі зразки в нормі, окрім незначного її перевищення в 1,04 рази в пилку заготовленому на території аеродрому (BV6). У зразках BV9 і BV6 норма перевищена і за вмістом хрому в 1,68 та 1,74 рази відповідно.

Таблиця 3.2

Вимоги до вмісту важких металів у бджолиному пилку, мг/кг

Джерело	Cd	Hg	Cr	As	Pb
Польський стандарт, 1997 <sup>[343]</sup>	0,05	0,02	–	0,20	0,5
Chlebo <i>et al.</i> , 2001 <sup>[148]</sup>	0,100	0,050	0,500	1,000	–
Campos <i>et al.</i> , 2008 <sup>[160]</sup>	0,03	0,01	–	–	0,5

Хром, ртуть та кадмій мають виражену імуноотропну дію [26]. Сvineць і кадмій вважаються основними токсичними ВМ і, таким чином, є найбільш частим предметом досліджень [148, 344]. Кадмій у ґрунті не розкладається, залишається в ньому, що призводить до забруднення рослин, головним чином, через дифузію металу в кореневу систему. У рослинах кадмій дуже рухливий. Зв'язується з фрагментом білку. Дослідження показують, що пилок дуже підходить для індикації кадмію, так як ПЗ містять багато білкових речовин з сульфгідрильними SH-групами, до яких приєднується кадмій [148, 344]. Типові джерела свинцю і кадмію – промислові гази і транспорт [22, 345]. У ґрунти придорожніх екосистем з продуктами згоряння палива, аерозольними частками (за рахунок корозії металевих частин автомобілів, зносу проїжджих частин доріг, коліс і гальмівних колодок) постійно надходить широкий спектр ВМ [185]. Концентрація металу в ґрунті залежить від інтенсивності руху

автотранспорту, місцевих умов тощо і може досягати ширини до 100 м і висоти 5-8 метрів [291].

В результаті проведеного дослідження встановлено, що березовий пилок дуже чутливий до дії забруднюючих речовин. Всі досліджувані зразки мали перевищення існуючих вимог як мінімум по одному ВМ, і це ще до виходу ПЗ в атмосферне повітря. Потрапивши в повітря, такий пилок сприятиме поширенню супутніх техногенних забруднень, міграції алергенних комплексів з ВМ і стане причиною виникнення нетипових АЗ [218]. Систематичний моніторинг концентрації токсичних металів в атмосфері, ґрунті, воді, санітарні і технологічно-профілактичні заходи є основним методом для зниження вмісту металів у НПС [346]. Раннє виявлення підвищених рівнів забруднюючих речовин у НПС має істотне значення. Тому дуже важливо використовувати пилок в якості одного з чутливих біологічних показників забруднення НПС.

### 3.1.4. Мікробіологічна якість пилку

На пилку ББ виявлена змішана мікробіота (табл. 3.3). Кількість представників родини *Enterobacteriaceae* в досліджуваних зразках пилку коливалась у межах 0,00-5,14 log КУО/г пилку (рис. 3.6 а, б). Словацькі зразки пилку ББ в цілому були забруднені більше і між ними немає достовірної різниці. Серед українського пилку в зразках BV3 і BV4 взагалі не спостерігалось ентеробактерій після доби культивування. Порівнюючи українські та словацькі зразки пилку за допомогою тесту середніх Тьюкі, достовірну різницю виявили серед двох груп зразків: BV2a, BV2b, BV5, BV6, BV7, BV8, BV9 і BV1, BV3, BV4. Ці результати вказують на те, що пилок ББ зразків BV1, BV3, BV4, відібраний з насаджень парку м. Київ, лісу с. Хоцьки та при дорозі смт. Іванків забруднений менше. Згідно Campos *et al.* (2008) кількість ентеробактерій в пилку не повинна перевищувати значення 100 КУО/г. За цим показником пилок ББ зі Словаччини має низьку

мікробіологічну якість. Серед українських зразків пилку норма також перевищена (BV2a, BV2b, BV5, BV6).

Таблиця 3.3

Мікробіота пилку *Betula verrucosa* Ehrh., КУО/г та log КУО/г пилку

Зразки	Представники родини <i>Enterobacteriaceae</i>		Анаеробні бактерії		Мезофільні аеробні бактерії		Гриби	
	10 <sup>2</sup> КУО/г	log КУО/г	10 <sup>2</sup> КУО/г	log КУО/г	10 <sup>2</sup> КУО/г	log КУО/г	10 <sup>2</sup> КУО/г	log КУО/г
BV1	1	2,00 <sup>ab</sup>	8	2,90 <sup>ab</sup>	—	—	3	2,48 <sup>ab</sup>
BV2a	105	4,02 <sup>a</sup>	475	4,68 <sup>a</sup>	—	—	11	3,04 <sup>ab</sup>
BV2b	2	2,30 <sup>a</sup>	61	3,79 <sup>a</sup>	—	—	18	3,26 <sup>ab</sup>
BV3	0	0,00 <sup>ab</sup>	608	4,78 <sup>a</sup>	—	—	138	4,14 <sup>a</sup>
BV4	0	0,00 <sup>ab</sup>	3	2,48 <sup>ab</sup>	—	—	17	3,23 <sup>ab</sup>
BV5	35	3,54 <sup>a</sup>	81	3,91 <sup>a</sup>	—	—	8	2,90 <sup>ab</sup>
BV6	146	4,16 <sup>a</sup>	795	4,90 <sup>a</sup>	—	—	24	3,38 <sup>a</sup>
BV7	1180	5,07 <sup>a</sup>	—	—	2638	5,42 <sup>a</sup>	54	3,73 <sup>a</sup>
BV8	1212	5,08 <sup>a</sup>	—	—	762	4,88 <sup>b</sup>	96	3,98 <sup>a</sup>
BV9	1380	5,14 <sup>a</sup>	—	—	932	4,97 <sup>b</sup>	156	4,19 <sup>a</sup>

Примітки: a, b, c,... – ранжування середніх значень згідно з тестом середніх Тьюкі ( $p \leq 0,05$ ). Однакові букви в межах стовпчика вказують на недостовірну різницю між середніми значеннями; «—» – не визначали

Кількість анаеробних бактерій, досліджених лише для зразків українського пилку ББ, знаходилась в межах 2,48-4,90 log КУО/г пилку (рис. 3.6 в). Найменш забрудненим виявився зразок BV4, найбільш – BV6. Тест Тьюкі підтвердив між ними достовірну різницю, але також відніс до менш забруднених зразків пилку і BV1, а до більш забруднених усі інші. В цілому кількість анаеробних бактерій на зразках пилку ББ виявилися більш численними порівняно з ентеробактеріями. Згідно Campos *et al.* (2008) забруднення *Salmonella* має бути відсутнім на 10 г пилку, *Staphylococcus aureus* – на 1 г пилку. За цим показником пилки ББ з України має низьку мікробіологічну якість.

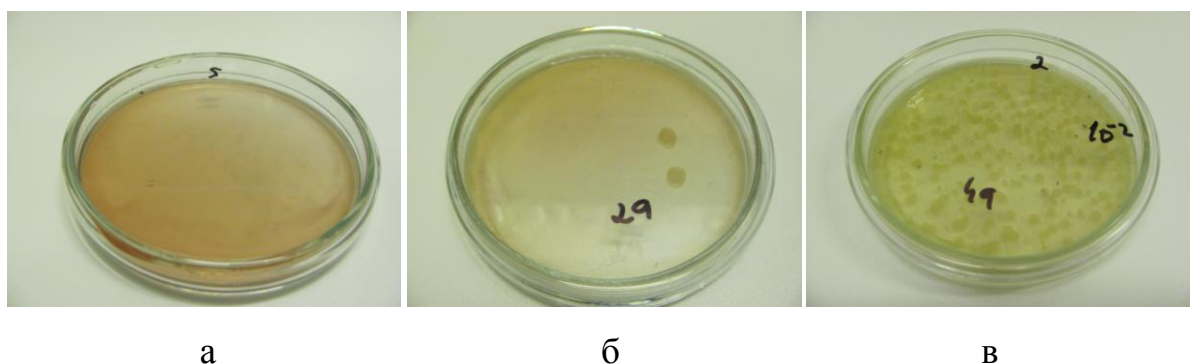


Рис. 3.6 Колонії мікроорганізмів на чашках Петрі:

*а, б* – колонії *Enterobacteriaceae*; *в* – колонії анаеробних бактерій

Кількість виявлених колоній мезофільних аеробних бактерій, досліджених лише для зразків словацького пилку ББ, коливалась в межах 4,88-5,42 log КУО/г пилку. В загальній кількості аеробних бактерій є відмінності. Згідно з рекомендаціями Campos *et al.* (2008) загальна кількість аеробних бактерій не може перевищувати  $10^5$  КУО/г. Зразок пилку BV7, заготовлений біля автомобільної дороги, значно перевищує цю норму в 26 разів і достовірно відрізняється від двох інших зразків (BV8 і BV9), зібраних на території ботанічного саду САУ та з придорожніх насаджень м. Нітра, які її перевищують у 8 і 9 разів відповідно.

Мікроскопічні гриби виявлено у кількості 2,48-4,14 log КУО/г на українських зразках пилку ББ, 3,73-4,19 log КУО/г – на зразках словацького пилку (рис. 3.7 та 3.8). Серед українського пилку найменше колоній грибів виявлено на зразках BV1, BV2a, BV2b, BV4 і BV5, в межах значень яких немає достовірної різниці згідно з тестом Тьюкі. Зразки пилку BV3 і BV6 забруднені більше інших зразків українського пилку. Серед словацького пилку найбільше забруднений пилко беріз, що ростуть в типових міських умовах – 4,19 log КУО/г: поблизу житлових будинків та автомобільної траси (BV9). Умови зростання на території ботанічного саду (BV8) та відносна його близькість (BV7) зумовили менше кількісне забруднення мікроскопічними грибами та дріжджами (3,98 і 3,73 log КУО/г відповідно).

Норма для дріжджів і грибів не повинна перевищувати  $5 \cdot 10^4$  КУО/г [160]. Жоден з українських та словацьких зразків пилку ББ не перевищує цей критерій мікробіологічної якості пилку.

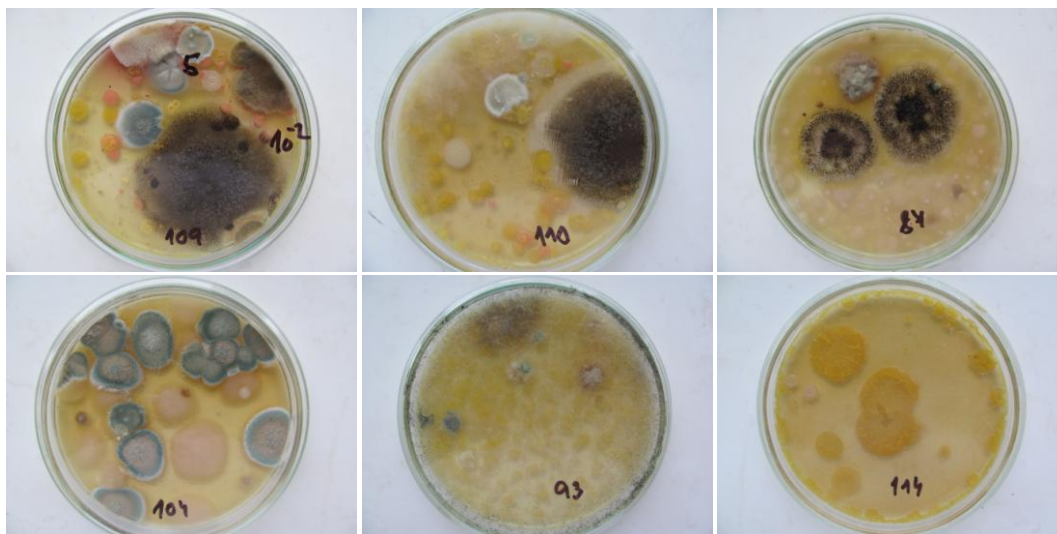


Рис. 3.7 Колонії грибів на зразках українського пилку

*Betula verrucosa* Ehrh.



BV7

BV8

BV9

Рис. 3.8 Колонії грибів на зразках словацького пилку

*Betula verrucosa* Ehrh.

Колонії грибів були ізольовані та ідентифіковані на рівні роду згідно з «Dictionary of the Fungi» [204]. Зразки пилку ББ виявилися забрудненими представниками родів *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* (рис. 3.9), дріжджами, а на словацькому зразку пилку BV8 додатково ідентифіковано *Rhizopus*.



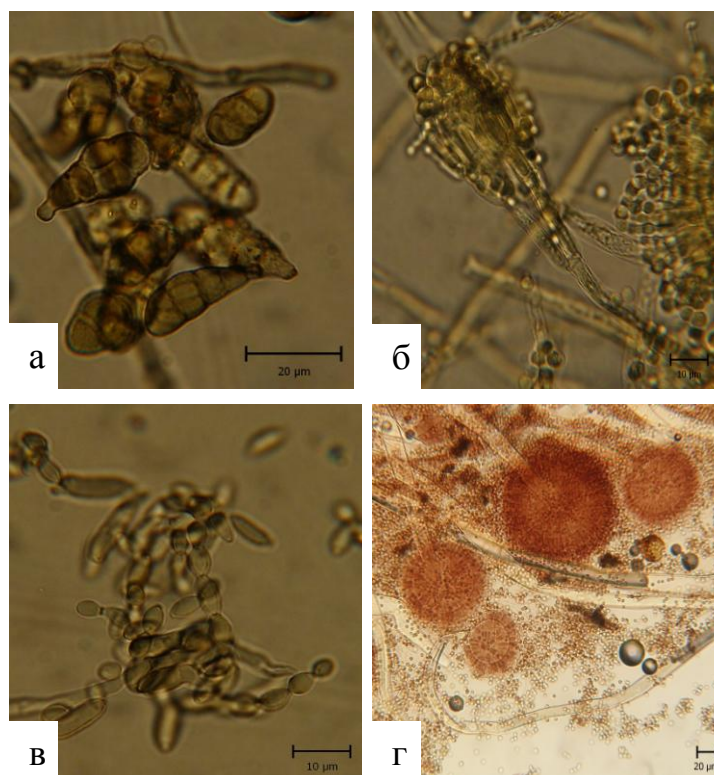


Рис. 3.9 Ідентифіковані мікроскопічні гриби на пилку *Betula verrucosa* Ehrh.: а – *Alternaria* spp.; б – *Penicillium* spp.; в – *Cladosporium* spp.; г – *Aspergillus* spp.

Найчастіше зразки словацького пилку забруднені *Alternaria* (45%) і *Cladosporium* (40%) (рис. 3.10), зразки українського пилку – *Penicillium* (48%) і дещо менше *Alternaria* (27%) (рис. 3.11). За вмістом *Aspergillus* – 7 і 10 % відповідно.

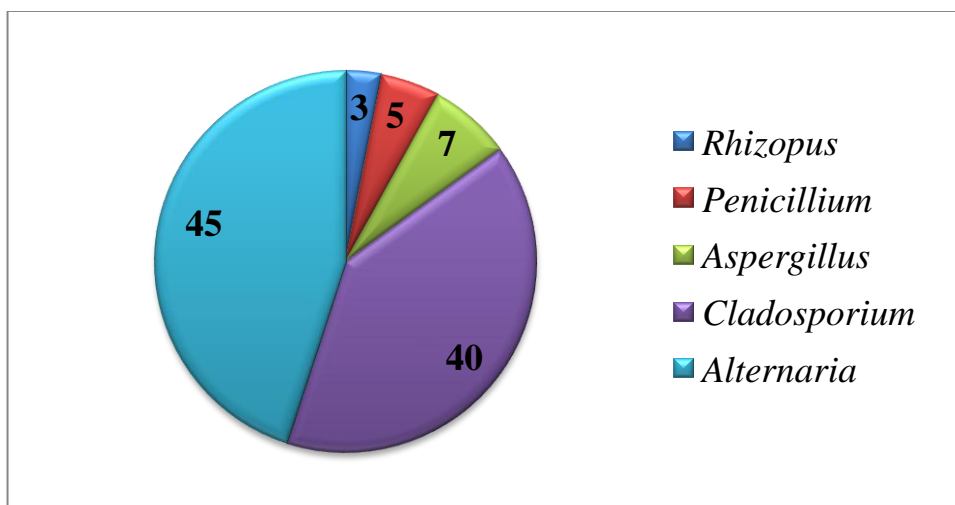


Рис. 3.10 Частота присутності мікроскопічних міцеліальних грибів на пилку *Betula verrucosa* Ehrh. зі Словаччини

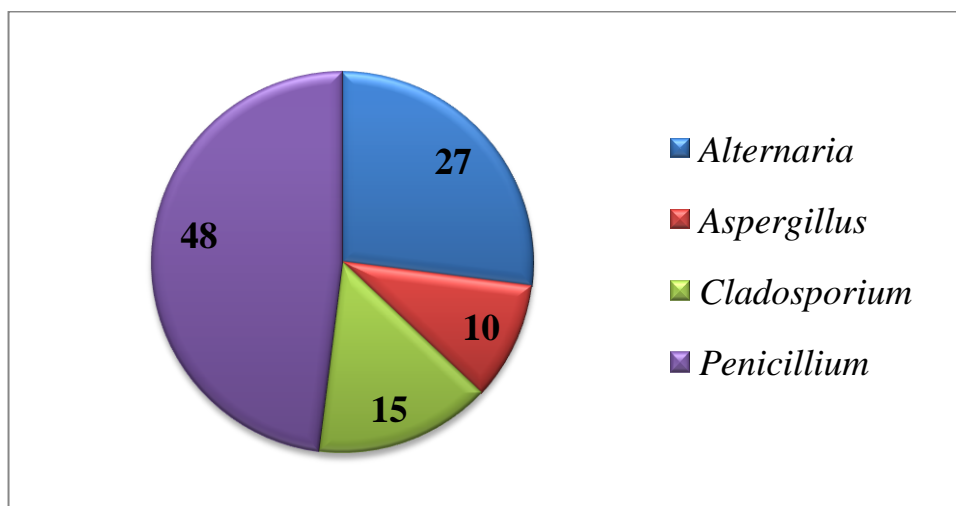


Рис. 3.11 Частота присутності мікроскопічних міцеліальних грибів на пилку *Betula verrucosa* Ehrh. із України

З літературних даних відомо, що при дослідженні присутніх мікроскопічних грибів на ентомофільному рослинному пилку (кизил звичайний, гарбуз звичайний, виноград культурний) частіше виявляють представників родів *Mucor*, *Alternaria* і *Cladosporium*, а на бджолиному обніжжі (соняшник, ріпак, мак, черешня) – *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus* і *Aspergillus* [190, 347].

Отже, на пилку ББ виявлена змішана мікробіота, що складається з ентеробактерій, анаеробних та аеробних бактерій, мікроскопічних грибів та дріжджів. В цілому за усіма дослідженими видами мікроорганізмів зразки словацького пилку ББ виявилися більш забрудненими, порівняно з українськими. Це берези, які зростають в житловій зоні поблизу автомобільних доріг (BV7 і BV9), або на території ботанічного саду університету (BV8). Цікаво, що для зразків пилку BV7 і BV8, які заготовлено з дерев, що зростають на відстані один від одного приблизно в 50 м, виявлено достовірні відмінності за кількістю аеробних бактерій.

Серед українських беріз найбільш забруднено пилки з дерев, які ростуть на території аеродрому (BV6). Зразок BV6 належить до групи «а» згідно з тестом середніх Тьюкі у всіх досліджених випадках. Найменш забрудненим виявився пилки зразків BV1 і BV4. Це берези паркової зони м. Київ, а також з

житлових зон поблизу автомобільних доріг смт. Іванків. Цікаво, що зразки, які забруднені більше представниками родини *Enterobacteriaceae* та анаеробними мікроорганізмами, менш забруднені мікроскопічними грибами. Ця залежність, підтверджена тестом Тьюкі, спостерігається для зразків пилку BV2a, BV2b (контрольний) та BV5. Зразок пилку із контрольної зони с. Хоцьки (BV3) відрізняється від решти: він менш забруднений представниками родини *Enterobacteriaceae*, але більше анаеробними мікроорганізмами та грибами.

Мікробіологічні показники пилку, який вивільнився з пиляків та циркулює в атмосфері, найімовірніше відрізняються від таких показників пилку, заготовленого ручним способом і підготовленого до зберігання або використання. Значення має якість мікробіологічного забруднення пилку. Перевищення норми найімовірніше свідчить про порушення умов сушіння пилку. Саме під час сушіння відбувається висипання зрілих ПЗ з пиляків. Пилок сушили при кімнатній температурі. Serra і Alegret рекомендують уникати природної сушки пилку, так як при низьких температурах, може відбутися ріст грибів і поява мікотоксинів [189]. Проведений додатковий аналіз на наявність мікотоксинів заготовлених зразків пилку підтвердив твердження про появу мікотоксинів. Результати забруднення мікотоксинами декількох зразків пилку ББ представлено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Вміст мікотоксинів у пилку *Betula verrucosa* Ehrh., мкг/кг

Мікотоксини	BV1	BV3	BV4	BV9
	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$
Сума афлатоксинів B1, B2, G1, G2	$<4 \pm 4,0$	$<4 \pm 4,0$	$<4 \pm 4,0$	$<4 \pm 4,0$
Фумонізін B1	$<100 \pm 100$	$<100 \pm 100$	$<100 \pm 100$	$<100 \pm 100$
Фумонізін B2	$<100 \pm 100$	$<100 \pm 100$	$<100 \pm 100$	$<100 \pm 100$
Деоксиніваленол, мкг/кг	$<0,1 \pm 0,10$	$<0,1 \pm 0,10$	$<0,1 \pm 0,10$	$<0,1 \pm 0,10$
Зеараленон	$<10 \pm 10$	$<10 \pm 10$	$<10 \pm 10$	$<10 \pm 10$
Т-2 токсин	$<10 \pm 10$	$<10 \pm 10$	$<10 \pm 10$	$<10 \pm 10$
Охратоксин А	$<0,5 \pm 0,5$	$<0,5 \pm 0,5$	$<0,5 \pm 0,5$	$<0,5 \pm 0,5$

Примітка:  $\bar{x} \pm S_x$  – середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення

Як видно з табл. 3.4 за вмістом мікотоксинів українські та словацькі зразки пилку ББ не відрізняються. Серед мікотоксинів, афлатоксини і охратоксин А займають особливі місця через високу ймовірність виникнення забруднення ними й токсичність. Європейська комісія встановила максимально допустимі межі для цих токсинів лише в деяких харчових продуктах [190, 191]. Згідно з рекомендаціями Campos *et al.* (2008) сума афлатоксинів B1+B2+G1+G2 не повинна перевищувати 4 мг/кг для пилку бджолиного, в нашому випадку значення не перевищує 4 мкг/кг. Норми вмісту деоксиніваленолу в зернових і продуктах їх переробки не повинно перевищувати 8 і 12 мг/кг відповідно, а у дослідженні – 0,1 мг/кг.

Існуючі норми по вмісту мікотоксинів у харчових продуктах та пилку бджолиному для досліджуваних зразків пилку ББ не були перевищені.

Отримані результати можуть бути корисними при розробці міжнародних мікробіологічних параметрів якості і стандартних протоколів обробки пилку анемофільних видів з алергенним потенціалом.

### 3.1.5. Визначення вмісту білка в пилку

Вміст білка в пилку ББ варіює в межах 17,85-25,62 % залежно від місця зростання (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вміст білка усіх зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh., %

BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9
23,8 ± 1,0	21,51 ± 1,0	25,14 ± 1,0	22,58 ± 1,0	23,08 ± 1,0	25,62 ± 1,0	21,82 ± 1,0	17,85 ± 1,0	24,41 ± 1,0	21,15 ± 1,0

Примітка: результати представлені при рівні значущості  $p < 0,05$ , коефіцієнт варіації дорівнює 8%

Було проведено попарне порівняння зразків пилку з метою виявлення достовірних відмінностей у вмісті білка (табл. 3.6). В результаті було встановлено, що серед українських зразків пилку ББ вміст білка найбільший в зразку з BV5, заготовленому поблизу автомобільної траси біля лісу і в 6 км від

РАЕС. Найменший вміст білка в пилку зразків з BV2a і BV6, заготовлених на території жилого комплексу поблизу автомобільних доріг та на території аеродрому.

Таблиця 3.6

Порівняння вмісту білка в пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від місця зростання за допомогою  $\phi$ -критерію кутового перетворення Фішера

Зразки, що порівнюються	Значення $\phi$ -критерію	р-значимий рівень	Більший % вмісту білка
BV1/ BV2a	8,69	<0,00001	BV1
BV1/ BV2b	4,93	<0,00001	BV2b
BV1/ BV3	4,57	<0,00001	BV1
BV1/ BV4	2,69	<0,01	BV1
BV1/ BV5	6,67	<0,00001	BV5
BV1/ BV6	7,46	<0,00001	BV1
BV2a/ BV2b	13,58	<0,00001	BV2b
BV2a/ BV3	4,08	<0,001	BV3
BV2a/ BV4	5,96	<0,00001	BV4
BV2a/ BV5	15,32	<0,00001	BV5
BV2a/ BV6	Немає значимих відмінностей		
BV2b/ BV3	9,5	<0,00001	BV2b
BV2b/ BV4	7,62	<0,00001	BV2b
BV2b/ BV5	1,74	<0,05	BV5
BV2b/ BV6	12,39	<0,00001	BV2b
BV3/ BV4	1,88	<0,05	BV4
BV3/ BV5	11,24	<0,00001	BV5
BV3/ BV6	2,89	<0,01	BV3
BV4/ BV5	9,36	<0,00001	BV5
BV4/ BV6	4,78	<0,0001	BV4
BV5/ BV6	14,14	<0,00001	BV5
BV7/ BV8	25,48	<0,00001	BV8
BV7/ BV9	13,18	<0,0001	BV9
BV8/ BV9	12,30	<0,00001	BV8

Порівнюючи словацькі зразки пилку ББ, встановлено, що у зразку з BV7, заготовленому поблизу автомобільної дороги з одного дерева, найменше білка, в зразку BV8, заготовленому на території ботанічного саду університету також з одного дерева і недалеко від зразка BV7, білка найбільше.

Значимо більший відсоток вмісту білка в пилку з України ( $23,36 \pm 1,6 \%$ ), ніж Словаччини ( $21,14 \pm 3,3 \%$ ) (ф-критерій кутового перетворення Фішера дорівнює 8,44 при  $p < 0,001$ ).

Отже, досліджувані зразки пилку відрізняються за вмістом білка в залежності від місця зростання, що може свідчити про його різну алергенність.

### 3.1.6. Визначення жирнокислотного складу ліпідів пилку

В сумарних ліпідах пилку ББ було виявлено 8 компонентів з числом вуглецевих атомів від 14 до 20, представлених як насиченими, так і ненасиченими ЖК. Як видно з табл. 3.7 і 3.8 серед насичених ЖК переважає пальмітинова ( $33,9 \pm 2,0 \%$ ), серед ненасичених – олеїнова ( $29,5 \pm 4,6 \%$ ) та лінолева ( $27,8 \pm 5,9 \%$ ). Л. В. Ветчинникова и др. (2012) досліджувала жирнокислотний склад сумарних ліпідів та їх фракцій зрілого пилку основних деревовидних представників роду *Betula*, які зростають в умовах південної частини Республіки Карелія [176]. Вона отримала аналогічні результати щодо переважання серед насичених ЖК пальмітинової кислоти, а серед ненасичених – лінолевої. Переважання цих ЖК також характерно для бджолиного пилку, так як олеїнова і пальмітинова кислоти відіграють важливу роль у харчуванні бджіл, а лінолева проявляє антимікробну і протигрибкову активність [148, 175].

Таблиця 3.7

Жирнокислотний склад ліпідів пилку усіх зразків *Betula verrucosa* Ehrh., %

Назва ЖК	BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9
Міристинова, C <sub>14:0</sub>	2,9	2,4	1,7	1,8	1,8	1,4	2,1	3,0	1,9	6,5
Пентодецилова, C <sub>15:0</sub>	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	1,5	0,7	3,3
Пальмітинова, C <sub>16:0</sub>	36,3	34,6	32,4	34,4	32,0	31,5	32,7	34,8	37,6	32,7
Стеаринова, C <sub>18:0</sub>	4,8	4,9	4,6	3,6	4,2	4,2	4,5	3,0	3,8	3,9
Олеїнова, C <sub>18:1</sub>	25,6	24,4	26,8	27,4	28,8	25,6	34,4	38,8	30,0	32,7
Лінолева, C <sub>18:2</sub>	28,6	31,6	32,9	30,8	31,5	35,6	24,5	17,9	25,2	19,6
Ліноленова, C <sub>18:3</sub>	1,2	1,2	0,7	1,4	1,1	1,1	1,2	0,5	0,4	0,7

Продовження табл. 3.7

Арахідонова, C <sub>20:4</sub>	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,6
Σ НЖК	44,3	42,1	39,1	40,1	38,3	37,4	39,6	42,3	44,0	46,4
Σ ННЖК	55,7	57,4	60,8	59,9	61,7	62,6	60,4	57,7	55,9	53,6
Σ ПНЖК	30,1	33,0	34,0	32,5	32,9	37,0	26,0	18,9	25,9	20,9

Примітка: Σ НЖК – сума насичених жирних кислот; Σ ННЖК – сума ненасичених жирних кислот; Σ ПНЖК – сума поліненасичених жирних кислот

Таблиця 3.8

Порівняння середніх значень жирнокислотного складу ліпідів пилку

*Betula verrucosa* Ehrh., %

Назва ЖК	$\bar{x} \pm \sigma$ BV1- BV6	$\bar{x} \pm \sigma$ BV7- BV9	$\bar{x} \pm \sigma$ BV1- BV9
Міристинова, C <sub>14:0</sub>	2,0 ± 0,5	3,8 ± 2,4	2,6 ± 1,5
Пентодецилова, C <sub>15:0</sub>	0,3 ± 0,06	1,8 ± 1,3	0,8 ± 1,0
Пальмітинова, C <sub>16:0</sub>	33,4 ± 1,7	35,0 ± 2,5	33,9 ± 2,0
Стеаринова, C <sub>18:0</sub>	4,4 ± 0,4	3,6 ± 0,5	4,2 ± 0,6
Олеїнова, C <sub>18:1</sub>	27,6 ± 3,3	33,8 ± 4,5	29,5 ± 4,6
Лінолева, C <sub>18:2</sub>	30,8 ± 3,5	20,9 ± 3,8	27,8 ± 5,9
Ліноленова, C <sub>18:3</sub>	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,15	1,0 ± 0,3
Арахідонова, C <sub>20:4</sub>	0,3 ± 0,06	0,5 ± 0,15	0,4 ± 0,1
Σ НЖК	40,1 ± 2,4	44,2 ± 2,1	41,4 ± 2,9
Σ ННЖК	59,8 ± 2,4	55,7 ± 2,1	58,6 ± 3,0
Σ ПНЖК	32,2 ± 3,4	21,9 ± 3,6	29,1 ± 6,0

Примітки:  $\bar{x}$  – середнє арифметичне вибірки;  $\sigma$  – стандартне відхилення; Σ НЖК – сума насичених ЖК; Σ ННЖК – сума ненасичених ЖК; Σ ПНЖК – сума поліненасичених ЖК

Для кожного зразка пилку ББ за допомогою ф-критерію кутового перетворення Фішера були порівняні отримані значення суми насичених, ненасичених та поліненасичених ЖК (див. табл. 3.7). Результати порівняння з виявленням достовірно більшого вмісту суми ЖК між зразками пилку представлено в табл. 3.9.

З табл. 3.9 видно, що лише для декількох зразків пилку ББ немає відмінностей у вмісті сумарної кількості ЖК: між BV3 і BV6 по Σ НЖК і Σ ННЖК, і по Σ ПНЖК між BV2а і BV3, BV2а і BV4, BV3 і BV4. Отже, місце зростання має вплив на жирнокислотний склад ліпідів досліджуваного пилку. Також результати показують, що найбільший вміст Σ НЖК серед українських

зразків належить BV1, серед словацьких – BV9. Найбільший вміст  $\Sigma$  ННЖК належить BV5 і BV7, а  $\Sigma$  ПНЖК – BV5 і BV8 відповідно.

Таблиця 3.9

Порівняння суми насичених, ненасичених та поліненасичених жирних кислот ліпідів пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від місця зростання

Зразки, що порівнюються	$\phi$	p	Більша $\Sigma$ НЖК	$\phi$	p	Більша $\Sigma$ ННЖК	$\phi$	p	Більша $\Sigma$ ПНЖК
BV1/ BV2a	4,04	<0,001	BV1	2,02	<0,05	BV2a	6,46	<0,0001	BV2a
BV1/ BV2b	10,15	<0,0001	BV1	10,15	<0,0001	BV2b	8,58	<0,0001	BV2b
BV1/ BV3	8,11	<0,0001	BV1	8,11	<0,0001	BV3	6,46	<0,0001	BV3
BV1/ BV4	12,21	<0,0001	BV1	12,21	<0,0001	BV4	6,46	<0,0001	BV4
BV1/ BV5	14,27	<0,0001	BV1	14,27	<0,0001	BV5	14,85	<0,0001	BV5
BV1/ BV6	8,11	<0,0001	BV1	8,11	<0,0001	BV6	8,91	<0,0001	BV1
BV2a/ BV2b	6,11	<0,0001	BV2a	8,14	<0,0001	BV2b	2,12	<0,05	BV2b
BV2a/ BV3	4,07	<0,001	BV2a	6,09	<0,0001	BV3	Немає значимих відмінностей		
BV2a/ BV4	8,17	<0,0001	BV2a	10,19	<0,0001	BV4	Немає значимих відмінностей		
BV2a/ BV5	10,23	<0,0001	BV2a	12,26	<0,0001	BV5	8,39	<0,0001	BV5
BV2a/ BV6	4,07	<0,001	BV2a	6,09	<0,0001	BV6	15,37	<0,0001	BV2a
BV2b/ BV3	2,05	<0,05	BV3	2,05	<0,05	BV2b	2,12	<0,05	BV2b
BV2b/ BV4	2,06	<0,05	BV2b	2,06	<0,05	BV4	2,12	<0,05	BV2b
BV2b/ BV5	4,12	<0,001	BV2b	4,12	<0,001	BV5	6,27	<0,0001	BV5
BV2b/ BV6	2,05	<0,05	BV6	2,05	<0,05	BV2b	17,49	<0,0001	BV2b
BV3/ BV4	4,1	<0,001	BV3	4,1	<0,001	BV4	Немає значимих відмінностей		
BV3/ BV5	6,17	<0,0001	BV3	6,11	<0,0001	BV5	8,39	<0,0001	BV5
BV3/ BV6	Немає значимих відмінностей			Немає значимих відмінностей			15,37	<0,0001	BV3
BV4/ BV5	2,07	<0,05	BV4	2,07	<0,05	BV5	8,39	<0,0001	BV5
BV4/ BV6	4,1	<0,001	BV6	4,1	<0,001	BV4	15,37	<0,0001	BV4
BV5/ BV6	6,17	<0,0001	BV6	6,17	<0,0001	BV5	23,76	<0,0001	BV5
BV7/ BV8	4,04	<0,001	BV8	2,02	<0,05	BV7	16,81	<0,0001	BV8
BV7/ BV9	8,06	<0,0001	BV9	8,06	<0,0001	BV7	5	<0,0001	BV9
BV8/ BV9	4,02	<0,001	BV9	4,02	<0,001	BV8	11,81	<0,0001	BV8

Примітки:  $\phi$  – критерій кутового перетворення Фішера; p – рівень значущості

При порівнянні суми ЖК серед українських та словацьких зразків – насичених, ненасичених чи поліненасичених, виявилось, що сума ненасичених ЖК в ліпідах достовірно більша і в українських і в словацьких зразках пилку ББ, сума поліненасичених ЖК достовірно менша в усіх випадках. Результати порівняння представлено в табл. 3.10 та на рис. 3.12.



Таблиця 3.10

Порівняння сумарної кількості насичених, ненасичених та поліненасичених жирних кислот ліпідів зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Зразки, що порівнюються	Україна			Словаччина		
	φ	p	Більша Σ	φ	p	Більша Σ
Σ НЖК / Σ ННЖК	40,27	<0,000001	Σ ННЖК	18,03	<0,00001	Σ ННЖК
Σ НЖК / Σ ПНЖК	16,69	<0,0001	Σ НЖК	53,43	<0,0001	Σ НЖК
Σ ННЖК / Σ ПНЖК	56,96	<0,000001	Σ ННЖК	71,47	<0,0001	Σ ННЖК

Примітки: φ – критерій кутового перетворення Фішера; p – рівень значущості

Цей висновок підтверджено і результатами дослідження Л. В. Ветчиннікової. Вона також зазначає, що за складом сумарні ліпіди пилку були представлені як нейтральними або запасними ліпідами, так і полярними – фосфо- і гліколіпідами, які є структурною основою мембран.

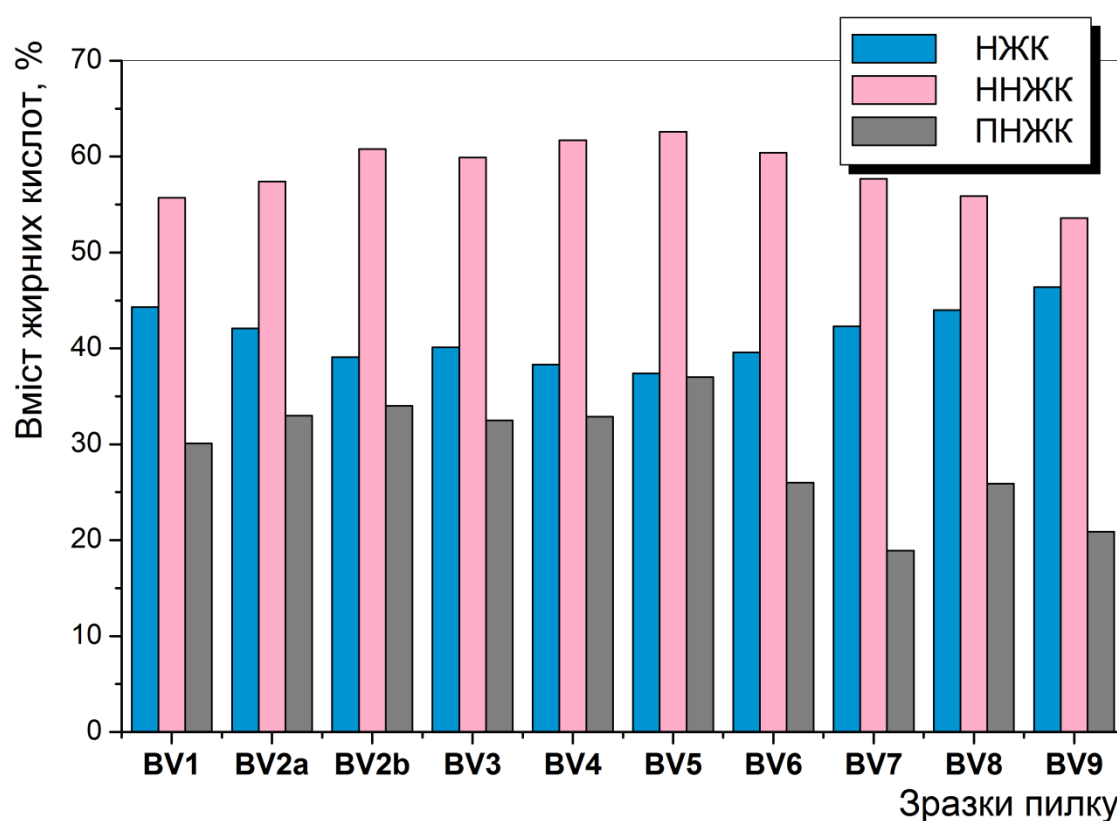


Рис. 3.12 Вміст суми насичених, ненасичених і поліненасичених жирних кислот ліпідів пилку *Betula verrucosa* Ehrh., %

Порівнюючи сумарну кількість ЖК зразків пилку ББ з України та Словаччини (табл. 3.11), бачимо, що  $\sum$  НЖК достовірно більша в зразках пилку зі Словаччини, а вміст  $\sum$  ННЖК і ПНЖК в зразках пилку з України.

Таблиця 3.11

Порівняння суми насичених, ненасичених та поліненасичених жирних кислот ліпідів зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з України та Словаччини

Зразки, що порівнюються	$\phi$	p	Більша $\sum$ НЖК	$\phi$	p	Більша $\sum$ ННЖК	$\phi$	p	Більша $\sum$ ПНЖК
Укр./Слов.	8,11	<0,0001	Слов.	8,11	<0,0001	Україна	22,61	<0,0001	Україна

Примітки:  $\phi$  – критерій кутового перетворення Фішера; p – рівень значущості

Серед українських зразків пилку ББ найбільш висока варіабельність вмісту встановлена для лінолевої (24,5-35,6 %) і олеїнової (24,4-34,4 %) кислот, найменша варіабельність значень відповідно для пентодецилової і арахідонової кислот (однаково 0,2-0,4 %). Найбільші значення варіабельності належать зразкам BV6-BV5 і BV2a-BV6, найменші – BV2a- BV2b відповідно.

Серед словацьких зразків пилку ББ найбільш висока варіабельність вмісту також встановлена для олеїнової (30,0-38,8 %) і лінолевої (17,9-25,2 %) кислот, найменша варіабельність значень для ліноленової (0,4-0,7 %) і арахідонової (0,3-0,6 %) відповідно. Найбільші значення варіабельності належать зразкам BV8-BV7 і BV7-BV8, найменші – BV8-BV9 аналогічно.

Достовірна різниця у жирнокислотному складі українського і словацького пилку відмічена для середніх значень насичених кислот – міристинової і пентодецилової, з переважанням вмісту у словацьких зразках пилку ББ, стеаринової – в українських; з ненасичених – олеїнової більше в словацькому пилку, а лінолевої – в українському; з поліненасичених – ліноленової кислоти більше в українському пилку, арахідонової – в словацькому пилку (табл. 3.12). В цілому зразки українського пилку ББ мають більше поліненасичених ЖК, ніж словацькі.

Таблиця 3.12

Порівняння жирних кислот ліпідів зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від країни походження

Зразки, що порівнюються	Україна/Словаччина	
Міристинова, C <sub>14:0</sub>	φ	11,89
	p	<0,0001
	Більше Словаччина	
Пентодецилова, C <sub>15:0</sub>	φ	17,42
	p	<0,0001
	Більше Словаччина	
Пальмітинова, C <sub>16:0</sub>	φ	4,22
	p	<0,001
	Більше Словаччина	
Стеаринова, C <sub>18:0</sub>	φ	4,09
	p	<0,001
	Більше Україна	
Олеїнова, C <sub>18:1</sub>	φ	12,99
	p	<0,0001
	Більше Словаччина	
Лінолева, C <sub>18:2</sub>	φ	22,89
	p	<0,0001
	Більше Україна	
Ліноленова, C <sub>18:3</sub>	φ	6,86
	p	<0,0001
	Більше Україна	
Арахідонова, C <sub>20:4</sub>	φ	3,19
	p	<0,01
	Більше Словаччина	

Примітки: φ – критерій кутового перетворення Фішера; p – рівень значущості

Отже, місце зростання має вплив на жирнокислотний склад ліпідів досліджуваного пилку ББ, а вищий вміст ненасичених та поліненасичених ЖК в українських зразках у порівнянні із словацькими може свідчити про активацію вільнорадикальних процесів при адаптації ПЗ до несприятливих екологічних умов саме на досліджуваній території України.

### 3.1.7. Вміст аскорбінової кислоти в пилку

Вміст АК в пилку ББ варіює в межах  $2,44 \cdot 10^{-3} - 7,62 \cdot 10^{-3}$  г/см<sup>3</sup> залежно від місця зростання (табл. 3.13). Найменший її вміст у словацькому зразку пилку (BV9) з придорожньої території, найбільший – із м. Київ (BV1) з паркової зони.

Таблиця 3.13

Вміст аскорбінової кислоти в екстрактах пилку *Betula verrucosa* Ehrh.,  
г/см<sup>3</sup>; n=3

Зразки пилку	$\bar{x}$	$\sigma$	V%
BV1	$7,62 \times 10^{-3}$	0,0000	0,00
BV2a	$4,82 \times 10^{-3}$	0,0000	0,00
BV2b	$5,26 \times 10^{-3}$	0,0000	0,00
BV3	$5,52 \times 10^{-3}$	0,0000	0,00
BV4	$5,17 \times 10^{-3}$	0,0000	0,00
BV5	$5,45 \times 10^{-3}$	0,0003	5,41
BV6	$4,57 \times 10^{-3}$	0,0005	10,00
BV7	$5,17 \times 10^{-3}$	0,0003	5,09
BV8	$4,23 \times 10^{-3}$	0,0000	0,00
BV9	$2,44 \times 10^{-3}$	0,0003	10,19

Примітки:  $\bar{x}$  – середнє арифметичне вибірки;  $\sigma$  – стандартне відхилення; V – коефіцієнт варіації, %

Статистично значуща різниця між різними зразками пилку за вмістом АК також наявна. Множинні порівняння значень АК за допомогою методу Бонфероні (дод. В. табл. 2.1) дозволяють відмітити, що нижнє і верхнє значення вмісту АК значимо відрізняються від значень усіх інших зразків пилку ББ. Словацький зразок пилку BV8 значимо відрізняється від семи зразків із дев'яти можливих варіантів. Після нього слідує зразок пилку BV6 (відрізняється від шести зразків із дев'яти можливих варіантів), BV3 (відрізняється від п'яти зразків із дев'яти можливих варіантів), BV2b, BV5, BV7 (відрізняються від чотирьох зразків із дев'яти можливих варіантів), а BV2a і BV4 відрізняються лише від трьох зразків із дев'яти можливих варіантів.

При порівнянні вмісту АК у зразках пилку ББ з України та Словаччини за допомогою t-критерію Стюдента для незалежних вибірок (табл. 3.14), було

встановлено, що вміст АК в українському пилку ББ достовірно вищий, ніж у пилку словацькому.

Таблиця 3.14

Результати порівняння вмісту аскорбінової кислоти у зразках пилку

*Betula verrucosa* Ehrh. з України та Словаччини

	Середнє значення (Україна)	Середнє значення (Словаччина)	t-значення	df	p
АК	0,005463	0,004026	3,432241	28	0,001879

Примітка: df – ступінь свободи, p – рівень значущості

Отже, результат аналогічний до випадку із вмістом білків і ЖК ліпідів: у пилку ББ із досліджуваної території України вміст цих хімічних речовин вищий, що дозволяє припустити більшу активацію антистресових механізмів ПЗ із беріз українських екосистем.

### 3.1.8. Визначення вмісту флавоноїдних сполук в пилку

Вміст флавоноїдних сполук в пилку ББ варіює в межах 0,86-3,15 % залежно від місця зростання (табл. 3.15). В пилку з України він найбільший в зразку з BV6, заготовленому на території аеродрому, найменший – з BV1 (паркова зона м. Київ) і BV3 (територія лісу с. Хоцьки). Не було відмічено достовірних відмінностей при попарному порівнянні між зразками BV2a/BV2b та BV4/BV5 (табл. 3.16).

Таблиця 3.15

Масова частка флавоноїдних сполук в пилку *Betula verrucosa* Ehrh., %

BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9
1,0 ± 0,01	1,58 ± 0,02	1,72 ± 0,03	1,08 ± 0,01	2,01 ± 0,02	2,15 ± 0,02	3,15 ± 0,03	0,86 ± 0,03	2,8 ± 0,15	–

Примітка: результати представлені при рівні значущості  $p < 0,05$ ; «–» – не визначено

Серед словацького пилку значимо більший вміст флавоноїдних сполук в пилку із ботанічного саду (BV8), аніж в безпосередній близькості від автомобільної дороги (BV7).

Таблиця 3.16

Порівняння вмісту флавоноїдних сполук в пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від місця зростання за допомогою  $\phi$ -критерію кутового перетворення Фішера

Зразки, що порівнюються	Значення $\phi$ -критерію	p-значимий рівень	Більший % вмісту флавоноїдів
BV1/ BV2a	5,78	<0,00001	BV2a
BV1/ BV2b	7,01	<0,00001	BV2b
BV1/ BV3	Немає значимих відмінностей		
BV1/ BV4	9,41	<0,00001	BV4
BV1/ BV5	10,51	<0,00001	BV5
BV1/ BV6	17,5	<0,00001	BV6
BV2a/ BV2b	Немає значимих відмінностей		
BV2a/ BV3	4,09	<0,0001	BV2a
BV2a/ BV4	3,63	<0,001	BV4
BV2a/ BV5	4,72	<0,00001	BV5
BV2a/ BV6	11,72	<0,00001	BV6
BV2b/ BV3	6,13	<0,00001	BV2b
BV2b/ BV4	2,4	<0,01	BV4
BV2b/ BV5	3,5	<0,001	BV5
BV2b/ BV6	10,49	<0,00001	BV6
BV3/ BV4	8,53	<0, 00001	BV4
BV3/ BV5	9,63	<0,00001	BV5
BV3/ BV6	16,62	<0,00001	BV6
BV4/ BV5	Немає значимих відмінностей		
BV4/ BV6	8,09	<0,0001	BV6
BV5/ BV6	6,99	<0,00001	BV6
BV7/ BV8	16,83	<0,00001	BV8

Між українськими (1,81% в середньому) і словацькими (1,83% в середньому) зразками березового пилку значущих відмінностей по процентному вмісту флавоноїдів виявлено не було ( $\phi = 0,17$  при  $p = 0,43$ ).

За ДСТУ 3127-95 в сухій бджолиній обножці, тобто у поліфлоральному пилку, обробленому ферментами слюни бджоли, вміст флавоноїдних сполук повинен становити 4,5 %. Зважаючи на те, що ми досліджували монофлоральний зразок пилку, заготовлений без участі бджіл, вміст флавоноїдних сполук допустимо може відрізнятися. Їх присутність є важливим фізіолого-біохімічним показником. Те, що між зразками пилку встановлена

достовірна відмінність у вмісті флавоноїдних сполук (крім, трьох випадків, див. табл. 3.16), вказує на вплив екологічних факторів місць зростання. Причин тому може бути декілька: забрудненість мікроорганізмами, ВМ тощо.

