

We collected urine from patients with bladder (sample size is $n = 42$) and used urine samples from 5 healthy people as negative control. DNA was precipitated by CTAB and isolated by using a standard phenol/chloroform/isopropanol approach. The presence of methylation of VIM, TMEFF2 and GDF15 promoters was detected by Real-Time MSP PCR after the procedure of DNA bisulfite conversion.

We found the presence of hypermethylation of all 3 genes among the studied patients ($n = 42$), while none was detected in samples taken from healthy people ($n = 5$). The sensitivity of this potential combination of markers was 69 %, with specificity of 100 %. Correspondence between tumor stage and presence or absence of any of the studied markers has not been identified. It was concluded that there is a necessity to increase the sample size and to test the capability of GDF15, TMEFF2 and VIM to distinguish between bladder cancer and other onco-urological diseases.

Keywords: methylation, tumor suppressor genes, bladder cancer, early diagnosis, tumor markers, GDF15, TMEFF2, VIM.

Матеріал надійшов 11.03.2016

УДК 582.929.4:[581.522.4+581.95]:543.061:543.621

Ковтун-Водяницька С. М.

МІНЕРАЛЬНИЙ СКЛАД СИРОВИНИ РОСЛИН РОДУ *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

У статті подано результати дослідження сировини інтродуцентів роду *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини Lamiaceae Lindl. Встановлено якісний склад і кількісний вміст мінеральних елементів у надземній частині рослин. Аналіз здійснено методом мас-спектрометрії з індукційно-зв'язаною плазмою (ІЗП-МС). Із 20 елементів, що визначали, ідентифіковано 6 – макро-, 7 – мікро- і 4 ультрамікроелементи. Важкі метали Cd, Pb, Ni не виявлено. Домінують елементи K, P, Mg, Fe, Cu.

Ключові слова: *Isodon*, елементний склад, мас-спектрометрія.

Вступ

Невід'ємною ланкою комплексних інтродукційних досліджень будь-якого виду рослин є біохімічна оцінка сировини, зокрема визначення мінерального складу. Кількісний і якісний мінеральний склад визначає потенційну цінність сировини конкретного виду рослин та її екологічну безпечність. Адже для забезпечення нормального функціонування систем живого організму елементи є незамінною складовою. Попри мінімізований вміст їх вплив на перебіг процесів і забезпечення життєдіяльності організму загалом є колосальним.

Нині в рослинах виявлено 71 хімічний елемент. Наявність того чи того елемента забезпечує нормальний розвиток рослини, зокрема,

С підтримує рівень окисно-відновного потенціалу клітини, входить до складу амінокислот, Na є активатором транспортних систем клітини рослини, K – активує понад 60 ферментів, сприяє гідратації протоплазми, відіграє роль у транспортуванні іонів, водному обміні і осморегуляції, Fe бере участь у функціонуванні основних редокс-систем фотосинтезу та дихання, входить до складу цитохромів, каталази, металоціанінових комплексів, Mg – є складовою хлорофілу, впливає на включення дезоксирибонуклеотидів у молекулу ДНК, тощо [1; 2].

Для людини, як споживача рослинної сировини, величезне значення має здатність рослин накопичувати окремі елементи, а також можливість їхнього кількісного переходу безпосередньо до

продукту. Для переважної більшості рослин властиве накопичення не окремих елементів, а групами по 5–10. Встановлено, що перехід елементів із рослинної сировини у водні форми – відвари або настої – складає 8–28 %. При цьому має значення ступінь подрібнення сировини та властивості самих елементів. Саме тому вважають, що доцільніше використання лікарських форм у вигляді порошоків із рослин. На сьогодні вони дуже поширені як БАДи, рідше – як зареєстровані лікарські препарати. Підраховано, що в номенклатурі лікарських препаратів понад 40 % становлять препарати, виготовлені на основі рослинної сировини. Серед препаратів відхаркувальної і муколітичної дії, для лікування серцево-судинних захворювань, печінки, шлунково-кишкового тракту цей показник сягає 70–80 % [2].

В організмі людини елементи беруть участь в окисно-відновних процесах, у передаванні нервово-м'язових збуджень, позитивно впливають на імуногенез тощо. З медичного погляду більшість елементів є важливими складовими фармакологічно активних фітохімічних комплексів, якими є вітаміни, флавоноїди та ін. Такі елементи, як Cu, Fe, Mg, Zn, Mn, здатні утворювати комплекси з речовинами органічної природи. Входять до складу або ж активують до 300 ферментів [3]. Наприклад, Mg вважають найважливішим мінералом для зняття стресу, P – забезпечує роботу головного мозку, скелетних і серцевого м'язу, поєднання Na і K є важливим для підтримки збалансованої кислотно-лужної рівноваги і осмотичного тиску рідини організму, Cr виявляє антиоксидантну дію у хворих на діабет за другим типом, особливо у поєднанні з Zn і Cu [4; 5]. Проте існує інша група елементів – так звані важкі метали, які, потрапляючи до організму, здатні залишатися і накопичуватися, а досягнувши певної концентрації – чинити згубний вплив, викликаючи отруєння і мутації [6].

Концентрація мінеральних елементів у рослинній сировині, згідно з літературними даними, має переважно такі діапазони значень (мг/кг): Fe 40 – 220, Mn 25 – 56, Al 100 – 400, Mg 90 – 400, Cu 14 – 64, Zn 15 – 35, Ni 0,3 – 4, Cr 0,5 – 4,5, Co 0,0065 – 0,01 [7].

Допустимий вміст елементів у лікарській сировині згідно з вимогами МОЗ становить для Zn – 30 мг/кг, Cr – 1,5, Cu – 10, Ni – 1,5, Mn – 200, Cd – 0,30, Pb – 10, As – 1,0 [8].

Зважаючи на вищевикладене, наші дослідження спрямовані на визначення мінерального складу та оцінку безпечності сировини рослин

роду *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини *Lamiaceae* Lindl. Роботу виконано у розрізі комплексних інтродукційних досліджень цього роду, який не належить до вітчизняного флористичного комплексу і практично відсутній у ботаничних колекціях наукових закладів України.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктами дослідження слугували рослини роду *Isodon* – *Isodon japonicus* (Burm.) H. Nara. та *I. japonicus* (N. Z. Burm) Nara var. *glaucocalyx* (Maxim.) H. W. Li, які інтродуковані у відділі нових культур Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп). Аналізували сировину рослин трирічного віку – облиствлену надземну частину, заготівлю якої проведено в 2014 році влітку (липень) у фазі максимального вегетативного розвитку та восени (вересень) під час цвітіння.

Якісний і кількісний склад мінеральних елементів у рослинній сировині визначали методом мас-спектрометрії з індукційно-зв'язаною плазмою (ІЗП – МС) на апараті ICAP 6000 Series ICP Spectrometr (Termo Scientific). Перевагою цього методу є те, що визначення елементів можливе як на найнижчому рівні концентрації, так і на високих рівнях, що забезпечує якість багатоелементного аналізу.

Підготовку проб абсолютно сухої сировини проводили шляхом їхньої гомогенізації, зважування з подальшим озоленням розчином азотної кислоти, після чого наважки переміщували до хімічної мікрохвильової печі. В ній під дією заданих параметрів тиску і температури відбувалося розкладання зразків. Отриманий екстракт вводили безпосередньо до мас-спектрометра і за допомогою концентричного розпилювача переводили в аерозоль з подальшим поданням до аргонної плазми, де проходила іонізація. Потім відбувалася сепарація іонів за мас-зарядним співвідношенням і вимірювання інтенсивності сигналів цих сепарованих іонів аналітів. Повторність дослідів – трикратна.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснено відповідно до методики Г. Н. Зайцева [9] з використанням програми Microsoft Excel 2010.

Результати та їх обговорення

Рід *Isodon* згідно з міжнародною науковою базою APG III налічує 107 видових і внутрішньовидових таксонів, які поширені переважно в тропічній і субтропічній Азії з центром різно-

маніття в Південно-Західному Китаї, та 2 види – в тропічній Африці.