### *Підсумки до Розділу 3.1*

Перша частина розділу присвячена дослідженню можливих причин розвитку алергенності пилку *Betula verrucosa* Ehrh. В другій частині розділу досліджено рівень пристосування ПЗ до впливу алергенних факторів на основі кількісного аналізу біохімічних складових – фізіологічних показників адаптивного потенціалу.

На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що хіміко-біологічні властивості інтактного пилку обумовлені факторами екотопів України та Словаччини. Саме від сприятливої або несприятливої дії екологічних факторів під час формування та дозрівання ПЗ ББ залежить вміст біохімічних компонентів. Якщо якісний склад пилку обумовлений більшою мірою ботанічним видом, то кількісний – безпосередньо умовами зростання популяцій ББ.

Вміст білків, ЖК ліпідів, АК, флавоноїдних сполук в пилку варіює залежно від місця зростання ББ і коливання цих сполук відрізняються достовірно (за винятком флавоноїдних сполук). Більший вміст білків, поліненасичених та ненасичених ЖК, АК характерний для пилку із беріз українських екосистем. Тому можна припустити більшу активацію їх антистресових механізмів з дослідженої території України.

До ВМ пилок ББ є чутливим у всіх досліджуваних типах зелених насаджень. Мікробіологічна якість ПЗ незадовільна через перевищення існуючих норм, особливо за кількістю ентеробактерій, аеробних та анаеробних бактерій. В цілому за усіма дослідженими видами мікроорганізмів зразки словацького пилку ББ виявилися більш забрудненими, порівняно з українськими. На вміст мікотоксинів місце збору пилкової сировини ББ не

впливає. Найважливіший досліджуваний показник алергенного потенціалу пилку ББ – рівень експресії Bet v 1 – чітко розрізняється в міських та маргінальних умовах зростання дерев (вищий за межами міста).

Дослідження хіміко-біологічних особливостей ПЗ ББ і підтвердження виявлення достовірних відмінностей залежно від місця зростання дозволяє обґрунтовано оцінити БА досліджуваних зразків пилку, представлену в наступному розділі.

Вищевикладені результати досліджень висвітлено у наступних друкованих працях (у хронологічному порядку):

1. Шевцова Т. Фітотерапевтичне значення берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) / Т. Шевцова, К. Гаркава, Я. Бриндза // Фітоапітерапія: здобутки та перспективи : між нар. наук.-практ. конф., 20-21 квітня 2012 р. : тези доп. – Ужгород, 2012. – С. 73-77.

2. Пат. 78713 Україна, МПК G01N 33/68. Спосіб оцінки жирнокислотного складу ліпідів пилку берези / Гаркава К. Г., Шевцова Т. В., Брюзгіна Т. С.; власник Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця. – №201212017; заявл. 19.10.2012; опубл. 25.03.2013, Бюл. №6. – 4 с.

3. Белково-липидный состав пыльцы березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.) и ее антиоксидантная активность в зависимости от места произрастания / Т. В. Шевцова, Е. Г. Гаркавая, Я. Бриндза, Т. С. Брюзгина, В. А. Гроза // Вісник Дніпропетровського університету. Серія Біологія, екологія. – 2013. – №21(2). – С. 105-112.

4. Changes in expression of Bet v 1 allergen of silver birch pollen in urbanized area of Ukraine / J. Žiarovská, M. Labajová, K. Ražná, M. Bežo, V. Štefúňová, T. Shevtsova, K. Garkava, J. Brindza // Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering. – Eng., 2013. – №48(12). – P. 1479-84.

5. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from Ukrainian *Betula verrucosa* Ehrh. pollen after microbiological analysis / T. Shevtsova, L. Hleba, M.



Kačániová, J. Brindza, K. Garkava // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2013. – №3(1). – P. 94-96.

6. Contamination of *Betula verrucosa* Ehrh. pollen by microorganisms, mycotoxins and heavy metals / T. Shevtsova, M. Kačániová, K. Garkava, J. Brindza, J. Petrova // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2014. – №3(6). – P. 509-513.

7. Шевцова Т. В. Содержание флавоноидных соединений в пыльце как биоиндикационный показатель / Т. В. Шевцова, Е. Г. Гаркавая, Я. Бриндза // Фундаментальные и прикладные аспекты создания биосферосовместимых систем : 2-я Междун. науч.-техн. конф., декабрь 2014 г. : тезисы докл. – Орел, Россия, 2015. – С. 346-350.

### 3.2. Визначення біологічної активності пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Згідно Оксфордського словника із біохімії, БА – це будь-яка дія речовини, яка є доказовою у живому організмі. Інші визначення БА: здатність впливати чи викликати реакцію в живій тканині; здатність молекули викликати певні біологічні зміни; максимальний прояв найважливіших біологічних функцій в межах свого діапазону толерантності до основних лімітуючих екологічних факторів середовища.

#### 3.2.1. Визначення антиоксидантної активності пилку

Одним із способів оцінки БА є встановлення антиоксидантної активності. Найчастіше визначають ЗАА при спільній дії складових біологічного об'єкта [148].

Анемофільний пилок ББ демонструє високі значення антиоксидантної активності в умовах *in vitro* (табл. 3.17 та рис. 3.13). Значення ЗАА для водних екстрактів визначено у межах 74,8-85,5 %, метанолових екстрактів – 46,1-92,6 %, спиртових екстрактів – 60,3-95,4 %.

Таблиця 3.17

Загальна антиоксидантна активність пилку *Betula verrucosa* Ehrh., %; n=5

Зразки пилку	min	max	$\bar{x}$	$\sigma$	V%
Водний екстракт					
BV1	81,17	82,90	81,94	0,67	0,82
BV2a	79,39	81,44	80,54	0,90	1,11
BV2b	82,37	86,68	84,08	1,78	2,12
BV3	82,24	84,93	84,06	1,07	1,28
BV4	84,83	87,09	85,50	0,93	1,08
BV5	84,01	85,87	84,66	0,72	0,85
BV6	78,94	85,41	82,69	2,43	2,94
BV7	74,11	75,16	74,75	0,43	0,57
BV8	76,45	78,99	78,40	1,10	1,40
BV9	77,48	78,80	78,11	0,57	0,74
Спиртовий екстракт					
BV1	61,48	66,51	64,60	1,95	3,02

Продовження табл. 3.17

BV2a	66,82	69,57	67,95	1,04	1,53
BV2b	68,66	73,63	70,84	2,06	2,91
BV3	55,90	63,89	60,27	3,18	5,27
BV4	73,48	76,52	75,05	1,16	1,54
BV5	83,70	85,98	84,91	0,89	1,05
BV6	66,04	73,43	69,27	2,60	3,76
BV7	94,80	95,44	95,04	0,28	0,29
BV8	89,08	96,90	95,04	3,34	3,51
BV9	94,82	95,94	95,40	0,51	0,53
Метаноловий екстракт					
BV1	44,77	47,04	46,08	0,84	1,81
BV2a	73,70	75,35	74,70	0,65	0,87
BV2b	78,43	80,15	79,35	0,66	0,83
BV3	50,38	52,53	51,44	0,97	1,88
BV4	91,95	93,71	92,62	0,67	0,72
BV5	91,50	92,86	92,40	0,57	0,61
BV6	78,24	79,60	78,84	0,57	0,72
BV7	91,13	92,21	91,64	0,43	0,47
BV8	64,83	76,52	72,00	4,33	6,01
BV9	90,93	91,97	91,51	0,39	0,43

Примітка: min – мінімальне значення вибірки; max – максимальне значення вибірки;  
 $\bar{x}$  – середнє арифметичне вибірки;  $\sigma$  – стандартне відхилення; V – коефіцієнт варіації, %

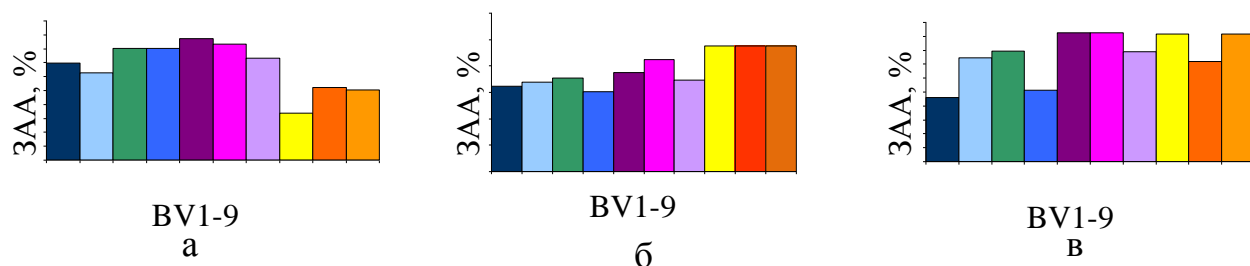


Рис. 3.13 Візуальна оцінка співвідношення загальної антиоксидантної активності усіх зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з різних місць зростання:  
 а – водний екстракт; б – спиртовий екстракт; в – метаноловий екстракт

Найбільша різниця в отриманих значеннях ЗАА спостерігається для метанолових екстрактів пилку, найменша – для водних екстрактів, що підтверджує і менше варіювання коефіцієнтів варіації. В цілому результати водних екстрактів ЗАА найменш варіабельні (рис. 3.14).

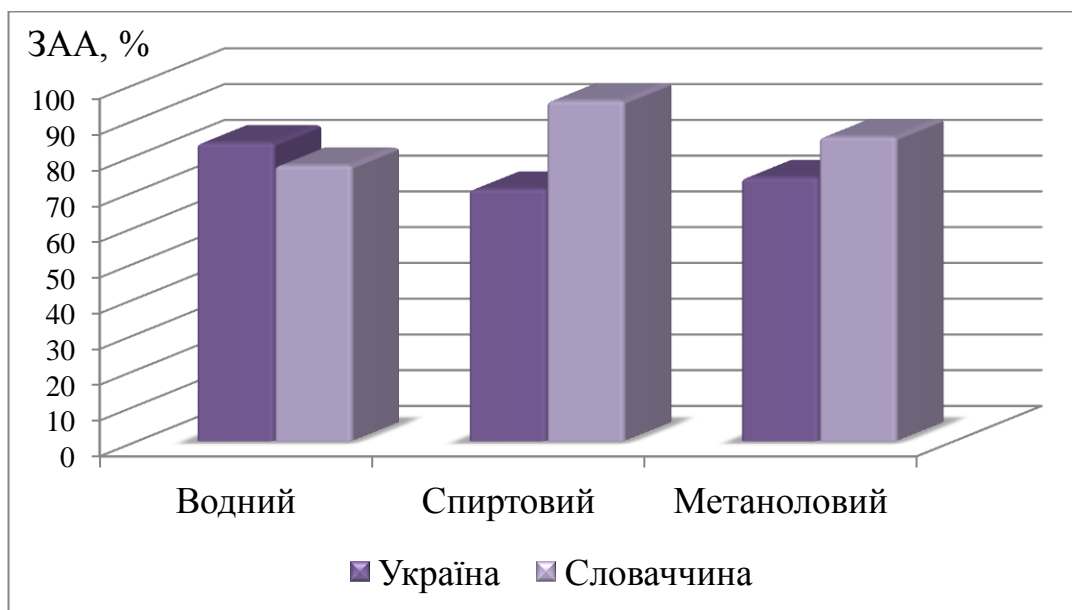


Рис. 3.14 Середня загальна антиоксидантна активність водних, спиртових і метанолових екстрактів зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з України та Словаччини

При порівнянні ЗАА екстрактів (вода, етанол, метанол) пилку ББ між місцями зростання на території України за t-критерієм Стьюдента (дод. Г табл. 1.1-1.6) були виявлені нижче наведені відмінності.

Виходячи з даних табл. Г.1.1, ЗАА:

- у водному екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV1, ніж в BV2a і значимо нижча в BV1, ніж в BV2b, BV3, BV4, BV5;
- в спиртовому екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV1, ніж в BV3 і значимо нижча в BV1, ніж в BV2a, BV2b, BV4, BV5, BV6;
- в метаноловому екстракті достовірно нижча у пилку, зібраному в BV1, ніж в BV2a, BV2b, BV3, BV4, BV5, BV6.

Виходячи з даних табл. Г.1.2, ЗАА:

- у водному екстракті достовірно нижча у пилку, зібраному в BV2a, ніж в BV2b, BV3, BV4, BV5, BV6;
- в спиртовому екстракті достовірно вища в BV2a, ніж в BV3 і нижче у пилку, зібраному в BV2a, ніж в BV2b, BV4, BV5;

– в метаноловому екстракті достовірно вища в BV2a, ніж в BV3 і нижча у пилку, зібраному в BV2a, ніж в BV2b, BV4, BV5, BV6.

Виходячи з даних табл. Г.1.3, ЗАА:

- у водному екстракті значущих відмінностей немає;
- в спиртовому екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV2b, ніж в BV3 і значимо нижче в BV2b, ніж в BV4, BV5;
- в метаноловому екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV2b, ніж в BV3 і значимо нижча в BV2b, ніж в BV4, BV5.

Виходячи з даних табл. Г.1.4, ЗАА:

- у водному екстракті значущих відмінностей немає;
- в спиртовому екстракті достовірно нижча у пилку, зібраному в BV3, ніж в BV4, BV5, BV6;
- в метаноловому екстракті достовірно нижча у пилку, зібраному в BV3, ніж в BV4, BV5, BV6.

Виходячи з даних табл. Г.1.5, ЗАА:

- у водному екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV4, ніж в BV6;
- в спиртовому екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV4, ніж в BV6 і значимо нижча в BV4, ніж в BV5;
- в метаноловому екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV4, ніж в BV6.

Виходячи з даних табл. Г.1.6, ЗАА:

- у водному екстракті значущих відмінностей немає;
- в спиртовому і метаноловому екстрактах достовірно вища у пилку, зібраному в BV5, ніж в BV6.

Як видно з табл. Г.1.1-1.6 результати із ЗАА екстрактів пилку ББ, заготовленого на території України, різняться. Беззаперечним лідером з максимальної ЗАА у всіх розчинниках є зразок з м. Кузнецовськ Рівненської обл. (BV5), що вказує на найвищу розчинність речовин різної природи або на

найбільший їх вміст у пилку. За ним слідує зразок з смт. Іванків Київської обл. (BV4), який має найвищу розчинність разом зі зразком BV5 у воді та метанолі. Необхідно додати, що у водному екстракті максимальну ЗАА також показали зразки березового пилку з BV2b і BV3 (із природного музею та лісу). Між цими чотирма зразками пилку (BV5, BV4, BV2b, BV3) немає достовірних відмінностей. Найнижча ЗАА у водному екстракті в зразка з BV2a, у спиртовому екстракті – з BV3, у метаноловому – з BV1.

Щодо ЗАА екстрактів (вода, етанол, метанол) пилку ББ зі Словаччини маємо (табл. Г.1.7):

- у водному екстракті достовірно нижча у пилку, зібраному в BV7, ніж в BV8 і BV9;
- в спиртовому екстракті значущих відмінностей виявлено не було;
- в метаноловому екстракті достовірно вища у пилку, зібраному в BV7, ніж в BV8 і значимо нижча в BV8, ніж в BV9.

Як видно з табл. Г.1.7 зразки пилку зі Словаччини, зібрані на території одного міста, відрізняються за ЗАА. Достовірні відмінності в ЗАА між зразками виявлені для води і метанолу.

Значення ЗАА водних, етанолових і метанолових екстрактів українських зразків пилку ББ достовірно відрізняються від словацьких значень (табл. 3.18-19). Рівень вільних радикалів після реакції антиоксиданта з радикалом ДФПГ у водному екстракті значимо вищий у пилку, зібраному на території України, ніж на території Словаччини ( $t=10,27$  при  $p < 0,001$ ), а рівень вільних радикалів в спиртовому ( $t=-12,28$  при  $p < 0,001$ ) і метаноловому ( $t=-2,39$  при  $p=0,02$ ) екстрактах значимо вищий у пилку, зібраному в Словаччині, аніж в Україні. Це може свідчити про різний механізм антиоксидантної активності, обумовлений відмінностями природи та кількості антиоксидантних речовин в пилку. Так, визначено, що вміст АК достовірно більший в українських зразках пилку ББ.

Таблиця 3.18

Результати перевірки даних на нормальність розподілу за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова

Екстрагент	Україна			Словаччина		
	N	max D	Колмогоров-Смірнов	N	max D	Колмогоров-Смірнов
Вода	35	0,11	$p > 0,20$	15	0,19	$p > 0,20$
Етанол	35	0,12	$p > 0,20$	15	0,36	$p < 0,10$
Метанол	35	0,22	$p < 0,10$	15	0,39	$p < 0,10$

Примітка: N – номер; max D – D статистика Колмогорова-Смірнова;  $p > 0,20$  рівень достовірності max D

Таблиця 3.19

Результати порівняння показника рівня вільних радикалів у екстракті пилку з України і Словаччини за допомогою t-критерію Стьюдента

Екстрагент	Середнє (Україна)	Середнє (Словаччина)	t-значення	df	p
Вода	83,35	77,09	10,27*	48	0,001
Етанол	70,42	95,16	-12,28*	48	0,001
Метанол	73,63	85,05	-2,39*	48	0,021

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента; df – число ступеней свободи; p – рівень значимості

Дослідження ЗАА водних, етанолових і метанолових екстрактів показало, що пилки ББ є гарним поглиначем радикалу ДФПГ *in vitro*. Значення водних екстрактів пилку ББ найбільш стабільні. Варіації спектру біологічно активних речовин пилку відображають відмінності в умовах НПС під час процесів формування та дозрівання пилку. Тому для діагностичного, лікувального і профілактичного використання треба застосовувати пилки ББ, зібраний у тих областях, де живуть пацієнти, але потрібно враховувати, що сильна антиоксидантна активність, яка спостерігається *in vitro*, не завжди може залишатись такою *in vivo* [88, 348, 349].

### 3.2.2. Визначення антимікробної активності пилку

Антимікробна дія – ще один із методів оцінки БА пилку [311].

На противагу до ЗАА пилок ББ проявив слабку АМА щодо 11 досліджених видів мікроорганізмів (табл. 3.20-3.21). Зони затримки росту культур мікроорганізмів проявились лише серед зразків пилку ББ з України і в межах 1,33-4,67 мм, а найсильніші антимікробні властивості показали зразки пилку ББ з придорожніх насаджень м. Кузнецовськ (результат позитивний у 6 випадках із 14 варіантів проти *Ralstonia solanacearum* (водні і водно-сольові екстракти), *Pseudomonas syringae* (водні і водно-сольові екстракти), *Paenobacillus larvae*, *Botrytis cinerea*) та з паркових насаджень м. Київ (результат позитивний у 5 випадках із 14 варіантів проти *Ralstonia solanacearum* (водні і водно-сольові екстракти), *Pseudomonas syringae* (водні і водно-сольові екстракти), *Paenobacillus larvae*). Зразок пилку ББ з території аеродрому не проявив АМА взагалі.

Таблиця 3.20

Вплив водних і водно-сольових екстрактів українського пилку

*Betula verrucosa* Ehrh. на мікроорганізми, мм

Мікроорганізми		BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6
<i>Ralstonia solanacearum</i> (24)	BB	+	–	+	+	+	+	–
	BC	+	+	+	–	+	+	–
<i>E. coli</i> M-17 (20)	BB	–	–	–	–	–	–	–
	BC	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas syringae</i> (22)	BB	+	–	+	+	+	+	–
	BC	+	+	+	–	+	+	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	BB	–	–	–	–	–	–	–
<i>Clostridium perfringens</i> (3)	BB	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus cereus</i> (2,33)	BB	–	–	–	–	–	–	–
<i>Paenobacillus larvae</i> (2)	BB	1,33±0,58	1,33±0,58	–	–	–	2,33±0,58	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	BB	–	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium expansum</i> (2)	BB	–	–	–	–	–	–	–
<i>Botrytis cinerea</i> (1)	BB	–	–	–	2,33±0,58	–	4,67±0,58	–
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (1)	BB	–	–	–	–	–	–	–

Примітка: BB – водний екстракт; BC – водно-сольовий екстракт; «+» - відсутній ріст мікроорганізмів; «–» - немає зон затримки росту мікроорганізмів; в дужках вказано зони затримки росту контролю



Таблиця 3.21

Вплив водних екстрактів словацького пилку *Betula verrucosa* Ehrh. на  
мікроорганізми, мм

Мікроорганізми		BV7	BV8	BV9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	BB	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i> (3)	BB	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i> (2,33)	BB	—	—	—
<i>Paenobacillus larvae</i> (2)	BB	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	BB	—	—	—
<i>Penicillium expansum</i> (2)	BB	—	—	—
<i>Botrytis cinerea</i> (1)	BB	—	—	—
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (1)	BB	—	—	—

Примітка: BB – водний екстракт; «—» - немає зон затримки росту мікроорганізмів; в дужках вказано зони затримки росту контролю

Екстракти пилку ББ взагалі не діють на *E. coli* М-17, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium expansum* та *Cladosporium sphaerospermum*.

Якщо порівнювати дію водних та водно-сольових екстрактів пилку ББ, вплив яких дослідили лише проти трьох видів мікроорганізмів (див. табл. 3.20) і лише у досліді з українськими зразками пилку, то їх дія виявилася однаковою для всіх зразків, крім BV2a і BV3. Для зразка пилку ББ BV2a діють лише водно-сольові екстракти, на водних екстрактах ріст спостерігався. Для зразка пилку BV3 навпаки – діють лише водні екстракти порівняно зі зразком BV2a.

Пилок ББ в цілому проявив слабку АМА, судячи із величини і частоти зон затримки росту. Можливим поясненням є низька концентрація водних екстрактів. По всій імовірності, пилок діє безпосередньо, завдяки вмісту у ньому антибіотичних речовин або ж каталізує дію розчинника.

Не виключено, що на отримані результати могла вплинути наявна мікробіота на зразках пилку ББ. Дія могла бути синергетичною або антагоністичною. Наприклад, на *E. coli* М-17 березові екстракти пилку не подіяли, можливо через синергетичний ефект наявних представників родини *Enterobacteriaceae* або через антагоністичну активність *E. coli* М-17. Згідно з табл. 3.3 зразок пилку BV1 входить до групи «ab» за тестом Тьюкі, тобто,

містить меншу кількість усіх досліджуваних мікроорганізмів і проявляє достатньо сильні антимікробні властивості. Зразок пилку BV6, навпаки, входить до групи «а» за тестом Тьюкі, отже, більше забруднений мікроорганізмами і не проявляє АМА. Зразки пилку BV2а та BV5 входять до однакових груп, але BV2а проявляє трохи слабші антимікробні властивості. Зразок пилку BV3 від них відрізняється, але АБА подібна до BV2а.

### 3.2.3. Визначення імунологічної активності пилку

В табл. 3.22 і 3.23 представлено результати НСТ-тесту та поглинальної активності фагоцитів.

Як видно з результатів (табл. 3.22), відсоток НСТ-позитивних клітин в усіх зразках пилку ББ перевищує контрольне значення: у зразку пилку ББ з BV1 в 1,5 рази і майже в 2 рази в зразках пилку з BV3 і BV4. В усіх зразках пилку, крім BV1 і BV5, вірогідно активуються пероксидазні системи, на що вказує збільшення значення СЦК клітин (див. табл. 3.22).

Таблиця 3.22

Кисеньгенеруюча активність фагоцитуючих клітин в реакції з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест)

Зразки пилку	НСТ-позитивні клітини, %	СЦК, у.о.
Контроль	$31,01 \pm 2,2$	$0,40 \pm 0,02$
BV1	$*51,52 \pm 3,5$	$0,41 \pm 0,015$
BV2a	$*42,92 \pm 2,9$	$*0,57 \pm 0,02$
BV2b	$*47,33 \pm 3,1$	$*0,58 \pm 0,02$
BV3	$*61,33 \pm 4,5$	$*0,72 \pm 0,02$
BV4	$*58,44 \pm 3,7$	$*0,49 \pm 0,02$
BV5	$*42,33 \pm 2,9$	$0,43 \pm 0,02$

Примітка: \* – відмічено достовірність результатів при  $p < 0,05$

Як видно з табл. 3.23 значення фагоцитарного індексу усіх зразків знаходиться в межах норми. Хоча відмічається і деяке підвищення показників фагоцитозу порівняно з контролем. Отже, під впливом водно-сольових

екстрактів з пилку ББ в клітині відбувається активація НАДФН<sub>2</sub>-оксидази і гексозомонофосфатного шунта. В результаті збільшується число клітин, які беруть участь у фагоцитозі – першій ланці захисту організму від дії негативних факторів, але знижується фагоцитарне число (достовірний результат для BV2b) за рахунок розподілу поглинутих частинок між активованими фагоцитами.

Таблиця 3.23

Вплив водно-сольових витяжок пилку *Betula verrucosa* Ehrh. на поглинальну активність фагоцитів крові

Зразки пилку	$\Phi_i$ , %	$\Phi_{\text{ч}}$ у.о.
Контроль	70,00±2,15	9,42±0,65
BV1	*81,33±2,8	7,93±0,55
BV2b	79,33±2,6	*6,22±0,4
BV4	*82,00±2,7	7,21±0,5
BV5	*82,66±2,7	7,85±0,5

Примітка:  $\Phi_i$  – фагоцитарний індекс – кількість клітин, що поглинають частинки;  $\Phi_{\text{ч}}$  – фагоцитарне число – число частин латексу в одному фагоциті; \* – відмічено достовірність результатів при  $p < 0,05$

З літературних джерел відомо, що збільшення фагоцитарної активності може спостерігатися при алергіях, аутоалергічних захворюваннях, лейкоцитозі тощо, відображаючи дію алергена на організм. Вивчення показників фагоцитозу має значення в комплексному аналізі та діагностиці імунодефіцитних станів.

В цілому водно-сольові екстракти із пилку ББ, заготовленого з різних місць зростання на території України, мають подібну дію на функціональну активність фагоцитів крові. Чіткої залежності між місцем зростання і отриманими значеннями немає. НСТ-тест у випадку пилку ББ є більш достовірним методом виявлення імунотропної активності пилку ББ порівняно з фагоцитозом.

### *Підсумки до Розділу 3.2*

БА пилку *Betula verrucosa* Ehrh. проявилася на високому рівні через ЗАА, середньому – через імуноактивність та низькому – через АМА. Основа БА – співвідношення біологічно активних сполук в ПЗ, а повнота їх дії обумовлена методом та умовами дослідження.

Дія досліджуваних пилкових екстрактів ББ достовірно відрізняється залежно від екотопу походження пилкової сировини, що є логічним продовженням висновків першої частини розділу. Між країнами походження пилку ББ найбільш помітні відмінності: високі значення ЗАА водних екстрактів українського пилку, а словацького – етанолових та метанолових, що обумовлено кількісними відмінностями біохімічних сполук; пилок з екоотопів Словаччини взагалі не продемонстрував АМА.

Вищевикладені результати досліджень висвітлено у наступних друкованих працях (у хронологічному порядку):

1. Шевцова Т. В. Визначення кисеньгенеруючої активності фагоцитів крові під впливом водно-сольових витяжок пилку берези бородавчастої з Іванківського району Київської області / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава, К. В. Криницька // Перспективи та напрямки сучасної біотехнології : наук.-практ. сем., 14-15 жовтня 2011 р. : тези доп. – К., 2011. – С. 151-152.

2. Шевцова Т. В. Активність пилку берези бородавчастої відносно фагоцитарної активності крові в умовах техногенного забруднення / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава, Л. В. Ковальчук // Відновлення порушених природних екосистем : IV Міжнар. наук. конф., 18-21 жовтня 2011 р. : тези доп. – Донецьк, 2011. – С. 396-398.

3. Шевцова Т. Вплив водно-сольових витяжок із пилку берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) на поглинальну активність фагоцитів крові / Т. Шевцова, К. Гаркава, Л. Ковальчук // Інтродукція та збереження рослинного різноманіття : Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – К., 2012. – №30. – С. 70-71.

4. Шевцова Т. В. Антиоксидантна активність водних та спиртових екстрактів пилку берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) в залежності від місця зростання / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава, Я. Бриндза // Науковий часопис НПУ імені М.П. Драгоманова : Зб. наук. праць. – К., 2012. – №4. – С. 107-113.

5. Антибактеріальні властивості пилку берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава, В. В. Хробуст, Л. Д. Варбанець // Radostim-2012. Микробные биотехнологии: актуальность и будущее : Міжнар. наук.-практ. конф., 19-22 листопада 2012 р. : тези доп. – К., 2012. – С. 353-354.

6. Шевцова Т. В. Антибактеріальна та протигрибкова активність пилку *Betula verrucosa* Ehrh. / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава // daRostim-2013 «Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища» : IX Міжнар. наук.-практ. конф., 7-10 жовтня 2013 р. : тези доп. – Львів, 2013. – С. 167.

### 3.3. Вимірювання морфометричних показників пилкових зерен

#### *Betula verrucosa* Ehrh.

Як відомо, процеси формування та розвитку пилку дуже чутливі до впливу факторів НПС різного генезису. Тому було виділено декілька кількісних морфологічних критеріїв з метою виявити відмінності ПЗ одного виду рослини з різних місць зростання до їх виходу в НПС при комплексному впливі природних та антропогенних факторів довкілля. Усі отримані морфометричні результати представлено в табл. 3.24.

Таблиця 3.24

Варіабельність морфологічних характеристик пилкових зерен

*Betula verrucosa* Ehrh., n=60

Зразки	min	max	$\bar{x}$	$\sigma$	V%
<b>Полярна вісь (Р) (ознака 1), мкм</b>					
BV1	16,11	21,21	18,57	1,19	6,39
BV2a	15,20	21,82	17,90	1,45	8,09
BV2b	14,25	21,80	18,57	1,48	7,99
BV3	15,07	21,58	18,42	1,64	8,92
BV4	16,52	22,51	18,97	1,38	7,26
BV5	15,27	21,05	17,95	1,36	7,56
BV6	15,34	21,50	18,28	1,44	7,88
BV7	14,26	22,39	18,76	1,95	10,38
BV8	14,82	21,88	18,11	1,59	8,80
BV9	14,28	27,08	18,86	2,35	12,45
<b>Екваторіальний діаметр (Е) (ознака 2), мкм</b>					
BV1	18,95	26,96	23,26	1,92	8,25
BV2a	16,85	26,43	22,58	2,20	9,72
BV2b	19,86	28,16	23,18	1,73	7,46
BV3	19,82	28,14	23,23	1,56	6,74
BV4	20,95	28,08	23,98	1,66	6,94
BV5	19,81	26,74	23,30	1,34	5,74
BV6	19,94	27,06	23,41	1,44	6,14
BV7	20,68	28,49	24,95	1,67	6,69
BV8	19,71	27,66	23,70	1,78	7,50
BV9	21,23	28,16	24,71	1,74	7,06
<b>Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна (ознака 3), deg</b>					
BV1	83,80	125,85	105,40	7,61	7,22

Продовження табл. 3.24

BV2a	81,33	122,15	99,42	8,92	8,98
BV2b	81,99	110,58	97,62	6,95	7,12
BV3	81,24	115,77	98,71	7,81	7,91
BV4	86,55	115,23	101,13	6,86	6,78
BV5	80,78	112,55	98,76	6,61	6,70
BV6	85,60	123,59	103,13	7,66	7,43
BV7	89,14	129,08	113,77	8,82	7,75
BV8	87,38	128,29	108,47	9,45	8,71
BV9	84,56	125,57	107,12	9,82	9,17
<b>Внутрішній діаметр апертури (ознака 4), мкм</b>					
BV1	2,06	4,27	3,28	0,45	13,62
BV2a	1,38	4,12	3,02	0,53	17,56
BV2b	2,13	3,97	3,13	0,45	14,26
BV3	2,38	4,25	3,41	0,40	11,62
BV4	2,53	3,89	3,25	0,33	10,19
BV5	2,37	4,07	3,36	0,34	10,03
BV6	2,20	4,15	2,98	0,43	14,57
BV7	1,65	3,73	2,84	0,41	14,63
BV8	1,98	3,92	2,82	0,43	15,22
BV9	1,77	3,80	2,72	0,49	18,03
<b>Рібро апопоріального поля (ознака 5), мкм</b>					
BV1	22,62	31,05	26,42	1,92	7,28
BV2a	20,52	28,66	25,55	1,93	7,54
BV2b	23,48	30,16	26,15	1,52	5,83
BV3	22,49	31,56	26,46	2,11	7,97
BV4	22,58	32,71	27,40	1,83	6,68
BV5	22,61	29,03	25,62	1,54	6,03
BV6	23,77	30,83	26,84	1,53	5,71
BV7	18,17	26,16	22,50	1,72	7,62
BV8	16,54	26,15	21,01	1,76	8,38
BV9	17,15	23,94	20,86	1,93	9,27

Примітка: min – мінімальне значення вибірки; max – максимальне значення вибірки;  
 $\bar{x}$  – середнє арифметичне вибірки;  $\sigma$  – стандартне відхилення; V – коефіцієнт варіації, %

Відмічено, що для досліджуваних ПЗ характерна різна ступінь усушки, і як наслідок, різна форма ПЗ з нерівномірно утвореними складками, але впадини є тільки між апертурами (рис. 3.15), що було зазначено і Blackmore *et al.* (2003) [221].

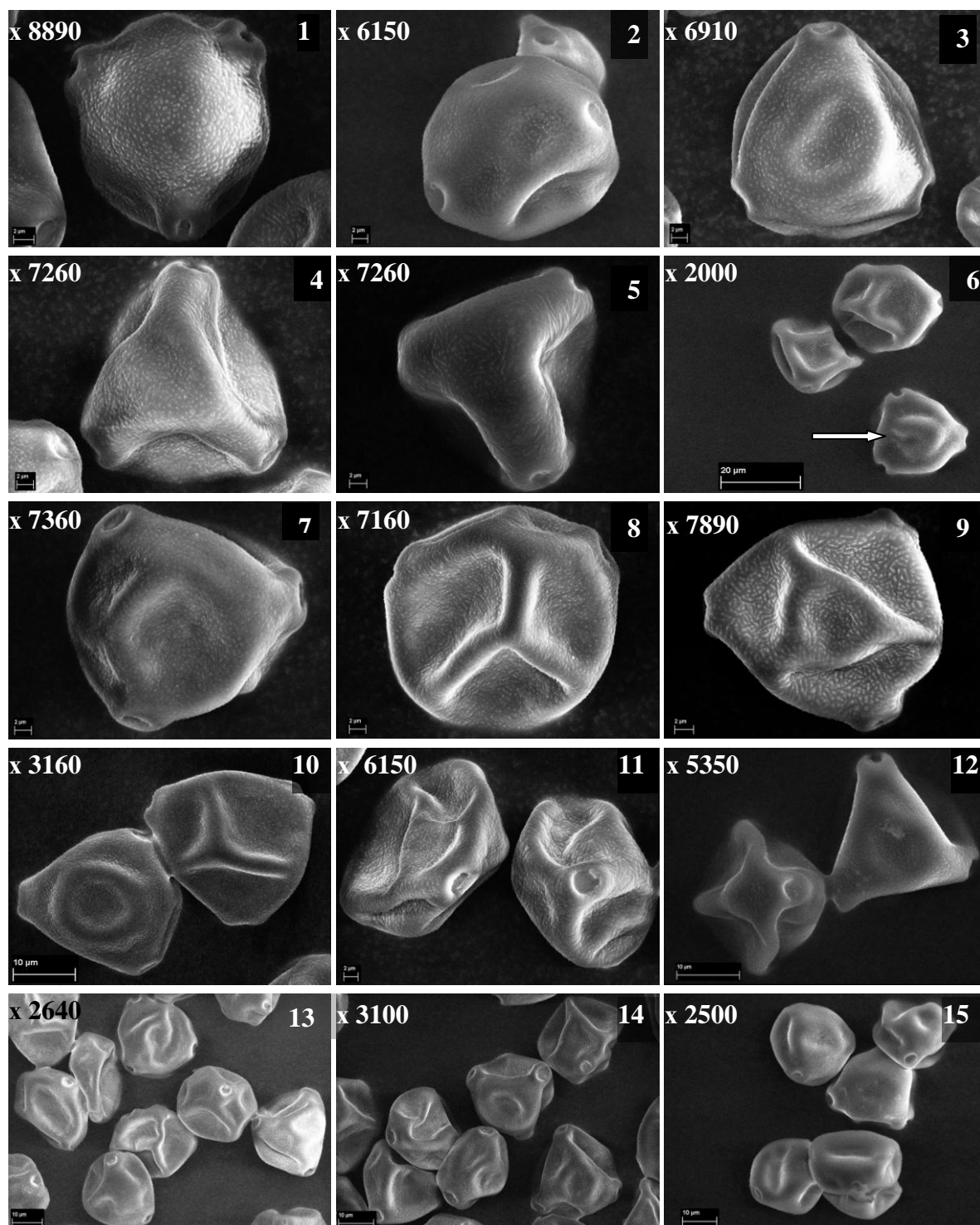


Рис. 3.15 Форма сухих пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh.: 1 – без деформацій; 2 – на початку деформації; 3 – «зразкова» деформація, вгинання центру; 4 – безформенна, вгинання центру; 5, 6 – випинання центру; 7-9 – види вгинань «задньої частини»; 10 – порівняння протилежних сторін; 11,12 – вигляд вгинань з екватору; 13-15 – в різних положеннях

(Фото: Р. Островський, Т. Шевцова 2011, 2013)



Морфологічні ознаки ПЗ порівнювали за допомогою t-критерію Стьюдента між кожним місцем заготовки пилку ББ (дод. Д табл. 1.2-1.8 та табл. 3.25) на основі статистичної перевірки даних (табл. Д.1.1).

Як видно з табл. Д.1.2:

- полярна вісь достовірно більша у зразків з BV1, ніж з BV2a і з BV5;
- екваторіальний діаметр достовірно більший у зразків з BV4, ніж з BV1;
- кут достовірно більший у зразків з BV1, ніж з BV2a, BV2b, BV3, BV4 і з BV5;
- внутрішній діаметр пори достовірно більший у зразків з BV1, ніж з BV6;
- ребро апопоріального поля достовірно більше у зразків з BV1, ніж з BV2a і BV6, і достовірно менше, ніж з BV4.

Як видно з табл. Д.1.3:

- полярна вісь достовірно менша у зразків з BV2a, ніж з BV2b і з BV4;
- екваторіальний діаметр достовірно менший у зразків з BV2a, ніж з BV4 і BV5;
- внутрішній діаметр пори достовірно менший у зразків з BV2a, ніж з BV3, BV4, BV5 і BV6;
- ребро апопоріального поля достовірно менше у зразків з BV2a, ніж з BV3 і BV4.

Як видно з табл. Д.1.4:

- полярна вісь достовірно більша у зразків з BV2b, ніж з BV5;
- екваторіальний діаметр достовірно менший у зразків з BV2b, ніж з BV4;
- кут достовірно менший у зразків з BV2b, ніж з BV4 і з BV6;
- внутрішній діаметр пори достовірно менший у зразків з BV2b, ніж з BV3 і BV5;
- ребро апопоріального поля достовірно менше у зразків з BV2b, ніж з BV4 і BV6.

Як видно з табл. Д.1.5:

- екваторіальний діаметр достовірно менший у зразків з BV3, ніж з BV4;
- кут достовірно менший у зразків з BV3, ніж з BV6;
- внутрішній діаметр пори достовірно більший у зразків з BV3, ніж з BV4 і BV6;
- ребро апопоріального поля достовірно менше у зразків з BV3, ніж з BV4 і більше, ніж з BV5.

Як видно з табл. Д.1.6:

- полярна вісь достовірно більша у зразків з BV4, ніж з BV5 і BV6;
- екваторіальний діаметр достовірно більший у зразків з BV4, ніж з BV5 і BV6;
- внутрішній діаметр пори достовірно більший у зразків з BV4, ніж з BV6;
- ребро апопоріального поля достовірно більше у зразків з BV4, ніж з BV5.

Як видно з табл. Д.1.7:

- кут достовірно менший у зразків з BV5, ніж з BV6;
- внутрішній діаметр пори достовірно більший у зразків з BV5, ніж з BV6;
- ребро апопоріального поля достовірно менше у зразків з BV5, ніж з BV6.

Як видно з табл. Д.1.8:

- полярна вісь достовірно більша у зразків з BV7, ніж з BV8, а з BV8 достовірно менша, ніж з BV9;
- екваторіальний діаметр достовірно більший у зразків з BV7, ніж з BV8;
- кут достовірно більший у зразків з BV7, ніж з BV8 і BV9;
- ребро апопоріального поля достовірно більше у зразків з BV7, ніж з BV8 і BV9.

Таблиця 3.25

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. заготовлених на території України та Словаччини

Змінні	Середнє (Україна)	Середнє (Словаччина)	t- значення	df	p
Полярна вісь	18,38	18,58	-1,35	598	0,178
Екваторіальний діаметр	23,28	24,45	-7,50*	598	0,001
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	100,60	109,79	-12,13*	598	0,001
Діаметр пори внутрішній	3,20	2,79	10,41*	598	0,001
Ребро апопоріального поля	26,35	21,46	29,01*	598	0,001

Примітки: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента; df – число ступенів свободи; p – рівень значимості

Як видно з табл. 3.25, такі ознаки як довжина екваторіального діаметру ( $t = -7,5$  при  $p < 0,001$ ) і кут розташування апертури до контуру ПЗ ( $t = -12,13$  при  $p < 0,001$ ) мають достовірно більші значення у пилку зі Словаччини, а внутрішній діаметр пори ( $t = 10,41$  при  $p < 0,001$ ) і ребро апопоріального поля ( $t = 29,01$  при  $p < 0,001$ ) мають достовірно більші значення у пилку з України.

Значущих відмінностей за морфологічним параметром – довжина полярної осі – виявлено не було.

Для виявлення сили зв'язків між морфологічними характеристиками було розраховано коефіцієнти кореляції Пірсона між ознаками в межах зразка та між ознаками серед усіх зразків. Результати представлено в табл. 3.26 і 3.27 та на рис. 3.16.

Після перевірки достовірності коефіцієнта кореляції за критичним значенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона з урахуванням числа ступенів свободи при  $n=60$  для рівня достовірності  $p=0,95$ , значення будуть значимі від 0,25. Як видно з табл. 3.26 коефіцієнти кореляції морфологічних характеристик ПЗ ББ в межах зразка дуже низькі. Знайдено лише 4 достовірні

коефіцієнти кореляції для зразків BV1, BV2a, BV7 і BV9, але для різних морфологічних характеристик.

Таблиця 3.26

Коефіцієнти кореляції морфологічних характеристик пилових зерен

*Betula verrucosa* Ehrh. в межах зразка, n=60

Вид кореляції	Зразки та сила зв'язків									
	BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9
ПВ+ЕД	0,09	0,11	-0,09	-0,06	0,22	-0,10	-0,06	0,21	0,03	<b>-0,29</b>
ПВ+К	<b>-0,39</b>	-0,10	-0,17	0,10	-0,11	-0,21	0,04	0,00	0,07	0,12
ПВ+А	0,08	0,05	-0,20	0,03	0,05	-0,06	0,01	<b>0,28</b>	0,02	0,02
ПВ+Р	-0,16	-0,19	0,12	0,20	-0,03	-0,16	0,04	0,08	-0,03	0,02
ЕД+К	0,08	-0,18	0,00	0,13	-0,02	0,01	0,08	-0,11	0,22	0,18
ЕД+А	0,07	-0,11	-0,09	-0,06	0,12	0,14	0,10	-0,04	0,02	0,04
ЕД+Р	0,05	<b>0,47</b>	0,09	0,22	0,09	0,11	0,11	-0,10	0,05	0,08
К+А	0,21	-0,13	-0,12	0,16	0,05	0,07	-0,16	0,08	0,05	0,05
К+Р	0,02	-0,03	0,08	0,25	0,23	0,21	0,14	-0,10	-0,10	0,00
А+Р	-0,15	0,12	-0,11	0,11	0,10	-0,03	-0,02	0,04	0,01	0,01

Примітки: ПВ – довжина полярної осі; ЕД – довжина екваторіального діаметра; К – кут розташування апертур до контуру пилового зерна; А – довжина внутрішнього діаметра апертури; Р – довжина ребра апопоріального поля; напівжирним шрифтом виділено достовірні коефіцієнти кореляції

Таблиця 3.27

Коефіцієнти кореляції морфологічних характеристик пилових зерен

*Betula verrucosa* Ehrh. між зразками, n=10

Вид кореляції	Сила зв'язків
ПВ+ЕД	<b>0,69</b>
ПВ+К	0,34
ПВ+А	-0,15
ПВ+Р	-0,07
ЕД+К	<b>0,78</b>
ЕД+А	-0,57
ЕД+Р	-0,62
К+А	<b>-0,71</b>
К+Р	<b>-0,72</b>
А+Р	<b>0,81</b>

Примітки: ПВ – довжина полярної осі; ЕД – довжина екваторіального діаметра; К – кут розташування апертур до контуру пилового зерна; А – довжина внутрішнього діаметра апертури; Р – довжина ребра апопоріального поля; жирним шрифтом виділено достовірні коефіцієнти кореляції

Після перевірки достовірності коефіцієнта кореляції за критичним значенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона з урахуванням числа ступенів свободи при  $n=10$  для рівня достовірності  $p=0,95$ , значення будуть значимі від 0,63. Як видно з табл. 3.27 найбільш корелюють між собою довжина внутрішнього діаметра апертури та довжина ребра апопоріального поля ( $r=0,81$ ); довжина екваторіального діаметра та кут розташування апертур до контуру ПЗ ( $r=0,78$ ). Між цими ознаками спостерігається пряма залежність. При вимірюваннях ці ознаки дійсно між собою взаємопов'язані. Згідно з табл. 3.25 за кореляційними ознаками українські та словацькі зразки пилку ББ відрізняються як показав t-критерій Стьюдента.

З рис. 3.16 бачимо, що кут нахилу прямої регресії та групування точок навколо прямої відображають ступінь взаємозалежності між морфологічними ознаками.

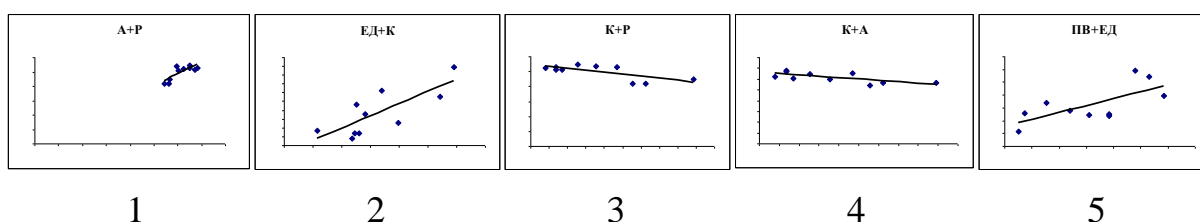


Рис. 3.16 Графічне зображення найсильніших кореляцій змінних між зразками пилку *Betula verrucosa* Ehrh.:

1 – А+Р; 2 – ЕД+К; 3 – К+Р; 4 – К+А; 5 – ПВ+ЕД.

1, 2, 5 – позитивна кореляція; 3, 4 – негативна кореляція

Із вищезазначеного з табл. Д.1.2-1.8 та 3.25-3.27 випливає, що 4 із 5-ти морфологічних ознак є діагностичними, між ними є відмінності в умовах зростання, які вплинули на морфологію пилку ББ. Найбільш стабільна ознака ПЗ ББ – довжина полярної осі. Це єдина ознака, за якою українські та словацькі зразки пилку подібні.

Іншою стабільною ознакою ПЗ ББ, яку, на відміну від довжини полярної осі, можливо використовувати при ідентифікації ПЗ ББ є кут розташування апертур до контуру ПЗ. Коефіцієнт варіації змінюється в незначних межах (6,70-9,17 %). Ця ознака корелює з розміром ПЗ, який характеризує довжина

екваторіального діаметра. Це найважливіша діагностична ознака будь-якого виду пилку. Разом з тим, кут розташування апертур до контуру ПЗ корелює обернено до довжини внутрішнього діаметра апертури і довжини ребра апопоріального поля – ознак, за якими розрізняються українські та словацькі зразки пилку, а отже, на які впливають і місця його збору.

Отже, кут розташування апертур до контуру ПЗ можна рекомендувати як надійно інформативну морфоознаку пилку ББ.

Найбільш варіабельна морфологічна ознака – довжина внутрішнього діаметра апертур. Хоча значення довжини внутрішнього діаметра апертур відрізняються в незначних межах, високі коефіцієнти варіації (найвищі серед п'яти вимірюваних ознак) вказують на нестабільність даної ознаки. Під час цього виду вимірювань було відмічено, що чим більш сухе ПЗ, тим менший отвір апертури. Ця ознака корелює з довжиною ребра апопоріального поля.

У табл. 3.28 наведено значення індексів Р/Е форми ПЗ ББ. Форма ПЗ обумовлюється співвідношенням між довжиною полярної осі та екваторіального діаметра. Це більш постійна характеристика у кожного виду рослин [350]. Розрахований індекс Р/Е ПЗ ББ визначений в межах 0,75-0,81. Згідно з G. Erdtman (1943), цим значенням індексу відповідає майже сфероїдальна форма ПЗ [351]. Отримані дані узгоджуються з літературними.

Таблиця 3.28

Індекс Р/Е пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh.

Зразок пилку	$\bar{x} \pm \sigma$	V%
BV1	0,80 $\pm$ 0,08	10,05
BV2a	0,80 $\pm$ 0,11	13,15
BV2b	0,81 $\pm$ 0,09	11,09
BV3	0,80 $\pm$ 0,09	11,32
BV4	0,79 $\pm$ 0,07	8,62
BV5	0,77 $\pm$ 0,08	10,01
BV6	0,78 $\pm$ 0,08	10,49
BV7	0,75 $\pm$ 0,08	11,24
BV8	0,77 $\pm$ 0,09	11,63
BV9	0,77 $\pm$ 0,13	16,76

Продовження табл. 3.28

Наші результати	0,75 – (0,78) – 0,81
База даних PalDat	0,72 – (0,79) – 0,88

Примітка:  $\bar{x}$  – середнє арифметичне вибірки;  $\sigma$  – стандартне відхилення; V – коефіцієнт варіації, %

Отже, при проведенні морфологічних і морфометричних досліджень ПЗ ББ було виявлено їх специфічні морфологічні особливості, які дозволяють вірогідно розрізняти пилок, зібраний на території України та Словаччини. Причина цього можливо і є в різному антропогенному навантаженні місць зростання об'єктів дослідження.