Представники роду *Isodon* – маловідомі рослини в культурі. Сировину окремих видів здавна активно використовують у народній медицині країн Азії як протипухлинний, антибактеріальний, протиалергічний, протизапальний і антигельмінтний засіб. За історичною довідкою, *Isodon japonicus* було включено до Фармакопеї Японії (п'ята поправка) у 1944 р. як замітник тирличу (*Gentiana lutea*), імпорт якого на той час було призупинено [10].

На сьогодні центром вивчення представників роду *Isodon* є Корея, Китай, Японія та США, де окрім фундаментальних наукових досліджень розробляють на основі сировини та її похідних нові лікарські препарати, БАДи, косметологічні засоби, добавки для харчової промисловості тощо.

На вітчизняному ринку зрідка трапляється продукція зарубіжних виробників, виготовлена із використанням сировини *Isodon*. Зокрема пропонують до вжитку з лікувально-профілактичною метою сировину *Isodon japonicus* азійського по-

Таблиця 1. Іноземні вживані назви видів роду *Isodon* (Schrاد. ex Benth.) Spach

Назва латиницею	Фармацевтична назва китайською	Назва англійською
<i>Isodon japonicus</i>	Mao Ye Xiang Cha Cai	Japanese Rabdosia
<i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	Dao Gen Ye Su, Lan E Xiang Cha Cai, Xiang Cha Cai	Blue-flowered Japanese Isodon, Japanese Isodon

ходження під різноманітними власними назвами (табл. 1) [11; 12].

Відомостей про мінеральний склад сировини *Isodon*, які зростають у природних умовах чи культурі, в доступних інформаційних джерелах немає. Згідно з результатами наших досліджень, при зростанні в умовах Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України сировина інтродукованих *Isodon japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* містить якісний склад хімічних елементів у достатньо високій концентрації (табл. 2).

Таблиця 2. Якісний та кількісний мінеральний склад сировини інтродуцентів роду видів роду *Isodon* (Schrاد. ex Benth.) Spach

Мінеральні елементи			<i>Isodon japonicus</i>	<i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	
			фаза розвитку рослин		
			вегетативний ріст	вегетативний ріст	цвітіння
Група	макроелементи	Ca	7418,33 ± 53,25	8247,33 ± 2,03	7019,67 ± 36,34
		K	26635,67 ± 148,47	18716,67 ± 12,02	13736,67 ± 36,67
		Mg	1828,33 ± 11,72	2310,33 ± 36,49	1911,0 ± 44,09
		Na	142,73 ± 2,86	133,27 ± 1,26	151,17 ± 0,58
		P	3033,67 ± 19,89	2282,33 ± 14,24	2324,67 ± 14,31
		S	1264,33 ± 17,32	1459,33 ± 7,22	1255,33 ± 21,49
	мікроелементи	Al	234,03 ± 0,95	254,93 ± 1,07	300,83 ± 7,07
		B	47,71 ± 0,35	47,6 ± 0,37	37,91 ± 0,47
		Cu	24,59 ± 0,14	20,29 ± 0,13	23,47 ± 0,06
		Fe	255,37 ± 2,01	248,17 ± 0,56	303,87 ± 7,1
		Mn	51,98 ± 0,26	49,67 ± 0,35	44,3 ± 0,23
		Sr	65,87 ± 0,05	72,21 ± 0,58	65,68 ± 0,58
		Zn	58,16 ± 0,61	61,55 ± 0,51	62,41 ± 0,62
		Pb	0	0	0
	Cd	0	0	0	
	ультрамикроелементи	Ba	2,29 ± 0,15	3,09 ± 0,01	0
		Cr	1,31 ± 0,0006	1,19 ± 0,0003	1,59 ± 0,01
		Ti	3,08 ± 0,04	4,29 ± 0,003	6,5 ± 0,003
		V	2,09 ± 0,11	2,49 ± 0,05	2,09 ± 0,01
Ni		0	0	0	

Встановлено, що ряд біологічного накопичення елементів у сировині рослин роду *Isodon* залежить від періоду заготівлі сировини і відповідно від фази розвитку.

На ритміку розвитку рослин (початок і тривалість фенологічних фаз) значний вплив мають кліматичні умови зростання. У 2014 р. упродовж вегетаційного сезону з березня по жовтень кількість опадів відповідала нормі, а температура повітря перевищила норму на 15,48 %, що склало в середньому на 1,99 °C/місяць. Найвищі відхилення від норми у бік збільшення мали місце в березні – 6,1 °C.