**Вищевикладені результати досліджень висвітлено у наступних друкованих працях (у хронологічному порядку):**

1. Шевцова Т. В. Морфологічні зміни пилку берези бородавчастої (*Betula verrucosa*) з різних місць зростання / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава // Актуальні проблеми ботаніки та екології : міжнар. конф. мол. уч., 9-13 серпня 2011 р. : тези доп. – Березне, 2011. – С. 141-143.

2. Morphological characteristics of pollen *Betula verrucosa* Ehrh. (syn. *B. pendula*) depending on habitat / T. Shevtsova, J. Brindza, K. Garkava, R. Ostrovsky, I. Maltsov // Conservation of plant diversity : Intern. Scient. Symp., 16-19 May 2012 : Abstracts. – Kishinev, Republic of Moldova, 2012. – P. 44-54.

3. Выявление изменений морфологических параметров пыльцы *Betula verrucosa* Ehrh. (син. *B. pendula* Roth.) с разных мест произрастания / Т. Шевцова, Я. Бриндза, Е. Гаркавая, Р. Островскы, И. Мальцов // Agrobiodiverzita pre zlepšenie života. – 2013. – №1. – P. 134-145.

4. Шевцова Т. В. Вариабельность морфологических характеристик пыльцевых зерен *Betula verrucosa* Ehrh. с разных мест произрастания / Т. В. Шевцова, И. Ю. Мальцов // Методы палеоэкологических исследований : Палинолог. шк.-конф. с междун. участ., 16-19 апреля 2014 г. : тезисы докл. – М., 2014. – С. 95-96.

5. Морфометрія пилкових зерен берези бородавчастої як індикатор якості екостану / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава, Я. Бриндза, Р. Островськи, С. М. Мотильова // Питання біоіндикації та екології. – 2014. – Вип. 19, №2. – С. 121-138.



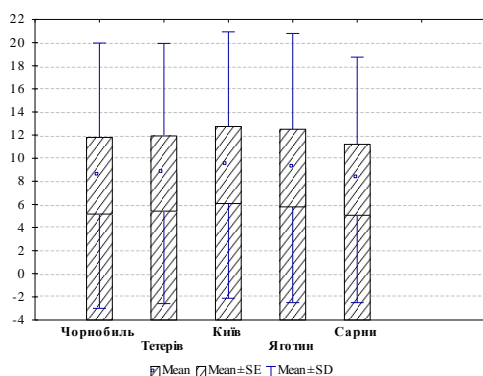
#### РОЗДІЛ IV

### ВПЛИВ МІСЦЯ ЗРОСТАННЯ НА БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПИЛКУ БЕРЕЗИ БОРОДАВЧАСТОЇ (ПОШУК ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ, ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ)

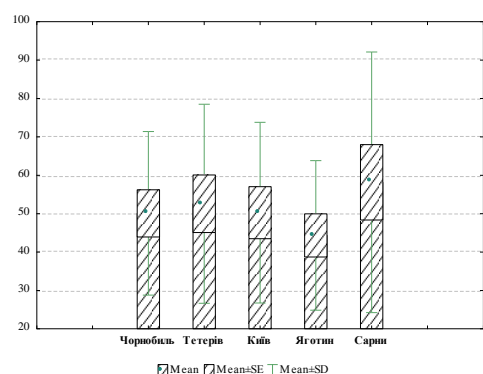
Результати досліджень показали, що вплив комплексу екологічних факторів та їх дія на ПЗ ББ є різносторонньою і може проявитися на будь-якому рівні – генетичному, фізіолого-біохімічному, морфологічному. У зв'язку з цим ми ставили за мету оцінити кожен з них.

Перш за все слід проаналізувати вплив метеорологічних та антропогенних факторів під час формування та дозрівання ПЗ.

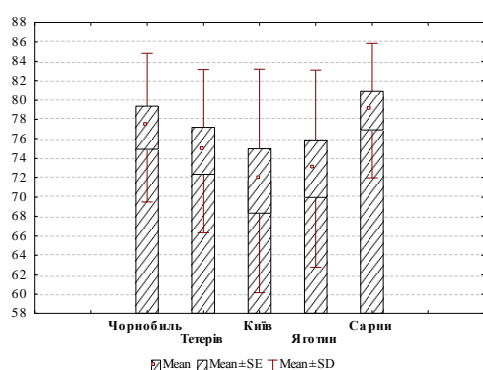
При попарному порівнянні метеоданих, зібраних із різних міст України (див. табл. Б.2.1), значущих відмінностей виявлено не було ( $p > 0,05$ ) (рис. 4.1). Флуктуації, виражені для середньомісячної кількості опадів, також не досягали рівня статистичної значущості. Формування пилку в 2010 році в Україні та в 2012 році в Словаччині відбувалось в умовах сухого спекотного літа. Отже, надмірна посушливість могла негативно вплинути і викликати як структурні, так і функціональні зміни чоловічого гаметофіту. Процес утворення пилку триває майже повний календарний рік і багато факторів проявляють свій негативний вплив на розвиток мікрогаметофіту [176]. У роки цвітіння ББ спостерігалися деякі відхилення від норм погодного комплексу і в Україні у 2011 році (лютий) і в Словаччині у 2013 році (лютий-березень-квітень). Лютий у Словаччині був теплим, а березень морозним. Повернення низьких температур у весняний період, може викликати зміну жирнокислотного складу ліпідів, що призводить до фізичної зміни стану гідрофобного мембранного матриксу [176].



Середньомісячна температура повітря,  
°C



Місячна кількість опадів, мм



Середньомісячна відносна вологість  
повітря, %

Рис. 4.1 Графічне відображення зафіксованих температури (°C), кількості опадів (мм) та відносної вологості (%) протягом 2010 року на українських метеостанціях із підтвердженням відсутності значущих відмінностей:

mean – середнє значення, mean±SE – середнє ± стандартна помилка,

mean±SD – середнє ± стандартне відхилення

Погода у період, що передує вегетаційному, тобто в січні-березні, також обумовлює інтенсивність пилокпродукції, а ближче до цвітіння – дати початку цвітіння, кількість ПЗ у повітрі. Оскільки ми досліджуємо пилок до виходу з пиляків, ці параметри не мають великого значення.

Отже, на нашу думку, погодні умови у рік закладання чоловічих генеративних органів та рік цвітіння ББ мали вплив на ПЗ, що слід враховувати при оцінці їх біологічних властивостей.

Стосовно антропогенного забруднення населених пунктів місць заготовки пилку ББ, то було проаналізовано вплив стаціонарних та пересувних джерел забруднень НПС на основі даних, отриманих із офіційних звітів та із запитів до Міністерства екології та природних ресурсів України [246, 248, 250, 253, 269, 270, 352].

Найпоширенішими забруднюючими речовинами атмосферного повітря є діоксид сірки, діоксид азоту, оксид вуглецю, формальдегід, пил, ґрунтів – нафтопродукти, хлориди, солі ВМ, отрутохімікати, феноли. Основним забруднювачем є пересувні джерела. Автотранспорт знаходиться на першому місці. Беззаперечним лідером по забрудненню атмосферного повітря з усіх досліджуваних пунктів Рівненської та Київської областей є м. Київ. Хоча локальних даних із місць відбору пилку і навіть із смт. Бородянка, смт. Іванків та с. Хоцьки немає.

Аналіз викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення протягом 2010-2012 рр. на основі звітних даних в табл. Б.1.1 та Б.1.4, вказує на тенденцію до їх зростання, особливо в Бородянському та Переяслав-Хмельницькому районах. При порівнянні цих даних по містах в сторону зменшення порядок такий: м. Київ, м. Переяслав-Хмельницький, м. Кузнецовськ. Стосовно викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря від пересувних джерел (див. табл. Б.1.2 і Б.1.4, рис. Б.1.4 і Б.1.5) у 2011 році спостерігалось деяке зниження показників, але в 2012 році вони перевищили 2010 рік. Порівняння значень викидів у районах наступний: Бородянський > Переяслав-Хмельницький > Іванківський; у містах аналогічно у випадку стаціонарних джерел забруднення. Окремо слід виділити м. Кузнецовськ. У місті ведеться контроль викидів забруднюючих речовин, що для смт. Бородянка, смт. Іванків, с. Хоцьки не характерно. Зазначається, що в 2011 р. відмічено перевищення за залізом в 2,8 рази та кадмієм в 1,2 рази до

фону у ґрунтах на території Рівненської атомної електростанції. Пилок заготовляли з дерев, що зростають приблизно в 6-ти км від РАЕС. Потенційний обсяг викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря в процесі виробничої діяльності РАЕС складає 86,2 т в рік.

На основі аналізу даних щодо антропогенного забруднення місць заготовки пилку ББ можна зазначити, що зразки пилку BV1 (м. Київ) та BV5 (м. Кузнецовськ) заготовлені з беріз, що зростають в дещо відмінних екосистемах, порівняно з іншими зразками. У м. Київ високий рівень забруднення атмосферного повітря, у м. Кузнецовськ – специфічне джерело викидів забруднюючих речовин.

Стосовно Словацької республіки, то для цієї європейської країни характерне територіальне забезпечення станціями контролю забруднення атмосферного повітря. Контролюються конкретні забруднюючі речовини:  $PM_{10}$ ,  $PM_{2,5}$ ,  $NO_2$ ,  $SO_2$ ,  $CO$ ,  $C_6H_6$ . У м. Нітра, де були заготовлені зразки пилку ББ (BV7, BV8, BV9), діє дві станції контролю викидів і декілька підприємств, які впливають на якість повітря. За роки контролю – 2011-2013, не було перевищень допустимих значень, крім добового граничного значення  $PM_{10}$  у досліджуваній рік (2012) на станції Nitra – Štúrova, що не є суттєвим.

Зважаючи на те, що на території м. Нітра не розташовані великі промислові об'єкти країни, що здійснюють найбільшу кількість викидів, і тенденцію Словаччини щодо зменшення викидів забруднюючих речовин, то стан забруднення атмосферного повітря в місцях заготовки словацьких зразків пилку ББ є в допустимих межах.

Було проведено простий регресійний аналіз для виявлення впливу викидів забруднюючих речовин від стаціонарних та пересувних джерел, а також щільності викидів на  $1 \text{ км}^2$  площі на морфометричні показники ПЗ, вміст білків, ЖК ліпідів, АК, флавоноїдів та ВМ у зразках пилку ББ. Екологічні дані взято з табл. Б.1.1, Б.1.2 та Б.1.4. Результати представлені у табл. 4.1-4.6.

Аналіз показав, що сума викидів з пересувних та стаціонарних джерел має значимий вплив на одну із вимірюваних морфологічних характеристик ПЗ

ББ, а саме кут розташування апертури до контуру ПЗ ( $F=16,79$ ,  $\beta=-0,75$  при  $p=0,001$ ), тобто при збільшенні викидів – кут зменшується (див. табл. 4.1). До того ж була виявлена дуже виражена тенденція до наявності впливу щільності викидів ( $F=4,4$ ,  $\beta=-0,46$  при  $p=0,052$ ) і викидів із стаціонарних джерел ( $F=3,81$ ,  $\beta=-0,44$  при  $p=0,069$ ) на полярну вісь ПЗ, а саме, полярна вісь буде менша у місцях, де спостерігається більше викидів із стаціонарних джерел і вища щільність викидів на одиницю площі.

Таблиця 4.1

Вплив викидів забруднюючих речовин від стаціонарних, пересувних джерел, їх сумарної кількості та щільності викидів на  $1 \text{ км}^2$  площі на морфологію

пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh.

Показники морфології (змінні)	Multiple	Multiple	df	$\beta$	F	p
Стаціонарні джерела						
Полярна вісь, мкм	0,44	0,19	1	-0,44	3,81	0,069
Екваторіальний діаметр, мкм	0,21	0,04	1	0,21	0,74	0,401
Кут, deg	0,06	0,00	1	-0,06	0,06	0,815
Діаметр пори внутрішній, мкм	0,18	0,03	1	0,18	0,51	0,485
Ребро апопоріального поля, мкм	0,10	0,01	1	0,10	0,16	0,695
Пересувні джерела						
Полярна вісь, мкм	0,42	0,18	1	-0,42	3,48	0,081
Екваторіальний діаметр, мкм	0,21	0,04	1	0,21	0,73	0,406
Кут, deg	0,05	0,00	1	-0,05	0,03	0,856
Діаметр пори внутрішній, мкм	0,15	0,02	1	0,15	0,37	0,549
Ребро апопоріального поля, мкм	0,11	0,01	1	0,11	0,20	0,663
Щільність викидів						
Полярна вісь, мкм	0,46	0,22	1	-0,46	4,40	0,052
Екваторіальний діаметр, мкм	0,21	0,04	1	0,21	0,72	0,409
Кут, deg	0,01	0,00	1	-0,01	0,00	0,971
Діаметр пори внутрішній, мкм	0,16	0,02	1	0,16	0,40	0,537
Ребро апопоріального поля, мкм	0,12	0,01	1	0,12	0,23	0,641
Сума викидів						
Полярна вісь, мкм	0,42	0,18	1	0,42	2,86	0,115
Екваторіальний діаметр, мкм	0,27	0,07	1	0,27	1,03	0,329
Кут, deg	0,75	0,56	1	-0,75	16,79*	0,001
Діаметр пори внутрішній, мкм	0,41	0,17	1	0,41	2,65	0,127
Ребро апопоріального поля, мкм	0,13	0,02	1	0,13	0,22	0,647

Примітка: \* – відмічено значимі F-критерії

Для виявлення впливу забруднюючих викидів і погодних умов на морфометричні показники пилку був проведений множинний регресійний аналіз (табл. 4.2). Було виявлено, що при взаємодії викидів і погодних умов, сумарна кількість викидів і мінімальна температура повітря впливають лише на довжину екваторіального діаметру, причому найбільший екваторіальний діаметр спостерігається в місцях, де буде менше викидів і вища мінімальна температура повітря, тобто при оптимальних умовах розвитку для ПЗ.

Таблиця 4.2

Вплив викидів забруднюючих речовин та погодних умов на морфологію пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh.

Змінні, які увійшли в аналіз	Multiple R <sup>2</sup>	F	p	$\beta$	t	p
Екваторіальний діаметр, $\mu\text{m}$						
Викиди	0,77	15,17	0,0013	-1,01	-5,41	0,000425
Мінімальна температура повітря за місяць				0,36	1,93	0,086065

Регресійний аналіз не виявив впливу досліджуваного рівня атмосферного забруднення від стаціонарних та пересувних джерел, щільності викидів на 1 км<sup>2</sup> площі на сумарний вміст білків, ЖК у ліпідах, як окремих, так і суми насичених, ненасичених і поліненасичених ЖК, АК та флавоноїдних сполук (див. табл. 4.3-4.4). Хоча виявлено, що сумарна кількість викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря впливає на вміст стеаринової кислоти, а також виявлена тенденція їх впливу на олеїнову кислоту (див. табл. 4.5). Причому  $\beta$ -коефіцієнти ( $\beta=0,72$  при  $p=0,019$  та  $\beta=-0,58$  при  $p=0,082$ ) вказують на те, що при збільшенні викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря вміст стеаринової кислоти буде збільшуватись, а олеїнової, навпаки, знижуватися. Іншими словами зростатиме насиченість ліпідного шару клітинних стінок. Наразі середній вміст стеаринової кислоти вищий в зразках пилку з України, а олеїнової – в словацьких зразках. Можливо виявлена тенденція є механізмом реагування ПЗ ББ на несприятливий вплив антропогенних факторів.

Таблиця 4.3

Вплив викидів забруднюючих речовин від стаціонарних джерел на вміст аскорбінової кислоти, флавоноїдів, білка, жирних кислот ліпідів та важких металів у пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Показник	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	df	$\beta$	F	p
Аскорбінова кислота	0,10	0,01	1	-0,10	0,16	0,697727
Флавоноїди	0,12	0,01	1	0,12	0,08	0,794837
Білок	0,12	0,01	1	0,12	0,07	0,80018
Міристинова	0,18	0,03	1	-0,18	0,17	0,696462
Пентодецилова	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,999317
Пальмітинова	0,36	0,13	1	-0,36	0,73	0,431710
Стеаринова	0,20	0,04	1	-0,20	0,20	0,674087
Олеїнова	0,17	0,03	1	0,17	0,15	0,718113
Лінолева	0,08	0,01	1	0,08	0,03	0,862210
Ліноленова	0,06	0,00	1	-0,06	0,02	0,905110
Арахідонова	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,999317
$\Sigma$ НЖК	0,34	0,11	1	-0,34	0,64	0,460070
$\Sigma$ ННЖК	0,34	0,12	1	0,34	0,67	0,451132
$\Sigma$ ПНЖК	0,08	0,01	1	0,08	0,03	0,865438
Кадмій (Cd)	0,64	0,41	1	-0,64	0,69	0,557598
Плюмбум (Pb)	0,47	0,22	1	-0,47	0,29	0,687022
Гідраргіум (Hg)	0,89	0,80	1	-0,89	3,89	0,298693
Хром (Cr)	0,57	0,32	1	-0,57	0,47	0,616924
Миш'як (As)	—	—	—	—	—	—
Нікель (Ni)	0,91	0,83	1	-0,91	4,93	0,269316
Селен (Se)	0,26	0,07	1	-0,26	0,07	0,834355
Кобальт (Co)	0,61	0,38	1	-0,61	0,60	0,580269
$\Sigma$ важкі метали	0,90	0,82	1	-0,90	4,45	0,281683

Примітка: миш'як не використовували, так як в даних немає варіативності

Таблиця 4.4

Вплив викидів забруднюючих речовин від пересувних джерел на вміст аскорбінової кислоти, флавоноїдів, білка, жирних кислот ліпідів та важких металів у пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Показник	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	df	$\beta$	F	p
Аскорбінова кислота	0,09	0,01	1	-0,09	0,14	0,709185
Флавоноїди	0,12	0,01	1	0,12	0,07	0,796288
Білок	0,08	0,01	1	0,08	0,03	0,867792
Міристинова	0,18	0,03	1	-0,18	0,17	0,699876

Продовження табл. 4.4

Пентодецилова	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,998180
Пальмітинова	0,36	0,13	1	-0,36	0,73	0,433283
Стеаринова	0,19	0,04	1	-0,19	0,19	0,681059
Олеїнова	0,17	0,03	1	0,17	0,14	0,719335
Лінолева	0,08	0,01	1	0,08	0,03	0,863355
Ліноленова	0,06	0,00	1	-0,06	0,02	0,897714
Арахідонова	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,998180
$\Sigma$ НЖК	0,33	0,11	1	-0,33	0,63	0,463098
$\Sigma$ ННЖК	0,34	0,12	1	0,34	0,66	0,454458
$\Sigma$ ПНЖК	0,08	0,01	1	0,08	0,03	0,867024
Кадмій (Cd)	0,83	0,69	1	-0,83	2,27	0,373301
Плюмбум (Pb)	0,20	0,04	1	-0,20	0,04	0,871319
Гідраргіум (Hg)	0,73	0,53	1	-0,73	1,11	0,482990
Хром (Cr)	0,31	0,09	1	-0,31	0,10	0,801221
Миш'як (As)	—	—	—	—	—	—
<b>Нікель (Ni)</b>	0,99	0,98	1	<b>-0,99</b>	<b>55,40</b>	<b>0,085019</b>
Селен (Se)	0,52	0,27	1	-0,52	0,38	0,650058
Кобальт (Co)	0,81	0,66	1	-0,81	1,95	0,395973
<b><math>\Sigma</math> важкі метали</b>	<b>0,99</b>	<b>0,98</b>	<b>1</b>	<b>-0,99</b>	<b>42,07</b>	<b>0,097386</b>

Примітка: миш'як не використовували, так як в даних немає варіативності

Таблиця 4.5

Вплив викидів забруднюючих речовин (сума стаціонарних і пересувних джерел) в атмосферне повітря на вміст аскорбінової кислоти, флавоноїдів, білка, жирних кислот ліпідів та важких металів у пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Показник	Multiple	Multiple	df	$\beta$	F	p
Білок						
Аскорбінова кислота	0,29	0,09	1	-0,29	1,24	0,286225
Флавоноїди	0,38	0,14	1	-0,38	0,83	0,404616
Білок	0,08	0,01	1	0,08	0,04	0,856714
Пентодецилова	0,32	0,11	1	-0,32	0,94	0,360138
Пальмітинова	0,19	0,04	1	0,19	0,31	0,594551
<b>Стеаринова</b>	<b>0,72</b>	<b>0,52</b>	<b>1</b>	<b>0,72</b>	<b>8,65*</b>	<b>0,018692</b>
<b>Олеїнова</b>	<b>0,58</b>	<b>0,33</b>	<b>1</b>	<b>-0,58</b>	<b>3,95</b>	<b>0,081957</b>
Лінолева	0,37	0,14	1	0,37	1,30	0,287732
Ліноленова	0,16	0,03	1	0,16	0,22	0,649004
Арахідонова	0,29	0,08	1	-0,29	0,72	0,419929
$\Sigma$ НЖК	0,12	0,01	1	0,12	0,11	0,745077
$\Sigma$ ННЖК	0,15	0,02	1	-0,15	0,18	0,685262
$\Sigma$ ПНЖК	0,37	0,14	1	0,37	1,27	0,292485
Кадмій (Cd)	0,50	0,25	1	0,50	0,68	0,495746



Продовження табл. 4.5

Плюмбум (Pb)	0,61	0,38	1	0,61	1,20	0,387513
Гідраргіум (Hg)	0,54	0,29	1	-0,54	0,82	0,461596
Хром (Cr)	0,53	0,28	1	-0,53	0,78	0,470655
Миш'як (As)	—	—	—	—	—	—
Нікель (Ni)	0,87	0,76	1	0,87	6,30	0,128712
Селен (Se)	0,29	0,08	1	0,29	0,18	0,713929
Кобальт (Co)	0,92	0,84	1	-0,92	5,35	0,259853
Σ важкі метали	0,02	0,00	1	0,02	0,00	0,949900

Примітка: \* – відмічено значимі F-критерії; миш'як не використовували, так як в даних немає варіативності

Дещо відмінну картину спостерігали для вмісту ВМ у ПЗ ББ. Так, внаслідок викидів забруднюючих речовин від пересувних джерел була виявлена тенденція зниження вмісту нікелю ( $p=0,08$ ) і суми ВМ ( $p=0,09$ ) при збільшенні кількості викидів пересувними джерелами (див. табл. 4.4). Крім того, на вміст нікелю в ПЗ ( $F=597194,08$ ,  $\beta=-1$  при  $p=0,000824$ ), а також суму ВМ ( $F=3041,04$ ,  $\beta=-1$  при  $p=0,011543$ ) вплинула щільність викидів на  $1 \text{ км}^2$  площі (див. табл. 4.6). Таким чином, чим вища щільність викидів, тим менший вміст нікелю і суми ВМ у ПЗ ББ. Можливо в даному явищі простежується захисна роль білків або флавоноїдних сполук.

Таблиця 4.6

Вплив щільності викидів забруднюючих речовин на  $1 \text{ км}^2$  площі на вміст аскорбінової кислоти, флавоноїдів, білка, жирних кислот ліпідів та важких металів у пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Показник	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	df	$\beta$	F	p
Аскорбінова кислота	0,14	0,02	1	-0,14	0,32	0,580104
Флавоноїди	0,04	0,00	1	0,04	0,01	0,931838
Білок	0,03	0,001	1	-0,03	0,003	0,957479
Міристинова	0,23	0,05	1	-0,23	0,29	0,613442
Пентодецилова	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,993978
Пальмітинова	0,32	0,10	1	-0,32	0,59	0,478561
Стеаринова	0,36	0,13	1	-0,36	0,76	0,424113
Олеїнова	0,16	0,03	1	0,16	0,14	0,726286
Лінолева	0,09	0,01	1	0,09	0,05	0,840208
Ліноленова	0,05	0,00	1	0,05	0,01	0,912529
Арахідонова	0,00	0,00	1	0,00	0,00	0,993978
Σ НЖК	0,35	0,13	1	-0,35	0,72	0,434742

Продовження табл. 4.6

Σ ННЖК	0,36	0,13	1	0,36	0,77	0,421239
Σ ПНЖК	0,10	0,01	1	0,10	0,05	0,831642
Кадмій (Cd)	0,90	0,81	1	-0,90	4,25	0,287458
Плюмбум (Pb)	0,07	0,00	1	-0,07	0,00	0,957162
Гідраргіум (Hg)	0,63	0,39	1	-0,63	0,65	0,568833
Хром (Cr)	0,18	0,03	1	-0,18	0,03	0,887064
Миш'як (As)	—	—	—	—	—	—
<b>Нікель (Ni)</b>	1,00	1,00	1	<b>-1,00</b>	<b>597194,08*</b>	<b>0,000824</b>
Селен (Se)	0,63	0,40	1	-0,63	0,67	0,564215
Кобальт (Co)	0,88	0,78	1	-0,88	3,56	0,310130
<b>Σ важкі метали</b>	1,00	1,00	1	<b>-1,00</b>	<b>3041,04*</b>	<b>0,011543</b>

Примітка: \* – відмічено значимі F-критерії; миш'як не використовували, так як в даних немає варіативності

В ході аналізу було виявлено, що в пилку з одних місць зростання спостерігається висока концентрація флавоноїдів поряд з концентрацією ВМ, хоча між вмістом флавоноїдів і ВМ у ПЗ ББ значущих коефіцієнтів кореляції Пірсона виявлено не було (табл. 4.7). Для вивчення даного нелінійного явища було вирішено провести кореляційний аналіз Пірсона окремо для флавоноїдів і ВМ для виявлення їх взаємозв'язку з погодними умовами і викидами (табл. 4.8-4.9).

Таблиця 4.7

Виявлення взаємозв'язків між флавоноїдами та важкими металами в пилкових зернах *Betula verrucosa* Ehrh. кореляційним аналізом Пірсона

	Флавоноїди
Кадмій (Cd)	0,5354
	p=0,640
Плюмбум (Pb)	0,5824
	p=0,604
Гідраргіум (Hg)	0,9430
	p=0,216
Хром (Cr)	0,6682
	p=0,534
Нікель (Ni)	0,8509
	p=0,352
Селен (Se)	0,1298
	p=0,917

Продовження табл. 4.7

Кобальт (Co)	0,5049
	p=0,663
Важкі метали сума	0,8406
	p=0,364
Важкі метали середнє значення	0,8406
	p=0,364

Було виявлено, що при збільшенні середньомісячної відносної вологості повітря буде збільшуватися вміст нікелю ( $r=0,99$  при  $p=0,012$ ) і ВМ в сумі ( $r=0,99$  при  $p=0,025$ ) у пилку (див. табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Виявлення впливу погодних умов на вміст важких металів в пилку *Betula verrucosa* Ehrh. кореляційним аналізом Пірсона

Взаємодія з погодою	Середньо-місячна температура повітря	Максимальна температура повітря за місяць	Мінімальна температура повітря за місяць	Кількість опадів за місяць, мм	Середньо-місячна відносна вологість повітря, %
Кадмій (Cd)	0,3032	0,2238	0,3075	0,3129	0,8906
	p=0,804	p=0,856	p=0,801	p=0,797	p=0,301
Плюмбум (Pb)	0,7698	0,8197	0,7669	0,7633	0,0879
	p=0,441	p=0,388	p=0,444	p=0,447	p=0,944
Гідраргіум (Hg)	0,9966	1,0000	0,9962	0,9957	0,6426
	p=0,052	p=---	p=0,055	p=0,059	p=0,556
Хром (Cr)	0,8353	0,8776	0,8328	0,8296	0,1968
	p=0,371	p=0,318	p=0,373	p=0,377	p=0,874
Нікель (Ni)	0,6895	0,6277	0,6928	0,6969	0,9998*
	p=0,516	p=0,568	p=0,513	p=0,509	p=0,012
Селен (Se)	-0,1264	-0,2075	-0,1219	-0,1163	0,6162
	p=0,919	p=0,867	p=0,922	p=0,926	p=0,577
Кобальт (Co)	0,2691	0,1890	0,2734	0,2789	0,8738
	p=0,827	p=0,879	p=0,824	p=0,820	p=0,323
Важкі метали сума	0,6753	0,6124	0,6787	0,6828	0,9992
	p=0,528	p=0,580	p=0,525	p=0,522	p=0,025*

Примітка: \* – відмічено значимі  $r$ -коефіцієнти Пірсона

При визначенні взаємозв'язків між вмістом флавоноїдів у ПЗ ББ, погодними умовами і викидами було виявлено, що при збільшенні середньомісячної відносної вологості повітря буде збільшуватися вміст флавоноїдів ( $r=0,92$  при  $p=0,003$ ), а знижуватися їх вміст буде зі збільшенням як

середньомісячної ( $r=-0,78$  при  $p=0,037$ ), так і максимальної температури повітря ( $r=-0,83$  при  $p=0,02$ ) (див. табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Кореляційний аналіз між вмістом флавоноїдів у пилкових зернах *Betula verrucosa* Ehrh., погодними умовами і викидами

Змінні, які увійшли до аналізу	Флавоноїди	
	r	p
Середньомісячна температура повітря, °C	-0,7830*	0,037
Максимальна температура повітря за місяць, °C	-0,8338*	0,020
Мінімальна температура повітря за місяць, °C	-0,6524	0,112
Кількість опадів за місяць, мм	0,1430	0,760
Середньомісячна відносна вологість повітря, %	0,9247*	0,003
Стаціонарні джерела, т	0,1218	0,795
Щільність викидів, т	0,0402	0,932
Пересувні джерела, т	0,1209	0,796
Викиди, т	-0,3769	0,405

Примітка: \* – відмічено значимі г-коефіцієнти Пірсона

Таким чином, виявлено, що збільшення або зменшення флавоноїдів і ВМ пов'язано із середньомісячною відносною вологістю повітря.

Отже, поточні метеорологічні умови та забруднення атмосферного повітря зумовили певні зміни в морфо-біологічних властивостях ПЗ ББ. Виявлена тенденція до зменшення розміру ПЗ, змін в насиченості ліпідного шару клітинних стінок, концентрації флавоноїдних сполук та забруднення ВМ.

Для дослідження алергенного потенціалу пилку ББ було обрано три показники: рівень експресії гену *Bet v 1*, забруднення ПЗ ВМ, мікроорганізмами та мікотоксинами.

Головним етапом дослідження та порівняння зразків пилку ББ з різних місць зростання було кількісне визначення головного гена, який відповідає за алергенні властивості пилку даного виду – *Bet v 1*. Для цього аналізу було підібрано метод ПЛР у реальному часі з використанням барвника SYBR GREEN. Контрольним зразком, відносно якого визначали рівень експресії *Bet v 1*, було обрано зразок пилку із території лісу (BV3) в межах України. Результат по Україні був таким, що рівень експресії *Bet v 1* був подібним і

значно нижчим для зразків березового пилку, заготовлених на урбанізованій території (BV1, BV2a, BV2b, BV4). А ті зразки з дерев, які зростають віддалено від міст (BV5, BV6), як і контрольний зразок (BV3), мали вищий рівень експресії даного гена. Для словацьких зразків пилку ББ, заготовлених з дерев, що зростають в одному місті, така тенденція підтвердилась (див. рис. 3.3).

Вміст Bet v 1 в ПЗ визначається різними факторами: генетичний фон дерева (не відомо у нашому випадку), властивості ґрунту (не визначали), затінення або добра освітлюваність дерева (змішані), умови збирання (однакові), стадії дозрівання (однакові), кліматичні умови (однакові в межах країн), місце зростання (різні). У нашому випадку прослідковується чіткий територіальний поділ для зразків – міські умови і маргінальні. Крім того, вміст алергену – вагомий, але не «повноцінний» показник алергенного потенціалу. М. Bryce *et al.* (2010) показали, що пилок берези з міських районів має більш високий алергенний потенціал, ніж пилок з сільської місцевості, хоча вміст алергену залишається незмінним [67]. Якщо взяти до уваги, що основна роль гена Bet v 1 – сигнальна та захисна, то результат з більшим вмістом Bet v 1 у пилку з м. Кузнецовськ та аеродрому «Бородянка» вказує на можливий стрес для ПЗ від викидів забруднюючих речовин літаками, автотранспортом та РАЕС.

Аналіз на вміст ВМ у ПЗ ББ зразків BV1, BV3, BV6, BV9 показав, що вони найбільшою мірою забруднені нікелем (див. табл. 3.1, рис. 3.4, 3.5). Крім того, за вмістом кадмію (для BV1, BV3, BV6), свинцю (для BV6), хрому (для BV6 і BV9) отримані значення перевищили існуючі вимоги до вмісту ВМ у пилку бджолиному. Для нікелю нормативних даних ми не знаходили. Він здатен утворювати органічні сполуки і комплекси, як і інші двовалентні катіони. Нікелю характерна рухливість в рослинному організмі, накопичення як в листі, так і в насінні, легкодоступність із ґрунту. Для здоров'я людини нікель і його сполуки становлять серйозну небезпеку [353]. Вважається, що пилок має гарну здатність поглинати і накопичувати ВМ, тому він є добрим і чутливим індикатором забруднення НПС, що підтверджено дослідженням В. А. Ляха зі

співавторами [187] і рядом інших робіт [21, 22, 209-212], і в той же час є носієм алергенного комплексу з ВМ, на що вказував В. Д. Савицький [218].

Наявність ВМ в пилку свідчить про забруднення ними ґрунту та/або атмосферного повітря, звідки вони надходять у надземні органи рослин з пилом і аерозольними частками, минаючи фізіологічні бар'єри на рівні кореня [185, 354]. Витягуючи з природного середовища забруднювачі і акумулюючи їх в собі, пилок різко змінюється і набуває непередбачуваних, як правило, шкідливих для людини властивостей. Найбільш важливий механізм токсичної дії ВМ на живі організми полягає в пошкодженні мембран і пригніченні активності багатьох ферментних систем [186, 289]. Це обумовлено здатністю ВМ вступати в хімічну взаємодію з сульфгідрильними групами протеїнів живих організмів, в першу чергу ферментних, а також інших білкових структур. Зміна їх конформаційного стану призводить до блокування протікання ряду біохімічних процесів. Деякі ферменти рослин мають антиоксидантну дію при стресі, викликаному ВМ. Такими ферментами є пероксидаза, каталаза, глутатіонредуктаза, гваяколпероксидаза, супероксиддисмутаза та інші [289, 354].

Отже, забруднення зразків українських та словацького пилку ББ ВМ є небезпідставним. Даний вид чутливий до цього виду забруднюючих речовин і проявляє цю властивість при можливості. ВМ, в свою чергу, впливають на білкові структури ПЗ і призводять до активації антиоксидантної системи захисту. Виявлений перелік хімічних елементів в пилку ББ і порівняння з можливими джерелами їх надходження вказує на те, що інтактний пилок ББ є чутливим до впливу пересувних джерел забруднення, що спостерігаються у різних зонах відбору проб (паркова зона м. Київ, лісова зона с. Хоцьки, територія аеродрому смт. Бородянки, житловий комплекс м. Нітра), і, в результаті, після виходу із пиляків, є фактором поширення супутніх техногенних забруднень. З потоками атмосферного повітря забруднюючі частинки переміщуються будь-куди. Campos *et al.* (2008) рекомендує збирати пилок в районах, розташованих не менш ніж за 3 км від джерела забруднення,

наприклад, від шляху з інтенсивним рухом, промислових центрів та сільськогосподарських районів, забруднених пестицидами [146]. Тому моніторинг концентрації токсичних металів в атмосфері та ґрунті у місцях заготовки пилку ББ з метою його використання для діагностичних та інших потреб є необхідним.

Наступним етапом оцінки пилку ББ було дослідження його мікробіологічної якості. Даний аналіз дозволяє проаналізувати вплив умов зростання і етапи заготовки без участі бджіл пилку анемофільного виду.

Відомо, що бактерії, гриби та продукти їх життєдіяльності на ПЗ можуть викликати алергічні та імунотоксичні реакції. Усередині пиляків пилок стерильний [189, 190]. Анемофільний пилок, найімовірніше, забруднюється мікроорганізмами, попадаючи в атмосферу, при зборі, сушінні і в процесі зберігання. Мікробіологічне забруднення пилку неминуче. Значення має якість мікробіологічного забруднення пилку. Чи перевищують ці показники норму. Було встановлено, що досліджувані зразки пилку ББ за кількістю визначених ентеробактерій перевищили норму для усіх словацьких зразків пилку, для українських зразків лише для двох місць збору – BV2a і BV6. За кількістю анаеробних бактерій, досліджених лише для зразків пилку з України, норма для всіх зразків перевищена. За кількістю аеробних бактерій, досліджених лише для зразків пилку зі Словаччини, норма для всіх зразків перевищена. Підраховані колонії мікроскопічних грибів на українських та словацьких зразках пилку норму не перевищили ( $<5 \cdot 10^4$  КУО/г). И. Г. Ахапкина (2007) повідомляє про забрудненість пилку *B. pendula* Roth. з м. Москва грибами та дріжджами в середньому  $3,69 \log$  КУО/г (за результатами даного дослідження в середньому  $3,20$  та  $3,97 \log$  КУО/г залежно від країни походження) [193]. Також були виявлені мікотоксини: сума афлатоксинів B1, B2, G1, G2, фумонізін B1 та B2, деоксиніваленол, зеараленон, Т-2 токсин, охратоксин А (див. табл. 3.4). Вони з'являються під час сушіння та зберігання пилку. За мікотоксинами норми не перевищені.

Ми ставили за мету проаналізувати мікробіоту анемофільного пилку з недотриманням стерильних умов збору, сушіння та зберігання. Дотримання стерильних умов збору і транспортування пилку в стерильне приміщення для сушіння не гарантує відсутності мікроорганізмів на пилку. Навіть коли Śpiewak *et al.* (1996) помістив гілки з сережками ББ до початку цвітіння в стерильну камеру, де не було значного руху повітря, пилок виявився забрудненим грампозитивними і грамнегативними бактеріями, термофільними актиноміцетами, грибами і з відносно екологічно чистого регіону в тому числі. Крім того, епіфітна мікрофлора рослин – нормальне явище.

González *et al.* рекомендує здійснювати процес сушіння пилку швидко [191]. Крім того, чим триваліший період збору пилку після сушіння, тим сильніше забрудненим буде пилок [189]. У нашому випадку пилок висипався менше, ніж через добу. Але збирався в скляні ємності поступово, протягом декількох діб. Якщо сирий пилок зберігається без обробки, гриби можуть процвітати у відповідних умовах (вологість і температура), так як пилок є підходящим рослинним продуктом або для росту грибів, або для вироблення мікотоксинів. Деоксиніваленол – вторинний метаболіт фузарієвих грибків, зокрема *Fusarium graminearum* і *Fusarium culmorum*, що вражають рослини на полі. Він менш токсичний, ніж інші трихотецени, наприклад, Т-2 токсин [355]. Т-2 токсин вражає кровотворні та імунокомпетентні органи, функції шлунково-кишкового тракту [356]. Фумонізін виробляється грибами *F. moniliforme* і *F. proliferatum*. Основний продуцент зеараленону – *F. graminearum*. Спори гриба зустрічаються у ґрунті, звідки вони потрапляють на вегетуючі рослини і при сприятливих умовах (висока вологість) проростають, вражаючи колос або качан і утворюючи продукти своєї життєдіяльності [357]. Афлатоксини і охратоксин А є термостабільними і канцерогенними молекулами, таким чином, пилок висушений природним шляхом або за допомогою спеціального обладнання може становити загрозу для здоров'я людини і тварин [189].

Наступний етап поводження з пилком – забезпечення належних умов зберігання. Умови зберігання були відповідними: у герметично закритих



пластикових пакетах і скляних банках в морозильній камері при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  [347]. Умови зберігання (температура, світло) можуть сприяти розкладанню ненасичених ЖК, зменшенню вмісту вітаміну С [148, 160, 358, 359]. В нашому випадку усі зразки зберігались в морозильній камері, що є найоптимальнішим варіантом збереження вітамінів [147, 359]. Таким чином ми зберігали усі досліджувані зразки, тому вважаємо, що фактор – умови зберігання має однаковий вплив на отримані результати досліджень.

Такий чинник як фактор часу також має вплив на якість БА пилку. S. Bogdanov (2012) стверджує, що пилок зберігає свою сенсорну та мікробіологічну якість терміном зберігання 2 роки, якщо зберігати в прохолодному, сухому і темному місці [321]. Так, за вмістом мікотоксинів досліджувані зразки пилку ББ не відрізняються, хоча зразки українського пилку зберігалися 2,5 роки до проведення аналізу, а словацькі зразки пилку – півроку.

Таким чином, проаналізовано вплив людського фактору протягом чотирьох етапів від моменту збору до використання пилку: збір, сушіння, упаковка і зберігання. Важливо дотримуватися рекомендацій на кожному з них. Найважливішим етапом для запобігання забруднення пилку мікроорганізмами та мікотоксинами при недотриманні стерильних умов збору пилку – є етап сушіння. Але навіть при деяких невідповідностях нормам, пилок ББ продемонстрував сильну антиоксидантну активність *in vitro* з різних місць зростання (див. табл. 3.17).

Отже, по кожному алергенному показнику –  $\text{Bet v 1}$ , забруднення ВМ, мікроорганізмами та мікотоксинами відмічено вплив на алергенний потенціал пилкової сировини ББ залежно від умов зростання, заготовки, сушіння та зберігання. Як саме цей вплив відображений на БА пилку показано нижче.

Для початку слід проаналізувати захисну роль хімічних складових ПЗ ББ, без характеристики яких оцінка БА була б не повною.

Провести повний аналіз пилку майже неможливо. В бджолиній обножці знайдено біля 250 різноманітних сполук і речовин [136]. Ми виділили ряд речовин для аналізу, які, на нашу думку, мають найбільший вплив на прояв БА. Це

білки, ЖК ліпідів, АК та флавоноїди. ІЧ-Фур'є та Раман спектри квіткового пилку ББ (див. рис. 3.1 і 3.2) відобразили загальну картину хімічного складу, в чому і полягала мета цього аналізу. Була показана присутність білків, ліпідів, вуглеводів, органічних кислот та поліфенолів.

Як відомо, білково-ліпідний комплекс відіграє важливу роль у стійкості рослин до несприятливих умов НПС [289]. Пилок містить окрім простих білків (альбуміни, глобуліни, проламіни, глютен) нуклеопротейди, ліпопротейди, глікопротейни і багато інших речовин. Високий вміст і спектр ферментів та ізоферментів відображає його біокаталітичне значення [148]. Вміст білка визначається генотипом і змінюється в залежності від видів рослин [160, 169, 360]. Також вміст білка в пилку одного виду може відрізнятися в залежності від погоди, ґрунту, ступеня зрілості пилку та інших факторів НПС [148] (див. табл. 3.5 і 3.6).

Було встановлено, що вміст білка в пилку ББ варіює в межах 17,85-25,62 %. Значимо більший відсоток вмісту білка в пилку з України. Усі словацькі зразки пилку заготовлені в одному місті, але навіть в межах одного міста спостерігається достовірне коливання його вмісту (див. табл. 3.6). В українському пилку вміст білка найбільший в зразку, заготовленому поблизу автомобільної траси біля лісу і в 6 км від РАЕС, у словацькому – білка найбільше в зразку із території ботанічного саду.

В табл. 4.10 наведено літературні дані по вмісту білка в пилку ББ, а також його норма для бджолиного пилку.

Таблиця 4.10

Порівняння результатів визначення білка в пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з літературними даними, %

Джерело	Середнє значення
Наші результати, 2013	22,70 ± 2,28
Přidal, 2003 <sup>[151]</sup>	23,02
Özler <i>et al.</i> , 2009 <sup>[169]</sup>	7,73
Норма для сухого бджолиного пилку <sup>[160]</sup>	10-40

Типовий діапазон вмісту білка в пилку, зібраного вручну і бджолами, становить від 7,5 до 35%, хоча було визначено вміст білка і більше 40% [148, 188, 360]. Як видно з табл. 4.10 дані узгоджуються з літературними і нормами для пилку бджолиного.

Більшість білків пилку, ймовірно, ферменти, які функціонують в процесі росту пилкової трубки і подальшого запліднення, але широкий діапазон кількості білка, може відображати не тільки взаємодію пилок-маточка [360]. Оскільки рослини характеризуються відносно «нерухомим» способом життя, їх адаптивні захисні реакції на негативні впливи локалізовані всередині клітин і безпосередньо зачіпають білкову систему. Так звані стресові білки відіграють важливу роль у формуванні стійкості рослин до дії несприятливих чинників, беручи участь у захисних відповідних реакціях [361]. Згідно Sousa *et al.* (2012), атмосферні забруднюючі речовини можуть збільшувати або зменшувати загальний вміст білка в пилку [8]. Згідно Філонік та Заморуєва (2005) вміст білків підвищується як адаптивна реакція на дію антропогенного тиску [362]. Виходячи з цього положення, якщо взяти до уваги отримані результати з аналізу загального вмісту білків, то їх більший вміст свідчить про більше негативне екологічне навантаження на території України в місцях заготовки березового пилку, аніж Словаччини. У будь-якому випадку забруднення повітря є фактором стресу, який впливає на експресію білків, які є невід'ємною частиною захисної системи рослин.

Алергени пилку також білки. Цілком імовірно, що білки стінки ПЗ складають дуже велику частку мобільного білка пилку, і, отже, можуть відігравати важливу роль в пилковій алергенності [168, 177]. Забруднення повітря впливає як на морфологічну структуру ПЗ, так і збільшує вміст алергізуючого білка в пилку [114, 126]. Пилок з сильно забруднених зон може вивільняти більшу кількість білків, які є алергенними [238]. Behrendt & Becker (2001) показали, що газоподібні і тверді забруднювачі можуть впливати на молекулярну структуру, кількість і випуск алергенних білків у пилку, забруднення повітря може призвести до пошкодження і стоншення екзини, змін

у загальному вмісті білка [126]. Забруднений пилок більш дієвий, ніж незабруднений, і у зрілого пилку є більше потужності викликати алергію, ніж в недозрілого [217]. Дослідження білків пилку, на які впливає забруднення повітря, важливе, тому що білки стінки і поверхневого шару відіграють важливу роль в адгезії і до векторів і до компонентів рильця. Передчасне звільнення клітинного матеріалу, в тому числі білків, яке спостерігається серед ПЗ із забруднених районів, впливає на родючість рослини [126].

Ще одним рослинним механізмом захисту від несприятливих екологічних чинників є ліпіди. Було встановлено, що серед насичених ЖК переважає пальмітинова ( $33,9 \pm 2,0$  %), серед ненасичених – олеїнова ( $29,5 \pm 4,6$  %) та лінолева ( $27,8 \pm 5,9$  %) ЖК (див. табл. 3.7). За місцями зростання вміст ЖК статистично відрізняється (див. табл. 3.9) за винятком декількох випадків. Найбільший вміст  $\Sigma$  НЖК серед українських зразків належить BV1 (паркова зона м. Київ, не далеко від житлових масивів), серед словацьких – BV9 (житловий масив м. Нітра поблизу автомобільних доріг). Найбільший вміст  $\Sigma$  ННЖК належить BV5 (біля лісу, але поблизу автомобільних доріг і РАЕС у м. Кузнецовськ) і BV7 (біля автомобільної дороги в м. Нітра), а  $\Sigma$  ПНЖК – BV5 і BV8 (ботанічний сад м. Нітра) відповідно. В цілому в усіх зразках пилку вміст  $\Sigma$  ННЖК достовірно більший,  $\Sigma$  ПНЖК – достовірно менший. Що ж стосується порівняння словацьких та українських зразків пилку, то  $\Sigma$  НЖК достовірно більша в зразках пилку зі Словаччини, а вміст  $\Sigma$  ННЖК і ПНЖК – в зразках пилку з України (див. табл. 3.11).

Отже, екологічні фактори місць зростання дерев впливають на жирнокислотний склад загальних ліпідів.

У дослідженнях Л. В. Ветчиннікової (2012) порівняльний аналіз пилку *Betula pubescens* Ehrh., *B. pendula* Roth. і *B. pendula* Roth. var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti за концентрацією окремих груп визначив певні відмінності між видами [176]. Так, у *B. pubescens* Ehrh. і *B. pendula* Roth. концентрації нейтральних ліпідів і гліколіпідів у клітинах пилку переважали над фосфоліпідами в 2 і 1,2 рази відповідно. Л. В. Ветчиннікова робить висновок

про те, що розподілення ліпідів за фракціями в зрілому пилку різних видів берези, ймовірно, зумовлено їх видовою специфічністю та/або екологічними особливостями місць їх зростання.

З літературних даних також відомо, що ліпіди відіграють важливу роль не лише у проростанні та рості пилкової трубки [176], а й у формуванні стійкості рослин до низьких температур та відповідних реакціях рослин на біотичний стрес [176, 179, 363]. Ця стійкість корелює з наявністю в клітинних мембранах поліненасичених ЖК [179]. Як було встановлено, поліненасичених ЖК найбільше з BV5 (біля лісу, але поблизу автомобільних доріг і РАЕС у м. Кузнецовськ). Функціональна роль поліненасичених ЖК полягає в нормалізації діяльності всіх мембранних структур клітин і внутрішньоклітинної передачі інформації. В умовах техногенного навантаження підвищується рівень ненасичених ЖК у відповідь на активацію вільнорадикальних процесів при адаптації чутливої деревної породи [362, 364]. ББ визнаний біоіндикатор [76, 81, 215, 365-372]. Якщо взяти до уваги отримані результати з аналізу жирнокислотного складу ліпідів, то більший вміст ненасичених і поліненасичених ЖК свідчить про більше негативне екологічне навантаження на території України в місцях заготовки березового пилку, аніж Словаччини.

Отже, достовірні відмінності у вмісті білків та ЖК ліпідів між країнами та між регіонами свідчить про білково-ліпідний механізм реагування ПЗ ББ на екологічну ситуацію місць зростання, і в той же час на більший прояв адаптаційних ресурсів українського пилку, аніж словацького.

АК – унікальна поліфункціональна сполука. Маючи здатність обернено окислюватися і відновлюватися, АК бере участь у найважливіших енергетичних процесах рослинної клітини – фотосинтезі та диханні. Безсумнівна її участь у процесах росту, цвітіння, вегетативної та репродуктивної диференціації, у водному обміні, регуляції ферментативної активності, стимуляції реакцій метаболізму, пов'язаних з обміном нуклеїнових кислот і синтезом білка, в захисних реакціях рослин. Під час диференціації АК стимулює ріст і морфогенез клітини. Велика кількість робіт присвячена

дослідженню дії АК на імунні властивості рослин, оскільки вважається, що одним з проявів активного імунітету рослин є нормальне або підвищене утворення в них цієї кислоти. За участю АК формується стійкість рослин по відношенню до багатьох несприятливих впливів: до зниженої температури, радіації, вірусної та бактеріальної інфекції і т.д. [373].

Отже, присутність АК в ПЗ ББ обумовлена широким спектром її функцій. Так як було показано достовірні відмінності у вмісті АК в зразках пилку з різних місць зростання, це свідчить про вплив місцевих екологічних факторів на процес формування та дозрівання пилку, а, отже, і на вироблений деревом імунітет.

Було показано, що достовірно вищий вміст АК в пилку з України, аніж Словаччини (див. табл. 3.14).

Дослідження вмісту флавоноїдних сполук в пилку ББ обумовлена широким спектром їх БА. В нашому випадку інтерес становлять антиоксидантні, антибактеріальні та захисні властивості.

За середнім вмістом флавоноїдних сполук українські та словацькі зразки пилку ББ достовірно не відрізняються. Такий результат віддаленої територіальної подібності досліджуваних параметрів спостерігається вперше для зразків пилку ББ серед досліджуваних показників.

Взаємозв'язок АК та флавоноїдних сполук березового пилку з його біологічною дією розглянуто нижче.

БА пилку ББ оцінювали *in vitro*, вимірюючи ЗАА трьох видів екстрактів – водного, метанолового та етанолового. Було встановлено, що значення ЗАА водних, етанолових і метанолових екстрактів українських зразків пилку ББ достовірно відрізняються від словацьких значень. ЗАА водних екстрактів зразків пилку з України значно вища, а ЗАА метанолових і етанолових екстрактів вища у зразків зі Словацької республіки.

Результати з визначення ЗАА можна пояснити декількома факторами.

Не виключений вплив фактора часу [348]. Тільки свіжий пилочок має оптимальну БА [188]. Вважається, що антирадикальна здатність пилку

зменшується з часом [148]. Протягом одного року пилок втрачає близько 59% своєї антиоксидантної активності [321]. Дослідження ЗАА для словацьких зразків пилку проводилися через місяць після збору і зберігання пилку, для українських зразків – через один рік. В кінцевому підсумку результати ЗАА в цілому високі.

Різні методи аналізу та лабораторії також можуть вплинути на отримані дані [175, 348]. В нашому випадку аналогічні методи і однакові умови були дотримані.

Вплив розчинника [348]. Біологічно активні властивості продуктів бджільництва можуть бути збільшені шляхом використання відповідного екстрагента [148]. Екстракція рослинних продуктів у воді або інших розчинниках – непростий процес. Вода та спирти – полярні розчинники. Багато речовин добре розчиняються у воді. До складу водних екстрактів з пилку, безсумнівно, надходять такі найважливіші біологічні речовини, як білки-ферменти, вуглеводи, азотисті основи, амінокислоти [172]. В результаті утворюється складний комплекс суміші фізіологічно активних речовин. Погано розчиняються у воді або зовсім не розчиняються жири, полісахариди та ін. Метанол і етанол – речовини одного класу, за своїми фізичними властивостями етанол практично нічим не відрізняється від метанолу [374]. Як правило, флавоноїди розчиняються в етиловому ефірі, ацетоні, спиртах і практично нерозчинні в воді [173].

Для виявлення впливу розчинника на значення ЗАА досліджуваних зразків пилку застосовували дисперсійний аналіз. Він показав, що вид екстрагента не чинить значущого впливу на виявлення рівня вільних радикалів в пилку (табл. 4.11). Але якщо розглядати вплив розчинника окремо для пилку ББ з України та Словаччини, то виявляється, що для зразків пилку з України коефіцієнт множинної детермінації дорівнює 0,21, що вказує на здатність виду екстрагента детермінувати рівень вільних радикалів на 21% (тобто, за 21% мінливості рівня вільних радикалів відповідає вид екстрагента, а за 79% – інші фактори). Для зразків пилку зі Словаччини коефіцієнт множинної детермінації

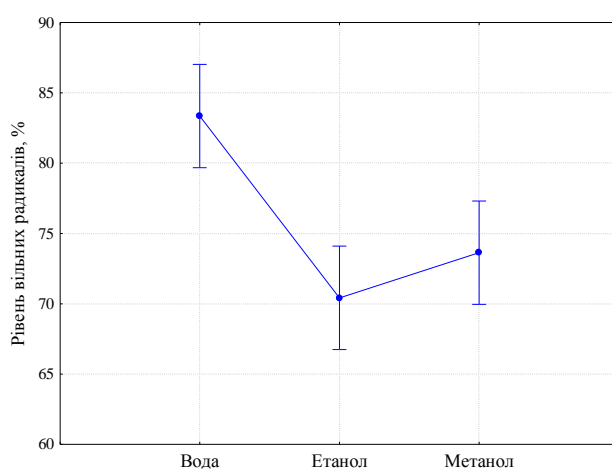
дорівнює 0,63, що вказує на здатність виду екстрагента детермінувати рівень вільних радикалів на 63%, а інші фактори на 37%. Залежність результатів з ЗАА від виду екстрагента для українських зразків пилку менше виражена, ніж для словацьких. Мабуть, це пов'язано з певними властивостями пилку, так як в Україні ці показники вищі для ПЗ, розчинених у воді, а в Словаччині – для ПЗ, розчинених в етанолі (рис. 4.2).

Таблиця 4.11

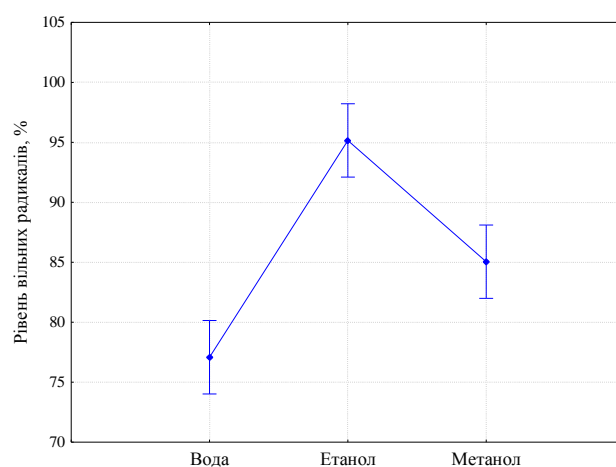
Виявлення залежності впливу екстрагентів на рівень вільних радикалів

Країни порівняння	Залежна змінна	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	F	p
Україна і Словаччина	Рівень вільних радикалів	0,157	0,025	1,86	0,160
Україна		0,453	0,21	13,181	0,008
Словаччина		0,7934	0,6295	35,6770	0,001

Примітка: Multiple R – коефіцієнт множинної кореляції, Multiple R<sup>2</sup> – коефіцієнт множинної детермінації, F – критерій Фішер, p – рівень значущості



Українські зразки пилку



Словацькі зразки пилку

Рис. 4.2 Графічне зображення середніх значень загальної антиоксидантної активності для українських і словацьких зразків березового пилку

Так, S. Bogdanov зазначає, що найкраща екстракція бджолиного пилку досягається з етанолом [321]. Літературний аналіз джерел, в яких проводилося порівняльне вивчення антиоксидантних властивостей водних та спиртових екстрактів різних видів пилку, який збирають бджоли (пилок чаю, мімози,



пальми, юки, лободи та ін.) показав, що завжди значення антиоксидантної активності такого пилку було вищим для спиртових розчинів [148, 320].

Отже, українські та словацькі зразки пилку ББ відрізняються за кількісним вмістом сполук різної хімічної природи, що було підтверджено вище (див. табл. 3.5, 3.7, 3.13, 3.15). Речовинами пилку, які забезпечують його антиоксидантні властивості, можуть бути білки, АК, флавоноїди різних груп, з ряду тих, які ми визначали хімічно та виявили спектрофотометрично (див. рис. 3.1, 3.2 та табл. В.1.1, В.1.2), а також відомі антиоксиданти з літератури – *para*-кумарова кислота,  $\beta$ -каротин, інші поліфеноли [148, 306, 349, 375]. J. Rozema *et al.* (2001) виявив *para*-кумарову кислоту, яка визнана найактивнішим антиоксидантом, що блокує вільні радикали, в негідролізованому нерозчинному залишку пилку берези *B. pendula* Roth. як складову фракції спорополеніну [376]. *para*-Кумарова кислота є водорозчинною сполукою, стимулює біосинтез білків. Білки можуть поглинати вільні радикали [316] та розчиняються у воді [172]. Було встановлено, що значимо більший відсоток вмісту білка в пилку з України, як і значення ЗАА для водних пилкових екстрактів. Більше того, зразок пилку ББ з найбільшим вмістом білків (BV5 – м. Кузнецовськ, функціонуюча РАЕС) має найбільше значення ЗАА серед водних екстрактів, зразок з найменшим вмістом білків (BV7 – м. Нітра, близькість автомобільної дороги) – найменше. Коефіцієнт кореляції між вмістом білка і ЗАА водних екстрактів пилку ББ становить 0,70, для етанолових і метанолових екстрактів всього лиш -0,26 і -0,22 відповідно. Можна припустити, що водорозчинні білки в пилку ББ беруть участь в захисній системі пилку.

Також високою антиоксидантною властивістю володіє водорозчинна АК. Для виявлення зв'язку між рівнем АК та ЗАА був проведений кореляційний аналіз Пірсона. Виявлено значущі обернено пропорційні зв'язки між вмістом АК і розчинником (дод. Е табл. 1).

Так, якщо не розглядати окремо за країною походження пилку, вміст АК втрачається при використанні етанолу ( $r = -0,58$  при  $p < 0,05$ ) і метанолу

( $r = -0,59$  при  $p < 0,05$ ). Дійсно, АК – найактивніший відомий на сьогодні водорозчинний антиоксидант [306].

Якщо розглядати результати щодо країни збору пилку, то видно, що в українських зразках рівень вмісту АК зменшується при використанні метанолу ( $r = -0,67$  при  $p < 0,05$ ), а в словацьких зразках – при використанні води ( $r = -0,72$  при  $p < 0,05$ ).

В цілому вміст АК в пилку ББ, заготовленому на території України, достовірно вищий, ніж у зразках пилку зі Словаччини (див. табл. 3.14), що свідчить про більший адаптивний потенціал пилку до екологічних факторів місця зростання.

При дослідженні впливу вмісту флавоноїдних сполук в березовому пилку на його антиоксидантні властивості за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона був виявлений позитивний взаємозв'язок між метанолом та концентрацією флавоноїдів ( $r=0,8$  при  $p<0,05$ ). Тобто, екстрагування метанолом дозволяє досягати значно вищих концентрацій флавоноїдів, порівняно зі спиртом та водою. Можна стверджувати, що антиоксидантна активність метанолових екстрактів пилку ББ також обумовлена дією флавоноїдів. Механізм антиоксидантної дії флавоноїдів полягає у видаленні вільних радикалів із середовища, також здатністю зв'язувати і видаляти з середовища іони металів, що ініціюють появу вільних радикалів. Більш дієвою є здатність флавоноїдів активувати природні механізми клітинного захисту від окисного стресу [301].

Відомо, що одним з підходів оцінки стану НПС є реакція рослин на різні види забруднювачів в результаті активації процесів системи антиоксидантного захисту [377]. Виходячи з вищесказаного, можна зробити висновок, що умови зростання найбільшим чином впливають на синтез речовин, які забезпечують антиоксидантну активність пилку ББ.

Іншим методом оцінки БА є АМА. Для її прояву застосовували два види екстрактів концентрацією 0,1% – водну та водно-сольову. Їх дію визначали проти фітопатогенних грибів та бактерій, патогену для комах, не патогенних,

умовно патогенних і патогенних видів для людини. В цілому проти 11 видів мікроорганізмів. Антибактеріальна дія пилку залежить від виду рослини, часу збирання і якісного стану пилку. Пилок бджолиний проявляє виражену антибактеріальну дію, чим і пояснюються його лікувальні та профілактичні властивості.

Досліджувані зразки пилку ББ проявили слабку АМА. Дія пилкових екстрактів проявилася проти *Paenobacillus larvae*, *Botrytis cinerea* у вигляді незначних зон затримки росту мікроорганізмів – 1,33-4,67 мм та відсутності росту *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* взагалі. Активність проявили лише зразки пилку з України: усі, окрім BV6 (територія аеродрому) BV1 (м. Київ), BV2a (м. Переяслав-Хмельницький), BV3 (с. Хоцьки), BV5 (м. Кузнецовськ). Не виключено, що на отримані результати могла вплинути наявна мікробіота на зразках пилку ББ. Дія могла бути синергетичною або антагоністичною. Або ж АМА у пилку ББ із заготовлених регіонів порушена. В умовах дестабілізуючої дії екотропних факторів активуються захисні системи ПЗ, щоб реалізувати головне призначення – розмноження. Тому, в першу чергу, їх дія направлена на адаптацію клітин до умов НПС. Антибіотичними речовинами пилку можуть бути ЖК та поліфенольні сполуки – флавоноїди. Так, АМА притаманна каприловій, каприновій, лауриновій, олеїновій, лінолевій та ліноленовій ЖК. Встановлено також, що чим коротший вуглецевий ланцюг, тим більше ЖК обніжжя забезпечують антибактеріальний та антигрибковий захист організму бджіл і вулика. Антибактеріальна та антигрибкова активність ЖК зростає також зі збільшенням кількості ненасичених зв'язків у їх вуглецевому ланцюгу [148, 364]. В досліджуваних зразках пилку вміст олеїнової та лінолевої ЖК один з найвищих. Для цих ЖК характерна найбільш висока варіабельність вмісту в зразках пилку залежно від місця зростання. Олеїнової ЖК достовірно більше в словацькому пилку, а лінолевої – в українському. Порівняно найсильніші антимікробні властивості проявив зразок березового пилку з м. Кузнецовськ – місто функціонування РАЕС. У ньому найбільший вміст лінолевої кислоти порівняно із олеїновою та ліноленовою і

зразками BV1, BV2a, BV3. Серед інших функцій лінолевої кислоти в пилку: попередник для біосинтезу ряду гормонів рослин – фітопростанів, кількість яких зростає при біотичних і абіотичних стресах.

АМА флавоноїдів пов'язана з пошкодженням плазматичної мембрани бактерій, ініціювання агрегації клітин і пошкодження мембран, специфічна взаємодія з певними білками бактеріальних клітин, викликаючи порушення їх функціонування. Флавоноїди можуть порушувати роботу генетичного апарату бактеріальних клітин. Вони здатні порушувати функціонування різних ферментів, що беруть участь в синтезі мембранних ліпідів бактерій [173].

Масова частка флавоноїдних сполук також найвища в пилку ББ із м. Кузнецовськ. Але стверджувати, що АМА водних екстрактів пилку ББ забезпечується флавоноїдами і ЖК ліпідів, зокрема, лінолевою, недоцільно, оскільки ці сполуки нерозчинні у воді. Імовірніше, водні та водно-сольові екстракти пилку ББ ефективніші при вищих концентраціях і у тих дерев, які зростають при сприятливій дії комплексу екологічних факторів.

Імунна система одна з перших відчуває на собі вплив усіх екологічних факторів і забезпечує адаптацію організму до нових умов. Наскільки сильною є імунологічна активність пилку ББ порівняно з фагоцитарною активністю клітин крові людини ми і намагалися з'ясувати за допомогою НСТ-тесту і фагоцитозу. Було встановлено, що кисеньгенеруюча активність фагоцитуючих клітин в реакції з нітросинім тетразолієм достовірно зростає, пероксидазні системи активуються, збільшується число клітин, які приймають участь у фагоцитозі. Клітини імунної системи активуються при дії водно-сольових екстрактів із пилку ББ.

На черговому етапі досліджень доцільно було також оцінити ступінь змін ПЗ ББ на видимому морфологічному рівні при комплексному впливі екологічних факторів місць зростання.

Менший або більший розмір зерен, більша чи менша кількість пор, видозмінена форма та скульптура поверхні спородерми, розриви, присутність чужорідних частинок на поверхні тощо – перш за все проявляються у ПЗ при дії

негативних екологічних чинників [235]. Традиційними морфологічними характеристиками є довжина екваторіального діаметру та полярної осі, індекс форми. З метою більш детальної оцінки та порівняння зразків пилку було підібрано три додаткові характеристики для ПЗ ББ, які виявились досить інформативними для ПЗ ББ.

ПЗ досліджували за допомогою СЕМ. Масових видимих пошкоджень ПЗ не було відмічено. Незмінюваність ПЗ, очевидно, забезпечується наявністю в екзині великої кількості спорополеніну, завдяки якому пилок набуває стійкості до дії різних хімічних речовин, температури [378]. Щоправда вдалося зафотографувати ПЗ з, як ми припускаємо, орбікулами (Україна, м. Переяслав-Хмельницький, територія природного музею) (рис. 4.3). Орбікули – позаклітинні структури, розміром 2-4 мкм в аеродинамічному діаметрі [106]. Вважають, що в орбікулах присутні алергени і їх розглядають в якості дуже ефективних векторів алергенів.

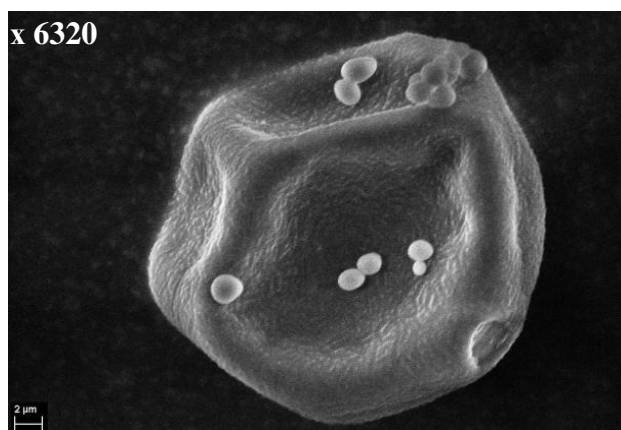


Рис. 4.3 Мікрофото пилкового зерна *Betula verrucosa* Ehrh. зі сторонніми частинками (Фото: Островськи Р., Шевцова Т. 2011)

У табл. 4.12 наведено порівняння отриманих значень вимірювань довжини полярної осі та екваторіального діаметра ПЗ ББ з літературними даними.

Таблиця 4.12

Порівняння отриманих даних основних морфологічних характеристик  
пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh. з літературними даними

Джерело		Довжина осі (мкм)		Вид пилкових зерен
		полярна (P)	екваторіальна (E)	
Наші результати	Український пилкок (2011)	17,9 – (18,4) – 18,9	22,6 – (23,3) – 23,9	Сухі
	Словацький пилкок (2013)	18,1 – (18,6) – 18,9	23,7 – (24,4) – 24,9	Сухі
J. Jentys-Szaferowa (1928) <sup>[222]</sup>		Немає даних	24,3	Свіжі
G. Erdtman (1943) <sup>[137]</sup>		Немає даних	18,6 – (21,8) – 24,3	Не вказано
W. Welten (1944) <sup>[379]</sup>		Немає даних	21,8	Свіжі
И. Покровская (1950) <sup>[380]</sup>		Немає даних	15,0 – (19,6) – 21,0	Не вказано
O. Eneroth (1951) <sup>[381]</sup>		Немає даних	22,1	Свіжі
R. Praglowski (1962) <sup>[226]</sup>		22,0	26,0	Не вказано
W. Koperowa & A. Srodon (1965) <sup>[382]</sup>		Немає даних	25,1	Свіжі
R. Andrew (1968) <sup>[383]</sup>		Немає даних	16,9 – (19,9) – 27,3	Свіжі
		Немає даних	16,9 – (19,5) – 28,6	Свіжі
E. Chira (1971) <sup>[384]</sup>		Немає даних	20,1 – 25,2	Не вказано
А. Чигуряева (1975) <sup>[351]</sup>		23,0	31,5	Не вказано
S. Blackmore (2003) <sup>[221]</sup>		17,0 – (19,5) – 24,0	22,0 – (24,5) – 28,0	Свіжі
Polleninfo <sup>[16]</sup>		21,0 – (22,6) – 25,0	22,0 – (24,0) – 25,0	Не вказано
Pollnet <sup>[225]</sup>		Немає даних	18,0 – 28,0	Не вказано
Р. Г. Курманов <sup>[385]</sup>		21,2 – 25,0	22,4 – 25,7	Не вказано

Примітка: дані в таблиці представлені у вигляді min – ( $\bar{x}$ ) – max, де min – мінімальне значення;  $\bar{x}$  – середнє арифметичне вибірки; max – максимальне значення

Було встановлено, що українські та словацькі ПЗ подібні за значеннями довжини полярної осі, які для сухих ПЗ коливаються в межах 17,9 – (18,4) – 19,0 мкм (рис. 4.4). В літературі зустрічаються значення 17,0 – (19,5) – 24,0 мкм (свіжі ПЗ), 21,0 – (22,6) – 25,0 (не зазначено стан ПЗ) з баз даних PalDat та Polleninfo. Наші результати узгоджуються з літературними і, отже, ця ознака не є інформативною для оцінки впливу умов зростання.

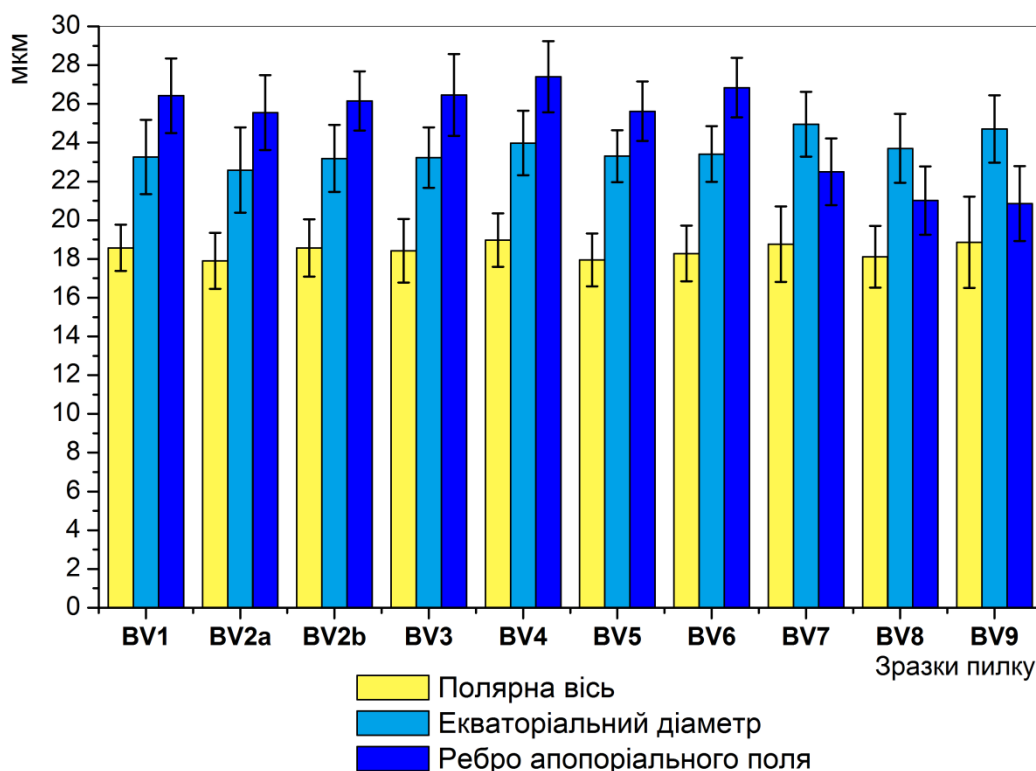


Рис. 4.4 Діаграма значень довжин полярної осі, екваторіального діаметру та ребра апопоріального поля для усіх зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Значення довжини екваторіального діаметру визначені в межах 22,6 – (23,6) – 25,0 мкм. Літературні дані – 22,0 – (24,5) – 28,0 мкм (свіжі ПЗ), 22,0 – (24,0) – 25,0 мкм (не зазначено стан ПЗ) з баз даних PalDat та Polleninfo. Результати також узгоджуються з літературними. За цією ознакою ПЗ зі Словаччини більші за українські (див. табл. 3.25).

Встановлений індекс форми 0,75 – (0,78) – 0,81 також не суперечить літературним даним: 0,72 – (0,79) – 0,88 (PalDat). Форма зерен визначена як майже сфероїдальна, сплюснена біля полюсів.

Отже, в межах виду спостерігаються певні варіації в традиційних морфологічних характеристиках. Проте всі вони знаходяться в рамках загального морфологічного типу, властивого ПЗ даного виду (див. рис. А.3.1-3.2). Але, як показав регресійний аналіз, при погіршенні екологічної ситуації в біогеоценозі зростання популяції ББ, в першу чергу, зміни проявлятимуться на довжині полярної осі у бік зменшення розміру ПЗ.

Із додаткових характеристик кут розташування апертур до контуру ПЗ є найбільш показовою ознакою. Результати представлені у межах 97,6 – (103,4) – 113,8 deg (рис. 4.5). За цією ознакою словацькі зразки пилку більші за українські, що не дивно, оскільки регресійний аналіз показав, що екологія місць зростання в Україні негативно впливає на ПЗ шляхом зменшення кута розташування апертур до контуру ПЗ.

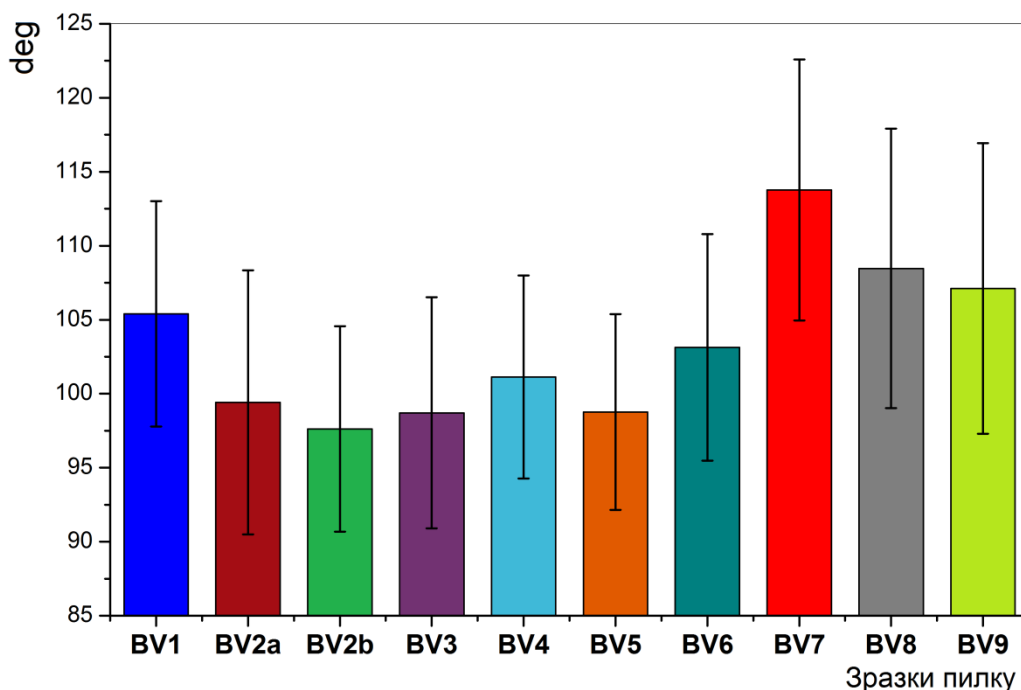


Рис. 4.5 Діаграма значень кута розташування апертур до контуру пилкових зерен усіх зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Довжина внутрішнього діаметра апертур є найбільш варіабельною морфоознакою. Результати представлені у межах 2,7 – (3,1) – 3,4 мкм (рис. 4.6). Відмічено, що чим більш сухе ПЗ, тим менший отвір апертури. За цією ознакою і довжиною ребра апопоріального поля ПЗ більші з території України.



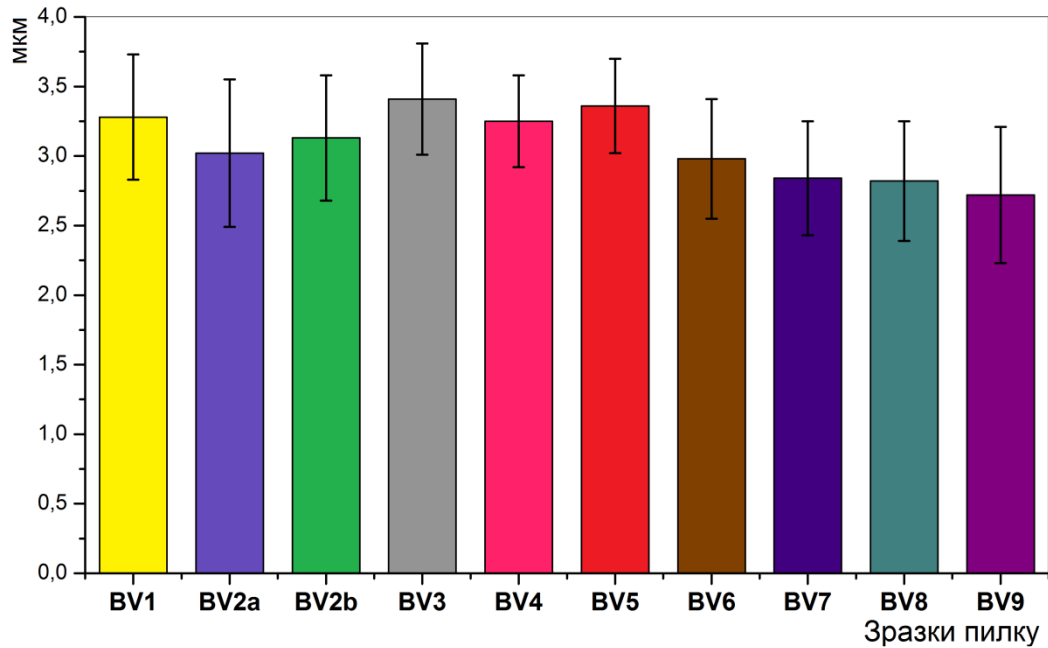


Рис. 4.6 Діаграма довжини внутрішнього діаметру апертури пилкових зерен усіх зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

При порівнянні розміру усіх зразків ПЗ ББ найменші зерна спостерігаються серед пилку беріз із м. Переяслав-Хмельницький, Україна (BV2a). Серед зразків пилку з України вони найбільші з смт. Іванків (BV4). Обидва українські зразки заготовлені на території житлового масиву поблизу автомобільних доріг. Чіткого достовірного поділу зразків пилку з України не спостерігається. Словацькі зразки пилку більші за розміром. Серед словацьких зразків ПЗ найбільші з BV7 (біля автомобільної дороги), за деякими ознаками трохи менші з BV9 (територія жилого масиву поблизу автомобільних доріг), найменші з BV8 (територія ботанічного саду). Отже, навіть в межах одного міста є відмінності в розмірі пилку ББ. Щоправда помічено, що навіть окремі дерева в рамках виду можуть проявити свої особливості, специфічні вимоги до умов проростання і власний ритм розвитку ПЗ [290, 386].

Вищесказане наглядно демонструють дендрограми, побудовані за допомогою кластерного аналізу (рис. 4.7). Дендрограми відображають послідовне об'єднання двох кластерів в один із зазначенням відстаней між ними. Чим більша відстань, тим менше спільного в досліджуваних об'єктах.

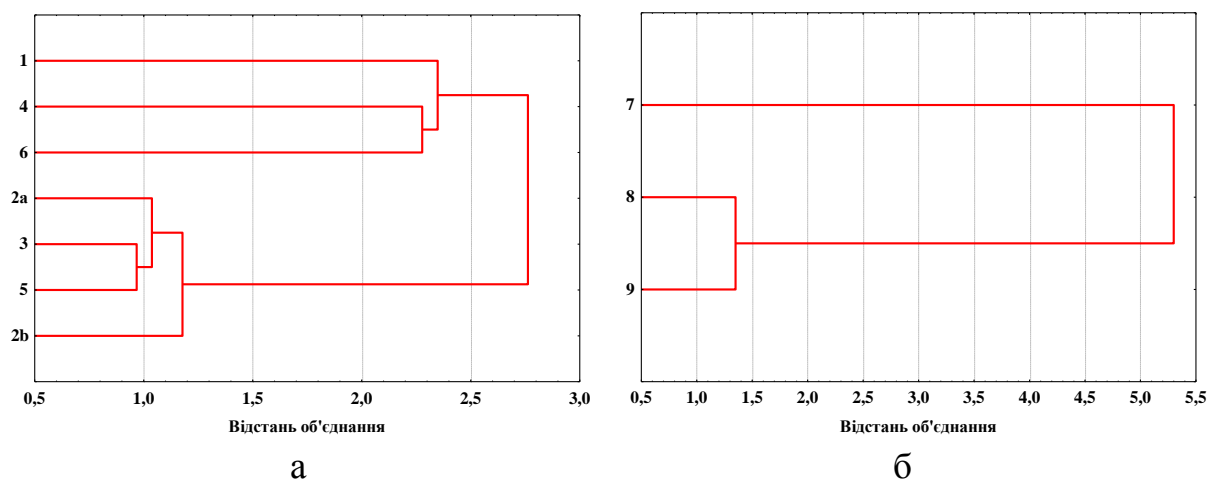


Рис. 4.7 Дендрограма кластерних відстаней між сімома зразками українського пилку (а) і трьома зразками словацького пилку (б) *Betula verrucosa* Ehrh.

Спільна дендрограма для українського та словацького пилку, що представлена нижче (рис. 4.8), підтверджує відмінності між ними.

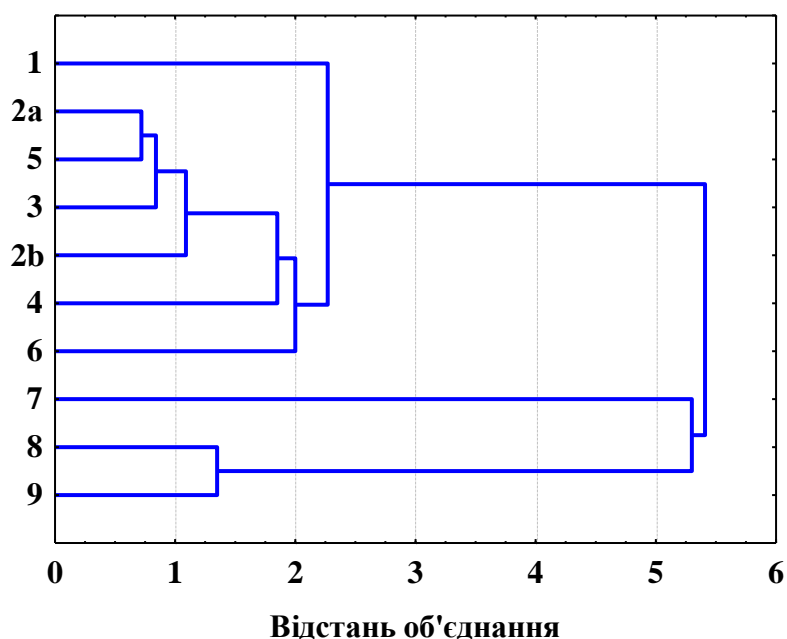


Рис. 4.8 Дендрограма кластерних відстаней між усіма зразками пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

С. Н. Куприянов (1992) зазначає, що діаметр ПЗ – приблизна його характеристика. В різні роки у однієї і тієї ж рослини може спостерігатися пилко, середні розміри якого різні. В одному і тому ж колоску квітки можуть дати пилко різних розмірів. Це залежить від того, з яких квіток взято пилко – з верхніх або нижніх, освітлених сонцем або тіньових. Навіть в одному і тому ж

пиляку пилкок може мати різні розміри, що залежить від локалізації зерна в пиляку. Все це пояснює відмінності в розмірах зерен одних і тих же видів, що приводяться різними авторами. Має значення і місце зростання рослини, і метод обробки пилку для дослідження [350]. Іншими словами, є багато факторів, вплив яких може відобразитися на морфометричних характеристиках ПЗ.

На наш погляд ці твердження актуальні для початку-середини XIX століття, коли техногенне навантаження на НПС тільки набувало масштабів і дослідженням морфології пилку займалися в основному палінологи, палеонтологи, геологи та ботаніки. В теперішніх екологічних умовах сучасні вчені спостерігають зовсім інший ефект щодо морфологічних ознак ПЗ. Згідно з дослідженнями G. Ostrolycká (1989), H. Behrendt *et al.* (2001), A. Majd *et al.* (2004), F. Rezanejad (2009) пилкок рослин дуже чутливий до впливу атмосферних поллютантів, таких як промислові та транспортні викиди [93, 217, 219, 386]. Н. А. Елькина (2008) зазначає, що найнижча якість пилку спостерігається в зразках з районів міста, в яких розташовані великі діючі промислові підприємства і/або проходять жваві автомобільні дороги та залізниця [387]. Були зафіксовані відкладення забруднюючих речовин на поверхні пилку, зміна форми ПЗ, утворення гігантських ПЗ і зерен із зміненим числом апертур, а також встановлено, що забруднення повітря викликало усушку, стоншення і крихкість пилку [93, 217, 219]. При атмосферному забрудненні ВМ, металеві частинки з повітря прикріплюються на рівні апертур і пор екзини і визначають зміни в морфологічній структурі пилку [237]. Можливий непрямий вплив забруднення повітря на зерна пилку через ґрунт. Ґрунти є учасником всіх процесів трансформації та міграції речовини, що протікають у біосфері і пов'язані з функціонуванням екосистем, і обміном речовин у живих організмах [290]. Якщо рослина росте в забрудненому ґрунті, її фізіологічні функції можуть змінитися і впливати на властивості зерен пилку, що розвиваються.

В цілому морфологічні характеристики визначені в межах значень для даного виду, приведених в міжнародних базах даних. Тому можна стверджувати, що метеорологічні та антропогенні фактори в даних місцях зростання не мали руйнівного впливу на морфологію ПЗ ББ у досліджувані роки. Хоча були виділені достовірні відмінності за морфометричними показниками для 4-ох із 5-ти вимірюваних ознак. Специфічні морфологічні особливості ПЗ ББ демонструють кут розташування апертур до контуру ПЗ, довжина ребра апопоріального поля та внутрішній діаметр пори. Все ж зразки українського та словацького пилку можна розрізнити, наприклад, вимірявши діаметр пори внутрішній та довжину ребра апопоріального поля.

Отже, вище було проаналізовано морфо-біологічні особливості зразків пилку ББ та їх БА в результаті комплексного впливу екологічних факторів місць зростання дерев в одному місті, в одній області, в одній країні та в сусідніх країнах. Для того, щоб впорядкувати зразки в порівняно однорідні групи за усіма отриманими результатами було проведено кластерний аналіз методом k-середніх. В результаті виділено 3 кластери. У перший кластер увійшли дані по пилку, зібраному в місцях BV1 і BV3; у другий кластер – BV2a, BV2b, BV4-BV6, а у третій кластер – BV7-BV9. Тобто, два перші кластери об'єднали зразки пилку з України, а третій – зі Словацької республіки. Дисперсійний аналіз показав за якими змінними утворені кластери різняться (табл. 4.13). Середньогрупові показники можна представити на графіку (рис. 4.9 та в табл. 4.14).

Таблиця 4.13

Змінні, за якими розрізняються кластери зразків пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

№п/п	Змінні	df	F	p
1	Водний екстракт	2	11,35	0,006353
2	Спиртовий екстракт	2	25,98	0,000577
3	Метаноловий екстракт	2	12,79	0,004598
4	Аскорбінова кислота	2	4,41	0,057502
5	Пентодецилова ЖК	2	4,85	0,047779
6	Лінолева ЖК	2	7,37	0,018924
7	Ліноленова ЖК	2	12,12	0,005328

Продовження табл. 4.13

8	$\Sigma$ НЖК	2	5,55	0,035963
9	$\Sigma$ ННЖК	2	4,86	0,047505
10	$\Sigma$ ПНЖК	2	8,40	0,013779
11	Екваторіальний діаметр	2	5,39	0,038245
12	Кут	2	9,77	0,009429
13	Діаметр пори внутрішній	2	11,68	0,005889
14	Ребро апопоріального поля	2	41,97	0,000127
15	Середньомісячна температура повітря	2	62,88	0,000034
16	Максимальна температура повітря за місяць	2	289,36	0,0000002
17	Мінімальна температура повітря за місяць	2	120,20	0,0000004
18	Середньомісячна відносна вологість повітря	2	6,25	0,027694

Таблиця 4.14

## Середні значення змінних для об'єднання в кластери

Змінні	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3
Водний екстракт, %	83,00	83,49	77,09
Спиртовий екстракт, %	62,43	73,62	95,16
Метаноловий екстракт, %	48,76	83,58	85,05
Аскорбінова кислота, г/см <sup>3</sup>	0,007	0,005	0,004
Пентодецилова ЖК, %	0,30	0,30	1,83
Лінолева ЖК, %	29,70	31,22	20,90
Ліноленова, ЖК %	1,30	1,06	0,53
$\Sigma$ НЖК, %	42,20	39,30	44,23
$\Sigma$ ННЖК, %	57,80	60,58	55,73
$\Sigma$ ПНЖК, %	31,30	32,58	21,90
Екваторіальний діаметр, мкм	23,25	23,29	24,45
Кут, deg	102,06	100,01	109,79
Діаметр пори внутрішній, мкм	3,34	3,15	2,79
Ребро апопоріального поля, мкм	26,44	26,31	21,46
Середньомісячна температура повітря, °С	9,48	8,97	11,05
Максимальна температура повітря за місяць, °С	20,32	20,03	16,14
Мінімальна температура повітря за місяць, °С	-1,13	-2,86	5,71
Середньомісячна відносна вологість повітря, %	70,98	74,35	69,87

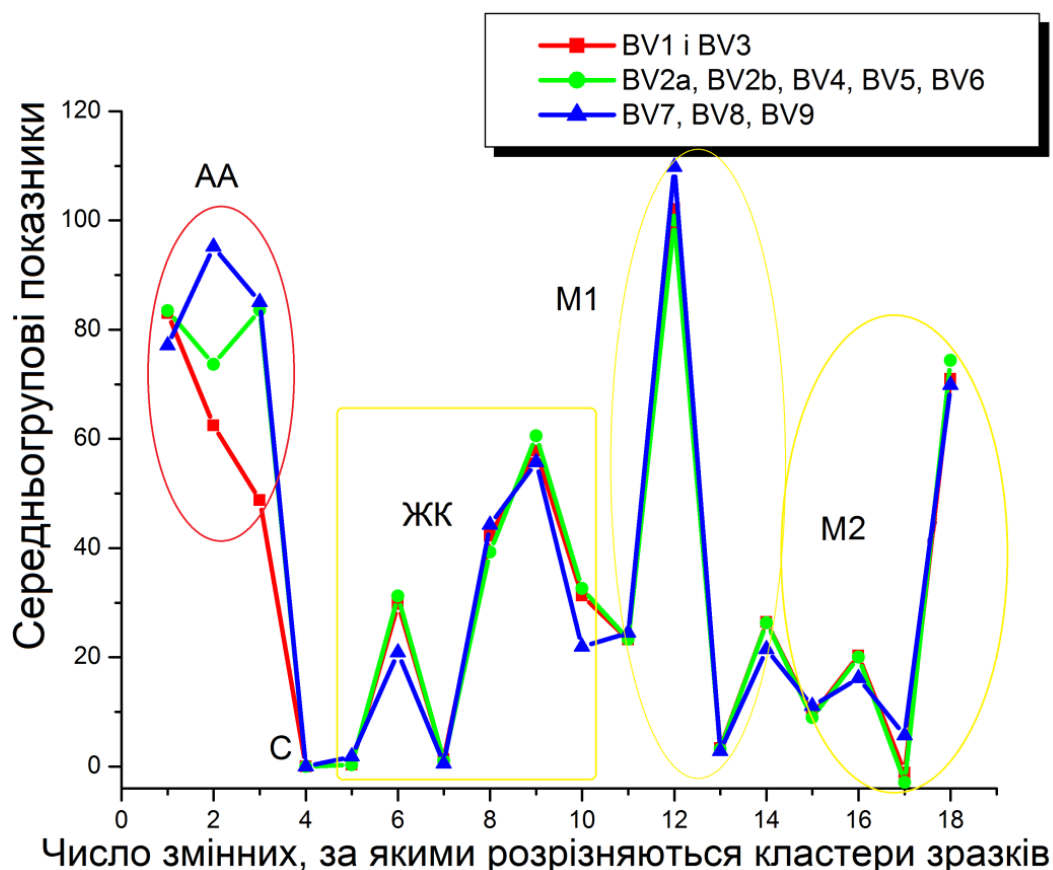


Рис. 4.9 Зразки пилку *Betula verrucosa* Ehrh., об'єднані в кластери за середніми значеннями з достовірними відмінностями: AA – антиоксидантна активність, С – аскорбінова кислота, ЖК – жирні кислоти, M1 – морфологічні характеристики, M2 – метеодини

Як видно з рис. 4.9 та табл. 4.14 БА, оцінена таким біологічним показником як антиоксидантна активність, є найбільш показовим параметром при порівнянні зразків пилку ББ, заготовлених в різних біогеоценозах. Враховуючи, вищесказане доцільно оцінити БА пилку ББ по відношенню до експресії гена *Bet v 1*. Оцінку проводили за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона між ЗАА водних і спиртових екстрактів та значеннями порогового циклу ампліфікації *Ct* (дод. Ж табл. 1). Найвищий показник позитивної кореляції – 0,71 був виявлений між *Ct* і ЗАА спиртового екстракту. Відношення між ЗАА водного екстракту і *Ct* був встановлений на рівні доказової позитивної кореляції зі значенням 0,58. При застосуванні множинного лінійного регресійного аналізу, в якому залежною змінною були значення *Ct*, а

незалежними – значення ЗАА водних та спиртових екстрактів, було отримано модель залежності, статистично достовірної ( $p=0,02$ ) лише для антиоксидантної активності спиртового екстракту. З урахуванням цих результатів безрезультатний фактор (водний екстракт) був видалений із моделі, а отримана лінійна модель між  $C_t$  і спиртовим екстрактом була підтверджена значимо високим коефіцієнтом регресії і статистично доказовою сталою регресії. Статистична достовірність моделі лінійної регресії була підтверджена дисперсійним аналізом.

На рис. 4.10 представлена модель лінійної регресії з довірчим інтервалом 95%.

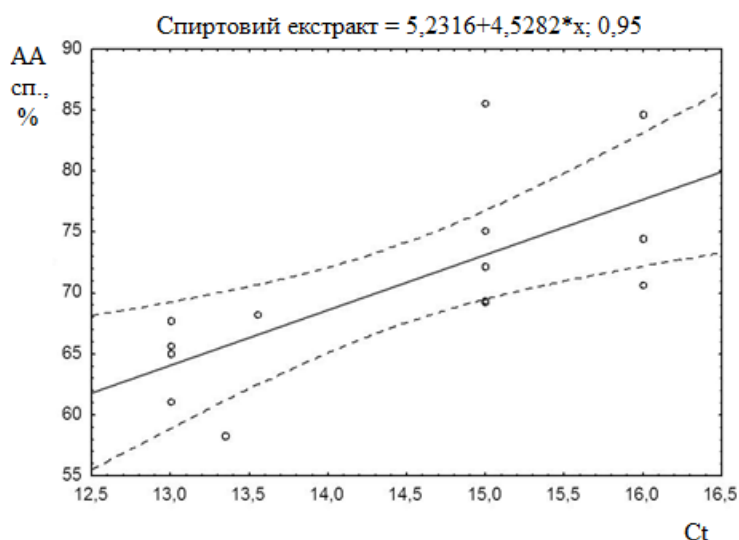


Рис. 4.10 Візуалізація залежності значень порогового циклу ампліфікації експресії гену Bet v 1 і загальною антиоксидантною активністю

Хоча водні екстракти пилку проявили вищу антиоксидантну активність, проте антиоксидантна активність спиртового екстракту корелює з експресією гену Bet v 1. Можна припустити, що це просто екстракція окремих компонентів Bet v 1 в спирт, що забезпечує достатню основу для кореляції з Bet v 1, отриманих від транскрибованої РНК його гену. Зважаючи на те, що алергени пилку за своєю природою є білками, Bet v 1 відноситься до групи білків PR10, які представляють собою клас розчинних кислих білків, то у водному середовищі різні частинки Bet v 1 з високою імовірністю залишаються у

компактному стані. Це, з однієї сторони, підвищує їх антиоксидантну активність, а з іншої, зумовлює алергенність, тоді як слизові оболонки дихальних шляхів людини, в першу чергу, є водним середовищем.

Заключним етапом дисертаційного дослідження був пошук оптимального місцезростання ББ. Вимогами для «ідеального» зразку пилку обрано меншу алергенність і більший адаптивний потенціал. Для його визначення необхідно проаналізувати середньогрупові показники для виділених типів зелених насаджень; паркові, лісові, придорожні та насадження спеціального призначення (біля аеродрому) за допомогою тесту відмінностей середніх значень (дод. 3 табл. 1).

По-перше, розглянемо ЗАА.

У зразків, зібраних в лісі, найвища ЗАА у водному екстракті, а в спиртовому і метаноловому розчинах – у зразках, зібраних біля дороги.

Вміст АК в більшій мірі спостерігається у зразків, зібраних у парку (0,57%) і лісі (0,55%), проте кількість флавоноїдів, які сприяють регенерації аскорбат аніон-радикала, а в подальшому і самої АК, набагато більша в зразках, зібраних біля аеродрому ( $3,15 \pm 0,03$ ).