Isodon japonicus

$K > Ca > P > Mg > S > Fe > Al > Na > Sr > Zn > Mn > B > Cu > Ti > Ba > V > Cr$;

Isodon japonicus var. *glaucocalyx*

$Mg > K > Ca > P > S > Al > Fe > Na > Sr > Zn > Mn > B > Cu > Ti > Ba > V > Cr$

В умовах інтродукції різновид *Isodon japonicus* var. *glaucocalyx* переходить до генеративної фази розвитку восени (вересень–жовтень). Це в середньому на місяць пізніше порівняно із рослинами природних місць зростань. Характерною ознакою рослин у цей час є здерев'янілі знизу стебла

Визначено, що найбільша сировинна продуктивність рослин *Isodon japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* спостерігається під час розвитку бічних пагонів (кінець червня – липень) і максимального наростання надземної частини. Тобто доцільним періодом заготівлі сировини *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* є літні місяці, особливо липень, коли рослини досягають максимуму лінійних розмірів органів і добре облиствені.

У цей період під час вегетативного росту *Isodon japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* ряд біологічного накопичення елементів за максимальними концентраціями (у порядку зменшення) виглядає таким чином:

і нижчий ступінь облиственості. Як свідчать експериментальні дані, кількісний вміст елементів у сировині в цей період змінюється, а якісний – зменшується за рахунок відсутності елемента Ba. Відповідно змінюється і ряд біологічного накопичення елементів:

$K > Ca > P > Mg > S > Fe > Al > Na > Sr > Zn > Mn > B > Cu > Ti > V > Cr$

У межах виду та різновиду у сировині літнього терміну заготівлі відмічено більший вміст K, P у *Isodon japonicus* та Mg, Ca, S – у *I. japonicus* var. *glaucocalyx*. У цей період валовий вміст елементів складає у сировині *I. japonicus* 41069,54 мг/кг і дещо менший у *I. japonicus* var. *glaucocalyx* – 33914,74 мг/кг. Восени, під час генеративного розвитку рослин різновиду валовий вміст елементів становить 27247,16 мг/кг.

У сировині інтродуцентів різних строків заготівлі не виявлено мікроелементів – Cd, Pb та ультрамікроелементу – Ni. Це важкі метали, які здатні накопичуватися в рослинній сировині. Їх відсутність свідчить про екологічні умови зростання рослин та чистоту продукуюваної сировини, завдяки чому вона має перспективу використання у фармакології та у фітотерапії.

За підсумком результатів експерименту встановлено, що сировина інтродуцентів видів роду *Isodon* збагачена на K (13700 – 26930 мг/кг), P (2254 – 3056 мг/кг), Mg (1805 – 2383 мг/кг), Fe (248 – 304 мг/кг) та Cu (20 – 25 мг/кг).

Висновки

Згідно з результатами дослідження, інтродуковані в умовах Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп) рослини *Isodon japonicus* і *I. japonicus* var. *glaucocalyx* продукують якісну сировину, яка має достатньо різноманітний мінеральний склад. Із 20 елементів, що визначали, виявлено 6 – макро-, 7 – мікро- і 4 ультрамікроелементів. Важких металів Cd, Pb і Ni у цій рослинній сировині немає. Отже, сировина є екологічно чистою і безпечною, придатною до використання як джерело мінеральних елементів при вживанні цих рослин у вигляді порошків, настоїв, відварів з лікувально-профілактичною метою.

Автор висловлює глибоку подяку Малошук Олені Валеріївні, інженеру ЦККП «СЦЕА» при лабораторії біоіндикації і хемосистематики Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України, за технічну допомогу у виконанні експериментальної частини роботи.