По-друге, розглянемо вміст ЖК і білка як показників захисного механізму пилку.

Варто відзначити, що вміст ПНЖК переважає в зразках, зібраних у лісі (32,5%) і парку (30%), а більша кількість білка спостерігається в зразках, зібраних у парку (24,5%), а найменша – в придорожній зоні і біля аеродрому (по 21,8%).

По-третє, необхідно порівняти вміст алергену Bet v 1, а також ВМ, які сприяють розвитку алергічних реакцій.

Як було виявлено, найбільший коефіцієнт експресії Bet v 1 проявився в зразках, зібраних біля аеродрому (4,13), а найменший у зразків, зібраних у парку (0,74) і в лісі (1). Однак, при аналізі вмісту ВМ було виявлено, що в зразках, зібраних у лісі, і, прийнятих за контрольний зразок, кількість ВМ найвища (4,9), причому тільки вміст нікелю досягає рівня  $2,4 \pm 0,2$ . До того ж,



результати імунологічної активності показали, що у зразків пилку, зібраних в лісі (61,3%) даний показник перевищує нормальні значення (15%) в 4 рази. В той час, як показник НСТ-позитивних клітин у зразків, зібраних у парку (49,4%) та біля дороги (47,9%), перевищують нормальні значення в 3,2-3,3 рази.

По-четверте, необхідно торкнутися і ступеня забрудненості пилку мікроорганізмами.

В результаті дослідження було виявлено, що ентеробактеріями забруднені всі зразки однаково. Найменше забруднення цим видом бактерій виявлено в зразках пилку, зібраного в лісі ( $0,7 \pm 1,2$ ), але при цьому розкид значень, виходячи з показника стандартного відхилення, досить широкий, тобто вибірка по пилку з даного місця збору неоднорідна. Наступним за ступенем однорідності є зразок пилку, зібраний біля дороги ( $3,0 \pm 2$ ). Незважаючи на велику однорідність за ступенем забруднення ентеробактеріями, показник забрудненості вже в 3,4 рази вище, ніж в лісових зразках ( $p < 0,0001$ ). Далі за ступенем однорідності забруднення йде зразок пилку, зібраний в парку ( $3,1 \pm 1,7$ ). Забрудненість ентеробактеріями в даному зразку перевищує цей же показник у пилку, зібраного біля дороги ( $p < 0,0001$ ), але при цьому однорідність у виявлених значень досить висока. Що стосується зразків, зібраних біля аеродрому ( $4,2 \pm 0,1$ ), то в них спостерігається найвищий ступінь забруднення ентеробактеріями ( $p < 0,0001$ ). Забрудненість ентеробактеріями у даного зразка вже в 6 разів перевищує вміст в зразках, зібраних у лісі.

Необхідно зауважити, що чим більш забруднений пилочок, тим більша однорідність значень, а це значить, що в даних місцях зростання такий же рівень забруднення має практично весь пилочок. У тих же місцях, де спостерігається менша забрудненість, однорідність значень забруднення менша, а це означає, що в таких місцях можуть бути присутні зразки як взагалі не забруднені даним видом мікроорганізмів, так і забруднені незначно.

Що стосується а(на)еробів, то забруднення даним видом мікроорганізмів більшою мірою ( $p < 0,0001$ ) спостерігається в пилку, зібраному також в районі

аеродрому ( $4,9 \pm 0,2$ ). Потім меншим за ступенем забрудненості йдуть зразки, зібрані в лісі ( $4,7 \pm 0,3$ ), у парку ( $3,9 \pm 1$ ), при дорозі ( $3,7 \pm 1,7$ ).

Забрудненість мікроскопічними грибами переважно ( $p < 0,0001$ ) спостерігається в пилку, зібраному в лісі ( $4,1 \pm 0,1$ ). Далі з меншим коефіцієнтом забрудненості йдуть зразки, зібрані в районі аеродрому ( $3,4 \pm 0,2$ ), при дорозі ( $3,4 \pm 0,5$ ), у парку ( $3,2 \pm 0,8$ ).

При аналізі а(на)еробних бактерій і мікроскопічних грибів простежується та ж тенденція до більшого розкиду значень при меншому коефіцієнті забруднення.

Якщо розглядати загальний коефіцієнт забруднення мікроорганізмами, то найбільш забрудненими ( $p < 0,0001$ ) є зразки пилку, зібрані в районі аеродрому ( $4,1 \pm 0,1$ ), найменш забрудненими ( $p < 0,0001$ ) – в лісі ( $3,2 \pm 0,3$ ).

Також необхідно розглянути і АМА пилку (табл. 4.15).

Таблиця 4.15

Наявність здатності затримувати ріст мікроорганізмів (антимікробна активність) екстрактами пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Мікроорганізми	Парк	Біля дороги	Ліс	Біля аеродрому
<i>Ralstonia solanacearum</i>	є	частково	є	немає
<i>E. coli</i> М-17	немає	немає	немає	немає
<i>Pseudomonas syringae</i>	є	частково	є	немає
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	немає	немає	немає	немає
<i>Clostridium perfringens</i>	немає	немає	немає	немає
<i>Bacillus cereus</i>	немає	немає	немає	немає
<i>Paenobacillus larvae</i>	немає	частково	немає	немає
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	немає	немає	немає	немає
<i>Penicillium expansum</i>	немає	немає	немає	немає
<i>Botrytis cinerea</i>	немає	немає	є	немає
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	немає	немає	немає	немає

Виявлено, що пилок, зібраний в районі аеродрому не має АМА проти усіх досліджуваних мікроорганізмів. Пилок, зібраний у лісі, має кращу АМА. Він здатен затримувати ріст таких мікроорганізмів як *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* і *Botrytis cinerea*. Пилок, зібраний в парку, володіє АМА проти таких мікроорганізмів як *Ralstonia solanacearum* і *Pseudomonas syringae*.

А пилок, зібраний в придорожніх насадженнях, має часткову АМА за рахунок більшого внеску пилку, зібраного при дорозі, але поблизу АЕС, який володіє АМА не тільки для *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Paenobacillus larvae*, але і для *Botrytis cinerea*.

Було зроблено висновок, що пилок ББ, зібраний в районі аеродрому, тобто такий, що зазнав впливу місцевого техногенного екофактору, виглядає більш здатним викликати алергію (високий рівень експресії Bet v 1; високий вміст хрому, свинцю, нікелю). Також він більшою мірою забруднений мікроорганізмами і не проявляє АМА. Необхідно відзначити, що в даних зразках пилку було виявлено найбільший вміст флавоноїдів, однак, ймовірно це пов'язано з підвищеною забрудненістю мікроорганізмами, так як флавоноїди оберігають основні рослинні полімери від біодеградації бактеріальними і грибовими ферментами, що, в свою чергу, перешкоджає поширенню інфекції по рослинному організму [388]. При цьому, флавоноїди є біологічно активними непоживними компонентами [389].

Взятий як контрольний зразок пилок, зібраний у лісі, незважаючи на досить високий адаптивний потенціал (високий вміст ПНЖК, білка, АК), більш низький коефіцієнт експресії Bet v 1, мав високе забруднення мікроорганізмами, а найголовніше, – високий вміст ВМ, особливо – кадмію, нікелю і селену. До того ж, більш високі показники результатів НСТ-тесту вказують на те, що даний пилок здатен викликати алергічну реакцію. Однак на наш погляд, прояв алергічних реакцій в даному випадку більше пов'язаний не стільки з алергеном пилку берези Bet v 1, скільки з досить високим вмістом ВМ та мікроорганізмів, і досить низьким вмістом флавоноїдів. Адже алергічні імунні реакції запускаються не лише самим алергеном, а й кофакторами, звільненими від носія алергену або ж експонованими разом з ним. Плісняві гриби та ендотоксини на поверхні ПЗ сприяють сенсibilізації до пилових алергенів або ж посилюють алергічні реакції у вже сенсibilізованих осіб. Крім того, бактеріальне забруднення алергенних екстрактів для алерген-специфічної імунотерапії є небажаним [194], а ПЗ з адсорбованими іонами металів

сприятимуть поширенню супутніх техногенних забруднень і появі нетипових АЗ [214].

Таким чином, виходячи з отриманих результатів, найбільш збалансованим виглядає зразок пилку ББ, зібраний з дерев, що зростають в паркових насадженнях. В даних зразках міститься достатня кількість захисних компонентів (ПНЖК, білка, АК), спостерігається середній рівень вмісту флавоноїдів в поєднанні з низьким вмістом ВМ і мікроорганізмів та виявлена АМА.

Якщо порівнювати Україну та Словаччину, то словацький пилок, незважаючи на те, що має менший адаптивний потенціал, є й менш алергенним, тому що характеризується меншим вмістом ВМ (особливо, нікелю), а рівень експресії алергенного білка нижчий через відсутність прямого впливу техногенного фактору. Досліджуваний словацький регіон характеризується більш сприятливими екологічними умовами. Фактором розвитку алергенного потенціалу словацького пилку є його високе забруднення ентеробактеріями, аеробними бактеріями та мікроскопічними грибами.

Комбіновані результати дисертаційного дослідження представлено у наступних друкованих працях (у хронологічному порядку):

1. Шевцова Т. В. Пилок берези як об'єкт алергологічних, імунологічних та екологічних досліджень / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава // Імунологія та алергологія: наука і практика : XIII Укр. наук.-практ. конф. з акт. пит. клін. та лабор. імун., алерг. і імунореабіл., 26-27 квітня 2012 р. : тези доп. – К., 2012. – С. 64-65.

2. Morphological characteristics and antioxidant activity of pollen silver birch (*Betula verrucosa* Ehrh.) / T. Shevtsova, K. Garkava, J. Brindza, R. Ostrovsky // The 3rd International Symposium on Medicinal Plants, Their Cultivation and Aspects of Uses, 21-23 November 2012 : Abstracts. – Petra, Jordan, 2012. – P. 44.

3. Шевцова Т. В. Пилок берези бородавчастої – надійний інструмент біомоніторингу / Т. В. Шевцова, К. Г. Гаркава, Я. Бриндза // Новітні досягнення

біотехнології : міжнар. наук.-практ. конф., 24-25 жовтня 2013 р. : тези доп. – К., 2013. – С. 153-154.

4. Шевцова Т. В. Пилок берези бородавчастої як об'єкт біотехнологій. Аналіз досліджень / Т. В. Шевцова // Політ. Сучасні проблеми науки : XIV міжнар. наук.-практ. конф. мол. уч. і студ., 2-3 квітня 2014 р. : тези доп. – К., 2014. – С. 18.

5. Morphological characteristics and antioxidant activity of pollen silver birch (*Betula pendula* Ehrh.) / T. Shevtsova, K. Garkava, J. Brindza, R. Ostrovsky // Pharmacognosy Communications. – 2014. – №4(1). – P. 25-34.

6. Antioxidačná aktivita peľu briez vo vzťahu k expresii Bet v 1 alergénu / J. Žiarovská, T. Shevtsova, J. Gažo, J. Brindza, K. Garkava, M. Bežo // Chemické listy. – 2014. – №108. – P. 1080-1083.

7. Шевцова Т. В. Береза бородавчатая – дерево противоречий / Т. В. Шевцова, Е. Г. Гаркавая // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ. – М. : ФГБНУ ВСТИСП, 2014. – Т. XXXX, Ч. 1. – С. 361-364.

## Висновки

В дисертаційній роботі на прикладі анемофільного пилку ББ, заготовленого ручним способом до початку цвітіння, було проаналізовано морфо-біологічні особливості та БА ПЗ з урахуванням комплексного впливу екологічних факторів у місцях зростання дерев в Україні та в сусідній країні.

1. Встановлено, що рівень експресії гену *Bet v 1* в пилку ББ з України та зі Словацької республіки відрізняється в міських та маргінальних умовах зростання беріз у обох країнах. Підсилення експресії *Bet v 1* в пилку ББ відбувається біля атомної електростанції та аеродрому. На кількість флавоноїдів і ВМ вплинула середньомісячна відносна вологість повітря у рік закладання чоловічих генеративних органів та цвітіння ББ.

2. Показано, що пилок ББ забруднений рядом ВМ, а саме: Cd, Pb, Hg, Cr, As, Ni, Se, Co, при цьому найбільше – нікелем, найменше – ртуттю з перевищенням норм за вмістом кадмію, хрому, незначно – за вмістом свинцю, та змішаною мікробіотою з перевищенням норм за вмістом ентеробактерій, кількістю аеробних та анаеробних бактерій. При збільшенні викидів забруднюючих речовин від стаціонарних та пересувних джерел і збільшенні їх щільності на 1 км<sup>2</sup> площі вміст нікелю і суми ВМ зростає. За вмістом таких мікотоксинів як сума афлатоксинів B1, B2, G1, G2, фумонізиніна B1 та B2, деоксиніваленола, зеараленона, Т-2 токсину, охратоксина А – норма не перевищена, а їх вміст не залежить від місця зростання.

3. Вміст білка варіює в пилку ББ в межах 17,85-25,62 %, ЖК ліпідів – насичених –  $41,4 \pm 2,9$  %, ненасичених –  $58,6 \pm 3,0$  %, поліненасичених –  $29,1 \pm 6,0$  %, АК –  $2,44 \cdot 10^{-3} - 7,62 \cdot 10^{-3}$  г/см<sup>3</sup>, флавоноїдних сполук – 0,86-3,15 %. Виявлено достовірні відмінності у вмісті хімічних сполук залежно від місця зростання з переважанням білків, АК, ненасичених і поліненасичених ЖК ліпідів в пилку з України, а насичених ЖК ліпідів в пилку зі Словаччини. За середнім вмістом флавоноїдів між країнами достовірних відмінностей немає.

4. Найбільш чутливими до впливу зовнішніх факторів морфологічними ознаками ПЗ є кут розташування апертур до контуру ПЗ, довжина ребра апопоріального поля та внутрішній діаметр апертури, за якими розрізняється пилок ББ з України та Словацької республіки, що може бути корисним при аеропалінологічних дослідженнях. При збільшенні викидів забруднюючих речовин від стаціонарних та пересувних джерел і збільшенні їх щільності на 1 км<sup>2</sup> площі кут розташування апертури до контуру ПЗ зменшується, а полярна вісь має тенденцію до зменшення.

5. БА пилку ББ в умовах *in vitro* виражена високою антиоксидантною активністю водних (74,8-85,5 %), метанолових (46,1-92,6 %) і етанолових (60,3-95,4 %) екстрактів, слабкою АМА водних та водно-сольових екстрактів лише зразків з України при дії фітопатогенного гриба *Botrytis cinerea*, патогена для комах *Paenobacillus larvae*, фітопатогенних бактерій *Ralstonia solanacearum* і *Pseudomonas syringae* та збільшенням кількості і активацією клітин імунної системи, пероксидазних систем, кисеньгенеруючої активності при дії водно-сольових екстрактів березового пилку.

6. Різносторонній аналіз ПЗ ББ дозволяє більш повно оцінити вплив умов мікроекосистем у кожному конкретному випадку зростання популяцій беріз. Залежно від країни походження пилок ББ відрізняється за досліджуваними характеристиками та властивостями, що показано на прикладі України та Словацької республіки. Він також різниться в межах однієї країни, однієї області та, навіть, у межах одного міста (м. Нітра). Найкраще анемофільний пилок ББ пристосувався до умов сучасного міського парку. У такому пилку достатня кількість захисних компонентів, середній рівень вмісту флавоноїдів в поєднанні з низьким вмістом ВМ і мікроорганізмів, висока БА *in vitro*.

## Практичні рекомендації

На основі висновків проведених досліджень розроблено рекомендаційні поради стосовно доцільності посадки ББ в сучасному місті, заготовки пилкової сировини – масової для промислового використання та для використання в лабораторних умовах не сенсифікованими особами.

Повністю позбутися виду не вдасться (якщо знищувати берези або не допускати посадки нових, то ББ, будучи місцевим видом, все одно з'являтиметься, як і інші види родини *Betulaceae*). До того ж ББ – однодомне дерево, висаджувати лише жіночі особини неможливо. Можливо зменшити алергенний потенціал пилку за рахунок зниження рівнів забруднення навколишнього природного середовища. В результаті проведених досліджень вдалося виявити цікаву тенденцію щодо зменшення алергенного потенціалу пилку, отриманого із беріз, що зростають у досліджуваних паркових зонах порівняно з лісовою місцевістю. Припускаємо, що такий результат зумовлений активацією захисних механізмів пилкової клітини в умовах сучасних міст. Як відомо, набута стійка ознака передається наступним поколінням. Це означає, що ББ з цінними властивостями та економічним потенціалом не лише можливо, а й необхідно висаджувати, у парках м. Київ зокрема. А першим кроком в цій благородній справі є культивування беріз з низьким рівнем алергенності. Це можливо лише при згуртованій роботі ботаніків, селекціонерів, імунологів, алергологів, екологів та органів влади.

Рекомендації по заготовці анемофільного пилку підготовлені у зв'язку з обмеженою інформацією стосовно цього процесу в доступних джерелах. Вони детально розроблені для пилку бджолиного, а стосовно анемофільного пилку методики збору пилкової сировини часто упускаються в наукових публікаціях. Заготовляти пилок ББ необхідно після подовження, пожовтіння та набухання чоловічих сережок, коли на руках не залишається або залишається ледь помітна кількість пилку, якщо доторкнутися до сережок. Найбільш щадним способом заготовки пилку для дерева є зривання лише сережок, а не гілок. Зрізання гілок



із сережками може бути виправданим при створенні конкретних умов досягання пилку. Заготовляти сережки можна як руками, так і пінцетом або ножицями. Якщо на руках є відкриті рани (порізи, екзема), краще здійснювати процес заготовки пилку в рукавицях. В сережках міститься рясна кількість ПЗ і одного дерева може бути достатньо залежно від мети заготовки. В якості ємності найкраще застосовувати цупкі паперові конверти. В них зручно залишити пилок для досягання і виходу ПЗ, попередньо рівномірно розклавши сережки в конверті. При правильному виборі часу заготовки пилку достатньо однієї доби для висипання пилку із пиляків. Збирати пилок найкраще в скляну ємність з не дуже вузьким горлом. Його можна зсипати із сторін конверта і додатково струсити з кожної сережки або просіяти через сито з отворами пор не більше 40 мкм.

При виборі ББ для використання пилку з метою виробництва діагностичних та лікувальних алергенів, краще підібрати популяцію беріз біля промислового об'єкту, траси з високою інтенсивністю руху транспорту, можливо, розташованої і поблизу лісу.

### Список використаних джерел

1. Mothes N. Biology of tree pollen allergens / N. Mothes, R. Valenta // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2004. – № 4. – P. 384–390.
2. Taylor P. E. Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens / P. E. Taylor, R. C. Flagan, A. G. Miguel [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. – 2004. – № 34. – P. 1591–159.
3. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe / G. D'Amato, L. Cecchi, S. Bonini [et al.] // *Allergy*. – 2007. – № 62. – P. 976–990.
4. Allergenic pollen plants and their influential factors in urban areas / X. Jianan, O. Zhiyun, Z. Hua [et al.] // *Acta Ecologica Sinica*. – 2007. – Vol. 27, № 9. – P. 3820–3827.
5. Cariñanos P. Urban green zones and related pollen allergy: A review. Some guidelines for designing spaces with low allergy impact / P. Cariñanos, M. Casares-Porcel // *Landscape and Urban Planning*. – 2011. – № 101. – P. 205–214.
6. Sources, impact and exchange of early-spring birch pollen in the Moscow region and Finland / P. Siljamo, M. Sofiev, E. Severova [et al.] // *Aerobiologia*. – 2008. – № 24. – P. 211–230.
7. Analysis of Airborne *Betula* Pollen in Finland; a 31-Year Perspective / E. Yli-Panula, D. B. Fekedulegn, B. J. Green [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2009. – № 6. – P. 1706–1723.
8. Exposure of *Betula pendula* Roth. pollen to atmospheric pollutants CO, O<sub>3</sub> and SO<sub>2</sub> / L. G. Cuinica, I. Abreu, C. R. Gomes, J. C. G. Esteves da Silva // *Grana*. – 2013. – № 52 (4). – P. 299–304.
9. Effects of atmospheric pollutants (CO, O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>) on the allergenicity of *Betula pendula*, *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* pollen / L. G. Cuinica, A. Cruzc, I. Abreub, J. C. G. Esteves da Silva // *International Journal of Environmental Health Research*. – 2014. – № 24. – P. 1–10.

10. Puc M. Artificial neural network model of the relationship between *Betula* pollen and meteorological factors in Szczecin (Poland) / M. Puc // Int. J. Biometeorol. – 2012. – № 56. – P. 395–401.
11. Питання поширеності та економічної ефективності лікування алергійних захворювань органів дихання в Україні / Б. М. Пухлик, Є. М. Дитятківська, І. В. Гогунська [та ін.] // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2012. – № 2. – С. 5–7.
12. Родінкова В. В. Наукове обґрунтування системи моніторингу та профілактики впливу алергенних чинників біологічного походження на стан здоров'я міського населення України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 14.02.01 «Гігієна та професійна патологія» / В. В. Родінкова. – Київ, 2015. – 40 с.
13. Вітик Л. Д. Підвищення ефективності специфічної алерговакцинації у хворих на поліноз шляхом корекції імунологічної реактивності : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 14.03.08 «Імунологія та алергологія» / Л. Д. Вітик. – Київ, 2008. – 20 с.
14. Родінкова В. В. Характер пилкування дерев у Вінниці: тенденції 1999-2000 та 2009-2010 років як маркери кліматичних змін, що мають вплив на здоров'я населення / В. В. Родінкова, Л. В. Кременська // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2011. – № 16. – С. 59–64.
15. Родінкова В. В. Особливості розповсюдження пилку аероалергенної флори у повітрі м. Полтави / В. В. Родінкова // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 4, Т. 2. – С. 49–55.
16. *Betula pendula* [Electronic resource] / Polleninfo Database. – Access : <http://www.polleninfo.org>.
17. Федосеева В. Н. Аллергены окружающей среды / В. Н. Федосеева // Врач. – 1998. – № 6. – С. 6–8.
18. Усовик О. В. Критерии стандартизации индивидуальных аллергенов пыльцы деревьев при создании микст-аллергена / О. В. Усовик // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2007. – № 1. – С. 34–41.

19. Алешина Р. М. Пыльцевая аллергия: клинико-аллергологическая диагностика и специфическая иммунотерапия / Р. М. Алешина // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2006. – № 2 (03). – С. 4–9.
20. Алергологія і алергени – проблема сьогодення / Д. І. Заболотний, Б. М. Пухлик, І. В. Гогунська, Л. В. Забродська // Здоровье Украины. – 2004. – № 106.
21. Хмелевская И. А. Эколого-физиологические исследования древесных пород в г. Пскове / И. А. Хмелевская // Вестник Псковского государственного университета. Серия: естественные и физико-математические науки. – 2008. – № 6. – С. 37–57.
22. Солнцева М. Влияние промышленного и транспортного загрязнения среды на репродукцию семенных растений / М. Солнцева, К. Глазунова // Журнал общей биологии. – 2010. – Т. 71, № 2. – С. 163–175.
23. Бессонова В. Н. Состояние пыльцы как показатель загрязнения среды тяжелыми металлами / В. Н. Бессонова // Экология. – 1992. – № 3. – С. 45–50.
24. Кобзарь В. Н. Изменчивость пыльцы и спектр аэроаллергенов в условиях экологического дисбаланса Кыргызской Республики : автореф. дисс. на соискание науч. степени д-ра биол. наук : спец. 14.00.36 «Аллергология и иммунология» / В. Н. Кобзарь. – Алматы, 1996. – 34 с.
25. Helander M. L. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens / M. L. Helander, J. Savolainen, J. Ahlholm // Allergy. – 1997. – № 52. – P. 1207–1214.
26. Крат И. В. Влияние состояния окружающей среды на качество лекарственного сырья и распространенность сезонного аллергического ринита : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.16 «Экология» / И. В. Крат. – Томск, 2003. – 25 с.
27. Дзюба О. Ф. Изучение пыльцы из поверхностных проб для оценки качества окружающей среды / О. Ф. Дзюба // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2006. – № 1. – С. 1–18.

28. Aeropalynological aspects in the detection of the quality of air in Bratislava / J. Dušička, K. Mičieta, E. Brutovská [et al.] // *Ekológia (Bratislava)*. – 2013. – № 32 (1). – P. 39–53.
29. Родінкова В. Закономірності пилювання видів роду *Betula* у містах лісостепової та степової зон України / В. Родінкова // *Studia Biologica*. – 2013. – № 7 (2). – С. 91–100.
30. Hynynen J. Silviculture of Birch (*Betula pendula* Roth. and *Betula pubescens* Ehrh.) in Northern Europe / J. Hynynen, P. Niemistö, A. Viherä-Aarnio [et al.] // *Forestry*. – 2010. – Vol. 83, № 1. – P. 103–119.
31. *Betula pendula* Roth. [Electronic resource] / Plants For A Future. – Access : <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Betula+pendula>
32. *Betula pendula* Roth; *Betula pubescens* Ehrh., folium. Assessment report for the development of community monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof in the list. – London : EMEA, 2008. – 20 p.
33. Handbook of medicinal herbs / [Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., duCellier J., Duke P.-A. K.]. – [2nd ed.]. – USA, 2002. – 893 p.
34. Piotrowska K. Pollen production in selected species of anemophilous plants / K. Piotrowska // *Acta Agrobotanica*. – 2008. – № 61 (1). – P. 41–52.
35. Spellerberg I. F. Silver Birch (*Betula pendula*) Pollen and Human Health: Problems for an Exotic Tree in New Zealand / I. F. Spellerberg, N. E. Eriksson, V. St. A. Crump // *Arboriculture & Urban Forestry*. – 2006. – № 32(4). – P. 133–137.
36. Вивчення антимікробної та протигрибкової активності рідких екстрактів бруньок і листя берези бородавчастої та лосьйонів на їх основі / О. В. Рехлецька, Т. Г. Калинюк, С. В. Вольбін, І. М. Кушнір // *Клінічна фармація*. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 48–50.
37. Петров В. В. Мир лесных растений / Петров В. В. – М. : Наука, 1978. – 168 с.

38. Жалпанова Л. Ж. Береза. Рецепты лекарственных средств / Л. Ж. Жалпанова. – М. : РИПОЛ классик, 2007. – 64 с.
39. Оценка относительного жизненного состояния и стабильности развития березы повислой (*Betula pendula* Roth.) города Салават / Л. С. Аралбаева, Р. В. Уразгильдин, А. Ю. Кулагин // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С. 39–42.
40. Шиманюк А. П. Лесная энциклопедия / А. П. Шиманюк. – М. : Лесная промышленность, 1974 – 264 с.
41. Airborne birch and oak pollen grains and birch pollen allergens at a common sampling station in Stockholm / L. Holmquist, A. Ekebon, K. A. Kübler, O. Vesterberg // Grana. – 2005. – № 44. – P. 104–107.
42. Constible J. Case Teaching Notes for «АН-CHOO! A Case Study on Climate Change and Allergies» / J. Constible, L. Sandro, R. E. Lee // National Center for Case Study Teaching in Science. – 2009. – 4 p.
43. Masting by *Betula*-species; applying the resource budget model to north European data sets / H. Ranta, A. Oksanen, T. Hokkanen [et al.] // Int. J. Biometeorol. – 2005. – № 49. – P. 146–151.
44. NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species / X.-L. Wang, T. Takai, S. Kamijo [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2009. – № 387. – P. 430–434.
45. Vinckier S. The manifold characters of orbicules: structural diversity, systematic significance, and vectors for allergens / S. Vinckier, P. Cadot, E. Smets // Grana. – 2005. – № 44. – P. 300–307.
46. World Allergy Organization (WAO) White Book on Allergy / [R. Pawankar, G. W. Canonica, S. T. Holgate et al.]. – United Kingdom : WAO, 2011. – 238 p.
47. Ziska L. H. Rising CO<sub>2</sub>, Climate Change, and Public Health: Exploring the Links to Plant Biology / L. H. Ziska, P. R. Epstein, W. H. Schlesinger // Environ. Health Perspect. – 2009. – № 117 (2). – P. 155–158.

48. Анализ уровня сенсибилизации к пыльцевым аллергенам у детей: значение растения солидаго в развитии поллиноза у детей / В. М. Бержец, О. В. Пронькина, С. В. Хлгатын, А. И. Бержец // Педиатрия. – 2007. – Т. 86, № 4. – С. 67–69.
49. Микромицеты ассоциированы с пылью березы повислой (*Betula pendula* Roth.) / А. Б. Антропова, Е. Н. Биланенко, В. Л. Мокеева [и др.] // Современная микология в России : II съезд микологов в России : тезисы докл. – М., 2008. – С. 216.
50. Северова Е. Э. Сезон пыления 2009: итоги мониторинга в Москве / Е. Э. Северова [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.pollen.ru/monitoring/results.aspx>.
51. Сигаєва І. А. Особливості перебігу полінозу в Києві / І. А. Сигаєва // Імунологія та алергологія: наука і практика. – 2011. – № 2. – С. 116–118.
52. Частная алергология. Т. 2. Под ред. Г. Б. Федосеева. – СПб : Нормед-Издат, 2001. – 464 с.
53. Шамгунова Б. А. Аэропалинологические аспекты поллинозов / Б. А. Шамгунова, Л. В. Заклякова // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 27–35.
54. Воробець Н. М. Напрямки та перспективи аеропалінологічного моніторингу в Україні [Електронний ресурс] / Н. М. Воробець, Н. О. Калинович // Український медичний часопис online. – 2012. – № 4 (90) – VII/VIII. – Режим доступу до журн. : <http://www.umj.com.ua/article/5637/napryamki-ta-perspektivi-aeropalinologichnogo-monitoringu-v-ukraini>.
55. Airborne pollen in Kiev (Ukraine): gravimetric sampling / V. D. Savitsky, L. G. Bezus'ko, N.G. Butich [et al.] // Aerobiologia. – 1996. – № 12 (1). – P. 209–211.
56. Родінкова В. В. Етапи розробки системи алергопрогнозування в контексті профілактики алергійних захворювань дихальних шляхів в Україні / В. В. Родінкова // Клиническая иммунология. Алергология. Инфектология. – 2012. – № 1-2. – С. 18–20.

57. Изучение особенностей палинации растений в г. Одессе / С. М. Пухлик, И. В. Дедикова, Н. Ш. Али Аль-Хабиб, В. В. Родинкова // Здоров'я України. – Квітень 2013. – С. 56–57.
58. Характеристика пилкової сенсibiliзації у дітей Харківського регіону / В. А. Клименко, А. В. Серветник, Л. М. Адарюкова // Астма та алергія. – 2012. – № 2. – С. 14–16.
59. Аеробіологічний спектр та структура гіперчутливості у дітей з сезонною алергією / С. М. Недельська, О. Д. Кузнєцова, Т. Г. Бессікало [та ін.] // Астма та алергія. – 2009. – № 1-2. – С.132–133.
60. Шумна Т. Є. Оцінка сенсibiliзації дитячого організму до алергенів у мешканців промислового регіону / Т. Є. Шумна // Астма та алергія. – 2012. – № 1. – С. 34–42.
61. Madeja J. Quantification of airborne birch (*Betula* sp.) pollen grains and allergens in Krakow / J. Madeja, E. Wypasek, B. Plytycz // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2005. – № 53. – P. 169–174.
62. Калинина Н. М. Современные технологии *in vitro* аллергодиагностики [Электронный ресурс] / Н. М.Калинина, Л. Б. Дрыгина. Н. А. Алхутова //Лабораторная диагностика *in vitro*. – 2004. – Режим доступа : [http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/allergy\\_allergen.shtml](http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/allergy_allergen.shtml).
63. Непомнящих В. М. Скоро в воздухе закружит пыльца березы / В. М. Непомнящих [Электронный ресурс] // Новости в Новосибирске. – 2003. – Режим доступа : <http://www.nnews.ru/2003/5/19/health/991.php3>.
64. Патури Ф. Р. Растения – гениальные инженеры природы / Ф. Р. Патури; Пер. с нем. Ю. И. Куналева. – 2-е изд. – М. : Прогресс, 1982. – 271 с.
65. D'Amato G. Pollen allergy in Europe / Gennaro D'Amato. – Naples, Italy : The UCB Institute of Allergy, 2007. – 12 p.
66. Emberlin J. The 2012 Birch Pollen Season [Electronic resource] / J. Emberlin // Opticrom. – 2012. – Access : <http://www.opticrom.co.uk/sites/all/themes/opticrom/misc/Opticrom%202012%20Birch%20Pollen%202012.pdf>.



67. Impact of urbanization on the proteome of birch pollen and its chemotactic activity on human granulocytes / M. Bryce, O. Drews, M. F. Schenk [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2010. – Vol. 151, № 1. – P. 46–55.
68. Proteomic profiling of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts from different origins / A. Erler, T. Hawranek, L. Krückemeier [et al.] // Proteomics. – 2011. – № 11. – P. 1486–1498.
69. Фрадкин В. Правильная береза – спасение от аллергии: открытие мюнхенских ученых [Электронный ресурс] / В. Фрадкин, Д. Брянцева. – 2010. – Режим доступа : <http://dw.de/p/OXb2>.
70. Стойко С. М. Україна стоїть на порозі екологічної катастрофи / С. М. Стойко, І. Б. Койнова [Електронний ресурс] // Вголос. – 2012. – Режим доступу : [http://vgolos.com.ua/articles/ukraina\\_stoit\\_na\\_porozi\\_ekologichnoi\\_katastrofy\\_108717.html](http://vgolos.com.ua/articles/ukraina_stoit_na_porozi_ekologichnoi_katastrofy_108717.html).
71. Allergy Diagnostic Testing: An Updated Practice Parameter / I. L. Bernstein, J. T. Li, D. I. Bernstein [et al.] // Annals of Allergy, Asthma, & Immunology. – 2008. – № 100 (3, 3) . – 149 p.
72. *Betula pendula* [Electronic resource] // Memidex Database . – Access : <http://www.memidex.com/betula-pendula>.
73. *Betula pendula* Roth. [Electronic resource] / Plants Database . – Access : <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>.
74. *Betula pendula* Roth. [Electronic resource] // ITIS Database . – Access : [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=19495](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19495).
75. Береза [Электронный ресурс] // Википедия. – Режим доступа : [https://ru.wikipedia.org/wiki/Берёза#cite\\_note-Kew-2](https://ru.wikipedia.org/wiki/Берёза#cite_note-Kew-2).
76. Franiel I. Leaf features of silver birch (*Betula pendula* Roth). Variability within and between two populations (uncontaminated vs Pb-contaminated and Zn-contaminated site) / I. Franiel, K. Więski // Trees. – 2005. – № 19. – P. 81–88.
77. Куцик Р. В. Береза бородавчатая (Береза повислая) / Р. В. Куцик, Б. М. Зузук // Аналитический обзор. Провизор. – 2001. – № 10. – С. 21–25.

78. Pasonen H-L. Effects of temperature and pollination site on pollen performance in *Betula pendula* Roth – evidence for genotype-environment interactions / H-L. Pasonen, M. Kärpylä, P. Pulkkinen // Theor. Appl. Genet. – 2000. – № 100. – P. 1108–1112.
79. Жизнь растений. В 6-ти томах / [под ред. А. Л. Тахтаджяна, гл. ред. А. А. Федоров]. – М. : Просвещение, 1974.
80. Жизнь растений. Том 6. Цветковые растения / [под. ред. А. Л. Тахтаджяна]. – М. : Просвещение, 1982. – 543 с.
81. Бухарина И. Л. Биоэкологические особенности травянистых и древесных растений в городских насаждениях / И. Л. Бухарина, А. А. Двоеглазова. – Ижевск : Изд-во «Удмуртский университет», 2010. – 184 с.
82. Иванов И. Электронная энциклопедия декоративных садовых растений / И. Иванов. – Издательство ЗМ, 2004. – 1000 с.
83. Коропачинский И. Ю. Древесные растения Азиатской России / И. Ю. Коропачинский, Т. Н. Встовская. – Новосибирск : Изд-во СО РАН, филиал «Гео», 2002. – 707 с.
84. Atkinson M. D. *Betula pendula* Roth. (*B. verrucosa* Ehrh.) and *B. pubescens* Ehrh. / M. D. Atkinson // Journal of Ecology. – 1992. – № 80 (4). – P. 837–870.
85. *Betula pendula* (silver birch) [Electronic resource] / Kew Database . – Access : <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/betula-pendula-silver-birch>.
86. Даников Н. И. Дерево жизни. Все о целебных свойствах березы / Н. И. Даников. – М. : Лабиринт, 1993. – 82 с.
87. Jato V. Use of phenological and pollen-production data for interpreting atmospheric birch pollen curves / V. Jato, F. J. Rodríguez-Rajo, M. J. Aira // Ann. Agric. Environ. Med. – 2007. – № 14. – P. 271–280.
88. Levetin E. Changing Pollen Types /Concentrations/ Distribution in the United States: Fact or Fiction? / E. Levetin, P. Van de Water // Current Allergy and Asthma Reports. – 2008. – № 8. – P. 418–424.

89. Каледа В. М. Биология плодоношения березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в лесостепных районах Западной Сибири : автореф. дисс. на соискание науч. степени к-та с.-х. наук : спец. 06.03.03 «Лесоведение, лесоводство и защитное лесоразведение, лесные пожары и борьба с ними» / В. М. Каледа. – Кулунда, 1984. – 28 с.
90. Male flowering of birch: Spatial synchronization, year-to-year variation and relation of catkin numbers and airborne pollen counts / H. Ranta, T. Hokkanen, T. Linkosalo [et al.] // *Forest Ecology and Management*. – 2008. – № 255 (3-4). – P. 643–650.
91. Куприянов С. Н. Распространенность поллиноза среди населения Ашхабада / С. Н. Куприянов // *Актуальные вопросы эпидемиологии, паразитологии и гигиены в Туркмении*. – Ашхабад. – 1983. – вып. 7. – С. 91–96.
92. Нокс Р. Б. Биология пыльцы / Р. Б. Нокс; [пер. с англ. и предисл. С. А. Резникова]. – М. : Агропромиздат, 1985. – 83 с.
93. Behrendt H. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors / H. Behrendt, W.-M. Becker // *Current Opinion in Immunology*. – 2001. – № 13. – P. 709–715.
94. Адо В. Поллинозы: Повышенная чувствительность к пыльце / В. Адо, Н. Г. Астафьева. – М. : Знание, 1991. – 224 с.
95. Родінкова В. В. Повітряний моніторинг пилку алергенних рослин урбанізованої екосистеми на прикладі м. Вінниці : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.16 «Екологія» / В. В. Родінкова. – Чернівці, 2005. – 24 с.
96. Недельская С. Предсезонная профилактика поллинозов у детей / С. Недельская, Т. Бессикало // *Здоровье ребенка*. – 2007. – № 2 (5).
97. Evaluation and forecasting of the atmospheric concentrations of allergenic pollen in Europe / M. Sofiev, P. Siljamo, H. Ranta, A. Rantio-Lehtimäki // *Annalen der Meteorologie*. – 2005. – № 41 (2). – P. 595–598.
98. Hilaire J. Modelling of birch pollen concentrations using an atmospheric transport model / Hilaire J. – The Netherlands : De Bilt, 2007. – 77 p.

99. Dyakowska J. Gravimetric studies on pollen / J. Dyakowska, J. Zurzycki // Bull. l'Acad. Polon. Sci. – 1959. – № 1 (7). – P. 11–17.
100. Пухлик Б. М. Українська алергологія: здобутки та проблеми / Б. М. Пухлик // Здоров'я України. – 2006. – № 11–12.
101. Allergic symptoms caused by long-distance transported birch pollen / J.-E. Wallin, U. Segerström, L. Rosenhall [et al.] // Grana. – 1991. – № 30. – P. 265–268.
102. Varis S. The role of pollen in the changing environmental conditions of Scots pine / S. Varis. – Helsinki : Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, 2010. – 37 p.
103. Изучение пыльцы у аборигенных и интродуцированных в условия Карелии представителей рода *Betula* L. / Т. С. Николаевская, Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов [и др.] // Труды Карельского научного центра РАН. – 2009. – № 4. – С. 90–95.
104. El-Ghazaly G. Orbicules in *Betula pendula* and their possible role in allergy / G. El-Ghazaly, Y. Takahashi, S. Nilsson [et al.] // Grana. – 1995, № 34. – P. 300–304.
105. El-Ghazaly G. Localization and release of allergens from tapetum and pollen grains of *Betula pendula* / G. El-Ghazaly, R. Moate, M. Cresti [et al.] // Protoplasma. – 1999. – № 208. – P. 37–46.
106. Matikainen E. Semiquantitative and qualitative analysis of pre-seasonal airborne birch pollen allergens in different particle sizes / Eila Matikainen, Auli Rantio-Lehtimäki // Grana. – 1998. – № 37. – P. 293–297.
107. Emilson A. Localization of the major allergen Bet v 1 in birch pollen by confocal laser scanning microscopy / A. Emilson, B. Berggren, A. Svensson [et al.] // Grana. – 1996. – № 35. – P. 199–203.
108. A new approach to the investigation of allergenic respirable particles using a modified Andersen Impactor / G. F. Schäppi, P. E. Taylor, C. Suphioglu, R. B. Knox // Grana. – 1997. – № 36. – P. 373–375.

109. Cotos-Yáñez R. T. Short-term prediction of *Betula* airborne pollen concentration in Vigo (NW Spain) using logistic additive models and partially linear models / R. T. Cotos-Yáñez, F. J. Rodríguez-Rajo, M. V. Jato // *Int. J. Biometeorol.* – 2004. – № 48. – P. 179–185.
110. Курганский А. Р. Моделирование региональных аспектов переноса примесей на примере пыльцы березы / А. Р. Курганский, С. В. Мостаманди, С. П. Смышляев // XVI Международная школа-конференция молодых ученых : тезисы докл. – М., 2012. – С. 129–132.
111. Rossi R. E. Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles / R. E. Rossi, G. Monasterolo, S. Monasterolo // *Allergy.* – 2003. – № 358. – P. 929–932.
112. Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1 / V. Mahler, S. Vrtala, O. Kuss [et al.] // *Clinical & Experimental Allergy.* – 2004. – № 34. – P. 115–122.
113. Вітчизняні алергени України / Б. М. Пухлик, В. М. Гонько, І. В. Корицька [та ін.] // *Biomedical and Biosocial Anthropology.* – 2004. – № 3. – С. 96–99.
114. Усовик О. В. Выявление и изучение аллергенной пыльцы Беларуси / О. В. Усовик, В. В. Янченко // *Достижения медицинской науки Беларуси.* – 2006.
115. Spieksma F. Th. M. Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol / F. Th. M. Spieksma, A. H. Nikkels // *Allergy.* – 1999. – № 54. – P. 235–241.
116. Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIALINE study / J. T. M. Buters, M. Thibaudon, M. Smith [et al.] // *Atmospheric Environment.* – 2012. – № 55. – P. 496–505.

117. Ekebom A. Detection and quantification of airborne birch pollen allergens on PVDF membranes by immunoblotting and chemiluminescence / A. Ekebom, O. Vesterberg, M. Hjelmroos // *Grana*. – 1996. – № 35. – P. 113–118.
118. Rantio-Lehtimäki A. Airborne birch pollen antigens in different particle sizes / A. Rantio-Lehtimäki, M. Viander, A. Koivikko // *Clinical & Experimental Allergy*. – 1994. – № 24 (1). – P. 23–28.
119. EI-Ghazaly G. Localization of the major allergen Bet v I in *Befula* pollen using monoclonal antibody labelling / G. EI-Ghazaly, S. Nakamura, Y. Takahashi [et al.] // *Grana*. – 1996. – № 35. – P. 369–374.
120. Source of Bet v 1 loaded inhalable particles from birch revealed / G. F. Schäppi, Ph. E. Taylor, I. A. Staff [et al.] // *Sex Plant Reprod*. – 1997. – № 10. – P. 315–323.
121. Pomés A. Allergen Structures and Biologic Functions: The Cutting Edge of Allergy Research / A. Pomés // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2008. – № 8. – P. 425–432.
122. Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen / M. F. Schenk, J. H. G. Cordewener, A. H. P. America [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2009. – № 9 (24). – P. 1–15.
123. Proteomic analysis of the major birch allergen Bet v 1 predicts allergenicity for 15 birch species / M. F. Schenk, J. H. Cordewener, A. H. America [et al.] // *J. Proteomics*. – 2011. – № 74 (8). – P. 1290–300.
124. Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1 / G. F. Schäppi, P. E. Taylor, I. A. Staff [et al.] // *Allergy*. – 1999. – № 54. – P. 478–483.
125. Detection and release of allergenic proteins in *Parietaria judaica* pollen grains / A. M. Vega-Maray, D. Fernández-González, R. Valencia-Barrera, M. Suárez-Cervera // *Protoplasma*. – 2006. – № 228. – P. 115–120.
126. Rezanejad F. The effect of air pollution on microsporogenesis, pollen development and soluble pollen proteins in *Spartium junceum* L. (*Fabaceae*) / F. Rezanejad // *Turk. J. Bot*. – 2007. – № 31. – P. 183–191.

127. Characterization of *Quercus* spp. pollen potential allergens: profiling and Bet v 1 – homologues / C. Bernardo, M. I. Amorim : Annual Bioplant map, 18-19 April 2011 : Abstracts of Posters. – Minho, 2011. – P. 22.
128. Common Silver Birch tree [Electronic resource] / Access : <http://www.allallergy.net/fapaidfind.cfm?cdeoc=411>.
129. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier / Z. Markovic'-Housley, M. Degano, D. Lamba [et al.] // J. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 325, № 1. – P. 123–133.
130. The potential of Bet v 1 homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants / J. Wen, M. Vanek-Krebitz, K. Hoffmann-Sommergruber [et al.] // Mol. Phylogenet. Evol. – 1997. – Vol. 8, № 3. – P. 317–333.
131. Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen / M. F. Schenk, L. J. Gilissen, G. D. Esselink [et al.] // BMC Genomics. – 2006. – Vol. 7. – P. 168–172.
132. Crystallographically mapped ligand binding differs in high and low IgE binding isoforms of birch pollen allergen Bet v 1 / S. Kofler, C. Asam, U. Eckhard [et al.] // J. Mol. Biol. – 2012. – Vol. 422, № 1. – P. 109–123.
133. Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy / F. Ferreira, K. Hirtenlehner, A. Jilek [et al.] // J. Exp. Med. – 1996. – Vol. 183, № 2. – P. 599–609.
134. Expression of Bet v 1, the major birch pollen allergen, during anther development. An *in situ* hybridization study / I. Swoboda, T. C. H. Dang, E. Heberle-Bors, O. Vicente // Protoplasma. – 1995. – Vol. 187, № 1-4. – P. 103–110.
135. Orbicules do not significantly contribute to the allergenic micro-aerosol emitted from birch trees / S. Vinckier, P. Cadot, M. Grote [et al.] // Allergy. – 2006. – Vol. 61, № 10. – P. 1243–1244.
136. Пыльца цветочная (обножка пчелиная) в фармации и медицине (теория, технология, медицинское применение) / [Тихонов А. И., Содзавичный

К., Тихонова С. А. и др.] ; под ред. А. И. Тихонова. – Х. : Изд-во НФаУ «ОРИГИНАЛ», 2006. – 313 с.

137. Erdtman G. An introduction to pollen analysis / G. Erdtman. – U.S.A. Walthman : Mass. Chronica Botanica Company, 1943. – 270 p.

138. Glossary of pollen and spore terminology / W. Punt, P. P. Hoen, S. Blackmore [et al.] // Review of Palaeobotany and Palynology. – 2007. – № 143. – 81 p.

139. Focke M. Molecular composition and biological activity of commercial birch pollen allergen extracts / M. Focke, K. Marth, R. Valenta // Eur. J. Clin. Invest. – 2009. – Vol. 39, № 5. – P. 429–436.

140. Nasser Sh. M. Allergens and Thunderstorm Asthma / Shuaib M. Nasser, Thomas B. Pulimood // Current Allergy and Asthma Reports. – 2009. – № 9. – P. 384–390.

141. Rapid production of the major birch pollen allergen Bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological *in vitro* and *in vivo* characterization / M. Krebitz, U. Wiedermann, D. Essl [et al.] // The FASEB Journal. – 2000. – № 14. – P. 1279–1288.

142. Biomolecular identification of allergenic pollen: a new perspective for aerobiological monitoring / S. Longhi, A. Cristofori, P. Gatto [et al.] // Annals of allergy, Asthma & Immunology. – 2009. – Vol. 103, № 6. – P. 508–514.

143. Современная биотехнология. Мифы и реальность. / Сост. Ю. Н. Елдышев. 2004. – 200 с. (Библиотека журнала «Экология и жизнь»).

144. Генетика : підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. // за ред. А. В. Сиволоба. – К. : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. – 320 с.

145. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др. ; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 418 с.



146. What is the future of Bee-Pollen? / M. G. R. Campos, C. Frigerio, J. Lopes, S. Bogdanov // Journal of ApiProduct and ApiMedical Science. – 2010. – № 2 (4). – P. 131–144.
147. Волошин О. І. Пилок квітковий (бджолине обніжжя) в клінічній та експериментальній медицині / Волошин О. І., Пішак О. В., Мешишин І. Ф. – Чернівці : Буков. держ. мед. акад., 1998. – 191 с.
148. Brovarskij V. Včelí obnôžkový peľ / V. Brovarskij, J. Brindza. – FOP I. S. Maidachenko, 2010. – 288 s.
149. Composition & chemical analysis of honeybee pollen [Electronic resource]. – Access : <http://www.envirobee.com/beepollen3.htm>.
150. Harmanescu M. Mineral micronutrients composition of bee's pollen / M. Harmanescu, D. Popovici, I. Gergen // Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. – 2007. – Vol. XIII, № 1. – P. 175–182.
151. Přidal A. Včelí produkty – cvičení / A. Přidal. – Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003.
152. Продукты пчеловодства как биологически активные средства и альтернативные продукты питания / Л. Т. Ахметова, С. Ю. Гармонов, Ж. Ж. Сибгатуллин [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – № 15. – С. 154–160.
153. *In vitro* and *in vivo* biological activities of old and fresh *Cupressus arizonica* pollen / R. Ariano, G. Mistrello, G. Mincigrucci [et al.] // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 16(3). – P. 177–182.
154. Schulte F. Chemical characterization and classification of pollen / F. Schulte, J. Lingott, U. Panne [et al.] // Anal. Chem. – 2008. – № 80. – P. 9551–9556.
155. New method for pollen identification by FT-IR Spectroscopy / C. Pappas, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis [et al.] // Applied Spectroscopy. – 2003. – № 57. – P. 23–27.
156. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen / I. Gonzalez-Martín, J. M. Hernandez-Hierro, N. Barros-Ferreiro [et al.] // Talanta. – 2007. – № 72. – P. 998–1003.

157. Pollen discrimination and classification by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and machine learning / R. Dell'Anna, P. Lazzeri, M. Frisanco [et al.] // *Anal Bioanal Chem.* – 2009. – № 394(5). – P. 1443-1452.
158. Nové trendy ve třídění a hodnocení kvality obnožkových pylů / A. Synytsya, A. Synytsya, R. Bleha [et al.] // *Potravinářstvo.* – 2010. – № 4. – P. 236–245.
159. Morphologic and spectroscopic analysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) bee pollen / A. Synytsya, A. Synytsya, R. Bleha [et al.] // *Potravinářstvo.* – 2011. – № 5. – P. 308–313.
160. Pollen composition and standardisation of analytical methods / M. G. R. Campos, S. Bogdanov, L. Bicudo de Almeida-Muradian [et al.] // *Journal of Apicultural Research and Bee World.* – 2008. – № 47 (2). – P. 156–163.
161. Ivleva N. P. Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy / N. P. Ivleva, R. Niessner, U. Panne // *Anal Bioanal Chem.* – 2005. – № 381. – P. 261–267.
162. Pollen Raman spectra database: Application to the identification of airborne pollen / A. Guedes, H. Ribeiro, M. Fernández-González [et al.] // *Talanta.* – 2014. – № 119. – P. 473–478.
163. Zimmermann B. Shedding light on plant biology by Fourier transform infrared spectroscopy of pollen / Boris Zimmermann, Achim Kohler // *Spectroscopy Europe.* – 2014. – № 26(4). – P. 20–23.
164. Zimmermann B. Infrared Spectroscopy of Pollen Identifies Plant Species and Genus as Well as Environmental Conditions / Boris Zimmermann, Achim Kohler // *PLoS ONE.* – 2014. – № 9(4). – P. 1–12.
165. Characterizing Aeroallergens by Infrared Spectroscopy of Fungal Spores and Pollen / B. Zimmermann, Z. Tkalčec, A. Mešić [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – № 10(4). – P. 1–22.
166. Pollen grains amino acids. Micro and macro elements and pollen tube germination in *Pistacia* spp. / M. H. Rashed, G. H. Davarynejad, M. Nasiri [et al.] // *Acta Horticulturae (ISHS).* – 1995. – № 419. – P. 61–66.

167. An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination / P. Barral, C. Suárez, E. Batanero [et al.] // *Biochem. J.* – 2005. – № 390. – P. 77–84.
168. Knox R. B. Pollen-wall proteins: localization and enzymic activity / R. B. Knox, J. Heslop-Harrison // *J. Cell Sci.* – 1970. – № 6. – P. 1–27.
169. Özler H. Analysis of free amino acid and total protein content in pollen of some allergenic taxa / H. Özler, S. Pehlivan, F. Bayrak // *Asian Journal of Plant Sciences.* – 2009. – № 8. – P. 308–312.
170. Henricsson S. Chemical Characterisation of Extractable Compounds Found in the Coating of Birch (*Betula*) Pollen / S. Henricsson, R. Westerholm, S. Nilsson // *Grana.* – 1996. – № 35. – P. 179–184.
171. Колесников М. П. Формы кремния в растениях / М. П. Колесников // *Успехи биологической химии.* – 2001. – Т. 41. – С. 301–332.
172. Молодцов М. А. Диагностика самоопыляемости сортов яблони по содержанию флавоноидов в репродуктивных структурах цветков : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. с.-х. наук : спец. 06.01.05 «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений» / М. А. Молодцов. – Мичуринск, 2014. – 33 с.
173. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрасилов Б. С., Музафаров Е. Н.; [отв. ред. Е. И. Маевский]. – Пущино: Synchrobook, 2013. – 310 с.
174. Rezanejad F. Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants / F. Rezanejad // *Turk. J. Bot.* – 2012. – № 36. – P. 49–54.
175. Nicolson S. W. Chemical composition of the «low quality» pollen of sunflower (*Helianthus annuus* L., *Asteraceae*) / S. W. Nicolson, H. Human // *Apidologie.* – 2013. – № 44(2). – P. 144–152.
176. Ветчинникова Л. В. Жирнокислотный состав липидов пыльцы основных представителей рода *Betula* L. / Л. В. Ветчинникова, О. С.

Серебрякова, М. К. Ильинова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2012. – № 2. – С. 56–62.

177. Measurement of pollen associated lipid mediators with structural and functional similarities to eicosanoids / A. Kasche, V. Mariani, T. Jakob [et al.] // Discov. Matters. – 2007. – № 2. – P. 27–28.

178. Алаудинова Е. В. Особенности метаболизма жирных кислот *Pinus sylvestris* L. / Е. В. Алаудинова, П. В. Миронов // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 5. – С. 62–66.

179. Изменение жирнокислотного состава в растениях при гипотермической адаптации / М. А. Живетьев, И. А. Граскова, Л. В. Дударева [и др.] // Journal of stress physiology & biochemistry. – 2010. – № 6 (4). – С. 51–65.

180. Алаудинова Е. В. Жирные кислоты мембранных липидов живых тканей почек лиственницы сибирской / Е. В. Алаудинова, П. В. Миронов, С. М. Репях // Химия растительного сырья. – 2000. – № 2. – С. 41–45.

181. Лось Д. А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений / Д. А. Лось // Вестник РАН. – 2005. – Т. 75, № 4. – С. 338–345.

182. Получение клатратов бета-циклодекстрина с синтетическими фитопростаноидами / М. А. Капустин, В. С. Радевич, В. П. Курченко [и др.] // Биологически активные вещества растений – изучение и использование : междун. науч. конф, 29-31 мая 2013 г. : тезисы докл. – Минск, 2013. – С. 106–107.

183. Филиппова Г. Г. Роль простаноидов в регуляции физиологических процессов в растениях / Г. Г. Филиппова, Е. М. Лапковская, В. М. Юрин // Труды БГУ. – 2011. – № 6 (2). – С. 59–65.

184. Исследование действия синтетического простаноида на устойчивость клеток каллизии к оксидативному стрессу [Электронный ресурс] / Г. Г. Филиппова, О. А. Потоцкая, О. В. Янович [и др.] // Клеточная биология и биотехнология растений. – 2013. – Режим доступа : <http://elib.bsu.by/handle/123456789/33885>.

185. Кайгородов Р. В. Загрязнение почв придорожных газонов г. Перми тяжелыми металлами, их распределение в вегетативных и генеративных органах и влияние на фертильность и линейные размеры пыльцевых зерен *Taraxacum officinale* S. L. / Р. В. Кайгородов, Л. В. Новоселова, Е. В. Мозжерина // Вестник Пермского университета. Биология. Экология. – 2010. – № 3. – С. 30–35.
186. Хосые Р. Д. Х. Физиологические особенности действия тяжелых металлов на растения : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.12 «Физиология растений» / Р. Д. Х. Хосые. – М., 1999. – 20 с.
187. Влияние тяжелых металлов на жизнеспособность пыльцы некоторых древесных / В. А. Лях, Т. Н. Пересыпкина, Е. В. Дубовая [и др.] // Вісник Сумського державного університету. Серія Технічні науки. – 2004. – № 2(61). – С. 174–177.
188. Bogdanov S. Quality and standards of pollen and beeswax / Stefan Bogdanov // *Apiacta*. – 2004. – № 38. – P. 334–341.
189. Microbiological sanitary aspects of pollen / B. Hani, B. Dalila, D. Saliha [et al.] // *Advances in Environmental Biology*. – 2012. – № 6(4). – P. 1415–1420.
190. Microscopic filamentous fungi occurrence in plant pollen from nontraditional plant species / M. Kačániová, J. Petrová, L. Hleba [et al.] // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. – 2014. – № 3(6). – P. 522–524.
191. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen / G. González, M. J. Hinojo, R. Mateo [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2005. – № 105(1). – P. 1–9.
192. Microflora of allergenic pollens – a preliminary study / R. Śpiewak, E. Krysińska-Traczyk, J. Sitkowska, J. Dutkiewicz // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. – 1996. – № 3. – P. 127–130.
193. Ахапкина И. Г. Иммунологическая активность пыльцы березы (*Betula pendula*) / И. Г. Ахапкина // *Иммунология*. 2007. – № 6. – С. 362–364.

194. TLR ligands of ryegrass pollen microbial contaminants enhance Th1 and Th2 responses and decrease induction of Foxp3(hi) regulatory T cells / D. Mittag, N. Varese, A. Scholzen [et al.] // Eur. J. Immunol. 2013. – № 43(3). – 723–33.

195. Конов А. Л. Биотехнология и «горизонтальный» перенос генов [Электронный ресурс] / А. Л. Конов // Экология и жизнь. – 2002. – № 2. – Режим доступа : <http://studyspace.ru/zdorove-i-okruzhayuschaya-sreda/biotehnologiya-i-gorizontalnyiy-perenos-3.html>.

196. De la Fuente L. Pathogenic and beneficial plant-associated bacteria. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) / L. De la Fuente, S. Burdman. – UK: Eolss Publishers, 2011. – 17 p.

197. Чекрыга Г. П. Факторы формирования микобиоты пыльцевой обножки медоносных пчел : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук. : спец. 03.00.16 «Экология» / Г. П. Чекрыга. – Красноярск, 2006. – 25 с.

198. Bacterial endotoxin associated with pollen as a potential factor aggravating pollinosis / R. Śpiwak, C. Skórska, Z. Prażmo, J. Dutkiewicz // Ann. Agric. Environ. Med. – 1996. – № 3. – P. 57–59.

199. Lacey J. Bioaerosols and occupational lung disease / J. Lacey, J. Dutkiewicz // J. Aerosol Sci. – 1994. – № 25. – P. 1371–1404.

200. Burrell R. Immunotoxic reactions in the agricultural environment / R. Burrell // Ann. Agric. Environ. Med. – 1995. – № 2. – P. 11–20.

201. Burrell R. Human immune toxicity / R. Burrell // Molec. Aspects Med. – 1993. – № 14. – P. 1–81.

202. Dziadzio L. Assessment and control of fungal allergens / L. Dziadzio, R. K. Bush. // Current allergy and asthma reports. – 2001. – № 1. – P. 455–460.

203. Рыжкин Д. В. Мониторинг концентрации спор грибов *Cladosporium* и *Alternaria* в атмосферном воздухе г. Москвы / Д. В. Рыжкин, С. Н. Еланский, Т. М. Жёлтикова // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2002. – № 2. – С. 30–31.

204. Dictionary of the Fungi / [Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A.]. – Wallingford, UK. : CABI Publishing, 2008. – 784 p. (10th edition).
205. Fungi Identification Test Panel [Electronic resource] / The Biolog Database. – Access : [www.biolog.com](http://www.biolog.com).
206. Ганнибал Ф. Б. Токсигенность, аллергенность и таксономия грибов рода *Alternaria* / Ф. Б. Ганнибал // Успехи медицинской микологии. – 2003. – № 1 (5). – 189–190.
207. Микрофлора окружающей среды и тела человека. Учебное пособие / [Литусов Н. В., Сергеев А. Г., Григорьева Ю. В., Ишутинова В. Г.]. – Екатеринбург, 2008. – 28 с.
208. Ибрагимова Э. Э. Оценка последствий аэротехногенного загрязнения окружающей среды выбросами автомобильного транспорта по их гаметоцидному влиянию на высшие растения / Э. Э. Ибрагимова // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. – № 2. – С. 192–199.
209. Про затвердження методичних рекомендацій «Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів» : наказ МОЗ України №116 від 13.03.2007 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : [http://uazakon.com/documents/date\\_6s/pg\\_gewxoj/index.htm](http://uazakon.com/documents/date_6s/pg_gewxoj/index.htm).
210. Горова А. І. Цитогенетична біоіндикація як метод інтегральної оцінки екологічного стану екосистем Криворіжжя (аналіз стану проблеми) / А.І. Горова, І.О. Сіліч // Питання біоіндикації та екології. – 2012. – Вип. 17, № 1. – С. 11–22.
211. Удосконалення методів оцінки якості атмосферного повітря із використанням рослин-індикаторів та геоінформаційних технологій / А. І. Горова, Ю. В. Бучавий, А. В. Павличенко, І. Г. Миронова // Екологічна безпека та природокористування. – 2014. – Вип. 14. – С. 53–58.
212. Технология повышения экологической безопасности при добыче железных руд подземным способом: Монография / А. И. Горová, И. Г.

Миронова, М. Н. Кононенко, А. В. Павличенко; Днепропетровск : Литограф, 2014. – 136 с.

213. Аллергенная пыльца и загрязнение атмосферы / В. Н. Кобзарь, Н. Р. Мейер, Г. А. Комаров, Э. П. Харитонова // Иммунология. – 1994. – № 3. – С. 43–45.

214. Pollen environment and its evaluation / G. Pauli, J. C. Bessot, N. Hutt, M. Thibaudon // Rev. Pneumol. Clin. – 1997. – № 53 (6). – P. 317–322.

215. Хлебова Л. П. Качество пыльцы березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях Барнаула / Л. П. Хлебова, О. В. Ерещенко // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. – 2012. – № 3-1 (75). – С. 89–92.

216. Reid C. E. Aeroallergens, Allergic Disease, and Climate Change: Impacts and Adaptation / C. E. Reid, J. L. Gamble // Ecohealth. – 2009. – № 6 (3). – P. 458–470.

217. The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains / A. Majd, A. Chehregani, M. Moin [et al.] // Aerobiologia. – 2004. – № 20 (2). – P. 111–118.

218. Савицкий В. Экология и распространение пыльцы аллергенных растений в Украине / В. Савицкий, Е. Савицкая // Астма та алергія. – 2002. – № 2. – С. 17–20.

219. Rezanejad F. Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L. (*Cupressaceae*) / F. Rezanejad // Grana. – 2009. – № 48 (3). – P. 205–213.

220. Rezanejad F. The Structure and Ultra Structure of Anther Epidermis and Pollen in *Lagerstroemia indica* L. (*Lythraceae*) in Response to Air Pollution / F. Rezanejad // Turk. J. Bot. – 2008. - № 32. – P. 35–42.

221. *Betulaceae* and *Corylaceae* / S. Blackmore, J. A. J. Steinmann, P. P. Hoen [et al.] // The Northwest European Pollen Flora. Rev Palaeobot Palynol. – 2003. – № 65. – P. 71–98.



222. Jentys-Szaferowa J. La structure des membranes du pollen de *Corylus*, de *Myrica* et des especes europeenes de *Betula* et leur determination a l'etat fossile / J. Jentys-Szaferowa // Bull. int. Acad. pol. Sci. Lett. – 1928. – № 68(1), Ser. B.

223. Куприянова Л. А. Пыльца и споры растений флоры европейской части СССР / Л. А. Куприянова, Л. А. Алешина. – Ленинград : Наука, Т. 1, 1972. – 170 с.

224. *Betula pendula* [Electronic resource] / PalDat Database. – Access : <http://www.paldat.org>.

225. Airborne pollen morphology. Handbook for laboratory technicians [Электронный ресурс] : Режим доступа : [http://www.pollnet.it/publicazioni.asp?somepubl\\_action=300&somepubl\\_image\\_id=200612](http://www.pollnet.it/publicazioni.asp?somepubl_action=300&somepubl_image_id=200612).

226. Praglowski J. R. Notes on the pollen morphology of Swedish trees and shrubs / J. R. Praglowski // Grana Palynologica. – 1962. – Vol. 3., № 3. – P. 45–76.

227. Куприянова Л. А. Палинологическая терминология покрытосеменных растений / Л. Куприянова, Л. Алешина. – Ленинград : Наука, 1967. – 83 с.

228. Эрдтман Г. В. Морфология пыльцы и систематика растений (Введение в палинологию) / Эрдтман Г. В. ; [пер. с англ. А. А. Козяр]. – М. : Изд-во иностр. лит., 1956. – Т. 1. Покрытосеменные. – 486 с.

229. Silfver T. Genetic variation in resistance of silver birch to biotic and abiotic stress / Silfver T. – Finland : University of Joensuu, 2009. – 93 p.

230. Bjorksten B. Epidemiology of pollution-induced airway disease in Scandinavia and Eastern Europe / B. Bjorksten // Allergy. – 1997. – Vol. 52. № 38. – P. 23–25.

231. Kim H. Air Pollution and Allergic Disease / H. Kim, J. A. Bernstein // Current Allergy and Asthma Reports. – 2009. – № 9. – P. 128–133.

232. Levetin E. Environmental Contributions to Allergic Disease / E. Levetin, P. Van de Water // Current Allergy and Asthma Reports. – 2001. – № 1. – P. 506–514.

233. D'Amato G. Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases / G. D'Amato // *Allergy*. – 2002. – № 57 (72). – P. 30–33.
234. The impact of air pollutants as an adjuvant for allergic sensitization and asthma / L. Viera, K. Chen, A. Nel, M. G. Lloret // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2009. – № 9. – P. 327–333.
235. Дзюба О. Ф. Тератоморфные пыльцевые зерна в современных и палеопалинологических спектрах и некоторые проблемы палиностратиграфии / О. Ф. Дзюба // *Нефтегазовая геология. Теория и практика*. – 2007. – № 2. – С. 1–22.
236. Коробкин В. И. Экология / В. И. Коробкин, Л. В. Передельский. – Ростов на Дону : Феникс, 2006. – 576 с.
237. Pollen microscopic identification of allergenic species in Oradea area / A. Pallag, S. Bungău, D. Gotea [et al.] // *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*. – 2011. – № 16. – P. 130–136.
238. Air pollution and allergens / J. Bartra, J. Mullol, A. del Cuvillo [et al.] // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2007. – № 17. – P. 3–8.
239. Звіряка А. І. Роль ландшафту у формуванні своєрідності історичного міста Переяслава-Хмельницького / А. І. Звіряка // *Сіверщина в історії України*. – 2011. – вип. 4. – С. 25–28.
240. Радиологічний стан територій, віднесених до зон радіоактивного забруднення (у розрізі районів) / За ред. В. І. Холоші // Міністерство України з питань надзвичайних ситуацій та у справах захисту населення від наслідків Чорнобильської катастрофи. ТОВ «Інтелектуальні Системи ГЕО». – К. : «БЕТА», 2008. – 49 с.
241. Погода в Україні [Електронний ресурс] / *Weather.in.ua*. – Режим доступу : [weather.in.ua](http://weather.in.ua).
242. NISYS.SK Nitriansky Informačný systém [Electronic resource] / Access : <http://www.nisys.sk/www/>.

243. Charakteristika uzemia [Electronic resource] / Botanická záhrada pri SPU v Nitre. – Access : <http://www.bz.uniag.sk>.
244. Ален Кайяс. Пыльца (сбор-свойства-применение) / Ален Кайяс ; [пер. с фр. Н. Б. Кобрин]. – Бухарест : Апимондия, 1985. – 82 с.
245. Kim Si-H. Impact of meteorological variation on hospital visits of patients with tree pollen allergy / Si-H. Kim, H.-S. Park, J.-Y. Jang // BMC Public Health. – 2011. - № 11. – P. 890–898.
246. Інформація щодо стану довкілля в м. Кузнецовськ Рівненської області за 2012 р. : №зп-180 /04-10 /13 від 23.09.2013. – Офіц. док. – Рівн. обл. держ. адмін. – 2 с.
247. Довкілля Київщини у 2012 році : стат. зб. / за ред. П. Т. Сметани. – К. : Гол. управл. стат. у Київс. обл., 2013. – 118 с. – (Статистичний збірник).
248. Регіональна доповідь м. Київ у 2010 році. – К. : М-во екології та природних ресурсів України, 2011. – 222 с.
249. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Рівненській області за 2011 р. – Рівне : Держ. управл. ох. навк. прир. сер. в Рівн. обл., 2012. – 246 с.
250. Інформація щодо екологічного стану в м. Кузнецовськ Рівненської області за 2011 р. : №зп-862/08-16 від 11.04.2012. – Офіц. док. – Держ. управл. ох. навк. прир. сер. в Рівн. обл. – 2 с.
251. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в м. Києві 2012 р. – К. : М-во екології та природних ресурсів України, 2013. – 27 с.
252. Kollár J. The harmful entomofauna of woody plants in Slovakia / J. Kollár // Acta entomologica serbica. – 2007. – № 12 (1). – P. 67–79.
253. М. Київ. Екологічний паспорт регіону. – К. : Держ. управл. ох. навк. прир. сер. в м. Києві, 2010. – 96 с.
254. Ботанічна екскурсія в околицях міста Переяслава-Хмельницького / [Федорончук М. М., Протопопова В. В., Шевера М. В. Та ін.]. – К. : Фітосоціоцентр, 2012. – 36 с.

255. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2010 році. – К. : Центр екологічної освіти та інформації, 2011. – 254 с.

256. Регіональна доповідь про стан навколишнього природного середовища Київської області у 2012 році. – К. : Департамент екології та природних ресурсів Київської обласної державної адміністрації, 2013. – 293 с.

257. Ascomycetes and their anamorphs associated with shoots of silver birch (*Betula pendula*) growing in the urban greenery of Nitra in Slovak Republic / Z. Hečková, K. Adamčíková, M. Strelková, Z. Rózová // Folia Oecologica. – 2013. – № 40 (1). – P. 137–140.

258. Atlas of the forest sector in Slovakia / L. Ambušová, D. Halaj, J. Ilavský, J. Marttila. – Vantaa, Finland : Finnish Forest Research Institute, 2013. – 38 p.

259. Moravčík M. Forests in Slovakia / M. Moravčík, M. Radocha. – Bratislava, Zvolen, Slovak Republic : Ministry of Agriculture of the Slovak Republic, National Forest Centre – Forest Research Institute, 2009. – 20 p.

260. Pastirčáková K. Two important ascomycetes and their anamorphs on twigs of *Betula pendula* in Slovakia / K. Pastirčáková, M. Pastirčák // Polish Botanical Journal. – 2010. – № 55 (2). – P. 373–380.

261. Пухлик Б. М. До Всесвітнього Дня боротьби з алергією [Електронний ресурс] / Б. М. Пухлик // Сайт Асоціації алергологів України. – 2014. – Режим доступу : <http://www.aalu.org.ua/aktualni-publikacii/do-vsesvitnogo-dnya-borotbi-z-alergiyeyu.html>.

262. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Рівненській області за 2012 р. – Рівне : Держ. управл. ох. навк. прир. сер. в Рівн. обл., 2013. – 242 с.

263. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Рівненській області у 2010 р. – Рівне : Держ. управл. ох. навк. прир. сер. в Рівн. обл., 2011. – 237 с.

264. European Aeroallergen Network [Electronic resource] / Polleninfo.org. – Access : <https://www.polleninfo.org>.
265. Aktuálne peľové spravodajstvo SR [Electronic resource] / Alergia.sk. – Access : <http://www.alergia.sk>.
266. Европейская база данных «Здоровье для всех» [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. – Режим доступа : <http://www.euro.who.int/ru/home>.
267. Šustrová M. Sezónne alergie [Electronic resource] / M. Šustrová // Bedeker zdravia. – 2009. – Access : <http://www.zzz.sk/?clanok=6237#diskusia>.
268. Регіони України 2012 : стат. зб. / за ред. О. Г. Осауленко. – К. : Держ. служ. стат. України, 2012. – Ч. 1. – 310 с. – (Статистичний збірник).
269. Інформація щодо стану довкілля смт. Іванків Київської області протягом 2011-2012 років, I півріччя 2013 року : №зп-02.20.603 від 11.10.2013. – Відповідь на запит. – Іванківська селищна рада – 1 с.
270. Інформація щодо стану довкілля м. Переяслав-Хмельницький Київської області протягом 2011-2013 років : №зп-09-04-26пі від 09.10.2013. – Відповідь на запит. – П.-Хмельницька міська рада – 1 с.
271. Оцінка стану забруднення атмосферного повітря на території України у 2011 році [Електронний ресурс] / Режим доступу : [http://www.krm.gov.ua/UserFiles/Image/news/atm\\_26.06.12\\_1.pdf](http://www.krm.gov.ua/UserFiles/Image/news/atm_26.06.12_1.pdf).
272. Správa o kvalite ovzdušia a podiele jednotlivých zdrojov na jeho znečisťovaní v Slovenskej Republike 2012. – Bratislava : Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky, Slovenský hydrometeorologický ústav, 2014. – 73 s.
273. Správa o kvalite ovzdušia a podiele jednotlivých zdrojov na jeho znečisťovaní v Slovenskej Republike 2011. – Bratislava : Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky, Slovenský hydrometeorologický ústav, 2013. – 85 s.
274. Správa o kvalite ovzdušia a podiele jednotlivých zdrojov na jeho znečisťovaní v Slovenskej Republike 2013. – Bratislava : Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky, Slovenský hydrometeorologický ústav, 2015. – 49 s.

275. Hodnotenie kvality ovzdušia v Slovenskej republike – 2012. – Bratislava : Slovenský hydrometeorologický ústav, 2014. – 62 s.
276. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 Update / J. Bousquet, N. Khaltaev, A. A. Cruz [et al.] // *Allergy*. – 2008. – № 63 (86). – P. 8–160.
277. Шамгунова Б. А. Эпидемиология поллинозов: факты, основные тенденции / Б. А. Шамгунова, Л. В. Заклякова // *Астраханский медицинский журнал*. – 2010. – т. 5, №1. – С. 27–35.
278. Atmospheric birch (*Betula*) pollen in Europe: Trends and fluctuations in annual quantities and the starting dates of the seasons / F. Th. M. Spieksma, J. C. Emberlin, M. Hjelmroos [et al.] // *Grana*. – 1995. – № 34. – P. 51–57.
279. Родман Л. С. Ботаника с основами географии растений. – М. : Колос, 2006. – 397 с.
280. Weather in Nitra [Electronic resource] / World Weather. – Access : <http://www.tutiempo.net/en/Climate/>.
281. Bulletin Meteorologia a klimatologia. Slovenská republika. – Bratislava : Slovenský hydrometeorologický ústav, 2012. – Číslo 1-12.
282. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2011 році. – К. : Міністерство екології та природних ресурсів України, LAT & K, 2012. – 258 с.
283. Bulletin Meteorologia a klimatologia. Slovenská republika. – Bratislava : Slovenský hydrometeorologický ústav, 2013. – Číslo 1-4.
284. Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia / W. Ahmed, F. Huygens, A. Goonetilleke, T. Gardner // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – № 17. – P. 5490–5496.
285. ПЦР «в реальном времени» / [Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. и др.] ; под. ред. Д. В. Ребрикова. – [2-е изд.]. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

286. Primer-BLAST [Electronic resource] / Primer-BLAST. – Access : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

287. Pfaffl M. W. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl, M. Hageleit // *Biotechn. Lett.* – 2001. – Vol. 23. – P. 275–282.

288. Анциферова И. В. Источники поступления наночастиц в окружающую среду / И. В. Анциферова // *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Машиностроение, материаловедение.* – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 54–66.

289. Біланич М. М. Сучасний стан дослідження впливу важких металів на рослинний світ / М. М. Біланич // *Вісник Прикарпатського національного університету ім. Василя Стефаника. Серія: Біологія.* – 2008. – Вип. 12. – С. 161–175.

290. Валетова Е. А. Влияние техногенного загрязнения на репродуктивную способность сосны обыкновенной : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук. : спец. 03.00.16 «Экология» / Е. А. Валетова. – Барнаул, 2009. – 16 с.

291. Танащук Л. І. Біогеохімія: Курс лекцій з дисципліни “Біогеохімія” для студ. спец. 6.070800 “Екологія та охорона навколишнього середовища” / Л. І. Танащук. – К. : НУХТ, 2005. – 94 с.

292. Чегринцев С. Н. Атомно-абсорбционный анализ : методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу «Физико-химические методы анализа» для студентов IV курса, обучающихся по направлению 240501 «Химическая технология материалов современной энергетики» / Чегринцев С. Н. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2014. – 44 с.

293. Фармацевтичний аналіз: Навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. III-IV рівнів акредитації / П. О. Безуглий, В. О. Грудько, С. Г. Леонова та ін.; За ред. П. О. Безуглого. – Х. : Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2001. – 240 с.

294. Визначення афлатоксину В<sub>1</sub> методом мікроколоночної високоефективної рідинної хроматографії з УФ-детектуванням [Електронний

ресурс] / М. В. Білоножко, О. К. Вяткін, М. Ф. Попов [та ін.]. – Режим доступу : [b-m-v.narod.ru/bibik.pdf](http://b-m-v.narod.ru/bibik.pdf).

295. Амелин В. Г. Хроматографические методы определения микотоксинов в пищевых продуктах / В. Г. Амелин, Н. М. Карасева, А. В. Третьяков // Журнал аналитической химии. – 2013. – № 68(3). – С. 212–223.

296. Cigić I. K. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins / Irena Kralj Cigić, Helena Prosen // Int. J. Mol. Sci. – 2009. – № 10. – P. 62–115.

297. Roulston T. H. Pollen nutritional content and digestibility for animals / T. H. Roulston, J. H. Cane // Plant Syst. Evol. – 2000. – № 222. – P. 187–209.

298. Шамрай Є. Ф. Метод кількісного визначення азоту в органічних сполуках і тканинах / Є. Ф. Шамрай, О. К. Хилько, Є. Б. Сапоцінська // Український біохімічний журнал. – 1962. – № 3. – С. 443–450.

299. Методи дослідження продуктів харчових виробництв. Методичні вказівки та інструкція до лабораторного практикуму з курсу «Методи контролю харчових виробництв» (частина II) для студентів базового напрямку 6.0917 “Харчова технологія та інженерія” / Укл.: Мельник С. Р., Мельник Ю. Р., Магорівська Г. Я. – Львів : Національний університет “Львівська політехніка”, 2005. – 26 с.

300. Лобода А. М. Застосування методу кутового перетворення Фішера при аналізі результатів досліджень / А. М. Лобода // Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини : міжнар. наук.-практ. конф. студ. та молод. вч., 10-12 квіт. 2013 р. : тези доп. – Суми, 2013. – С. 161–162.

301. Сладков А. Н. Введение в спорово-пыльцевой анализ / А. Н. Сладков. – М. : Наука, 1967. – 270 с.

302. Губський Ю. І. Жирнокислотний склад ліпідів головного мозку щурів при токсичному ураженні 1,2-дихлоретаном та введення нікотинаміду / Ю. І. Губський, Л. В. Яніцька, Т. С. Брюзгіна // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – № 1. – С. 19–22.



303. Вивчення жирнокислотного складу ліпідів топінамбура / П. І. Середа, Н. П. Максютіна, Ю. А. Цимбаліста [та ін.] // Фітотерапія. Часопис. – 2011. – № 1. – С. 75–76.
304. Визначення сквалену – унікального фітостерину ліпідів методом газорідинної хроматографії / В. А. Кіщенко, І. В. Левчук, М. І. Осейко [та ін.] // Вісник НТУ «ХПІ». – 2013. – № 11(985). – С. 137–141.
305. Поливаний С. В. Вплив синтетичних регуляторів росту на вміст та якість олії у насінні маку [Електронний ресурс] / С. В. Поливаний, А. С. Куйбіда, В. Г. Кур'ята // Біологічні науки. Структурна ботаніка і біохімія рослин. – 2012. – Режим доступу : [http://www.rusnauka.com/34\\_VPEK\\_2012/Biologia/2\\_121426.doc.htm](http://www.rusnauka.com/34_VPEK_2012/Biologia/2_121426.doc.htm).
306. Кобзар А. Я. Фармакогнозія в медицині : [навч. посібник] / Алла Яківна Кобзар. – К. : Медицина, 2007. – 544 с.
307. Handbook of Vitamins / [Zempleni J., Rucker R. B., McCormick D. B., Suttie J. W.]. – Boca Raton : CRC Press, 2007. – 593 p.
308. Химический анализ лекарственных растений : [учеб. пособие для фармацевтических вузов] / Ладыгина Е. Я., Сафронич Л. Н., Отряшенкова В. Э. и др]; под ред. Гриянкевич Н. И., Сафронич Л. Н. – М. : Высш. школа, 1983. – 176 с.
309. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков / Урбах В. Ю. – М. : Изд-во АН СССР, 1963. – 323 с.
310. Обніжжя бджолине (пилок квітковий) і його суміші. Технічні умови : ДСТУ 3127-95. – [Чинний від 1996-01-07]. – К. : Держстандарт України, 1996. – 66 с.
311. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory / A. Pascoal, S. Rodrigues, A. Teixeira [et al.] // Food and Chemical Toxicology. – 2014. – № 63. – P. 233–239.
312. Chemical analysis of Greek pollen – antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties / K. Graikou, S. Kapeta, N. Aligiannis [et al.] // Chemistry Central Journal. – 2011. – № 5. – P. 33–42.

313. Лубсандоржиева П. Б. Содержание биологически активных веществ в некоторых растениях Забайкалья и их антиоксидантная активность / П. Б. Лубсандоржиева // Химия растительного сырья. – 2009. – № 3. – С. 133–137.
314. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen / B. W. LeBlanc, O. K. Davis, S. Boue [et al.] // Food Chem. – 2009, № 115. – P. 1299–1305.
315. Basuny A. M. Chemical analysis of olive and palm pollen: Antioxidant and antimicrobial activation properties / A. M. Basuny, S. M. Arafat, H. M. Soliman // Herald Journal of Agriculture and Food Science Research. – 2013. – № 2(3). – P. 091–097.
316. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil / S. T. Carpes, G. B. Mourão, S. M. de Alencar [et al.] // Braz. J. Food Technol. – 2009. – № 12(3). – P. 220–229.
317. Lee K.-H. Antioxidant and antiinflammatory activity of pine pollen extract *in vitro* / K.-H. Lee, Ae-J. Kim, E.-Mi Choi // Phytother. Res. – 2009. – № 23 (41-48). – P. 41–48.
318. Белая Н. И. Антирадикальная активность фруктовых соков в реакции с дифенилпикрилгидразилом / Н. И. Белая, А. Н. Николаевский, Т. Н. Ивлева, О. Г. Шептура // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, № 6. – С. 32–34.
319. Saeheng S. Chemical constituents and antioxidant activity of *Borussus flabellifer*, *Elaeis guineensis*, *Mimosa diplotricha* and *Mimosa pigra* / S. Saeheng, M. Wongnawa, Ch. Purintavaragul // Medicinal Chemistry & Drug Discovery. – 2012. – № 3 (1). – P. 52–57.
320. Kao Y.-T. Preliminary analyses of phenolic compounds and antioxidant activities in tea pollen extracts / Y.-T. Kao, M.-J. Lu, A.C. Chen // Jour. of Food and Drug Anal. – 2011. – Vol. 19, № 4. – P. 470–477.
321. Bogdanov S. Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review [Электронный ресурс] : Bee Product Science. – 2012. – 34 p. – Режим доступа : [http://issuu.com/apiariosilvestre/docs/pollen\\_production\\_\\_nutrition\\_and\\_he](http://issuu.com/apiariosilvestre/docs/pollen_production__nutrition_and_he).

322. Получение и характеристика антиоксидантной активности экстрактов *Iris domestica* и их отдельных компонентов / Н. А. Орешко, Н. А. Бовдей, П. А. Киселев [и др.] // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7, Ч. 1. – С. 228–237.

323. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды : метод. пос. по фармакогнозии / [Федосеева Г. М., Мирович В. М., Горячкина Е. Г., Переломова М. В.]. – Иркутск : Иркутский государственный медицинский университет, 2009. – 67 с.

324. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia / M. Kačániová, N. Vuković, R. Chlebo [et al.] // Arch. Biol. Sci., Belgrade. – 2012. – № 64 (3). – P. 927–934.

325. The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic / L. Vorlová, R. Karpíšková, I. Chabinioková [et al.] // Czech J. Anim. Sci. – 2005. – № 50 (8). – P. 376–384.

326. Parkman J. P. Beekeeping for extension agents: fundamentals, crop pollination and pest management / J. P. Parkman, J. A. Skinner. – Knoxville : The University of Tennessee Extension. – 12 p.

327. Botrytis Blight [Electronic resource] / Access : <http://plantclinic.cornell.edu/factsheets/botrytisblight.pdf>.

328. Álvarez B. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen / B. Álvarez, E. G. Biosca, M. M. López // Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. – 2010. – P. 267–279.

329. *Pseudomonas syringae* – diseases of fruit trees / M. M. Kennelly, F. M. Cazorla, A. de Vicente [et al.] // Plant Disease. – 2007. – Vol. 91, № 1. – P. 4–17.

330. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова – М. : Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.

331. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi [Electronic resource] / E. Dadachova, R. A.

Bryan, X. Huang [et al.] // PLOS ONE. – 2007. – № 2(5). – Access : doi:10.1371/journal.pone.0000457.

332. НАДФН-оксидаза растений / А. К. Глянько, А. А. Ищенко, Н. Б. Митанова, Г. Г. Васильева // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6–18.

333. Тотолян А. А. Клетки иммунной системы / А. А. Тотолян, И. С. Фрейдлин. – СПб. : Наука, 2000. – 231 с.

334. Нагоев Б. С. Лабораторное дело / Б. С. Нагоев, М. Г. Шубич. – К., 1981, №4. – С. 195–198.

335. Вплив водно-солевих витяжок із бруньок *Betula verrucosa* Ehrh. на функціональну активність фагоцитів / К. Гаркава, Л. Махиня, Т. Гавриш [та ін.] // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2009. – № 25-27. – С. 36–37.

336. Silverstein R. M. Spectrometric identification of organic compounds / Silverstein R. M., Bassler G. C., Morrill T. C. – New York : John Wiley and Sons, 1981. – 4th ed.

337. Analysis of Allergenic Pollen by FTIR Microspectroscopy / B. Zimmerman, V. Tafintseva, M. Bağcıoğlu [et al.] // Anal. Chem. – 2015. – № 88. – P. 803–811.

338. Detection of allergenic ingredients using real-time PCR: a case study on hazelnut (*Corylus avellana*) and soy (*Glycine max*) / C. Platteau, M. De Loose, B. De Meulenaer [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59, № 20. – P. 10803–10814.

339. Temporal and spatial expression of the major allergens in developing and germinating peanut seed / I. H. Kang, P. Srivastava, P. Ozias-Akins [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 144. – P. 836–845.

340. Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen / T. Midoro-Horiuti, R. M. Goldblum, A. Kurosky [et al.] // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164. – P. 2188–2192.

341. Hjelmroos M. Heterogeneity of pollen proteins within individual *Betula pendula* trees / M. Hjelmroos, M. J. Schumacher, M. Van Hage-Hamsten // Int Arch Allergy Immunol. – 1995. – № 108. – P. 368–376.
342. Buters J. Year-to-Year variation in release of Bet v 1 allergen from birch pollen: evidence for geographical differences between West and South Germany // J. Buters, A. Kasche, I. Weichenmeier [et al.] / Int. Arch. Allergy Immunol. – 2008. – № 145. – P. 122–130.
343. Roman A. Content of some trace elements in fresh honeybee pollen / A. Roman // Pol. J. Food Nutr. Sci. – 2007. – Vol. 57, № 4(C). – P. 475–478.
344. Колясникова Н. Л. Влияние аэротехногенного загрязнения на морфологические и эмбриологические признаки сосны обыкновенной / Н. Л. Колясникова, Т. Д. Карнажицкая, К. А. Паршакова // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о земле. – 2011. – № 2. – С. 31–35.
345. Назарова Н. П. Влияние токсичных соединений на медоносных пчел в условиях экологически кризисных районов Республики Татарстан / Н. П. Назарова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2009. – Т. 1, № 7. – С. 45–48.
346. Specific distribution of minerals in selected unifloral bee pollen / O. G. Stanciu, L. A. Marghitas, D. Dezmirean // Food Science and Technology Letters. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 27–31.
347. Pollen microbial colonization and food safety / J. Brindza, J. Gróf, K. Bacigálová [et al.] // Acta Chimica Slovaca. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 95–102.
348. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand / A. Chantarudee, P. Phuwapraisirisan, K. Kimura [et al.] // Complementary and Alternative Medicine. – 2012. – № 12(45). – P. 1–12.
349. Павлюченко И. И. Биохимические аспекты изучения бета-каротина («Каролина») / И. И. Павлюченко, А. А. Басов, А. Э. Моргоев [и др.] // Успехи современного естествознания : материалы конференции, 2009 г. : тезисы докл. – № 2. – С. 54–56.

350. Аллергенная флора и пыльца земного шара : Энциклопедия-атлас / С. Н. Куприянов, И. В. Галактионова, Е. С. Куприянова. – Ашгабат : Ылым, 1992. – 431 с.
351. Чигуряева А. А. Учебное пособие по палинологии / А. А. Чигуряева. – Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 1975. – Ч. 1. – 47 с.
352. Інформація щодо стану довкілля в смт. Бородянка Київської області за 2011-2013 р. : №зп-01-32/09 від 16.10.2013. – Офіц. док. – Бородянська селищна рада VI скликання Бородянського р-ну Київс. обл. – 1 с.
353. Кабата-Пендиас А. Микроэлементы в почвах и растениях: Пер. с англ. / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М. : Мир, 1989. – 439 с.
354. Особенности аккумуляции тяжелых металлов в медоносных пчелах различных временных генераций / Л. А. Скребнева, Ф. С. Билалов, М. Н. Мукминов [и др.] // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. – 2012. – Т. 154, кн. 1. – С. 133–145.
355. Фисинин В. Свойства и токсичность дезоксиниваленола (ДОНа). Микотоксины и антиоксиданты: непримиримая борьба / В. Фисинин, П. Сурай // Животноводство России. – 2012. – С. 11–14.
356. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье : 29 дек. 1984 г. № 3184-84 [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://docs.cntd.ru/document/1200058303>.
357. Мхитаров И. Стандарты микотоксинов [Электронный ресурс] / И. Мхитаров. – 2001. – Режим доступа : <http://www.sorbfil.com/mikotox.htm>.
358. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen / K. C. L. S. Oliveira, M. Moriya, R. A. B. Azedo [et al.] // Quim. Nova. – 2009. – Vol. 32, № 5. – P. 1099–1102.
359. Pereira de Melo I. L. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples / Illana Louise Pereira de Melo, Ligia Bicudo de Almeida-Muradian // Quim. Nova. – 2010. – Vol. 33, № 3. – P. 514–518.

360. Roulston T. H. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? / T. H. Roulston, J. H. Cane, S. L. Buchmann // *Ecological Monographs*. – 2000. – № 70. – P. 617–643.
361. Косаковская И. В. Стрессовые белки растений / И. В. Косаковская. – К. : Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного, 2008. – 154 с.
362. Заморуєва Л. Ф. Фізіолого-біохімічні характеристики білкового та ліпідного обмінів насіння клена та каштана з різних ділянок техногенного забруднення м. Дніпропетровська / Л. Ф. Заморуєва, І. О. Філонік // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. – 2005. – № 1. – С. 271–276.
363. Лаврова В. В. Жирнокислотный состав липидов листьев картофеля в условиях периодической и длительной гипотермии / В. В. Лаврова, М. И. Сысоева, Е. М. Матвеева // *Труды Карельского научного центра РАН*. – 2012. – № 2. – С. 91–96.
364. Віщур В. Я. Вміст важких металів, аніонних і неетерифікованих жирних кислот у пилку з кульбаби лікарської залежно від техногенного навантаження на довкілля [Електронний ресурс] / В. Я. Віщур // *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. Добавок*. – Режим доступу : [www.inenbiol.com/ntb/ntb7/61.pdf](http://www.inenbiol.com/ntb/ntb7/61.pdf).
365. Franiel I. Leaf fluctuating asymmetry of *Betula pendula* Roth. as an indicator of environment quality / I. Franiel, A. Błocka // *Air Pollution and Climate Change at Contrasting Altitude and Latitude : 23rd IUFRO Conference for Specialists in Air Pollution and Climate Change Effects on Forest Ecosystems, 7-12 Sept 2008 : Abstracts*. – Murten, Switzerland, 2008. – P. 27.
366. Zhelev P. Variation in a silver birch locality near Ardino (Eastern Rhodopes) / P. Zhelev, V. Angelov // *Forestry ideas*. – 2012. – Vol. 18, № 2(44). – P. 125–131.
367. Гавриков Д. Е. Методика оценки стабильности развития на примере березы (*Betula pendula*) / Д. Е. Гавриков, С. Г. Баранов // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2006. – № 2 (48). – С. 13–17.

368. Захаров В. М. Оценка стабильности развития березы в разных частях ареала / В. М. Захаров, Ф. Н. Шкиль, Н. Г. Кряжева // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Серия: биология. – 2005. – № 1. – С. 77–84.

369. Татьяна Баранова. Цитозкологические исследования березы повислой (*Betula pendula* Roth). Практическое руководство / Татьяна Баранова. – LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 100 с.

370. Ерещенко О. В. Оценка экологического состояния городской среды с использованием березы повислой (на примере г. Барнаула) [Электронный ресурс] / О. В. Ерещенко // Исследования в области естественных наук. – 2012. – Режим доступа : <http://science.snauka.ru/2012/04/289>.

371. Гандалипова Э. И. Качественный и количественный состав пыльцы в атмосфере г. Уфы : автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаника» / Э. И. Гандалипова. – Уфа, 2003. – 19 с.

372. Сенькевич Е. В. Цитогенетика сосны обыкновенной и березы повислой в районе Нововоронежской АЭС в связи с вопросами оценки загрязнения окружающей среды : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.16 «Экология» / Е. В. Сенькевич. – Воронеж, 2007. – 24 с.

373. Чупахина Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений: Монография. – Калининград : Калинингр. ун-т., 1997. – 120 с.

374. Общие санитарные правила при работе с метанолом : № 4132-86. – [Действующий от 1986-07-18]. – СССР, 1986. – 7 с.

375. Ключников С. О. Клинико-иммунологические обоснования целесообразности применения  $\beta$ -каротина у детей дошкольного возраста / С. О. Ключников, А. П. Продеус, И. А. Снимщикова // Вопросы современной педиатрии. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 22–26.

376. UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels / J.



Rozema, R.A. Broekman, P. Blokker [et al.] // Photochem Photobiol B. – 2001. – № 62 (1-2). – P. 108–117.

377. Позняк С. С. Оценка аккумуляции тяжелых металлов и образования антиоксидантных веществ в растениях Беларуси / С. С. Позняк, Ю. В. Жильцова, Ч. А. Романовский // Труды БГУ. – 2010. – Т. 5, Ч. 1. – С. 89–93.

378. Губанков С. Г. Изучение аллергенных пылевых зерен с помощью сканирующего электронного микроскопа / С. Г. Губанков // Доклад АН СССР, 1997. – Т. 232, № 5. – С. 1222–1224.

379. Welten W. Pollenanalytische, stratigraphische und geochronologische Untersuchungen aus dem Faulenseenioss bei Spiez / W. Welten. – Zurich : Veröff. geobot. Inst., 1944. – 201 p.

380. Покровская И. М. Пыльцевой анализ / И. М. Покровская. – М. : Госгеолтехиздат, 1950. – 572 с.

381. Eneroth O. Undersökning rörande moljigheter att 1 fossitt material vrskilja de olika *Betula* arternas pollen / O. Eneroth // Geol. För. Stockh. Förh. – 1951. – № 73. – 343 p.

382. Koperowa W. Pleniglacial deposits of the Last glaciation at Zator (West of Krakow) / W. Koperowa, A. Srodon. – Cracov : Acta. Palaeobot., 1965.

383. Birks H. J. B. The identification of *Betula nana* pollen / H. J. B. Birks // New Phytol. – 1968. – № 67. – P. 309–314.

384. Chira E. Metody cytogenetiky v šľachtení lesných drevín / Eugen Chira. – Bratislava : Vydavateľstvo Príroda, 1971. – 111 p.

385. Курманов Р. Г. Палинология: учебное пособие / Р. Г. Курманов, А. Р. Ишбирдин. – Уфа : РИЦ БашГУ, 2012. – 92 с.

386. Ostrolycká M. G. Biológia samčích reprodukčných orgánov druhov rodu *Quercus* L. / M. G. Ostrolycká, M. Križo. – Bratislava : VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 1989. – 126 s.

387. Елькина Н. А. Состав и динамика пылевого спектра воздушной среды г. Петрозаводска : автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук. : спец. 03.00.16 «Экология» / Н. А. Елькина. – Спб., 2008. – 25 с.

388. Rahman M. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms / M. Rahman, Z. K. Punja // *Plant Physiol. Biochem.* – 2005. – Vol. 43, № 12. – P. 1103–1114.

389. Червяковский Е. М. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов / Е. М. Червяковский, В. П. Курченко, В. А. Костюк // *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.* – 2009. – Т 4., Ч. 1. – С. 9–26.