Список літератури

1. Коровецька Г. Макроелементний склад рослин *Carex hirta* L. за дії нафтового забруднення ґрунту / Г. Коровецька, Н. Джура, О. Цвілінюк [та ін.] // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2009. – Вип. 50. – С. 182–188.
2. Ловкова М. Я. О возможности исследования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний / М. Я. Ловкова, Г. Н. Бузук, С. М. Соколова [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2005. – № 6 (4). – С. 3–10.
3. Попова Н. В. Элементный состав цинну та фламину / Н. В. Попова, Л. О. Бобрицька, М. А. Арапелян // Вісник фармації. – 2013. – № 3 (75). – С. 49–51.
4. Adazabra A. N. Compositional Elemental Assessment of Some Core Herbal Plants used in Northern Ghana by Instrumental Neutron Activation Analysis / A. N. Adazabra, Apori Ntifono, K. Appiah-Kubi // Der Pharma Chemica. – 2012. – Vol. 4 (5). – P. 1962–1968.
5. Макро- та мікроелементи (обмін, патологія та методи визначення) : монографія / М. В. Погорелов, В. І. Бумейстер, Г. Ф. Ткач [та ін.]. – Суми : Вид-во СумДУ, 2010. – 147 с.
6. Дубініна А. А. Визначення вмісту важких металів у виноградному вині «Кагор» вітчизняного виробництва [Електронний ресурс] / А. А. Дубініна, І. Ф. Овчиннікова, В. Д. Петрів. – Режим доступу: www.irbis-nbuv.gov.ua. – Назва з екрана.
7. Масляная А. В. Сырьё лекарственных растений – источник микроэлементов / А. В. Масляная // Здоровье и образование в XXI веке, 2008. – Т. 10, № 1: матер. IX междунар. конгресса «Здоровье и образование в XXI веке».
8. Струсовская О. Г. Определение элементного состава некоторых лекарственных растений Соловецких островов / О. Г. Струсовская, О. В. Буяклинская // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 1 (8). – С. 2038–2040.
9. Зайцев Г. Н. Математический анализ биологических данных / Г. Н. Зайцев. – М. : Наука, 1991. – 184 с.
10. Травяной чай. База данных [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.hyakka-saen.co.jp. – Заглавие с экрана.
11. Traditional Chinese Medicine [Electronic resource] / From Iberis Amara to Ixora Chinensis. – Mode of access: www.wikibooks.org. – Title from the screen.
12. *Isodon* / [Electronic resource]. – Mode of access: www.yaosaodict.com. – Title from the screen.

S. Kovtun-Vodyanytska

MINERAL COMPOSITION OF THE SUBSTANCE OF THE PLANTS OF THE *ISODON* GENUS (*SCHRAD. EX BENTH.*) SPACH

Mineral composition of the substance of specific species of plants determines its potential value and environmental safety for humans. The elements are involved in almost all the processes of human life support.

*The qualitative and quantitative composition of mineral elements is determined in the aerial part of three-year old plants of the *Isodon* genus (*Schrad. ex Benth.*) Spach (*Lamiaceae*) – *I. japonicus* (Burm.) H. Hara. and *I. japonicus* (Burm. N.Z.) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) H. W. Li. These plants are introduced at M. M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine (Right-Bank Forest-Steppe). The experiment included the method of mass-spectrometry with inductive-connected plasma (ICP-MS) on the ICAP 6000 Series ICP Spectrometr (Termo Scientific) unit. The experiment was reproduced three times.*

It is established that the substance of these species contains qualitative composition of chemical elements in high concentrations. Of the 20 elements which were determined, 6 macro-, 7 micro- and 4 ultramicroelements were identified. Heavy metals Cd, Pb, Ni are not detected. This demonstrates the environmental safety of this substance.

*The highest total content of the elements in the substance of plants was studied during the vegetative development of the plants (July) in *I. japonicus* – 41069,54 mg/kg, and lowest in *I. japonicus* var. *glaucocalyx* – 27247,16 mg/kg during the generative development (September). The dominant elements in the substance is K (13700 – 26930 mg/kg), P (2254 – 3056 mg/kg), Mg (1805 – 2383 mg/kg), Fe (248 – 304 mg/kg) and Cu (20 – 25 mg/kg).*

*Our research has revealed that the substance of *I. japonicus* and *I. japonicus* var. *glaucocalyx* is suitable for use as a source of mineral elements through the use of these plants in the form of powders, infusions, decoctions, with therapeutic and preventive purposes.*

Keywords: *Isodon*, elemental analysis, mass-spectrometry.

Матеріал надійшов 11.03.2016