Додаток А

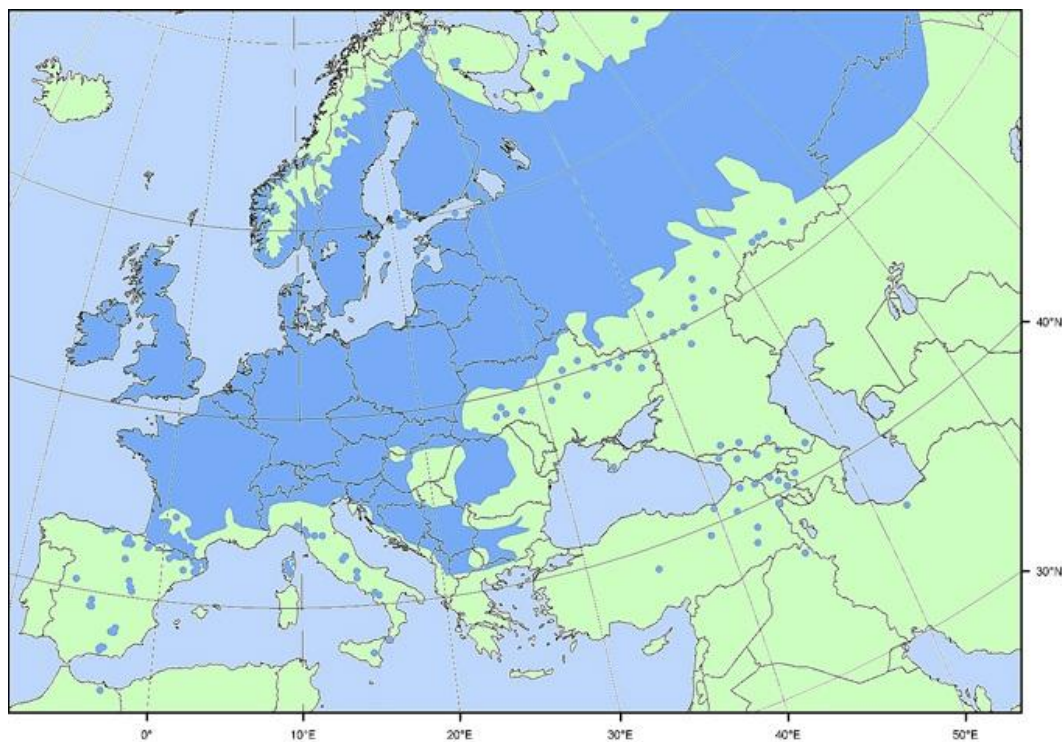


Рис. А.1 Карта поширення *Betula pendula* EUFORGEN 2009  
([www.euforgen.org](http://www.euforgen.org))

# Продовження додатку А

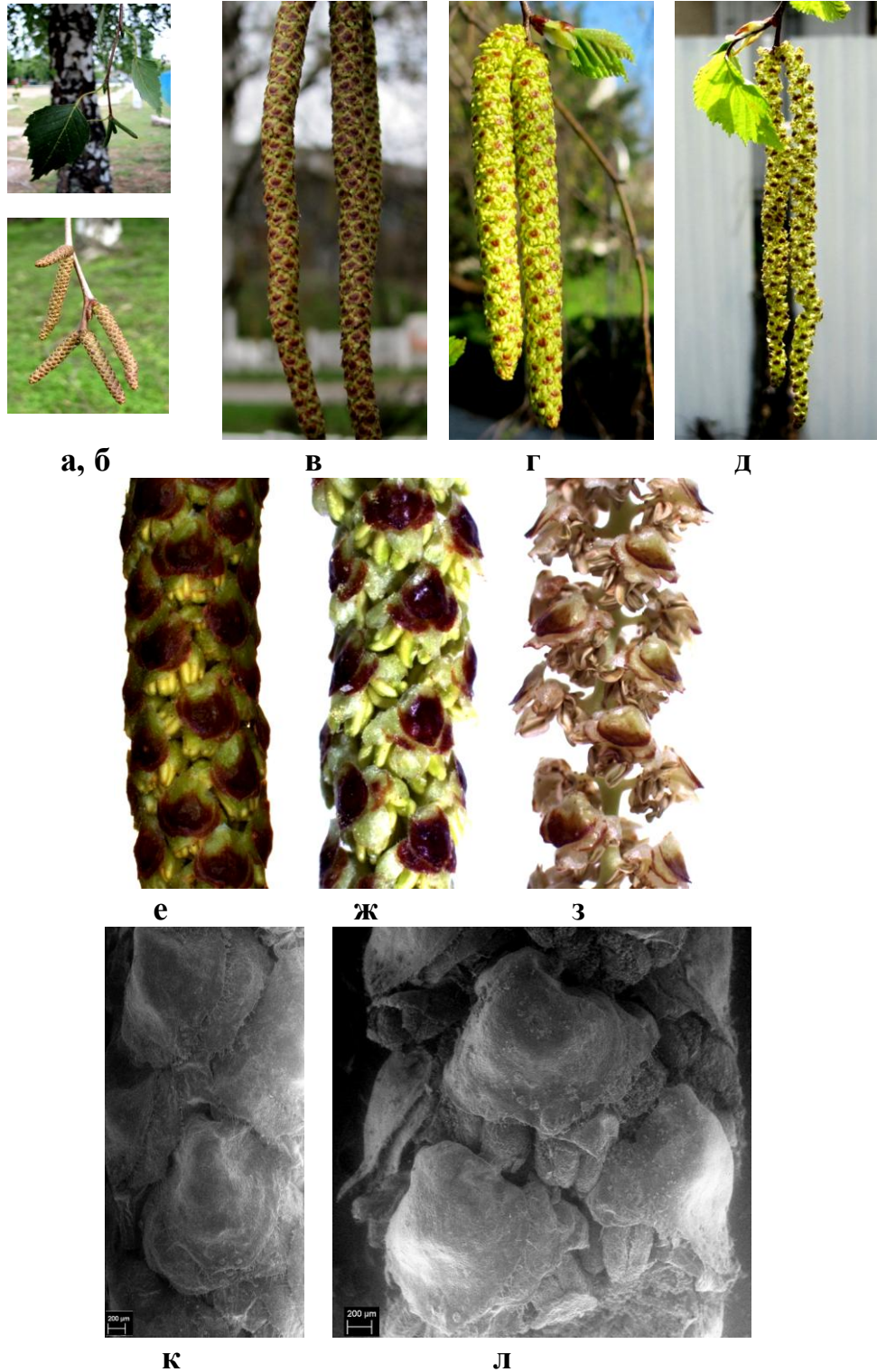


Рис. А.2.1 Чоловічі суцвіття *Betula verrucosa* Ehrh. на різних стадіях дозрівання та при різних збільшеннях: 1. Цифрова камера Canon Power Shot SX120: а – перед зимуванням, серпень; б – після зимування, березень; в – під час дозрівання пилку; г – під час цвітіння; д – після цвітіння 2. Макрофото Zeiss Discovery V12. Збільшення в 5,4 рази: е – незріле; ж – зріле; з – перезріле 3. Скануючий електронний мікроскоп Zeiss Evo LS 15: к – незріле; л – зріле (Фото: Шевцова Т., Оравець А., Мотильова С.)

Продовження додатку А



Рис. А.2.2 Тичинкова сережка *Betula verrucosa* Ehrh. в розрізі. Макрофото Zeiss Discovery V12: *а* – поздовжній розріз сережки; *б* – тичинки, оточені зрощеними лопатевими листочками оцвітини; *в* – пиляки  
(Фото: Оравець А., Шевцова Т., 2012, 2013)

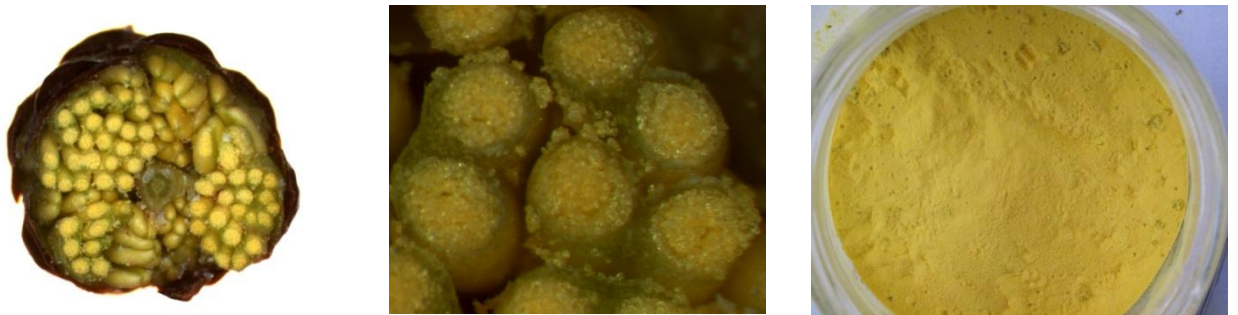


Рис. А.2.3 Зрілий пилок *Betula verrucosa* Ehrh.: *а, б* – макрофото пилку в пиляках, поперечний зріз,  $\times 10,2$ ;  $\times 62,0$  відповідно; *в* – сухий заготовлений пилок, цифрове фото  
(Фото: Оравець А., Шевцова Т., 2011, 2013)



### А.3 Морфологія пилкових зерен *Betula verrucosa* Ehrh.

Ряд авторів наводять морфологічний опис ПЗ ББ, починаючи від первинного примітивного у роботах J. Jentys-Szaferowa (1928), G. Erdtman (1943) до сучасного з використанням скануючої електронної мікроскопії (СЕМ), наприклад, S. Blackmore [137, 221-223]. Пилок ББ представлений поодинокими ПЗ (рис. А.3.1 а, б). У контурі з полюса округло-3-кутові або майже округлі з виступаючими порами, з екватора – широкоеліптичні. ПЗ дрібні, ізоплярні (проксимальна і дистальна сторони екзини однакові), за формою – сфероїдальні. Форма сухих ПЗ нерегулярна, вид зерен безформенний з нерівномірно утвореними складками, але впадини є тільки між апертурами (рис. А.3.2 а, б).

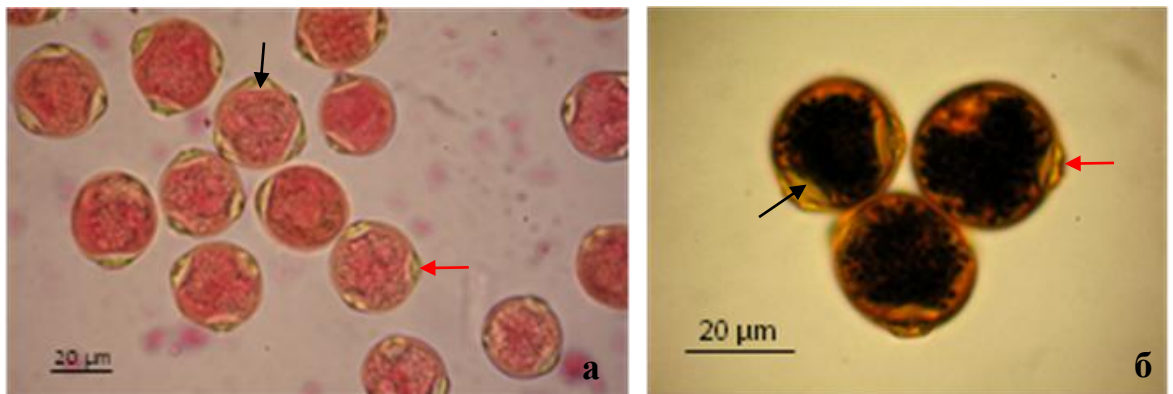


Рис. А.3.1 Пилкові зерна *Betula verrucosa* Ehrh. Мікроскоп Carl Zeiss Axiostar plus: а – забарвлені ацетокарміном; б – забарвлені розчином йоду  
(Фото: Шевцова Т., 2013)

Довжина полярної осі (Р) 17,0-24,0 мкм [224], 21,0-25,0 мкм [16], довжина екватора – 22,0-28,0 мкм [224], 18-28 мкм [225], 22,0-25,0 мкм [16], 25,2-27,0 мкм [18], 22-26 мкм [226]; співвідношення Р/Е (індекс форми) – 0,72-0,88. Пори слабо виступають над загальною поверхнею зерен (рис. А.3.1 червона стрілка), вузькокамерні, щілиноподібні; розміщені вздовж екватора; отвір пор кільцеподібний (рис. А.3.2 в).

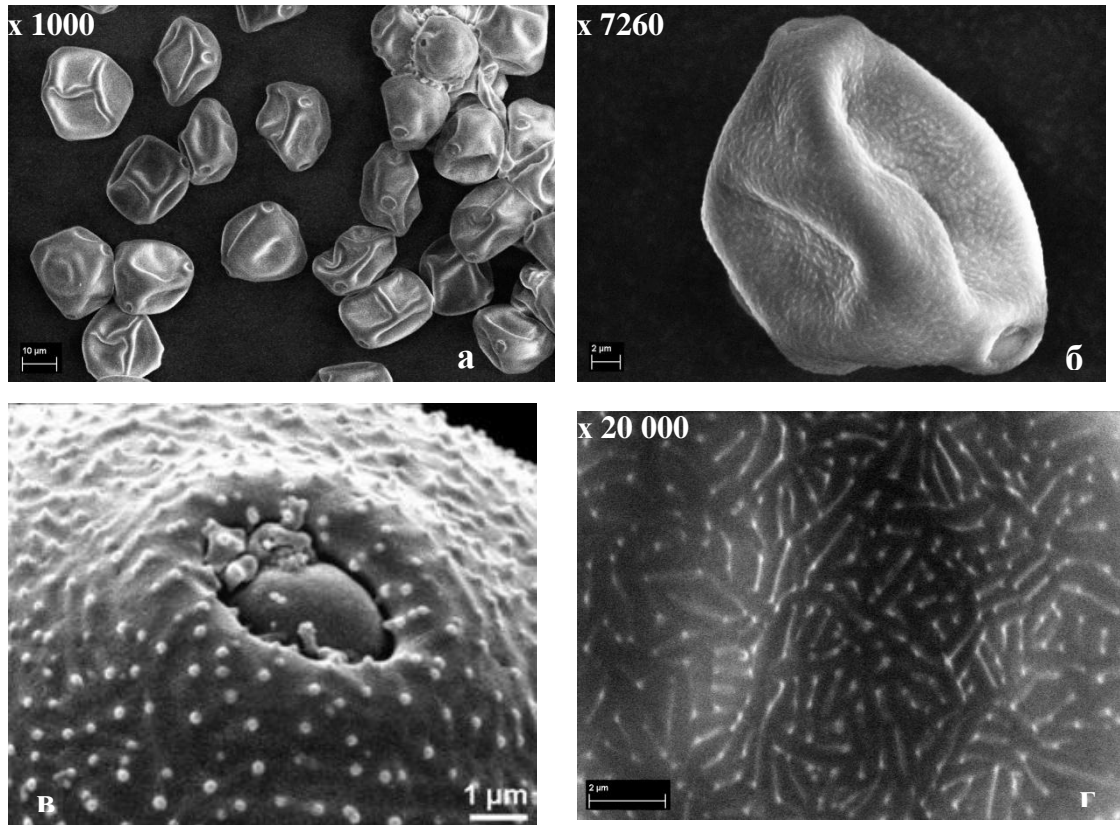


Рис. А.3.2 Мікрофото пилових зерен *Betula verrucosa* Ehrh. Скануючий електронний мікроскоп Zeiss Evo LS 15: *а* – сухі пилові зерна; *б* – впадина між апертурами; *в* – апертура, джерело PalDat; *г* – деталі скульптури (Фото *а*, *б*, *г*: Островський Р., Мотильова С., Шевцова Т., 2011, 2013)

Пора ектоапертури більш-менш округла, трохи еліптична, краї гладкі та роздільні, з окремими помітно виступаючими потовщеннями екзини навколо пори. Ендоапертура подібна діаметром до ектопори. Потовщення екзини навколо пори – чітко виступаючі. Екзина злегка сітчаста, тонка, товщиною 0,8-1,4 мкм, за даними О. В. Усовик – 1,7-2,0 мкм. Секзина (від *с* – скульптурна і екзина) – зовнішня частина екзини, забезпечена скульптурними прикрасами, в три рази товстіша, ніж некзина (від *н* – не маюча скульптури і екзина). Секзина 1 представлена короткими паличкоподібними елементами, які не завжди видно під світловим мікроскопом. Секзина 2 – тектум, в два рази товстіший, ніж секзина 1. Секзина 3 складається з елементів по краях, розмір яких не перевищує 1 мкм (видно за допомогою СЕМ або з імерсією). Інтина

збільшується внизу пори, утворюючи дрібні лінзовидні структури під апертурами – онкус (onci) (рис. А.3.1 чорна стрілка). Для сухих ПЗ характерний дуже потужний тектум (товстий дахоподібний покрив). Роздивляючись зерна за допомогою світлової мікроскопії, скульптуру видно з гладкою поверхнею, а за допомогою СЕМ – вона дуже дрібна, горбкувата або неясно кутасто-зморшкувата (рис. А.3.2 в, г). Елементи скульптури короткі та конічні. Колумелла кругова, часто в нерівномірних, коротких рядах, які рівняються з краями. Ендекзина відсутня, інтина стандартна. Колір зерен жовтуватий [16, 18, 225-228].



**Характеристика клімато-географічних умов, рослинності, екологічного стану та метеоумов місць відбору пилку в роки досліджень**

До уваги були взяті клімато-географічні умови, рослинність, екологічний стан довкілля, метеорологічні умови у роки і місяці формування та дозрівання ПЗ, відомі дані про стан захворювання населення на алергічні хвороби.

**Природне розташування.** Територія України досить велика і займає 3 фізико-географічні зони (лісову, лісостепову, степову, в Карпатах і Кримських горах – висотну поясну), в яких є різні фітоценози з різними видами алергенної флори [11, 54, 245]. Кожне місто України має неповторне геокліматичне положення [95]. Структура пилкової сенсibiliзації тісно пов'язана з ботаніко-географічними та природно-кліматичними умовами [51].

Рівненська область та північна частина Київської області (в тому числі смт. Іванків і смт. Бородянка) знаходяться в зоні мішаних лісів, або Полісся, де природну рослинність складають лісові, лучні і болотні види. Місто Кузнецовськ розташоване на північному заході Рівненської області, зоні Волинського полісся та правому березі річки Стир [246]. Місто Переяслав-Хмельницький та с. Хоцьки відносяться до лісостепової зони з переважанням широколистяних лісів, головним чином дібров [247]. Місто Київ розташоване на двох фізико-географічних зонах: лісостеповій та зоні мішаних лісів. Північна частина міста розташована на Поліській низовині, південно-західна (правобережна) – на Придніпровській височині, південно-східна (лівобережна) – на Придніпровській низовині, чим і зумовлена своєрідність і різноманітність природних умов міста [248].

Словаччина – типова внутрішньоконтинентальна країна Центральної Європи. Третина території Словаччини – це гірські райони, покриті широколистяними та змішаними (на південних схилах) і хвойними (на північних схилах) лісами. У природному відношенні Словаччина поділяється на

три провінції: Західні Карпати, Східні Карпати, Дунайська рівнина. Більша частина міста Нітра розташована в долині річки Нітра в Дунайській низовині, менша – біля підніжжя гори Zobor (587 м). Така подвійність розташування на кордоні низовини та пагорбів є характерною особливістю міста [242]. Ботанічний сад САУ знаходиться на території міста.

**Клімат.** Клімат м. Кузнецовськ характеризується м'якою зимою, вологою весною і осінню, відносно вологим і дощовим літом. Середньорічна кількість опадів – 600-700 мм. Зима настає наприкінці листопада, а стійкий сніговий покрив утворюється в останні дні грудня – першій декаді січня. Літо, що приходить наприкінці травня, триває до вересня. Це період найвищих температур повітря і ґрунту, опадів, дозрівання врожаю. Ясна, прохолодна ранньоосіння погода встановлюється на початку вересня [249, 250].

Клімат Київської області помірно континентальний, м'який з достатньою кількістю вологи. Місто Київ характеризується досить комфортним, помірно континентальним кліматом з теплим літом і м'якою зимою, оптимальною є зволоженість [248]. Взимку у Києві утворюється сніговий покрив, середня висота покриву у лютому 20 см, максимальна – 440 см. Середньорічна загальна хмарність – 6,4 бали, максимум припадає на грудень (8,2), мінімум – на серпень (4,8). Середня вологість повітря – від 64 % (травень) до 85 % (листопад) [251].

Місто Нітра розташоване в північно помірній зоні і має континентальний клімат з чотирма чітко вираженими сезонами. Воно характеризується значною зміною між жарким літом і холодною, сніжною зимою. Місто розташоване в самій теплій і сухій частині Словаччини [242]. Максимальна кількість опадів становить 660 мм. Середньорічні температури цього регіону лежать в діапазоні 10 °С. Найтеплішим місяцем є, як правило, липень, іноді червень або серпень. Прихід весни у місті раптовий. Температурні максимуми, близько 15 °С, встановлюються вже у березні. Літо тепле, дні з максимумом понад 30 °С часті. Осінь суха, зима м'яка з легким снігопадом. Морози бувають рідко. Місто Нітра цілком вітряне [252].

**Ґрунти та рослинність.** Ґрунтовий покрив Рівненської області неоднорідний. Найбільш поширені дерново-підзолисті, опідзолені, дернові, торфові та торфоболотні ґрунти. У рослинному покриві області переважають ліси та інші лісовкриті площі. На Поліссі найбільш поширені соснові та сосново-дубові ліси. У природному складі деревної рослинності переважають сосна (69 % лісовкритої площі), дуб звичайний (10 %), береза (10 %) та вільха чорна (8 %). Інші породи (граб, осика, ясен, ялина тощо) займають незначні площі [249].

Ґрунтовий покрив м. Київ є вельми строкатим, зважаючи на різноманітність природних умов. Властиві дерново-підзолисті ґрунти, чорноземи, темно-сірі лісові ґрунти [253].

У м. Переяслав-Хмельницький переважають дерново-прихованопідзолисті та дерново-слабопідзолисті ґрунти (на борових терасах річок). У заплавах на алювіальних відкладах формуються лучні та чорноземно-лучні ґрунти, зустрічаються типові чорноземи, лучно-чорноземні глибоковилуговані ґрунти, торфовища [254].

В Національній доповіді про стан НПС в Україні у 2010 році ґрунти в зоні вуличних деревних насаджень незалежно від розташування дерев мають усі ознаки специфічних трансформованих чорноземів і належать до малогумусних (1,1-2,95 %), концентрація органічного азоту (4,2-11,72 мг/100 г) за нормативними оцінками є вдвічі нижчою за оптимальну [255].

Природна рослинність північної частини Київської області представлена великими масивами хвойних і змішаних лісів (поширені ліси головним чином з сосни з домішкою берези і дуба, а також вільхи та ін.); південної частини – широколистяними лісами (невеликі ліси з дуба, граба, липи), чагарниками і луками [256]. Посіви на території області, в основному, складаються з численних злакових (грязниці збірної, костриці лучної, пажитнику багаторічного, пирію повзучого, стоколосу прямого, тимофіївки лучної, а в останній час приєднується ще й пилок амброзії з маревних (лобода), складноквітові (кульбаба, полинь гірка, соняшник). Широке розповсюдження

зазнали кропива, подорожник великий та щавель кінський, тому що багато земель погано, а в багатьох випадках і зовсім не обробляються. Суттєву роль у формуванні аеропалінологічної ситуації грають також рослини міського фітоценозу [13, 51].

В Словацькій республіці частка лісів є відносно високою порівняно з іншими країнами Центральної та Східної Європи. У 2011 році площа земель лісового фонду становила 40% від загальної площі земель, з них 60,2% покриті листяними породами. ББ в країні аборигенний вид [257], поширений як у лісових, так і місцевих насадженнях. Загальний обсяг беріз становить 1,4% і займає площу 27,9 тис. га [258, 259], що дозволяє березі бути тільки на сьомому місці серед листяних порід. У Нітранському краї площа лісів займає 16% території, береза входить до складу 43,4% видового складу листяних порід краю [258]. Присутність виду ББ у м. Нітра підтверджено роботами ряду авторів: Kollár (2007), Pastirčáková, Pastirčák (2010), Hečková *et al.* (2013) [252, 257, 260], а обрані нами дерева ідентифіковано проф. кафедри ботаніки САУ Т. Баранцем. В ботанічному саду САУ даний вид зазначено.

**Стан захворюваності населення.** Ситуація з АЗ в Україні є вивченою недостатньо. Екстраполюючи дані поодиноких вітчизняних досліджень в різних регіонах України, можна вважати, що на АЗ страждає близько 25% населення України, в тому числі на поліноз – 4-8% (Пухлик Б. М., 2014) [261]. В Києві та області полінози складають 31% від рівня усіх АЗ та 65% від загальної кількості хворих з алергічним ринітом за даними на 2011 р. [51].

Стосовно Рівненської області відомо, що захворюваність на алергічний риніт у 2007 році була однією з найвищих серед областей України і становила 155,8 на 100 тис. дорослого населення, а в Києві – 175,8 відповідно [11]. Поширеність хвороб органів дихання знаходиться на другому місці у Рівненській області і складала у 2010 році 376,5 випадків на 1000 осіб, у 2011 році – 357,2 і 350,1 у 2012 році, залишаючись високою [249, 262, 263]. Погіршення екологічної обстановки в області безпосередньо впливає на

зростання кількості людей, що страждають від алергій, хвороб систем кровообігу та онкологічних захворювань [262].

На сьогодні існує європейська мережа пилкової інформаційної служби з центром у Відні (Європейська алергенна мережа (EAN) «Polleninfo» (<https://www.polleninfo.org>)). Представником EAN в Україні є д.б.н., доц. Родінкова В. В., а центром – міста Вінниця та Запоріжжя. Словацька республіка, хоча і є членом EAN, але всю актуальну інформацію про ПЗ в повітрі по регіонах Словаччини працівники служб розміщують на сайті <http://www.alergia.sk> згідно даних шести моніторингових станцій (Banská Bystrica, Bratislava, Trnava, Nitra, Košice i Žilina) [264, 265].

Щодо кількості хворих на АЗ серед населення країн, то лише в Європейській базі даних ЗДВ (HFA-DB) наведено загальну кількість захворювань органів дихання серед українського та словацького населення. Порівняння цих показників для України та Словаччини наведено на рис. Б.1.1 і Б.1.2 (дані на сайті оновлено в квітні 2014 р.).



Рис. Б.1.1 Статистика захворювань органів дихання на 100 тис. населення в Україні (1981-2012 рр.) та Словаччині (1971-2010 рр.) за даними Європейської бази даних ЗДВ

З рис. Б.1.1 зрозуміло, що для Словацької республіки за 39-річний період характерна нерівномірна тенденція зростання і зменшення захворювань органів дихання і, починаючи з 2008 р., кількість хворих поступово зростала. В Україні

хоч і аналізувався коротший період часу, але строкатість даних не така чітка і, починаючи з 2006 р., кількість хворих постійно зменшується. Хоча протилежна тенденція спостерігається зі стаціонарними хворими (рис. Б.1.2) [266].



Рис. Б.1.2 Статистика стаціонарних хворих із захворюваннями органів дихання на 100 тис. населення в Україні (1980-2010 рр.) та Словаччині (1991-2010 рр.) за даними Європейської бази даних ЗДВ

Дані на рис. Б.1.1 Б.1.2, відсутність інформації стосовно кількості хворих АЗ, поширення ББ в країні, визнання її пилку агресивним [267] і власні дослідження цього питання під час стажування в м. Нітра наводять на висновок, що на території Словацької республіки ситуація з АЗ також є актуальною та такою, що потребує вивчення.

**Екологічний стан довкілля пунктів досліджень.** Звітні дані наведені за 2010 р. – рік формування пилку, – та за 2011 р. – рік збору пилку на території України. Для Словацької республіки це 2012 і 2013 роки відповідно.

**Місто Кузнецовськ, Рівненська область.** Рівненщина відноситься до регіонів України з помірним рівнем забруднення довкілля, але з помітно вираженою тенденцією до зростання техногенного навантаження на нього. Основний внесок у забруднення довкілля області припадає на хімічну, деревообробну промисловість, промисловість будівельних матеріалів, машинобудування, виробництво тепла та житлово-комунальне господарство. Всі складові довкілля області зазнають антропогенного навантаження, що

супроводжується збільшенням обсягів викидів в атмосферу та скидів у поверхневі водні об'єкти зворотних вод підприємств, накопиченням відходів усіх класів небезпеки.

*Стан забруднення атмосфери.* До основних підприємств м. Кузнецовськ, що здійснювали викиди в атмосферне повітря протягом 2011-2012 рр. відносяться: ВП «Рівненська АЕС» ДП НАЕК «Енергоатом»; ПАТ «Кузнецовський хлібозавод»; ДП Західно-Українське монтажне управління ПАТ «Південтеплоенергомонтаж»; ПАТ «Укрнафта», АЗС №17/033; ТзОВ фірма «Журавлина», АЗС №5; ТзОВ «Норд ЛТД», АЗС №12; ДП «Кузнецовськенергозахист» ВАТ «Укренергозахист». На ВП «Рівненська АЕС» питання екологічної безпеки стоїть в числі пріоритетів у роботі. Тут налагоджена та діє система контролю за станом НПС, дотримання допустимих норм скидів та викидів. Вміст радіоактивних речовин, що потрапили назовні в результаті роботи електростанції набагато нижчий від допустимих значень. За даними інструментально-лабораторного контролю, проведеного на ВП «Рівненська АЕС», перевищень ГДВ забруднюючих речовин не виявлено [246, 250].

У місті відмічаються одні з найбільших концентрацій забруднюючих речовин від пересувних джерел через найбільше скупчення автотранспорту [249]. Викиди від стаціонарних джерел забруднення (підприємств) та пересувних джерел наведено в табл. Б.1.1 та Б.1.2 [246, 249, 250, 262].

Таблиця Б.1.1

Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення в м. Кузнецовськ

Рік	Обсяг викидів всього, т	Щільність викидів на 1 особу, кг	Щільність викидів на 1 км <sup>2</sup> площі, кг
2010	24,5	0,6	8161,3
2011	32,8	0,8	10889,7
2012	40,1	1,0	13361,3

Таблиця Б.1.2

Динаміка викидів в атмосферне повітря м. Кузнецовськ, в тому числі за найпоширенішими речовинами (пил, діоксид сірки, діоксид азоту, оксид вуглецю), тис. т

Рік	Стаціонарні джерела					Пересувні джерела
	Разом	в т.ч.				
		Пил	Діоксид сірки	Діоксид азоту	Оксид вуглецю	
2010	0,02	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4
2011	0,03	0,003	0,002	0,006	0,003	1,4
2012	0,04	0,004	0,001	0,006	0,003	1,4

*Стан забруднення ґрунтів.* Протягом 2011 року контролювався вміст забруднюючих речовин в ґрунті навколо полігону твердих побутових відходів, який знаходиться на відстані 5 км від житлової зони та промислових і будівельних відходів. Відмічено перевищення вмісту ВМ: нікелю в 1,5 та 1,3 ГДК відповідно, міді в 2,5 та 3 ГДК, кадмію в 2,3 та 4,3 рази до фону; лише на території полігону ТПВ – свинцю в 1,4 ГДК, заліза в 2 рази до фону. Крім того, протягом року відбирали проби ґрунту на території РАЕС, де відмічено перевищення за залізом в 2,8 рази та кадмієм в 1,2 рази до фону [250].

Рівненська атомна електростанція розташована в північно-західній частині області (Володимирецький район) на правому березі р. Стир, приблизно за 80 км від обласних центрів м. Рівне та м. Луцьк. Рівненська АЕС є відокремленим підрозділом Державного підприємства «Національна атомна енергогенеруюча компанія «Енергоатом» і спроектована як шестиблочна станція. Нині РАЕС експлуатує 4 енергетичні блоки з ядерними реакторами ВВЕР-440 та ВВЕР-1000. В процесі виробничої діяльності ВП «Рівненська АЕС» здійснює викиди найбільш поширених забруднюючих речовин – оксид вуглецю, речовини у вигляді суспендованих твердих частинок, діоксид та інші сполуки сірки, сполуки азоту, метали та їх сполуки, неметанові леткі органічні сполуки, фтор та його сполуки, хлор та його сполуки, фреони, емульсол.



Потенційний обсяг викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря від ВП «Рівненська АЕС» складає 86,2 т в рік [249].

*Радіаційна обстановка* в районі РАЕС протягом 2011 року залишалась незмінною і характеризувалась значеннями радіаційних параметрів, що не перевищують «нульовий фон» [249]. У 2012 р. відбулось 4 порушення в роботі РАЕС, які класифікуються за шкалою INES як «нижче шкали/рівень 0» [262]. В зоні спостереження ВП «Рівненська АЕС» відбираються проби ґрунту, рослинності і основного біологічного індикатора – хвої дерев в 22 контрольних пунктах; сільськогосподарської продукції (молоко, овочі та зерно) в 12 населених пунктах. Результати вимірювань питомої активності  $^{137}\text{Cs}$  в ґрунті, рослинності та хвої наведена в табл. Б.1.3.

Таблиця Б.1.3

Питома активність  $^{137}\text{Cs}$  в пробах ґрунті, рослинності та хвої в зоні спостережень РАЕС

Рік	Ґрунт, Бк/м <sup>2</sup>	Рослинність, Бк/кг	Хвоя, Бк/кг
2010	8620	12,20	27,4
2011	10300	3,25	10,70
2012	6080	9,58	0,62

Район розміщення РАЕС характеризується розповсюдженням торф'яно-болотних і дерново-підзолистих ґрунтів, сформованих на пісках. Тому, для таких типів ґрунтів характерне легко доступне потрапляння радіонукліду  $^{137}\text{Cs}$  з повітря в ґрунт і рослини. Дерново-підзолисті ґрунти мають здатність до найбільшої рухливості цього радіонукліду в системі «ґрунт-розчин». Характерна значна неоднорідність забруднення ґрунтового покриву та рослинності в зоні спостереження РАЕС. У всіх пробах рослинності активність техногенних радіонуклідів менша за мінімальну допустиму активність [249, 262, 263].

Рівненщина залишається однією з найбільш постраждалих від наслідків Чорнобильської катастрофи. Радіацією уражено понад 11 тис. км<sup>2</sup> території, або 56 % від загальної площі області [249, 262].

Отже, в м. Кузнецовськ ведеться контроль за основними показниками забруднення НПС. Основним забруднювачем є автотранспорт. Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення за 2010-2012 рр. збільшувались, динаміка викидів основних забруднюючих речовин залишалась сталою протягом вказаного періоду. Відмічено перевищення вмісту ВМ: нікелю, міді, кадмію, свинцю. Радіаційні параметри не перевищують «нульовий фон».

**Місто Київ і Київська область.** Основними забруднювачами повітря Київської області є підприємства-виробники електроенергії, газу та води (85% від загального обсягу викидів від стаціонарних джерел забруднення), діяльності транспорту та зв'язку (8%) та підприємства переробної промисловості (4%). Від роботи двигунів пересувних джерел забруднення у 2011 р. в повітря надійшло 165 тис. т забруднюючих речовин. Основними токсичними інгредієнтами, якими забруднювалось повітря під час експлуатації транспортних засобів та виробничої техніки, були: оксид вуглецю (133,0 тис. т, або 74,5%), неметанові леткі органічні сполуки (20,5 тис. т, або 11,5%), діоксид азоту (20,0 тис. т, або 11,2%) [247]. Динаміка викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря районів і міст Київської області наведено в табл. Б.1.4 та на рис. Б.1.3 і Б.1.4 [247, 268].

Таблиця Б.1.4

Динаміка викидів забруднюючих речовин в атмосферне повітря в  
Київській області по районах і містах

Рік	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря, т				
	Бородянський район	Іванківський район	П.-Хмельницький район	м. П.-Хмельницький	м. Київ
2010	4553	2972	3285	2060	265300
2011	4461	2839	3275	2009	254500
2012	4695	3029	3550	2165	259200
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря у розрахунку на км <sup>2</sup> , т				
2010	4,9	0,8	2,3	66,4	331,6
2011	4,8	0,8	2,2	64,8	318,1

Продовження табл. Б.1.4

2012	5,0	0,8	2,4	69,8	324,0
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря у розрахунку на 1 особу, кг				
2010	79,8	94,7	108,3	73,2	94
2011	78,1	91,3	109,6	71,9	–
2012	81,9	98,3	120,3	77,5	–
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення, т				
2010	263	32	17	43	28600
2011	265	6	17	58	33300
2012	300	23	140	70	32900
	Викиди діоксиду вуглецю в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення, тис. т				
2012	9,3	0,2	8,4	13,8	7,1
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення у розрахунку на км <sup>2</sup> , кг				
2010	300	0	0	1400	–
2011	300	0	0	1900	–
2012	300	0	100	2300	–
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення у розрахунку на 1 особу, кг				
2010	4,6	1,0	0,6	1,5	–
2011	4,6	0,2	0,6	2,1	–
2012	5,2	0,7	4,7	2,5	–
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від пересувних джерел, т				
2010	4290	2940	3268	2017	236700
2011	4196	2834	3257	1951	221200
2012	4395	3007	3410	2094	226300
	Викиди діоксиду вуглецю в атмосферне повітря від пересувних джерел забруднення, тис. т				
2012	46,9	32,7	45,6	21,3	2700
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від автотранспорту, т				
2010	4262	2885	2971	2002	229200
2011	4158	2759	2936	1932	212600
2012	4358	2913	3041	2078	–

Примітка: – дані не зазначено у джерелі

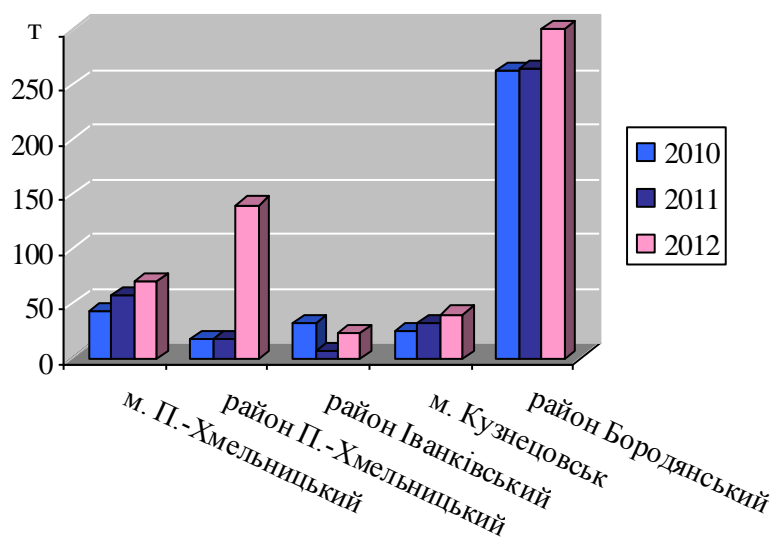


Рис. Б.1.3 Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення

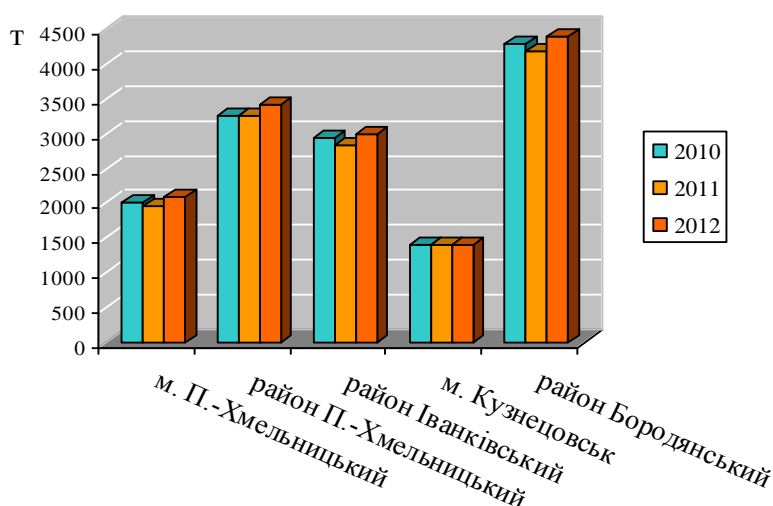


Рис. Б.1.4 Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від пересувних джерел

Основними забруднювачами атмосферного повітря м. Київ є пересувні джерела, серед них на першому місці знаходиться автотранспорт (96 %). Основні зони забруднення повітря зосереджуються в місцях, що прилягають до автомагістралей та в місцях концентрації промислових підприємств [251]. Обсяги викидів від автотранспорту обумовлені збільшенням кількості автотранспорту в місті за рахунок транспортних засобів населення, погіршенням технічного стану автомобільного парку автотранспортних підприємств, незадовільною якістю палива та недостатньо розвиненою

законодавчою та юридичною базою у галузі ефективного управління автотранспортом. Це ставить дану проблему на провідне місце серед екологічних проблем м. Київ [248]. Другорядну роль відіграють стаціонарні джерела викидів забруднюючих речовин (див. табл. Б.1.4): підприємства енергетичного комплексу, а також підприємства будівельної індустрії, машинобудівної, хіміко-фармацевтичної та харчової промисловості. Місто Київ має потужний промисловий комплекс різногалузевих підприємств, подекуди з неудосконаленими енерговитратними та ресурсовитратними технологіями без належної очистки викидів [248, 251].

Для м. Київ, порівняно з іншими пунктами досліджень і навіть районами, викиди більші в 100-1000 разів, тому їх динаміку відображено на окремому графіку (рис. Б.1.5). Значення індексу забруднення атмосфери у 2010 р. – 7,4 (високий рівень забруднення), у 2011 р. – 6,8 (підвищений рівень забруднення). В цілому по м. Київ перевищення середньодобових гранично допустимих концентрацій спостерігалось з формальдегіду у 2,7 рази та з діоксиду азоту – у 2 рази за даними на 2010 рік. Це речовини 2-го та 3-го класів небезпеки і ті, що у найбільшій мірі забруднюють атмосферне повітря у місті [248].

Основними забруднювачами ґрунтів у м. Київ є нафтопродукти, хлориди, солі ВМ, отрутохімікати, феноли та інші речовини. Радіаційний стан у м. Київ залишається стабільним [248].

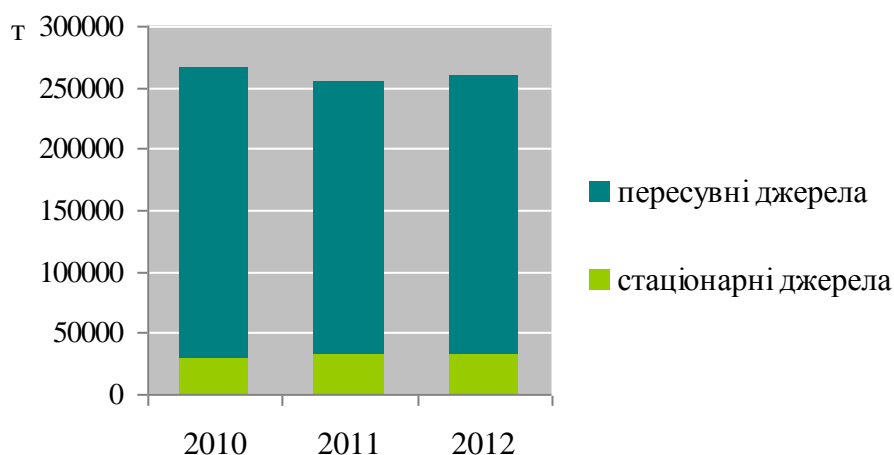


Рис. Б.1.5 Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних та пересувних джерел забруднення для м. Київ

**Смт. Іванків.** Щодо стану довкілля смт. Іванків Київської області протягом 2011-2012 рр. та I півріччя 2013 року екологічних аварій не траплялося. Підприємства, які мають підвищену екологічну небезпеку, відсутні. Аварій, пов'язаних з витоком нафтопродуктів, не відбувалося. У зв'язку з відсутністю каналізаційних очисних споруд в смт. Іванків погіршується екологічний стан р. Тетерів, в яку проводиться скид неочищених господарсько-побутових стічних вод селища. Згідно з лабораторними дослідженнями річкової води, не відповідали вимогам проби, досліджені в 2011 році по мікробіологічних показниках в контрольній точці 1 км нижче смт. Іванків (вміст ЛЗП становив 24000 при нормі 5000). У I півріччі 2013 року в пробах річкової води була виявлена умовно-патогенна флора [269].

**М. Переяслав-Хмельницький.** Стан довкілля м. Переяслав-Хмельницький впродовж 2011-2013 рр. в межах норм встановлених законодавством згідно з даними виконавчого комітету Переяслав-Хмельницької міської ради. За цей період не надходило жодних звернень чи приписів щодо перевищення норм забруднення НПС [270].

Отже, беззаперечним лідером по забрудненню атмосферного повітря з усіх досліджуваних пунктів Рівненської та Київської областей є м. Київ, що впливає з даних табл. Б.1.1, Б.1.2 та Б.1.4. Міський транспорт та його супутня інфраструктура є одним з головних забруднювачів не тільки атмосферного повітря у всіх досліджуваних пунктах, але й ґрунтів нафтопродуктами [248]. Загальний рівень забруднення атмосферного повітря в Україні у 2010 році за індексом забруднення атмосфери становив 8,2, у 2011 році – 8,7 [271].

**Місто Нітра та Словацька республіка.** На території Словацької республіки, починаючи з 2010 р., діє 30 станцій контролю забруднення атмосферного повітря, і додатково 4 станції, які входять до Європейської мережі моніторингу ЕМЕР для спостереження й оцінки поширення транскордонного переносу забруднюючих речовин у Європі. На території Нітранського краю розташовано дві станції контролю якості повітря: Nitra – Štúrova (контрольовані забруднюючі речовини  $PM_{10}$ ,  $NO_2$ ,  $SO_2$ ,  $CO$ ,  $C_6H_6$ ), яка

розташована безпосередньо на території міста Нітра і Nitra – Janíkovce (контрольовані забруднюючі речовини PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub>, NO<sub>2</sub>, озон) біля аеропорту Нітра [272]. Саме за даними цих станцій ми оцінюємо вплив атмосферного забруднення повітря на пилок ББ (табл. Б.1.5) [272-274].

Таблиця Б.1.5

Оцінка якості повітря відповідно до граничних значень для словацького регіону Нітра за 2011-2013 роки

Рік	Забруднювач	SO <sub>2</sub>		NO <sub>2</sub>		PM <sub>10</sub>		PM <sub>2,5</sub> +MT	CO	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>
	Час усереднення	1 год	24 год	1 год	1 рік	24 год	1 рік	1 рік	8 Год <sup>1)</sup>	1 рік
	Граничне значення, мкг/м <sup>3</sup>	350	125	200	40	50	40	27	10000	5
	Станція контролю									
2011	Нітра – Štúrova	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4	47,3	67	38,4	47,3 <sup>c</sup>	2223 <sup>a</sup>	1,2 <sup>b</sup>
	Нітра – Janíkovce	–	–	3	14,6	63	37,7	24,0	–	–
2012	Нітра – Štúrova	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	26,6	37	30,0	–	2017	1,1 <sup>a</sup>
	Нітра – Janíkovce	–	–	0 <sup>a</sup>	17,0 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>	26,4 <sup>a</sup>	19,3 <sup>b</sup>	–	–
	Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення, т/год									
	Нітра	71		308		336		1183		–
	Викиди зважених забруднюючих речовин в атмосферне повітря від стаціонарних джерел забруднення, т/год·км <sup>2</sup>									
	Нітра	0,08		0,35		0,39		1,36		–
2013	Нітра – Štúrova	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	36 <sup>c</sup>	11 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	–	1986	0,8
	Нітра – Janíkovce	–	–	0 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	–	–

Примітка: «–» - визначення не проводились; <sup>1)</sup> Максимальна 8-годинна концентрація; забруднюючі речовини, які перевищили граничне значення виділені жирним шрифтом.

Позначення даних:    > 90 %, <sup>a</sup> 75-90 %, <sup>b</sup> 50-75 % від допустимих значень

На території міста діє декілька підприємств, які впливають на якість повітря регіону, а саме: PPC ČAB akciová spoločnosť Nové Sady (джерело твердих частинок), Eustream, a.s., prev. Ivanka pri Nitre, Nitrianska teplárenská spoločnosť a.s. (джерела NO<sub>x</sub>), Dalkia Vráble, a.s. (джерело NO<sub>x</sub> і CO), MO SR,

Posádková správa budov Nitra, BMC s.r.o. Nitra (джерела  $\text{SO}_2$ ), CALMIT spol. s r.o. Bratislava, prev. Žirany, Bioplyn Cetín s.r.o., Malý Cetín (джерела  $\text{SO}_2$  і  $\text{CO}$ ) [272]. Як видно з табл. Б.1.5 на всіх станціях контролю в Нітранському краї не було перевищень допустимих значень за два роки, крім добового граничного значення  $\text{PM}_{10}$  у 2011 і 2012 р. [275].

Найбільша проблема якості повітря у Словаччині, а також у більшості європейських країнах на даний час, це  $\text{PM}_{10}$  частинки [272, 273]. До них відносяться частинки від пилу, бруду, сажі, диму і крапель рідини. Найчастіше їх джерела – дизельні двигуни і вугільні електростанції, споживання деревини житловим сектором. Частинки розміром менше 10 мкм в діаметрі представляють проблему для здоров'я, тому що вони можуть вдихатися і накопичуватись у дихальній системі. Частинки менше 2,5 мкм в діаметрі ( $\text{PM}_{2.5}$ ), називаються «дрібними» частинками і становлять найбільшу небезпеку для здоров'я [272, 276, 277]. ВОЗ у Європі наводить дані щодо вмісту  $\text{PM}_{10}$  і  $\text{PM}_{2.5}$  для європейських країн (рис. Б.1.6, Б.1.7).

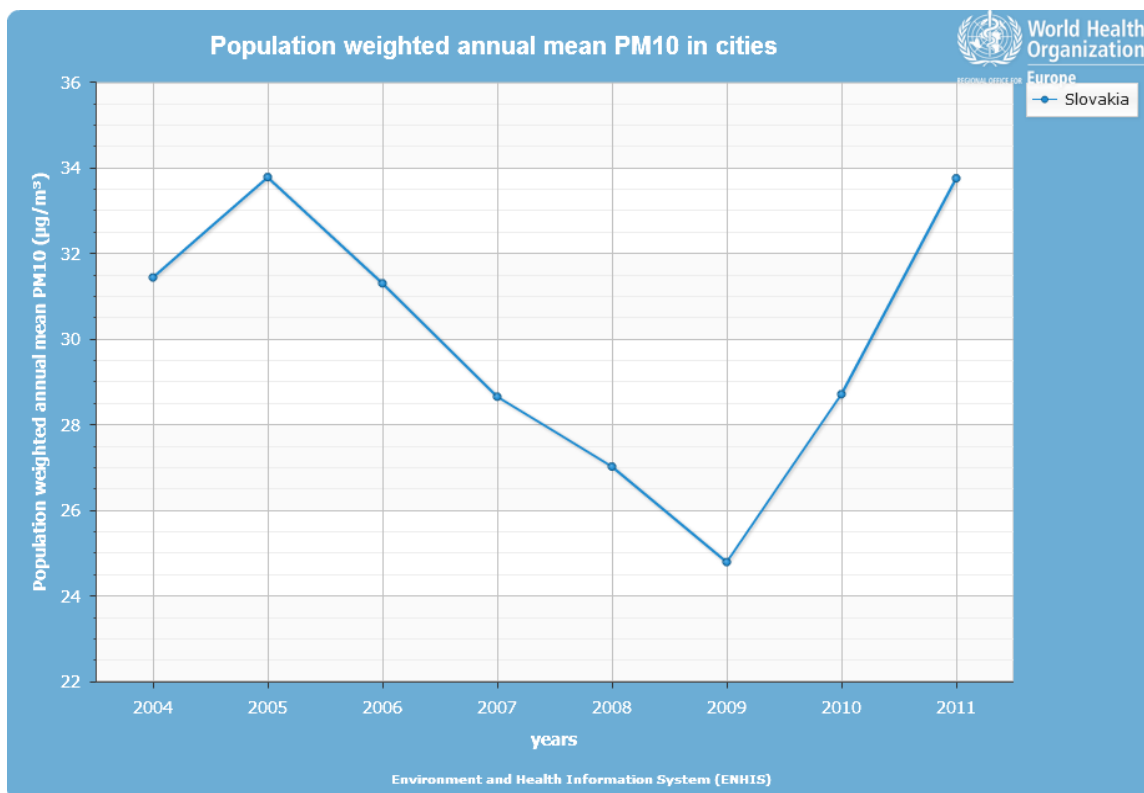


Рис. Б.1.6 Середня річна кількість  $\text{PM}_{10}$  у містах Словаччини протягом 2004-2011 рр. (за даними Європейської бази даних ЗДВ)



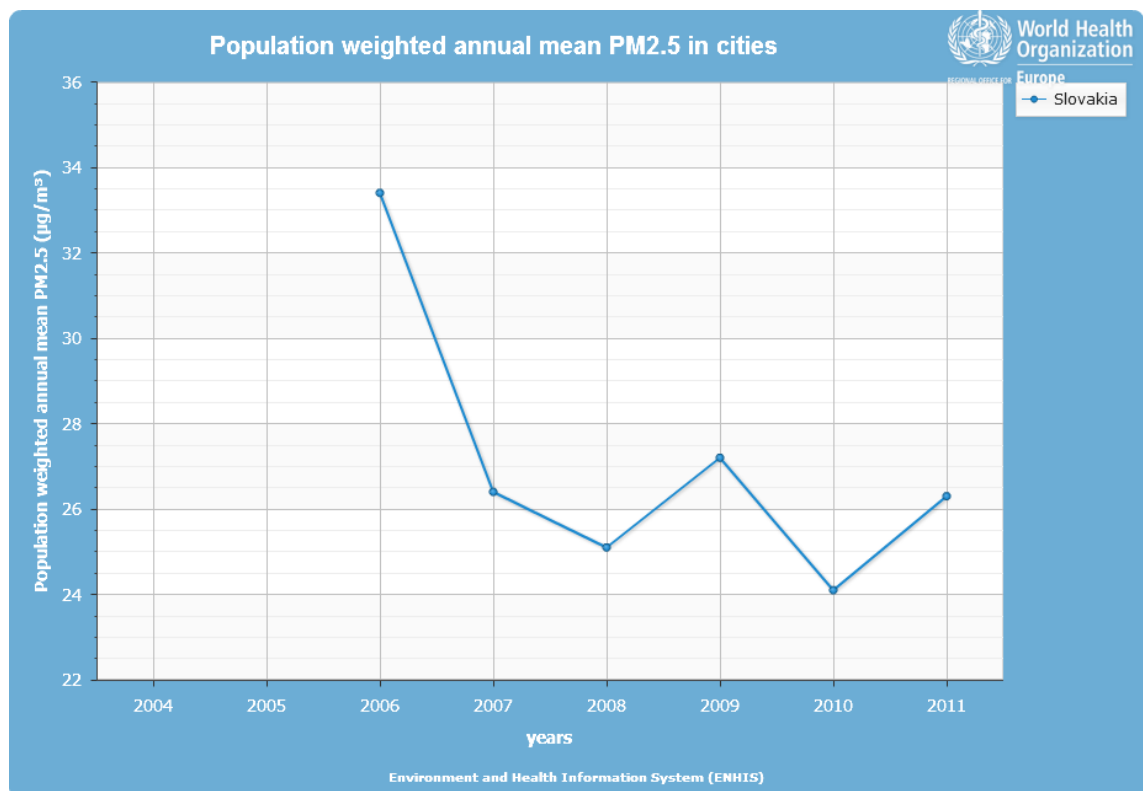


Рис. Б.1.7 Середня річна кількість  $PM_{2.5}$  у містах Словаччини протягом 2006-2011 рр. (за даними Європейської бази даних ЗДВ)

Щодо інших забруднюючих речовин, то зазначається, що в Словацькій республіці було досягнуте значне зниження викидів  $NO_x$  від пересувних джерел, в основному в автомобільних перевезеннях. Це зниження пов'язане з ремонтом рухомого складу у випадку пасажирських і власних автомобілів, і з використанням більш точного коефіцієнта викидів. В цілому, починаючи з 1990 р., для Словацької республіки характерна тенденція зменшення викидів забруднюючих речовин. Найбільші промислові об'єкти країни, що здійснюють найбільше викидів, не розташовані на території м. Нітра [272].

Динаміка основних показників техногенного навантаження на НПС та витрат на природоохоронні заходи, що наведена вище, свідчить про те, що екологічна ситуація у природному довкіллі, як життєво важливому середовищі для існування людини, залишається досить складною. З кожним роком все гостріше стоїть питання збереження довкілля. Охорона НПС, раціональне використання природних ресурсів, забезпечення екологічної безпеки життєдіяльності людини – невід'ємна умова розвитку країни.

**Метеорологічні умови в місяці і роки спостережень.** Погодні умови впливають на всі процеси, що відбуваються з пилом. Тому дуже важливо володіти інформацією про температуру, вологість, опади, які підкажуть початок сезону пилювання у рослин. Одним з основних метеорологічних факторів, що визначають дати початку сезону пилу, особливо для дерев, які цвітуть навесні, є температура повітря протягом періоду до початку цвітіння, а також відносна вологість повітря [10, 98, 176, 278]. Також метеорологічні параметри в попередньому році впливають на аспекти сезону пилу ББ в наступному [7]. Ініціювання і ріст чоловічих сережок відбувається протягом року перед цвітінням (рік закладання). В умовах м. Київ види *Betula* завершують формування чоловічих сережок в кінці червня – на початку липня, коли вони стають візуально помітними. Формування пилу завершується наступної весни [176], в умовах України зазвичай у квітні (рік цвітіння) [29]. На масовість продукування ПЗ мало впливає внутрішньосезонна погода. Велике значення має погода у період, що передує вегетаційному. Так, погода у лютому – на початку березня детермінує інтенсивність пилопродукції, а вже погодній комплекс безпосередньо під час сезону палінації визначатиме реальну кількість ПЗ у повітрі [95]. Дощова, холодна погода в період цвітіння погіршує якість пилу, знижує його життєздатність (як і температура вище 30 °C) [279]. Також нестабільність погодних умов у період формування ПЗ, різкі перепади температур, посушливість або надмірна вологість можуть негативно вплинути і викликати як структурні, так і функціональні зміни чоловічого гаметофіту [176].

За даними досліджень В. В. Родінкової (1999-2000 рр.) на початку хвилі палінації підвищення температури є стимулюючим фактором для продукції ПЗ рослинами. Крім температури повітря, вихід ПЗ з пиляків залежить і від вологості повітря: при її збільшенні ПЗ у повітря не продукуються. На розповсюдження ж продукованих ПЗ впливають швидкість та напрямок вітру. Опади очищають атмосферу від наявного в ній пилу та пилу, проте цей

метеорологічний фактор позитивно корелює із вологістю повітря, яка впливає на пилкопродукцію [95].

Враховуючи вищезазначене, вважаємо за потрібне навести метеорологічні дані протягом року перед збором пилку ББ (2010 р. для українських зразків пилку і 2012 р. для словацьких зразків пилку) (табл. Б.2.1) і в місяці перед і під час цвітіння ББ (подекадно січень-квітень 2011 р. для українських зразків пилку і січень-квітень 2013 р. для словацьких зразків пилку) (табл. Б.2.2). Дані отримано від Українського гідрометеорологічного центру та з офіційного сайту погоди TuTiempo <http://www.tutiempo.net/en/Climate/> [280].

В Україні 2010 рік був теплішим за попередній і повторив кліматичні показники 2007 р. Середня річна температура повітря перевищила кліматичну норму в більшості областей України на 1,0-3,0 °C, у західних областях – на 0,5-0,8 °C. Сумарна річна кількість опадів переважно становила 100-150 % кліматичної норми. Протягом року було зафіксовано більше небезпечних і стихійних метеорологічних явищ та випадків різкої зміни погоди порівняно з попереднім роком, зокрема метеорологічних небезпечних явищ – 2903, стихійних гідрометеорологічних явищ – 247, випадків різкої зміни погоди – 67. Рік відзначився надзвичайно спекотним літом. Найспекотнішою була погода у серпні (середня місячна температура повітря перевищила кліматичну норму на 2,0-7,1 °C). Максимальна температура повітря досягала 33-39 °C, місцями, крім західних областей, – 40-42 °C. У східній половині країни протягом 11-18 днів, на Волині, Рівненщині, Вінниччині, Житомирщині, місцями на Хмельниччині, впродовж 1-6 днів максимум температури повітря перевищував 35 °C. В Україні (крім Львівської, Закарпатської та Чернівецької областей) було перевищено абсолютні значення максимальних температур як для окремих днів, так і загалом для серпня.

Таблиця Б.2.1

Погодні дані за роки формування пилку *Betula verrucosa* Ehrh. для місць заготовки на території України та Словаччини

Назва метеостанції	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<b>Україна, 2010 рік</b>												
Середньомісячна температура повітря, °C												
Чорнобиль	-10	-3,2	0,3	9,4	16,9	20,9	23,9	23,2	13,6	5,4	6,5	-5,1
Тетерів	-9,0	-3,3	0,8	9,3	16,8	21,2	23,3	23,4	13,8	5,4	7,2	-4,8
Київ	-8,8	-3,3	1,4	10,3	17,3	22,0	24,4	24,6	14,9	6,3	8,0	-4,2
Яготин	-9,2	-3,3	-0,3	10,0	17,5	22,0	24,4	24,2	14,8	5,9	7,7	-3,9
Сарни	-9,4	-3,8	2,2	9,4	16,2	19,5	22,4	20,9	12,9	5,5	6,2	-4,5
Кількість опадів за місяць, мм												
Чорнобиль	44	65	14	32	49	61	33	55	51	36	98	63
Тетерів	43	63	12	24	96	59	91	32	42	37	76	56
Київ	54	62	20	42	55	25	104	25	51	35	72	58
Яготин	44	73	22	20	53	27	69	24	57	27	54	62
Сарни	28	38	19	15	75	76	75	124	96	23	64	65
Середньомісячна відносна вологість повітря, %												
Чорнобиль	82	86	74	69	72	70	71	67	79	80	89	87
Тетерів	80	86	76	66	71	66	70	61	73	77	86	85
Київ	84	89	72	60	65	61	64	54	69	73	83	86
Яготин	76	85	78	64	66	62	67	57	70	76	85	89
Сарни	87	89	78	69	73	69	75	76	81	78	87	85
<b>Словаччина, 2012 рік</b>												
Середньомісячна температура повітря, °C												
Нітра	1,3	-2,8	7,6	11,6	17,1	20,3	22,7	22	17,6	10,8	7,6	-1,2
Кількість опадів за місяць, мм												
Нітра	49	17	1	35	9	62	101	10	29	72	23	40
Середньомісячна відносна вологість повітря, %												
Нітра	77	69	54	56	53	65	61	51	61	77	83	87

Примітка: Дані по метеостанціям, розташованим найближче до пунктів досліджень: Чорнобиль – смт. Іванків (52 км), Тетерів – смт. Бородянка (34 км), Яготин – м. Переяслав-Хмельницький (46 км) і с. Хоцьки (65 км), Сарни – м. Кузнецовськ (54 км)

У 2010 р. погодні умови часто призводили до ускладнень у роботі деяких галузей господарства та життєдіяльності населення. Під негативним впливом мінливих метеорологічних або гідрологічних умов (з різними за масштабом наслідками) опинялась більшість регіонів країни. Спостерігались ускладнення у роботі енергетичної галузі та транспорту, у життєдіяльності населення, в агропромисловому комплексі, коли істотне зниження температури повітря та тривалі морози стали вкрай несприятливим фактором для плодових насаджень і спричинили пошкодження плодових бруньок, молодих гілок, виноградної лози

у січні-лютому та через суху спекотну погоду, яка заважала росту і розвитку практично усіх культур у квітні та на початку червня й призвела до посухи та втрати частини врожаю у липні та серпні на більшості території країни, особливо у східних та південних областях [255].

Отже, формування пилку на території України у 2010 р. відбувалось в умовах спекотного сухого літа, що могло вплинути на його розвиток.

У Словацькій республіці 2012 р. характеризувався дуже холодною першою половиною лютого, перевищенням температурних норм для показників п'яти місяців (квітень, червень-вересень), перевищенням нормальної температури в травні і листопаді, сухим і жарким літом. Грудень за метеорологічними показниками найбільше відповідав нормам. Береза цвіла в першій декаді квітня [281].

Отже, формування пилку на території Словаччини у 2012 р. відбувалось в умовах спекотного сухого літа, що могло вплинути на його розвиток.

Таблиця Б.2.2

Подекадні погодні дані у рік цвітіння пилку *Betula verrucosa* Ehrh. для місць заготовки на території України та Словаччини

Назва метеостанції	Січень			Лютий			Березень			Квітень		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	<b>Україна, 2011 рік</b>											
	Середня температура повітря, °С											
Чорнобиль	-3,7	0,4	-4,0	0,3	-10,2	-10,3	-4,1	2,5	2,4	7,7	7,0	13,5
Тетерів	-3,7	1,2	-4,1	0,5	-10,0	-9,5	-4,3	2,5	3,0	8,3	6,9	12,6
Київ	-3,8	0,7	-3,9	0,5	-9,5	-10,1	-2,7	3,0	4,1	7,9	7,7	15,1
Яготин	-5,3	-0,6	-6,2	0,1	-11,4	-10,2	-4,4	2,2	3,1	7,5	7,3	13,5
Сарни	-2,8	1,4	-5,0	0,7	-7,9	-8,3	-3,9	3,5	4,2	8,1	7,3	13,0
	Максимальна температура повітря, °С											
Чорнобиль	2	4	1	10	1	-3	5	18	13	18	20	25
Тетерів	3	6	1	10	2	-2	5	18	15	18	19	25
Київ	2	5	1	11	1	-4	5	17	15	18	18	24
Яготин	2	3	0	10	1	-7	4	15	15	16	19	24
Сарни	2	5	0	9	1	-3	7	17	16	16	20	24
	Мінімальна температура повітря, °С											
Чорнобиль	-13	-7	-10	-6	-21	-16	-19	-7	-10	2	-1	-1
Тетерів	-12	-5	-12	-5	-22	-13	-18	-8	-9	1	-2	-2
Київ	-14	-5	-9	-5	-17	-13	-10	-6	-5	1	1	3
Яготин	-17	-6	-15	-5	-22	-14	-15	-8	-6	1	-1	-2
Сарни	-14	-5	-16	-6	-21	-15	-20	-3	-9	1	-1	0

	Кількість опадів, мм											
Чорнобиль	5	12	9	16	7	12	0	9	12	20	3	21
Тетерів	7	6	7	10	14	10	0	3	7	16	3	1
Київ	4	10	9	10	12	11	0	3	5	18	3	3
Яготин	7	19	7	8	14	3	1	3	7	12	2	0
Сарни	7	10	10	10	10	14	0	3	6	12	3	1
	Середня відносна вологість повітря, %											
Чорнобиль	85	95	81	78	73	78	67	72	69	67	62	53
Тетерів	84	92	80	76	74	76	69	73	69	65	65	54
Київ	86	94	82	75	71	79	60	70	59	63	57	37
Яготин	90	95	88	81	74	76	72	76	69	67	61	48
Сарни	88	95	86	78	72	83	72	75	65	75	70	56
	Максимальна швидкість вітру, м/с											
Чорнобиль	11	8	9	14	14	8	11	11	13	15	11	9
Тетерів	9	8	9	16	17	7	12	11	15	17	10	11
Київ	13	11	11	17	18	8	16	13	16	17	14	11
Яготин	11	9	9	16	19	11	12	10	18	19	11	11
Сарни	17	7	7	19	18	5	14	10	18	24	10	9
	Словаччина, 2013 рік											
	Середня температура повітря, °С											
Нітра	0,0	-1,3	-1,3	1,0	0,7	3,5	6,2	2,5	1,1	5,2	12,3	17,9
	Максимальна температура повітря, °С											
Нітра	2,7	1,2	1,2	3,3	3,2	7,3	10,8	7,1	4,3	9,2	20,2	25,1
	Мінімальна температура повітря, °С											
Нітра	-3,1	-3,9	-4,2	-1,6	-1,1	-0,1	1,8	-2,1	-1,5	1,1	3,7	9,4
	Кількість опадів, мм											
Нітра	0,8	2,3	2,8	1,7	2,8	3,5	0,6	2,4	4,4	2,5	0,9	0,0
	Середня відносна вологість повітря, %											
Нітра	85	88	85	80	85	81	70	68	74	72	62	55
	Максимальна швидкість вітру, м/с											
Нітра	30	26	23	29	25	24	31	37	29	28	21	22

Примітка: Дані по метеостанціям, розташованим найближче до пунктів досліджень: Чорнобиль – смт. Іванків (52 км), Тетерів – смт. Бородянка (34 км), Яготин – м. Переяслав-Хмельницький (46 км) і с. Хоцьки (65 км), Сарни – м. Кузнецовськ (54 км)

У рік цвітіння ББ зимові місяці першої декади 2011 р. в Україні були відносно теплими, весняні місяці відзначилися значними коливаннями температури повітря. Порівняно з минулим 2010 р. зафіксовано менше небезпечних і стихійних гідрометеорологічних явищ (гідрологічних стихійних явищ взагалі не було). Проте кількість випадків різкої зміни погоди дещо збільшилась. Найбільш несприятливими для багатьох галузей господарства були погодні умови у лютому. Друга та третя декади місяця виявилися найхолоднішим періодом зимового сезону 2010-2011 рр.: середня добова температура була нижчою за норму на 4-11 °С. 9-13 лютого спостерігався

найбільш складний період для функціонування господарського комплексу України та життєдіяльності населення. Внаслідок переміщення активних циклонів із Скандинавії спостерігалися складні погодні умови: випадав сніг та мокрий сніг (невеликий і помірний), 9-12 лютого місцями з дощем. В Україні, крім крайнього півдня, спостерігались налипання мокрого снігу, ожеледь, хуртовини, пориви вітру 15–24 м/с. Температура повітря знизилась і становила 13-14 лютого вночі 8-16 °С морозу, на півночі та заході до 19 °С, вдень 4-12 °С морозу [282].

Такі погодні умови на території України в місяці перед сезоном цвітіння дерев, ББ в тому числі, не могли не вплинути на дати початку сезону.

У січні 2013 р. в Словацькій республіці температура повітря відповідала нормі, але були характерні понаднормові опади і середня відносна вологість повітря. У лютому температура повітря (середня місячна, середня максимальна і мінімальна добові, абсолютні максимум і мінімум) була вище норми, як і відносна вологість повітря. У березні випала надзвичайно велика кількість снігу, температура повітря була дуже низькою. А уже в квітні температура перевищила норму. Місяць був надзвичайно сухим. З кінця другого тижня почала цвісти береза [283]. Карти середніх місячних температур і загальної кількості опадів за першу декаду 2013 р. наведено на рис. Б.2.1.

Такі різкі зміни в погоді на території Словаччини у місяці перед цвітінням вплинули на дати початку березового сезону. Лютий був дуже теплим (ліщина почала цвісти на початку лютого) і береза б зацвіла у березні, але різке зниження температури і випадання понаднормової кількості снігу віддалили цей процес на тиждень пізніше за минулий рік (власні спостереження).

Так як місця збору пилку ББ в Україні розташовані в межах 51° 20' – 49° 54' пн. ш., значення метеорологічних показників статистично не повинні відрізнятися протягом досліджуваного періоду. Вплив метеофакторів був однаковим на усі місця зростання. Так як словацькі зразки пилку заготовлені на території одного міста, то і в цьому випадку немає відмінностей у впливі погоди на формування пилку. Початок сезону пилкування ББ у нашому

випадку нас не цікавить, оскільки пилок ми заготовляли до моменту виходу ПЗ із пиляків.

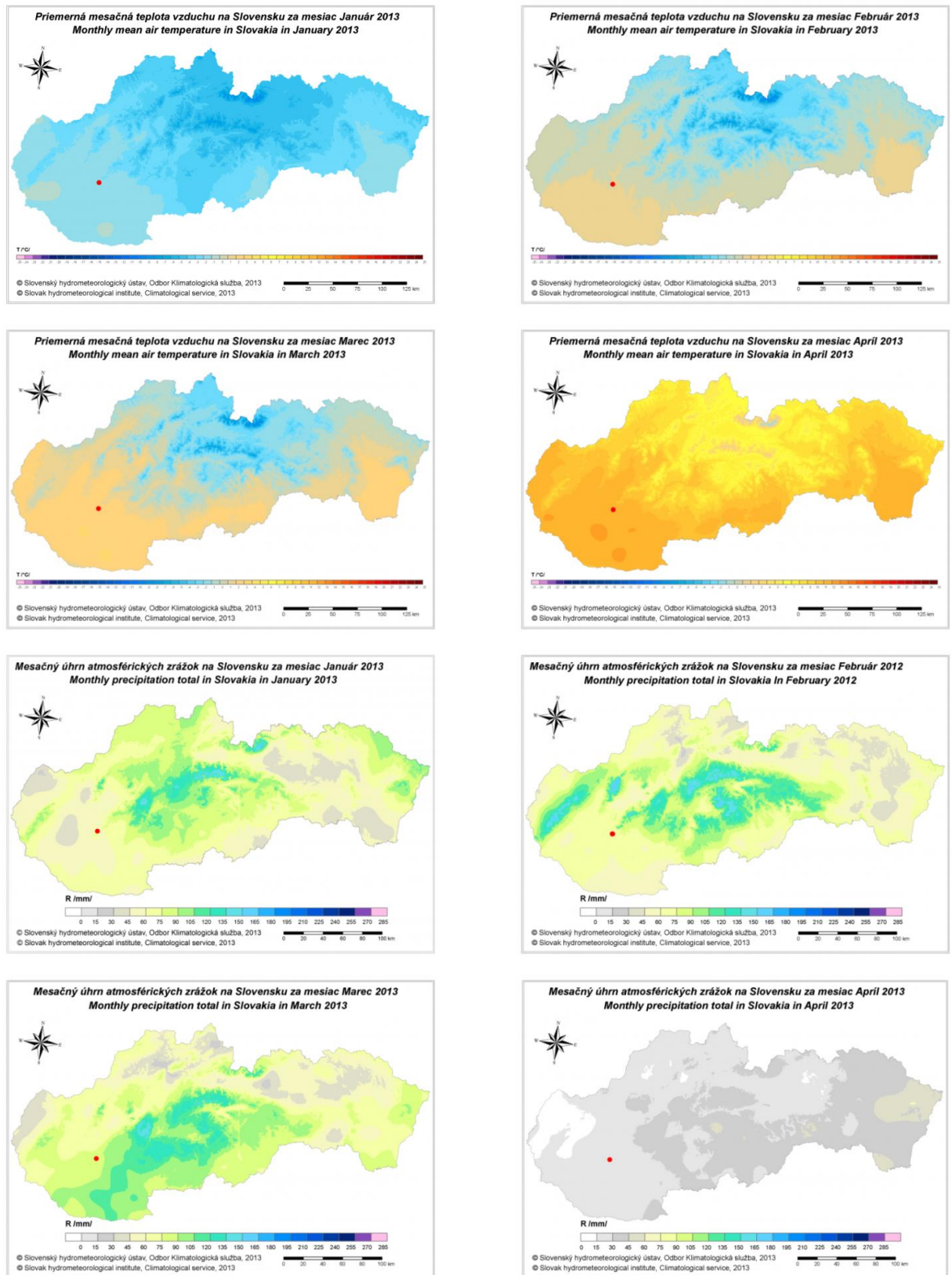


Рис. Б.2.1 Карти середніх місячних температур і загальної кількості опадів на території Словаччини за першу декаду 2013 року за даними Словацького гідрометеорологічного інституту



## Додаток В

Таблиця В.1.1

Віднесення смуг ІЧ-спектрів пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Хвильове число (см <sup>-1</sup> )	Вібрація	Хімічна група, речовина
3388	$\nu(\text{OH})$	ROH, вода
3010	$\nu(=\text{CH})$	ненасичені жирні кислоти
2960sh	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	білки
2926	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	ліпіди
2873	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	білки
2854	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	ліпіди
1738sh	$\nu(\text{C}=\text{O})$	складні ефіри
1710sh	$\nu(\text{C}=\text{O})$	органічні кислоти
1678	$\nu(\text{C}=\text{O})$	ароматичні сполуки
1655	амід І	білки
1636	$\nu(\text{C}=\text{C})$	ароматичні сполуки
1604	$\nu(\text{C}=\text{C})$ , $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	ароматичні сполуки, солі органічних кислот
1548	амід ІІ	білки
1518	$\nu(\text{C}=\text{C})$	ароматичні кислоти
1467sh	$\delta(\text{CH}_2)$	ліпіди
1454	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	білки
1415	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , $\delta(\text{OH})$ , $\delta(\text{CH})$	солі органічних кислот, вуглеводи
1246	$\nu(\text{COC})$ , $\nu(\text{CO})$	складні ефіри, органічні кислоти
1150	$\nu(\text{COC})$ , $\delta(\text{OH})$	полісахариди
1106sh 1078	$\nu(\text{CO})$ , $\nu(\text{CC})$ , $\delta(\text{CON})$	вуглеводи
1048 1025 930	$\nu(\text{CO})$ , $\nu(\text{CC})$ , $\nu(\text{CN})$	вуглеводи, білки
836	$\gamma(\text{OH})$	пектин
700 579 534	скелетні	вуглеводи, білки, ароматичні сполуки

Примітка:  $\nu$  – валентні коливання,  $\delta$  – деформаційні коливання, s і as – симетричні і антисиметричні коливання відповідно, sh – плече

Продовження додатку В

Таблиця В.1.2

Віднесення смуг Раман-спектрів пилку *Betula verrucosa* Ehrh.

Хвильове число (см <sup>-1</sup> )	Вібрація	Хімічна група, речовина
1653	амід I, $\nu(\text{C}=\text{C})$	білки, ліпіди
1605	$\nu(\text{C}=\text{C})$	ароматичні сполуки
1447	$\delta(\text{CH}_2)$ , $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	ліпіди, білки
1365	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	білки
1338	$\delta(\text{CH})$ , $\delta(\text{NH})$	білки, нуклеїнові кислоти
1312	$\tau(\text{CH}_2)$	ліпіди
1263	амід III	білки
1207	$\nu(\text{PO})$	фосфат, нуклеїнові кислоти
1169	$\delta(\text{CH})$ , $\delta(\text{NH})$	білки, нуклеїнові кислоти
1126	$\nu(\text{CC})$ , $\nu(\text{CO})$	ліпіди, вуглеводи
1109	$\nu(\text{CC})$ , $\nu(\text{CO})$ , $\nu(\text{CN})$	ліпіди, вуглеводи, білки
1080		
1063		
1005	«дихання» кільця	фенілаланін, білки
978	скелетні	ліпіди, вуглеводи, білки
852	«дихання» кільця	тирозин, білки
830sh		
785	«дихання» кільця	нуклеїнові кислоти
716		
642	деформація кільця	тирозин, білки
536	$\nu(\text{SS})$	цистин, білки
448	$\tau(\text{OH})$	вуглеводи

Примітка:  $\nu$  – валентні коливання,  $\delta$  – деформаційні коливання, s і as – симетричні і антисиметричні коливання відповідно, sh – плече

Продовження додатку В

Таблиця В.2.1

Порівняння значень вмісту аскорбінової кислоти в пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від місця зростання  
методом Бонфероні

Зразки пилку	1	3	4	5	6	7	8	9	2b	2a
1		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
3	<b>0,000000</b>		1,000000	1,000000	<b>0,000843</b>	1,000000	<b>0,000012</b>	<b>0,000000</b>	1,000000	<b>0,024736</b>
4	<b>0,000000</b>	1,000000		1,000000	0,097110	1,000000	<b>0,000962</b>	<b>0,000000</b>	1,000000	1,000000
5	<b>0,000000</b>	1,000000	1,000000		<b>0,020602</b>	1,000000	<b>0,000221</b>	<b>0,000000</b>	1,000000	0,596749
6	<b>0,000000</b>	<b>0,000843</b>	0,097110	<b>0,020602</b>		<b>0,011379</b>	1,000000	<b>0,000000</b>	<b>0,028373</b>	1,000000
7	<b>0,000000</b>	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,011379</b>		<b>0,000128</b>	<b>0,000000</b>	1,000000	0,339405
8	<b>0,000000</b>	<b>0,000012</b>	<b>0,000962</b>	<b>0,000221</b>	1,000000	<b>0,000128</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000298</b>	0,111227
9	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
2b	<b>0,000000</b>	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,028373</b>	1,000000	<b>0,000298</b>	<b>0,000000</b>		0,803688
2a	<b>0,000000</b>	<b>0,024736</b>	1,000000	0,596749	1,000000	0,339405	0,111227	<b>0,000000</b>	0,803688	

Примітка: жирним шрифтом виділено достовірну різницю між зразками

## Додаток Г

Таблиця Г.1.1

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV1 і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки	t- значення	p
Вода	BV1	BV2a	2,80*
		BV2b	-2,52*
		BV3	-3,74*
		BV4	-6,97*
		BV5	-6,18*
		BV6	-0,67
Етанол	BV1	BV2a	-3,39*
		BV2b	-4,93*
		BV3	2,60*
		BV4	-10,32*
		BV5	-21,21*
		BV6	-3,03*
Метанол	BV1	BV2a	-60,51*
		BV2b	-69,84*
		BV3	-9,37*
		BV4	-97,13*
		BV5	-102,55*
		BV6	-72,52*

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Г.1.2

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV2a і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки	t-значення	p
Вода	BV2a	BV2b	-3,97*
		BV3	-5,62*
		BV4	-8,60*
		BV5	-8,00*
		BV6	-1,86
Етанол	BV2a	BV2b	-2,80*
		BV3	5,14*
		BV4	-10,21*
		BV5	-27,70*
		BV6	-1,00

Продовження табл. Г.1.2

Метанол	BV2a	BV2b	-11,23*	0,000
		BV3	44,60*	0,001
		BV4	-42,99*	0,001
		BV5	-45,98*	0,001
		BV6	-10,74*	0,000

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Г.1.3

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa*

Ehrh. з місця заготовки BV2b і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Вода	BV2b	BV3	0,03	0,979
		BV4	-1,58	0,153
		BV5	-0,68	0,518
		BV6	1,03	0,333
Етанол	BV2b	BV3	6,24*	0,000
		BV4	-3,99*	0,004
		BV5	-14,03*	0,001
		BV6	0,95	0,372
Метанол	BV2b	BV3	53,2*	0,001
		BV4	-31,56*	0,001
		BV5	-33,56*	0,001
		BV6	1,31	0,226

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Г.1.4

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa*

Ehrh. з місця заготовки BV3 і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Вода	BV3	BV4	-2,27	0,053
		BV5	-1,05	0,326
		BV6	1,15	0,284
Етанол	BV3	BV4	-9,78*	0,000
		BV5	-16,70*	0,001
		BV6	-4,71*	0,002
Метанол	BV3	BV4	-78,12*	0,001
		BV5	-81,56*	0,001
		BV6	-54,54*	0,001

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Г.1.5

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV4 і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Вода	BV4	BV5	1,59	0,150
		BV6	2,41*	0,042
Етанол	BV4	BV5	-15,11*	0,004
		BV6	4,09*	0,003
Метанол	BV4	BV5	0,55	0,595
		BV6	35,12*	0,005

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Г.1.6

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV5 з BV6

Змінні	t-значення	p
Вода	1,74	0,120
Етанол	11,46*	0,003
Метанол	37,85*	0,000

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Г.1.7

Порівняння загальної антиоксидантної активності пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з BV7, BV8 і BV9

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Вода	BV7	BV8	-6,92*	0,000
		BV9	-10,47*	0,006
	BV8	BV9	0,52	0,616
Етанол	BV7	BV8	0,00	0,999
		BV9	-1,40	0,200
	BV8	BV9	-0,24	0,817
Метанол	BV7	BV8	10,10*	0,008
		BV9	0,49	0,636
	BV8	BV9	-10,04*	0,008

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

# Додаток Д

Таблиця Д.1.1

Результати перевірки даних на нормальність розподілу за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова

Змінні	Україна			Словаччина		
	N	max D	Колмогоров-Смірнов	N	max D	Колмогоров-Смірнов
Полярна вісь, $\mu\text{m}$	420	0,04	$p > 0,20$	180	0,04	$p > 0,20$
Екваторіальний діаметр, $\mu\text{m}$	420	0,03	$p > 0,20$	180	0,04	$p > 0,20$
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна, deg	420	0,02	$p > 0,20$	180	0,06	$p > 0,20$
Діаметр пори внутрішній, $\mu\text{m}$	420	0,06	$p < 0,10$	180	0,06	$p > 0,20$
Ребро апопоріального поля, $\mu\text{m}$	420	0,03	$p > 0,20$	180	0,04	$p > 0,20$

Примітка: N – номер; max D – D статистика Колмогорова-Смірнова;  $p > 0,20$  рівень достовірності max D

Таблиця Д.1.2

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV1 і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки	t-значення	p
Полярна вісь	BV1	BV2a	2,784727*
		BV2b	0,019706
		BV3	0,58934
		BV4	-1,68269
		BV5	2,67960*
		BV6	1,21845
Екваторіальний діаметр	BV1	BV2a	1,802926
		BV2b	0,234863
		BV3	0,07299
		BV4	-2,22110*
		BV5	-0,14291
		BV6	-0,49204
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	BV1	BV2a	3,952917*
		BV2b	5,844009*
		BV3	4,75217*
		BV4	3,23182*

Продовження табл. Д.1.2

		BV5	5,10398*	0,000
		BV6	1,63367	0,105
Діаметр пори внутрішній	BV1	BV2a	2,991207*	0,003
		BV2b	1,852775	0,066
		BV3	-1,63350	0,105
		BV4	0,50828	0,612
		BV5	-1,08338	0,281
		BV6	3,76934*	0,000
Ребро апопоріального поля	BV1	BV2a	2,492164*	0,014
		BV2b	0,864020	0,389
		BV3	-0,11713	0,907
		BV4	-2,85573*	0,005
		BV5	2,50614*	0,014
		BV6	-1,32796	0,187

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Д.1.3

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV2a і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Полярна вісь	BV2a	BV2b	-2,49567*	0,014
		BV3	-1,83492	0,069
		BV4	-4,13845*	0,000
		BV5	-0,19248	0,848
		BV6	0,52244	0,602
Екваторіальний діаметр	BV2a	BV2b	-1,66393	0,099
		BV3	-1,88295	0,062
		BV4	-3,95626*	0,000
		BV5	-2,17476*	0,032
		BV6	-0,18265	0,855
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	BV2a	BV2b	1,22752	0,222
		BV3	0,46056	0,646
		BV4	-1,17808	0,241
		BV5	0,45940	0,647
		BV6	-0,80572	0,422
Діаметр пори внутрішній	BV2a	BV2b	-1,30275	0,195
		BV3	-4,61066*	0,000
		BV4	-2,86790*	0,005
		BV5	-4,26926*	0,000
		BV6	-3,59642*	0,000
Ребро апопоріального поля	BV2a	BV2b	-1,89897	0,060



Продовження табл. Д.1.3

		BV3	-2,49321*	0,014
		BV4	-5,40799*	0,000
		BV5	-0,24322	0,808
		BV6	-0,94383	0,347

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Д.1.4

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця  
заготовки BV2b і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки	t-значення	p
Полярна вісь	BV2b	BV3	0,52244
		BV4	-1,52894
		BV5	2,38289*
		BV6	1,08110
Екваторіальний діаметр	BV2b	BV3	-0,18265
		BV4	-2,60331*
		BV5	-0,43034
		BV6	-0,79434
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	BV2b	BV3	-0,80572
		BV4	-2,77973*
		BV5	-0,91535
		BV6	-4,11750*
Діаметр пори внутрішній	BV2b	BV3	-3,59642*
		BV4	-1,59839
		BV5	-3,17724*
		BV6	1,89240
Ребро апопоріального поля	BV2b	BV3	-0,94383
		BV4	-4,07415*
		BV5	1,87242
		BV6	-2,49253*

Примітки: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Д.1.5

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця  
заготовки BV3 і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки	t-значення	p
Полярна вісь	BV3	BV4	-1,98359
		BV5	1,706264
		BV6	0,49396

Продовження табл. Д.1.5

Екваторіальний діаметр	BV3	BV4	-2,54879*	0,012
		BV5	-0,250154	0,803
		BV6	-0,64024	0,523
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	BV3	BV4	-1,80125	0,074
		BV5	-0,035065	0,972
		BV6	-3,12400*	0,002
Діаметр пори внутрішній	BV3	BV4	2,43887*	0,016
		BV5	0,709744	0,479
		BV6	5,65765*	0,000
Ребро апопоріального поля	BV3	BV4	-2,59687*	0,011
		BV5	2,494114*	0,014
		BV6	-1,12514	0,263

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Д.1.6

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV4 і з решти територій України

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Полярна вісь	BV4	BV5	4,07917*	0,000
		BV6	2,67540*	0,009
Екваторіальний діаметр	BV4	BV5	2,48517*	0,014
		BV6	2,02869*	0,045
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	BV4	BV5	1,92737	0,056
		BV6	-1,50380	0,135
Діаметр пори внутрішній	BV4	BV5	-1,88337	0,062
		BV6	3,78660*	0,000
Ребро апопоріального поля	BV4	BV5	5,74791*	0,000
		BV6	1,80838	0,073

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Д.1.7

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. з місця заготовки BV5 і з BV6

Змінні	t-значення	p
Полярна вісь	-1,29198	0,199
Екваторіальний діаметр	-0,43045	0,668
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	-3,34136*	0,001
Діаметр пори внутрішній	5,37785*	0,000
Ребро апопоріального поля	-4,34315*	0,000

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Таблиця Д.1.8

Порівняння морфологічних ознак пилку *Betula verrucosa* Ehrh. заготовлених у  
Словаччині

Змінні	Місця заготовки		t-значення	p
Полярна вісь	BV7	BV8	1,993609*	0,049
		BV9	-0,254806	0,799
	BV8	BV9	-2,04093*	0,043
Екваторіальний діаметр	BV7	BV8	3,966274*	0,000
		BV9	0,790493	0,431
	BV8	BV9	-3,11790*	0,002
Кут розташування апертури до контуру пилкового зерна	BV7	BV8	3,177030*	0,002
		BV9	3,902433*	0,000
	BV8	BV9	0,76701	0,445
Діаметр пори внутрішній	BV7	BV8	0,259688	0,796
		BV9	1,441894	0,152
	BV8	BV9	1,18406	0,239
Ребро апопоріального поля	BV7	BV8	4,710499*	0,000
		BV9	4,912354*	0,000
	BV8	BV9	0,42871	0,669

Примітка: \* – відмічені значимі t-критерії Стьюдента

Додаток Е

Таблиця Е.1

Коефіцієнти кореляції між вмістом аскорбінової кислоти в пилкових зернах

*Betula verrucosa* Ehrh. та антиоксидантною активністю

Розчинники	Аскорбінова кислота		
	Загальна	Україна	Словаччина
Вода	0,29	-0,27	-0,72*
Етанол	-0,58*	-0,31	-0,13
Метанол	-0,59*	-0,67*	-0,10

Примітка: \* – відмічено значущі кореляційні зв'язки

Кореляція між пороговим циклом ампліфікації та антиоксидантною активністю

Змінна	Пороговий цикл ампліфікації	Водний екстракт	Спиртовий екстракт
Пороговий цикл ампліфікації	1,0000	0,5753 <sup>a</sup>	0,7124 <sup>a</sup>
	p=---	p=0,031 <sup>a</sup>	p=0,004 <sup>a</sup>
Водний екстракт	0,5753 <sup>a</sup>	1,0000	0,4304
	p=0,031 <sup>a</sup>	p=---	p=0,125
Спиртовий екстракт	0,7124 <sup>a</sup>	0,4304	1,0000
	p=0,004 <sup>a</sup>	p=0,125	p=---

Примітка: кореляції значущі при  $p < 0,05$

## Додаток 3

Таблиця 3.1

Середньогрупові показники для виявлення «ідеального» зразку пилку

Змінні	Парк		Біля дороги		Ліс		Біля аеродрому	
	Mean	$\sigma$	Mean	$\sigma$	Mean	$\sigma$	Mean	$\sigma$
Полярна вісь	18,4	0,5	18,5	0,8	18,5	0,3	18,3	1,4
Екваторіальний діаметр	23,4	0,8	23,9	1,3	23,3	0,3	23,4	1,4
Кут	103,8	5,1	103,8	6,4	99,0	1,5	103,1	7,7
Діаметр пори внутрішній	3,1	0,3	3,0	0,3	3,4	0,1	3,0	0,4
Ребро апопоріального поля	24,6	2,7	24,4	2,5	26,6	0,5	26,8	1,5
Водний екстракт	81,5	2,7	80,7	4,2	84,1	1,1	82,7	2,4
Спиртовий екстракт	76,8	13,8	83,7	11,1	60,3	3,2	78,8	0,6
Метаноловий екстракт	65,8	15,0	88,6	7,1	51,4	1,0	69,3	2,6
АК	0,57%		0,46%		0,55%		0,46%	
Bet v 1	0,74		2,04		1,00		4,13	
Флавоноїди	1,8	0,9	1,7	0,6	1,1	0,01	3,15	0,03
Міристинова ЖК	2,2%		3%		1,8%		2,1%	
Пентодецилова ЖК	0,5%		1,1%		0,3%		0,3%	
Пальмітинова ЖК	35,4%		33,1%		34,4%		32,7%	
Стеаринова ЖК	4,4%		4%		3,6%		4,5%	
Олеїнова ЖК	27,5%		30,1%		27,4%		34,4%	
Лінолева ЖК	28,9%		27,2%		30,8%		24,5%	
Ліноленова ЖК	0,8%		0,9%		1,4%		1,2%	
Арахідонова ЖК	0,3%		0,4%		0,3%		0,3%	
$\Sigma$ НЖК	42,5%		41,3%		40,1%		39,6%	
$\Sigma$ ННЖК	57,5%		58,6%		59,9%		60,4%	
$\Sigma$ ПНЖК	30%		28,5%		32,5%		26%	
Блок	24,5%		21,8%		22,6%		21,8%	
Кадмій (Cd)	0,1	0,005	0,05	0,005	0,6	0,005	0,2	0,005
Плюмбум (Pb)	0,3	0,05	0,2	0,05	0,3	0,05	0,5	0,05
Гідраргіум (Hg)	0,003	0,002	0,005	0,002	0,004	0,002	0,005	0,002
Хром (Cr)	0,5	0,3	0,8	0,3	0,5	0,3	0,9	0,3
Миш'як (As)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Нікель (Ni)	1,6	0,2	0,7	0,2	2,4	0,2	2,1	0,2
Селен (Se)	0,2	0,1	0,2	0,1	0,7	0,1	0,1	0,1
Кобальт (Co)	0,1	0,1	–	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
$\Sigma$ ВМ	3,1		2,3		4,9		4,2	
НСТ-тест	49,4%	26,3	47,9%	22,4	61,3%	32,6	–	–
СЦК	0,5	0,3	0,5	0,3	0,9	0,7	–	–
Фі, %	80,3	9,9	82,3	7,5	–	–	–	–
Фч	6,9	1,9	7,5	2,5	–	–	–	–
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,1	1,7	3,0	2,0	0,7	1,2	4,2	0,1
А(на)еробні бактерії	3,9	1,0	3,7	1,6	4,7	0,3	4,9	0,2
Мікроскопчні гриби	3,2	0,8	3,4	0,5	4,1	0,1	3,4	0,2
Забруднення мікроорганізмами	3,4	1,2	3,4	1,4	3,2	0,3	4,1	0,1

Примітка: «-» – дослідження не проводилось; mean – середнє значення;  $\sigma$  – станд. відхилення

Словацький аграрний університет в Нїтрі  
Факультет агробіології і продовольчих ресурсів



# Підтвердження

**Тетяна Шевцова**

аспірант

Національний авіаційний університет, Київ, Україна

**успішно закінчила наукове стажування**

**в Інституті збереження біорізноманіття та біобезпеки  
в Відмінному центрі охорони і використання агробіорізноманіття  
в рамках**

**Вишеградської стипендіальної програми**

**Ч. 51200175**

з вирішення проблематики


***Морфологічні і хімічні зміни в пилку берези бородавчастої (Betula  
verrucosa Ehrh.) в залежності від місця зростання з метою  
створення діагностичних і терапевтичних препаратів***

**протягом 01 січня – 01 липня 2013**

Наукове стажування: 2013/TS  
Нїтра, 01 липня 2013

  
**Доц. Ян Бриндза**  
Науковий керівник  
стажування



  
**Проф. Даніель Біро**  
Декан Факультету агробіології і  
продовольчих ресурсів



## Додаток Л

### Акт

#### про впровадження результатів дисертаційної роботи

Шевцової Тетяни Володимирівни

Наявні дані (Śpiewak *et al.*, 1996, Trivedi *et al.*, 2003, Heydenreich *et al.*, 2011, Mittag *et al.*, 2013), що мікробіологічне забруднення пилку може стати причиною забруднення алергенних екстрактів, які використовуються для лікування алергічних захворювань в алерген-специфічній імунотерапії (СИТ), що, відповідно, позначиться на її ефективності. Пилкові екстракти, що використовуються для СИТ мають дуже змінний вміст ліпополісахаридів (ЛПС). ЛПС із зовнішнього середовища посилюють алергічні реакції в сенсibilізованих осіб. Вони були виявлені на пилкових зернах через присутність грам-позитивних бактерій на їх поверхні. Тому таке «випадкове» приймання ЛПС із екстрактами пилкових алергенів протягом СИТ не може бути корисним. І хоча компоненти із малою молекулярною масою видаляються за допомогою діалізу, видалити ЛПС і інші мікробні продукти з великою молекулярною масою не вдається. Зрозуміло, що бактеріальне забруднення алергенних препаратів для СИТ не вигідне.

Запобіжними заходами в даному випадку може бути дотримання рекомендацій щодо заготовки і поводження з пилковою сировиною: збір, сушіння, зберігання чи використання, а також проведення попереднього мікробіологічного аналізу.

Проведені експериментальні дослідження з визначення мікробіологічного забруднення пилку *Betula verrucosa* Ehrh. залежно від регіону походження в рамках дисертаційної роботи «Біологічна активність пилку берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) в залежності від місця зростання» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.16 – екологія дозволили виявити не лише мікробіологічну якість, а й достовірні відмінності залежно від умов зростання дерев. Було встановлено, що в досліджуваних місцях заготовки пилкової сировини рівень забруднення пилку однорідний: чим більш забруднений пилкок, тим більша імовірність, що в даних місцях зростання такий же рівень забруднення має практично весь пилкок, і навпаки.

Отримані дані дали змогу проаналізувати та розробити рекомендації щодо збору та інших операцій поводження з анемофільним пилком до його фактичного застосування, а також рекомендувати місця заготовки для виробництва регіональних діагностичних та лікувальних алергенних препаратів, що відображено в дисертаційній роботі. Також результати досліджень можуть бути корисними при розробці національних та міжнародних мікробіологічних параметрів якості і стандартних протоколів обробки пилку анемофільних видів з алергенним потенціалом.

Результати досліджень відображені в наукових публікаціях:

1. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from Ukrainian *Betula verrucosa* Ehrh. pollen after microbiological analysis / T. Shevtsova, L. Hleba, M. Kačániová, J. Brindza, K. Garkava // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2013. – №3(1). – P. 94-96.
2. Contamination of *Betula verrucosa* Ehrh. pollen by microorganisms, mycotoxins and heavy metals / T. Shevtsova, M. Kačániová, K. Garkava, J. Brindza, J. Petrova // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2014. – №3 (6). – P. 509-513.



## Продовження додатку Л

Первинні дослідження, представлені в дисертаційній роботі, стали підґрунтям для реалізації наукової теми «Мікробіологічна якість анемофільного пилку з алергенним потенціалом» на базі кафедри мікробіології Факультету біотехнології та продовольчих наук Словацького аграрного університету в Нітрі за фінансування Міністерства освіти, науки, досліджень та спорту Словацької Республіки протягом періоду квітень-липень 2015 року.

Сертифікат про участь у вирішенні наукової теми додається.

Відповідальний за впровадження  
професор, доктор наук

  
Мірослава Качаніова  
SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA  
UNIVERZITA V NITRE ①  
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE  
A POTRAVINÁRSTVA  
DEKANÁT  
Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 NITRA

Продовження додатку Л

**Slovak University of Agriculture in Nitra**  
**Faculty of Biotechnology and Food Sciences**



# Certificate

**Tetiana Shevtsova**

*Researcher of*

**National Aviation University,  
Institute of Ecological Safety in Kyiv, Ukraine**

*Completed research stay*

**At the Department of Microbiology  
in frame of created international network for realization of research,  
education and development program**

*Research study theme*

**Microbiological quality of anemophilous pollen with allergenic  
potential**

**from April to July 2015**

**Nitra, 29. 07. 2015**

**Prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.**  
**Vice dean for international affairs**

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA  
UNIVERZITA V NITRE  
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE  
A POTRAVINÁRSTVA  
DEKANÁT  
Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 NITRA